

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WALTER ANTÔNIO ROMAN JUNIOR

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO PARA AS ESPÉCIES MEDICINAIS
Alpinia zerumbet, Solidago chilensis E Eugenia uniflora



CURITIBA

2013

WALTER ANTÔNIO ROMAN JUNIOR

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO PARA AS ESPÉCIES MEDICINAIS

Alpinia zerumbet, Solidago chilensis E Eugenia uniflora

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia do Rocio Duarte

CURITIBA

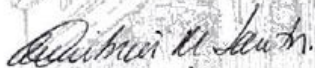
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

WALTER ANTÔNIO ROMAN JUNIOR

Título: **ESTUDO FARMACOGNÓSTICO PARA AS ESPÉCIES MEDICINAIS**
Alpinia zerumbet, Solidago chilensis e Eugenia uniflora.

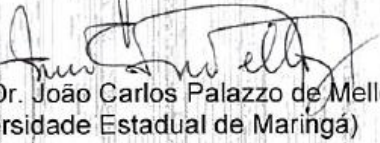
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



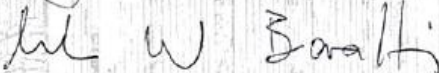
Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos
(Orientador)



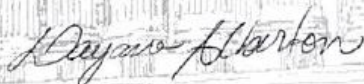
Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
(Universidade Federal do Paraná)



Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
(Universidade Estadual de Maringá)



Prof^a. Dr^a. Maique Weber Biavatti
(Universidade Federal de Santa Catarina)



Prof^a. Dr^a. Dayane Alberton
(Universidade Federal do Paraná)

Curitiba, 16 de julho de 2013.

NOTA BIOGRÁFICA

O autor graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina em 1996. Foi farmacêutico responsável na Farmácia Santa Tereza (Itá-SC) de 1996 a 2000 e nesse período, também realizou Pós-graduação *Lato Sensu* em Farmacotécnica Homeopática na Fundação de Estudos Médicos Homeopáticos do Paraná. Em 2001 foi contratado como professor na Universidade Regional Integrada (Campus Frederico Westphalen-RS) e na Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Chapecó-SC), na qual permanece até o momento. Em 2003 concluiu o mestrado em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Araraquara-SP). Em 2010 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Área de Concentração em Fármacos, Medicamentos e Correlatos, Linha de Pesquisa Produtos Naturais, nível doutorado, cujos resultados obtidos estão em parte publicados em:

Roman Junior WA, Piatto AL, Conterato GM, Wildner, SM, Marcon M, Santo G, Moreira, Mocelin R, Emanuelli T, Santos CAM. Psychopharmacological and antioxidant effects of hydroethanolic extract of *Alpinia zerumbet* leaves in mice. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phcggj.2013.05.003>. *Pharmacognosy Journal* 5(3): 113-118 (2013).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Walter e Maria Cecília, à minha esposa Fabiane e aos meus filhos Maria Isadora e Marco Aurélio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que pela sua infinita bondade, proporcionou o dom da vida e iluminou meu caminho.

Ao Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos pela orientação, amizade e constante apoio.

À Prof^a. Dra. Márcia do Rocio Duarte pela coorientação, acompanhamento e incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de concretizar este trabalho.

A Universidade Comunitária da Região de Chapecó por possibilitar a formação alcançada.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, coordenador do Centro e Estudos em Biofarmácia, e ao pesquisador João Gasparetto pelas análises em espectroscopia de massas.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná e à pesquisadora Angelita Neppel, que proporcionaram as análises em ressonância magnética nuclear.

À farmacêutica Maria da Graça Toledo, responsável pela Central Analítica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pela capacitação, dedicação e execução das análises em cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, em especial à Juliana de Lima Rodrigues pela amizade construída durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas pós-graduandos Cláudia Seidl, Kely Santos e Wesley Maurício de Souza pelo aprendizado e companhia nos momentos difíceis.

Aos professores do Núcleo de Fitoterápicos da Universidade Comunitária da Região de Chapecó Ângelo Luis Stapassoli Piato, Greyci Michelle Conteratto Marafiga e Silvana Muraro Wildner pela parceria e auxílio recebido.

Às técnicas de laboratório da Universidade Comunitária da Região de Chapecó Marieli Loeblein, Silvia Maria Ferreira, Adriana Grando, Tânia Muneron, Liliane Santos Wanderlei e Débora Leite, que não mediram esforços no desenvolvimento deste estudo.

Aos estudantes do Núcleo de Fitoterápicos da Universidade Comunitária da Região de Chapecó Gláucia Dal Santo, Matheus Marcon, Ricieri Mocelin e Suélen Moreira pelo companheirismo em todas as horas.

Aos amigos Gilberto Luis Dalle Laste e Gilberto Oss pela força, amparo e acolhida.

À minha mãe Maria Cecília. Ainda lembro-me da lição sobre destilação retirada de um livro muito antigo nos primeiros anos do colégio. Apresentei à professora e foi um sucesso na sala de aula. Depois foram os laboratórios caseiros e o incentivo ilimitado ao estudo e à pesquisa. Sem a sua presença constante, este trabalho não seria realizado.

Ao meu pai Walter (*in memoriam*), um simples caminhoneiro que me forneceu a formação mais preciosa, o caráter. Eterna saudade.

Às minhas irmãs Simone, Raquel, Fabíola e Lia, que não me deixaram perder a determinação.

A minha esposa Fabiane cujo amor e a confiança superaram a distância, ausência, insegurança e os medos. Foram dias difíceis. Minha cúmplice, razão do meu viver. Te amo.

Aos meus filhos Maria Isadora e Marco Aurélio. Amor incondicional. Motivo pelo qual continuo a me capacitar e sonhar com um mundo melhor.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

Nada no mundo pode substituir a persistência.
O talento não pode. Nada é mais comum que homens talentosos frustrados.
O gênio não pode: o gênio não recompensado é quase proverbial.
A educação não pode: o mundo está cheio de fracassados instruídos.
Apenas a persistência e a determinação são onipotentes.

Ralph W. Emerson

RESUMO

Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) são conhecidas popularmente como colônia, erva-lanceta e pitangueira, sendo utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades. Este trabalho teve por finalidade, realizar para estas espécies medicinais, análises de controle de qualidade, pesquisa fitoquímica e avaliação de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. Como resultados, observaram-se características morfoanatômicas para as amostras vegetais e para o material vegetal desidratado e extratos fluidos hidroalcoólicos foram realizados testes físico-químicos de controle de qualidade. Na pesquisa fitoquímica, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência foi possível identificar e quantificar a rutina em *A. zerumbet*, a quercetrina em *S. chilensis* e a quercetina em *E. uniflora*. Obteve-se o isolamento químico de di-hidro-5,6-de-hidrocaína (DDK), 5,6-de-hidrocaína (DK) e 3,4',5,7-tetrahidroxiflavona (canferol) em *A. zerumbet* e de quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercetrina) em *S. chilensis*. Os resultados mais significativos nos testes antimicrobianos foram observados para os extratos de *S. chilensis* frente à micro-organismos Gram positivos, Gram negativos e fungos. Na avaliação da atividade hipolipidêmica para os ratos alimentados com dieta hipercalórica e tratados com extratos fluidos de *S. chilensis* (150, 300 e 600 mg/kg), quercetrina (10 mg/kg), *A. zerumbet* (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) observaram-se redução nas taxas de colesterol total (-19,9, -27,5, -31,0, -39,4, -39,7 e -34,2%), LDL-colesterol (-36,0, -37,5, -43,3, -59,4, -55,4 e -44,2%) e triacilglicerídeos (-23,5, -29,8, -27,2, -32,5 e -32,4%, respectivamente). Os mecanismos de ação propostos para justificar estes efeitos biológicos foram a inibição da atividade da enzima HMGCoA redutase e a diminuição da reabsorção ou aumento da excreção colesterol via fezes. Na quantificação de marcadores para aterosclerose, as substâncias testadas reduziram os valores das interleucinas (IL-1 e IL-6), do fator de necrose tumoral (TNF α), do interferon gama (INF γ), da proteína C reativa (PCR) e da LDL-oxidada. Também se verificou a elevação dos valores de IL-10 e anti LDL-oxidada. Os resultados obtidos apontam para proteção biológica realizada pelos compostos polifenólicos frente aos processos hipolipidêmico e de aterosclerose. Os extratos de *A. zerumbet* (200, 400 e 800 mg/kg) demonstraram efeitos ansiolítico e antidepressivo nos testes de atividade exploratória (campo aberto), caixa claro-escuro e teste de suspensão de cauda comparados com os grupos controle, diazepam e imipramina. O mecanismo de ação envolvido não está definido, mas parece envolver a atividade das cavapironas sobre os receptores GABA e monoaminérgicos. Os resultados deste trabalho são considerados importantes para a pesquisa de plantas medicinais e contribuem para a prospecção de novos medicamentos.

Palavras-chave: atividade hipolipidêmica, flavonoides, de-hidrocaína, quercetrina, LDL-colesterol.

ABSTRACT

Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) and *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) are popularly known as “colônia”, “pitangueira” and “erva-lanceta” and are widely used in traditional medicine to treat various diseases. This work aims to analyze the control of quality, to perform a phytochemical research, and also to evaluate the biological activity *in vitro* and *in vivo* for both species. The results showed morphoanatomic characteristics observed for the samples and dehydrated material and hydroalcoholic extracts fluid tests were physico-chemical quality control. Phytochemical researches by high performance liquid chromatography identified and quantified rutin in *A. zerumbet*, quercetrin in *S. chilensis* and quercetin in *E. uniflora*. We also chemically isolated diidro-5,6-dehidrokavain (DDK), 5,6-dehidrokavain (DK) and 3,4',5,7-tetrahidroxyflavone (kaempferol) in *A. zerumbet* and quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (quercetrin) in *S. chilensis*. The most statistically significant results in antimicrobial tests were observed for antimicrobial extracts of *S. chilensis* against the Gram positive and Gram negative microorganisms and fungi. Hypolipidemic activity for rats fed high calorie diet and treated with fluid extracts of *S. chilensis* (150, 300 and 600 mg/kg), quercetrin (10 mg/kg), *A. zerumbet* (300 mg/kg) and simvastatin (4 mg/kg) demonstrated a significant reduction in total cholesterol (-19.9, -27.5, -31.0, -39.4, and -39.7 and -34.2%), LDL-cholesterol (-36.0, -37.5, -43.3, -59.4, -55.4 and -44.2%) and triacylglycerols (-23.5, -29.8, -27.2, -32.5 and -32.4%, respectively). The mechanisms of action proposed to justify these biological effects were the inhibition on HMGCoA reductase activity and decreased reabsorption or increased cholesterol excretion through the feces. In the quantification of markers for atherosclerosis, the substances tested reduced the values of interleukins (IL-1 and IL-6), tumor necrosis factor (TNF α), interferon-gamma (INF γ), C-reactive protein (CRP) and oxidized LDL. Besides, an increase in the amounts of IL-10 and anti-oxidized LDL were also detected. The results suggest that polyphenolic compounds may exert biological protection against hypolipidemic processes and atherosclerosis. The extracts of *A. zerumbet* (200, 400 and 800 mg/kg) showed anxiolytic and antidepressant effects in the open field, light-dark box and tail suspension test compared with the control group, diazepam and imipramine. The mechanism of action is not clearly defined, but appears to involve the activity of kawapirones on GABA and monoamine receptors. In conclusion, the data of this study are important for the research of medicinal plants and also to contribute for prospecting new potential drugs.

Keywords: hypolipidemic activity, flavonoids, dehidrokavain, quercetrin, LDL-cholesterol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fontes de novos fármacos.....	28
Figura 2.	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): aspectos gerais no habitat.....	34
Figura 3.	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): características do material vegetal desidratado.....	35
Figura 4.	<i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae): aspectos gerais no habitat.....	40
Figura 5.	<i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae): inflorescência e material vegetal desidratado.....	41
Figura 6.	<i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae): aspectos gerais e material vegetal desidratado.....	44
Figura 7.	Constituintes das lipoproteínas.....	49
Figura 8.	Transporte de lipídeos aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas.....	52
Figura 9.	Captação e a regulação exógena do colesterol.....	53
Figura 10.	Representação esquemática da hipótese oxidativa e do papel das LDL-oxidadas no processo de aterogênese.....	57
Figura 11.	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): aspecto geral das partes aéreas vegetativas e das folhas faces adaxial e abaxial.....	89
Figura 12.	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): secção transversal do limbo.....	90
Figura 13.	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): secção transversal da região central.....	91
Figura 14.	<i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae), aspecto geral das partes aéreas vegetativas e das folhas faces adaxial e abaxial.....	94
Figura 15.	<i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae): secção transversal do limbo.....	95

Figura 16.	<i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae): secção transversal do caule.....	96
Figura 17.	<i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae): vista do ramo apical e. secção transversal da folha.....	99
Figura 18.	<i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae): secção transversal da nervura central.....	100
Figura 19.	Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae) (partes aéreas).....	110
Figura 20.	Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas). Eluente: AcOEt:HCO ₂ H:AcOH:H ₂ O (100:11:11:27 v/v) e revelação com difenilboriloxidietilamina a 1% em MeOH (m/v) com consequente observação em 366 nm.....	110
Figura 21.	Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas) Eluente: AcOEt:HCO ₂ H:H ₂ O (90:5:5 v/v) e revelação com anisalaldeído (1% v/v) seguido de aquecimento em estufa a 100 °C por 5 min.....	111
Figura 22.	Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) (folhas).....	111
Figura 23.	Curva analítica para o padrão ácido gálico (2,5 a 50 µg/mL em MeOH) utilizando método de Folin–Ciocalteu e absorvância após 2 h em 750 nm (n=3).....	115
Figura 24.	Curva analítica do padrão rutina (12,5 a 200 µg/mL em MeOH) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)...	117
Figura 25.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para fração acetato de etila das folhas de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (10 mg/mL em MEOH).....	118
Figura 26.	Curva analítica do padrão quercetrina (12,5 a 450 µg/mL em MeOH) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	120

Figura 27.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para padrão quercetrina (200 µg/mL em MeOH).....	120
Figura 28.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para extrato fluido de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae) (1 mg/mL em MeOH).....	121
Figura 29.	Curva analítica para o padrão quercetina (3,12 a 50 µg/mL em MeOH) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	123
Figura 30.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para fração acetato de etila das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) (10 mg/mL em MeOH).....	124
Figura 31.	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) para di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK).....	126
Figura 32.	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK).....	127
Figura 33.	Espectro de varredura (EM-ESI) para di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK) obtido por infusão direta.....	128
Figura 34.	Espectro de massa/massa (ESI) para di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK) obtido por infusão direta.....	128
Figura 35.	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) para 5,6-de-hidrocavaína (DK).....	129
Figura 36.	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para 5,6-de-hidrocavaína (DK).....	130
Figura 37.	Espectro de varredura (EM-ESI) para 5,6-de-hidrocavaína (DK) obtido por infusão direta.....	131
Figura 38.	Espectro de massa/massa (ESI) para 5,6-de-hidrocavaína (DK) obtido por infusão direta.....	131
Figura 39.	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) para o canferol.....	133
Figura 40.	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para o canferol.....	133
Figura 41.	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) para quercetrina.....	136
Figura 42.	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para	

	quercetrina.....	136
Figura 43.	Espectro de varredura (EM-ESI) para quercetrina obtido por infusão direta.....	138
Figura 44.	Espectro de massa/massa (ESI) para quercetrina obtido por infusão direta.....	139
Figura 45.	Concentração dos padrões quercetina, rutina e dos extratos fluidos de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) (folhas) e <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) (1,25–150 µg/mL) com as respectivas atividades antioxidantes (%)......	143
Figura 46.	Efeitos dos tratamentos nos valores de colesterol total.....	146
Figura 47.	Efeitos dos tratamentos nos valores de LDL-colesterol.....	147
Figura 48.	Efeitos dos tratamentos nos valores de triacilglicerídeos.....	148
Figura 49.	Efeitos dos tratamentos na atividade da enzima HMGCoA redutase.....	149
Figura 50.	Efeitos dos tratamentos no colesterol fecal.....	150
Figura 51.	Efeitos dos tratamentos nos valores de IL-1.....	151
Figura 52.	Efeitos dos tratamentos nos valores de IL-6.....	151
Figura 53.	Efeitos dos tratamentos nos valores de TNF α	152
Figura 54.	Efeitos dos tratamentos nos valores de INF γ	153
Figura 55.	Efeitos dos tratamentos nos valores de IL-10.....	153
Figura 56.	Efeitos dos tratamentos nos valores de PCR.....	154
Figura 57.	Efeitos dos tratamentos nos valores de LDL-oxidada.....	155
Figura 58.	Efeitos dos tratamentos nos valores de anti LDL-oxidada.....	155
Figura 59.	Efeitos dos tratamentos no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao campo aberto (<i>open field</i>).....	162
Figura 60.	Efeitos dos tratamentos no número de cruzamentos dos camundongos submetidos ao campo aberto (<i>open field</i>).....	162
Figura 61.	Efeitos dos tratamentos no comportamento de autolimpeza dos camundongos submetidos ao campo aberto (<i>open field</i>)	163
Figura 62.	Respostas de orientação dos camundongos submetidos ao	

	campo aberto (<i>open field</i>).....	164
Figura 63.	Número de bolos fecais nos camundongos submetidos ao campo aberto (<i>open field</i>).....	164
Figura 64.	Tempo de latência (s) para os camundongos submetidos a caixa claro-escuro (<i>Light/dark box</i>).....	165
Figura 65.	Tempo de permanência no lado claro para os camundongos submetidos a caixa claro-escuro (<i>Light/dark box</i>).....	166
Figura 66.	Número de cruzamentos para os camundongos submetidos a caixa claro-escuro (<i>Light/dark box</i>).....	166
Figura 67.	Tempo de imobilidade para os camundongos submetidos à suspensão pela cauda (<i>tail suspension</i>).....	167

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Determinação de água para as amostras de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) por meio de método gravimétrico (n=8)..... 103
- Tabela 2.** Determinação dos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido para as amostras de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas)..... 105
- Tabela 3.** Características organolépticas para extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas)..... 106
- Tabela 4.** Teores de resíduo seco para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas)..... 106
- Tabela 5.** Valores do pH para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas)..... 107
- Tabela 6.** Densidade relativa para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas)..... 108
- Tabela 7.** Densidade de massa para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas)..... 108
- Tabela 8.** Resultados da análise fitoquímica preliminar para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen

	(Asteraceae) (partes aéreas) e <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) (folhas).....	109
Tabela 9.	Concentrações de flavonoides representados por quercetina quantificados por espectrometria de UV/Vis nas diferentes amostras de folhas de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) e <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae)...	112
Tabela 10.	Teores de flavonoides representados por hiperosídeo nas diferentes amostras das partes aéreas de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae), quantificados por espectrometria de UV/Vis.....	114
Tabela 11.	Concentração de flavonoides representados por hiperosídeo nas diferentes partes da planta para amostra SC1 de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae), quantificados por espectrometria de UV/VIS.....	114
Tabela 12.	Conteúdo de fenóis totais (FT) representados por equivalentes de ácido gálico (EAG) para os extratos fluidos de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), <i>Solidago chilensis</i> Meyen, (Asteraceae) (partes aéreas) e <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) (folhas).....	116
Tabela 13.	Concentração de rutina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas frações acetato de etila, extrato fluido e nas folhas secas de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae).....	119
Tabela 14.	Concentração de quercetrina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nos extratos fluidos e planta seca de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae).....	122
Tabela 15.	Concentração de quercetina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na fração acetato de etila, extrato fluido e planta seca de <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae).....	125
Tabela 16.	Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) e RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para di-hidro-5,6-dehidrocavaína (DDK).....	127
Tabela 17.	Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD)	

	e RMN de ¹³ C (100 MHz; CDCl ₃) para 5,6-de-hidrocavaína (DK).....	130
Tabela 18.	Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) e RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para o canferol.....	134
Tabela 19.	Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H (400 MHz; CD ₃ OD) e RMN de ¹³ C (100 MHz; CD ₃ OD) para quercetrina.....	137
Tabela 20.	Avaliação da atividade antimicrobiana para os extratos fluidos das folhas de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) e <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) e partes aéreas de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae).....	142
Tabela 21.	Atividades antioxidantes para os padrões e extratos fluidos de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) (folhas) e <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) (1,25 - 150 µg/mL).....	144
Tabela 22.	Peso corporal e pesos dos fígados dos animais submetidos à avaliação de atividade hipolipidêmica.....	145
Tabela 23.	Efeitos dos grupos experimentais nos valores do índice aterogênico, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e alanina aminotransferase (ALT).....	148

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1.	Pesquisa farmacêutica para obtenção novos fármacos..	29
Fluxograma 2.	Via metabólica para sínteses de colesterol e ácidos biliares.....	54
Fluxograma 3.	Análises de pureza para as amostras vegetais.....	66
Fluxograma 4.	Preparação dos extratos e determinação de parâmetros de qualidade.....	66
Fluxograma 5.	Análises fitoquímicas.....	67
Fluxograma 6.	Ensaio biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação das dislipidemias.....	55
Quadro 2.	Locais e épocas das coletas para os materiais vegetais.....	64
Quadro 3.	Modelo experimental hipolipidêmico: tratamentos com administração oral intragátrica por 30 dias.....	82

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Fracionamento da fração acetato de etila de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) e obtenção de subfrações.....	75
Esquema 2.	Fracionamento da fração acetato de etila de <i>Solidago chilensis</i> Meyen (Asteraceae) e obtenção de subfrações....	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	absorvância
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
ALT	alamina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZ	<i>Alpinia zerumbet</i>
CCD	cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CE ₅₀	concentração efetiva média
CHCl ₃	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	coeficiente de variação
DCM	diclorometano
DDK	di-hidro-5,6-de-hidrocavaína
DK	5,6-de-hidrocavaína
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DZP	diazepan
EM	espectrometria de massas
EU	<i>Eugenia uniflora</i>
FB 5	Farmacopeia Brasileira, 5ª edição
FAE	fração acetato de etila
FAFSA	fração acetato de etila submetida a extração por fase sólida de <i>Alpinia zerumbet</i>
FAFSE	fração acetato de etila submetida a extração por fase sólida de <i>Eugenia uniflora</i>
FC	folhas e caules
HCO ₂ H	ácido fórmico

HDL	lipoproteína de alta densidade
HMGC _o A	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A
IL	interleucina
IMI	imipramina
INF	Inflorescências
LDL	lipoproteína de baixa densidade
m/v	massa – volume
<i>m/z</i>	relação massa/carga
MeOD	metanol deuterado
MeOH	metanol
MHz	megahertz
mL	mililitro
[M+H] ⁺	massa molecular mais um hidrogênio
[M+H] ⁻	massa molecular menos um hidrogênio
N	normal
n	número de amostras
<i>n</i> -BuOH	butanol
nm	nanômetro
p	peso
PA	partes aéreas
pH	potencial hidrogeniônico
PNPIC	Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
QRT	quercetrina
<i>R_f</i>	fator de retenção
RMN- ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
s	segundo

SC	<i>Solidago chilensis</i>
SINV	sinvastatina
SUS	Sistema Único de Saúde
TMS	tetrametilsilano
UV/Vis	ultravioleta – visível
VLDL	lipoproteína de muito alta densidade
v	volume
μL	microlitro
μm	micrômetro
°C	grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Objetivos.....	25
1.1.1 Objetivo geral.....	25
1.1.2 Objetivos específicos.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Plantas medicinais como fonte de substâncias bioativas.....	26
2.2 A importância dos produtos naturais na obtenção de novos medicamentos.....	27
2.3 Fitoterapia no Sistema Único de Saúde	30
2.4 Aspectos gerais de <i>Alpinia zerumbet</i>	32
2.4.1 Constituintes químicos.....	34
2.4.2 Atividades farmacológicas.....	37
2.5 Aspectos gerais de <i>Solidago chilensis</i>	38
2.5.1 Constituintes químicos.....	41
2.5.2 Atividades farmacológicas.....	42
2.6 Aspectos gerais da <i>Eugenia uniflora</i>	42
2.6.1 Constituintes químicos.....	44
2.6.2 Atividades farmacológicas.....	45
2.7 Parâmetros de qualidade e pesquisa fitoquímica.....	45
2.8 Extratos de plantas medicinais frente às atividades biológicas hipolipidêmica, ansiolítica, antidepressiva, antioxidante e antimicrobiana..	46
2.8.1 Atividade hipolipêmica.....	46
2.8.2 Transtornos da ansiedade e do humor.....	59
2.8.3 Atividade antioxidante.....	61
2.8.4 Atividade antimicrobiana.....	61
3 MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1 Material, equipamentos e solventes.....	63
3.2 Desenvolvimento dos métodos.....	64
3.2.1 Coleta dos materiais vegetais e preparação de exsiccatas.....	64
3.2.2 Estudo morfoanatômico.....	65
3.2.3 Preparo dos materiais vegetais para análises químicas e farmacológicas.....	65
3.2.4 Análises de pureza para amostras vegetais.....	67
3.2.5 Preparação e determinação de parâmetros de qualidade para os extratos vegetais.....	68
3.2.6 Análises fitoquímicas.....	69
3.2.7 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	78
3.2.8. Análises estatísticas.....	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 Caracterização morfoanatômica.....	87
4.2 Parâmetros de pureza para as amostras vegetais.....	100
4.3 Parâmetros de qualidade para os extratos fluidos.....	104
4.4 Caracterização fitoquímica.....	107
4.6 Avaliação das atividades biológicas.....	139
5. CONCLUSÕES	169
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
7. ANEXOS	187

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais como fonte de medicamentos para o tratamento de enfermidades remonta à idade antiga (Hostettmann *et al.*, 2008). Certamente a terapêutica moderna, composta por um grande número de produtos medicamentosos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados de plantas superiores. São inúmeros os exemplos de fármacos que foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de moléculas bioativas, incluindo entre outros a morfina, pilocarpina, atropina e escopolamina (Calixto, 2001; Viegas & Bolzani, 2006; Nicolaou *et al.*, 2009).

Na atualidade, o mercado de produtos fitoterápicos apresenta um notável crescimento e muitos fatores têm contribuído para o aumento da pesquisa na obtenção de novos medicamentos dentre eles, o desenvolvimento de métodos analíticos de alta tecnologia, que possibilitam estabelecer perfis químicos e isolar componentes de extratos e a suplementação de ensaios farmacológicos e toxicológicos *in vitro* e *in vivo* (Wagner, 2007; Barnes *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o governo federal aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Essas iniciativas objetivam resgatar o saber popular, valorizar a biodiversidade e propor uma terapêutica complementar no Sistema Único de Saúde (SUS) (Santos *et al.*, 2011).

No entanto, a garantia do uso seguro e eficaz de fitomedicamentos pelo SUS envolve inúmeras etapas tecnológicas indispensáveis para alcançar um padrão de qualidade necessário para uma formulação medicamentosa. Entre elas, se destacam as análises fitoquímicas, de controle de qualidade, bem como ensaios pré-clínicos e clínicos (Moreira *et al.*, 2010).

Esses dados justificam o fato de que apesar dos recentes avanços nas políticas públicas e dos marcos regulatórios na área de plantas medicinais e fitoterápicos somados aos esforços do trabalho desenvolvido por diversos grupos de pesquisa que atuam nas diferentes áreas do conhecimento, o

desenvolvimento de extratos e medicamentos oriundos de plantas brasileiras continua em ritmo extremamente lento (Guilhermino *et al.*, 2010).

Com o intuito de impulsionar pesquisas nesse setor, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que contém 71 espécies cujos estudos químicos e biológicos devem ser estimulados (Panizza, 2010). Nessa relação constam, *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm., *Solidago chilensis* Meyen e *Eugenia uniflora* L. plantas com ampla distribuição em nosso país e utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias (Lorenzi & Matos, 2002).

Desta forma, este trabalho visou o desenvolvimento de parâmetros de qualidade para as matérias-primas vegetais e extratos bem como, a investigação fitoquímica e avaliação de efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* de *A. zerumbet*, *S. chilensis* e *E. uniflora*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Realizar estudos farmacognósticos para *A. zerumbet*, *S. chilensis* e *E. uniflora*, colaborando dessa maneira para a pesquisa de plantas medicinais e a ciência dos produtos naturais.

1.1.2 Específicos

- Realizar coleta dos materiais vegetais em diferentes locais e datas, estudar a morfoanatomia e estabelecer parâmetros de controle de qualidade para o material desidratado e os extratos obtidos;
- Identificar, quantificar e isolar os principais constituintes químicos das espécies medicinais por meio de métodos espectrofotométricos, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida em coluna;
- Avaliar as atividades dos extratos fluidos nos modelos biológicos antioxidante, antimicrobiano, hipolipidêmico, antiaterogênico, ansiolítico e antidepressivo.
- Propor mecanismos de ação para os efeitos biológicos alcançados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais como fonte de substâncias bioativas

Desde a era primitiva, o homem busca na natureza recursos que melhorem sua condição de vida. Assim, a utilização de plantas medicinais faz parte da história da humanidade, tendo grande importância tanto no que se refere aos aspectos medicinais, como culturais (Rezende & Cocco, 2002; Alonso, 2006; Cravotto *et al.*, 2010).

Na idade antiga, percebe-se a utilização de plantas bioativas na medicina ayurvédica e tradicional chinesa. No mundo ocidental, os gregos representados por Hipócrates (460-377 a.C), Aristóteles (384-322 a.C), Teofrasto (372-286 a.C), Dioscórides (90-40 a.C) e Galeno (129-200 d.C) contribuíram significativamente para o arsenal de conhecimentos sobre as propriedades das plantas medicinais e o pensamento no campo da saúde. Dioscórides, o primeiro médico-botânico, é também considerado o pai da Farmacognosia (ciência que estuda os produtos naturais biologicamente ativos) (Leite, 2009).

O estudo das plantas medicinais, como em outras áreas do conhecimento, teve uma grande estagnação na Idade Média (séculos V a XIV), que entre outros fatores pode ser justificada pelas inúmeras guerras ocorridas, entre as quais a queda do império romano e o fortalecimento da igreja católica. Desse modo, muitas literaturas perderam-se e as ciências ficaram restritas a alguns mosteiros da Europa. Nessa época pode-se destacar a contribuição dos alquimistas e Avicena (980-1037) (Lorenzi & Matos, 2002).

No renascimento (séculos XV e XVI), ocorreu uma renovação do interesse pela cultura clássica, num movimento crescente que foi das letras e das artes à ciência e à tecnologia. Nesse período, surgem também as ideias inovadoras de Paracelso (1493-1541 d.C), que mistura moléculas orgânicas e inorgânicas (ferro, antimônio, mercúrio) para o tratamento de patologias (Almeida, 1993; Rezende & Cocco, 2002).

No século XVIII com o desenvolvimento das primeiras técnicas fitoquímicas de isolamento, várias plantas utilizadas até então de forma bruta foram alvos de pesquisa visando à obtenção de substâncias puras. Essa mudança de enfoque, passando a se atentar menos para as plantas e os

extratos brutos e mais para seus constituintes químicos, influenciou diretamente a história da cura nos anos subsequentes (Leite, 2009).

2.2 A importância dos produtos naturais na obtenção de novos medicamentos

Para Yunes & Calixto (2001) é possível estabelecer algumas hipóteses sobre o motivo pelo qual os produtos naturais continuam sendo uma fonte de protótipos e de possíveis fármacos e medicamentos:

- Grande parte de importantes fármacos é oriunda de produtos naturais ou foram obtidos considerando um produto natural como protótipo;
- Para a maioria dos fármacos desenvolvidos por via sintética existem produtos naturais com o mesmo modo de ação já identificados;
- Existem muitos alvos moleculares relacionados a problemas patológicos, para os quais os produtos naturais podem ser considerados protótipos, possuindo um bom efeito, ainda que não tenham sido desenvolvidos os fármacos correspondentes;
- A quase infinita diversidade de estruturas que podem ser determinadas, uma vez que a natureza é pródiga em fornecer moléculas de complexidade estruturais dificilmente imaginadas ou elaboradas por meio de síntese;
- O sinergismo, importante efeito observado nos extratos de plantas medicinais, pode ser um modelo aplicado à química medicinal moderna.

Hostettmann *et al.* (2008) e Nicolaou *et al.* (2009) destacam que na atualidade apesar do incrível desenvolvimento na síntese de fármacos e da fermentação microbiana, os fármacos obtidos de plantas continuam em posição de destaque. Conforme Newman *et al.* (2003) e Cragg & Newman (2013), é surpreendente notar que os produtos naturais estão implicados no desenvolvimento de 52% de todos os novos medicamentos (Figura 1).

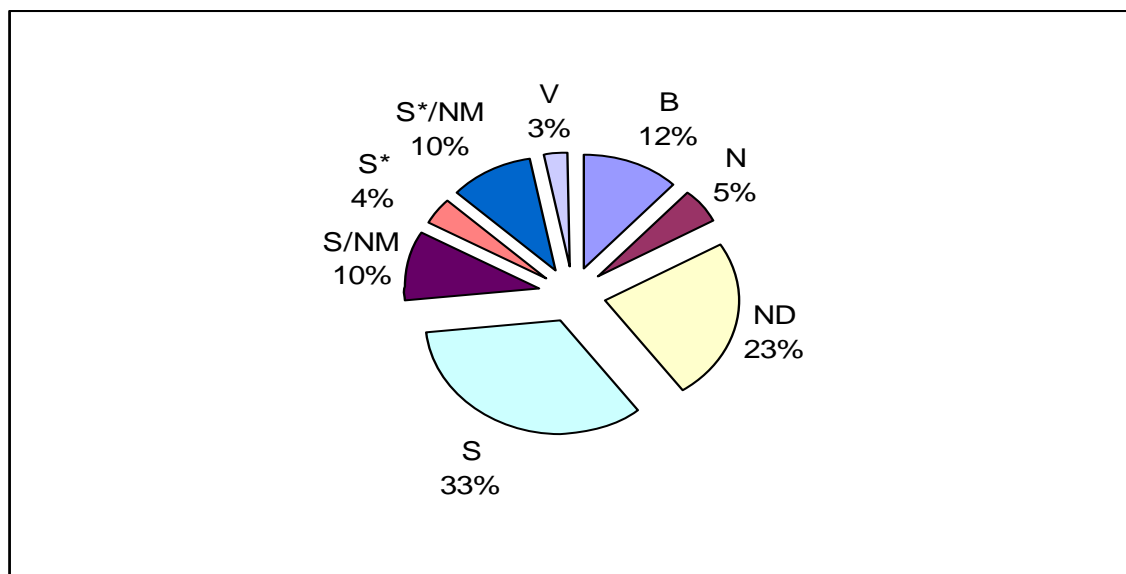
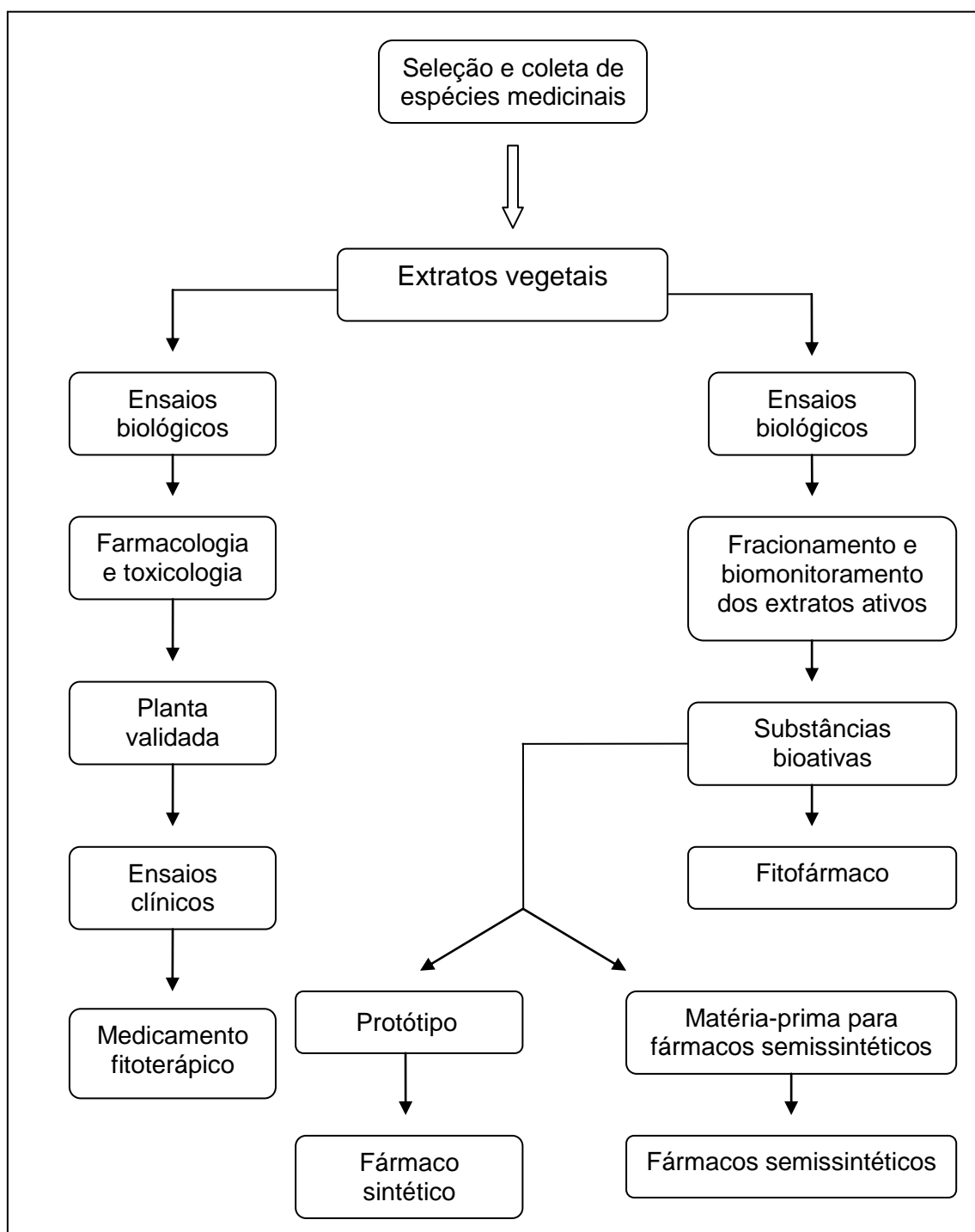


Figura 1. Fontes de novos fármacos. B = biológico (peptídeo, proteínas obtidas por biotecnologia); N = produto natural; ND = derivado de produto natural; S = fármaco de síntese total; S* = síntese total porém, com farmacóforo de um produto natural; NM = imitador de produto natural; V = vacina.
Fonte: adaptado de Cragg & Newman (2013).

Percebe-se a partir desse panorama que o desenvolvimento de novos produtos medicamentosos, oriundos de moléculas naturais, é uma atividade de caráter multidisciplinar, envolvendo setores da academia, de parcerias público-privadas, como também de indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais (Leite, 2009; Cordell & Colvard, 2012).

Do ponto de vista tecnológico, a busca de novos fármacos à base de plantas é um processo interativo de descoberta de protótipos moleculares obtidos do fracionamento biomonitorado, seguido de melhoramento dos protótipos e pelo planejamento e síntese de análogos objetivando incrementar as atividades farmacológicas, diminuindo a toxicidade (Barreiro, 2000; Bolzani *et al.*, 2012).

Outra possibilidade são as pesquisas direcionadas com o objetivo de avaliar a eficácia terapêutica e a segurança de plantas medicinais de uso tradicional que, quando validadas, podem vir a constituir os medicamentos fitoterápicos (Calixto, 2000) (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Pesquisa farmacêutica para obtenção novos fármacos.

Fonte: adaptado de Calixto (2000).

Nesse contexto, é notório o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. Como exemplo, dezessete das maiores indústrias farmacêuticas do mundo possuem programas na área de produtos naturais e quatorze comercializam medicamentos desenvolvidos a partir de moléculas bioativas. A maioria dessas

empresas utilizam os conhecimentos etnofarmacológicos e faturam bilhões de dólares/ano, gerando também milhares de empregos (Carvalho *et al.*, 2008).

No Brasil o crescimento do mercado de fitoterápicos está em torno de 15% ao ano contra 4% dos medicamentos sintéticos e, em meados de 2008, estavam registrados na ANVISA 512 produtos que movimentam cerca de 400 milhões de reais anuais (Carvalho *et al.*, 2008).

2.3 Fitoterapia no Sistema Único de Saúde

O governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto Presidencial nº. 5.813, em 22 de junho de 2006, constituindo-se, como parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social e como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (Brasil, 2007).

Dentre as justificativas para essas ações destacam-se a ampliação das opções terapêuticas e a melhoria a atenção à saúde dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Também deve-se enfatizar, a pressão social estimulada pelas informações benéficas das variedades medicinais no combate às várias doenças, realizada por organizações não governamentais (ONG), Pastorais da Saúde, Cooperativas e Sindicatos (Brasil, 2006).

Assim sendo, várias prefeituras em todas as regiões do Brasil implantaram programas de fitoterapia objetivando, dentre tantas ações, a diminuição de custos na compra de medicamentos, aliar o uso de plantas medicinais a práticas terapêuticas e de prevenção em saúde (saúde preventiva), bem como, buscar a valorização da cidadania pelo saber popular (Brasil, 2007).

No contexto histórico das recomendações e resoluções de entidades internacionais na área da saúde, destaca-se a resolução 3.049 da Assembleia Mundial de Saúde, que recomenda para os países membros a utilização de plantas medicinais em seus sistemas tradicionais de medicina (Rossato & Krüger, 2005).

Outro avanço ocorreu com as diretrizes obtidas na Confederação

Internacional de Cuidados Primários à Saúde (OMS/UNICEF) – Alma Ata, realizada na antiga União Soviética em 1978. Nesse documento, houve um grande incentivo à utilização de plantas medicinais nos sistemas de saúde de países em desenvolvimento (Rossato & Krüger, 2005).

Acompanhando essa tendência, o Brasil criou em 1982 o Programa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (CEME), que dentre outros objetivos previa o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar com embasamento científico. Também pretendia a elaboração de medicamentos originados a partir do valor farmacológico das preparações de uso popular à base de plantas medicinais (Brasil, 2006).

Sua estratégia de ação consistia em submeter às preparações de espécies vegetais, tais quais são utilizadas pela população, a uma completa bateria de testes farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos, clínicos, buscando a confirmação, ou não, da propriedade terapêutica que lhes era atribuída (Brasil, 2006).

Destaca-se ainda, com relação aos aspectos históricos em políticas públicas com plantas medicinais, a 10ª Conferência Nacional de Saúde, ocorrida em 1998, na cidade de Brasília (DF). No relatório final constam as seguintes deliberações: incorporar no SUS em todo país práticas de saúde como a Fitoterapia, Acupuntura e Homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares; O Ministério da Saúde (MS) deve incentivar a Fitoterapia e a Homeopatia na Assistência Farmacêutica Pública, e elaborar normas para sua utilização, amplamente discutidas com trabalhadores em saúde e os especialistas, nas cidades onde existir maior participação popular, com gestores mais empenhados com a questão da cidadania e dos movimentos populares (Rossato & Krüger, 2005).

Em 2001 foi divulgado pelo Secretário de Políticas de Saúde, Cláudio Duarte da Fonseca (MS), uma “Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos”. Nesse instrumento, o poder público federal estabelece diretrizes para utilização, pesquisa e implementação de fitoterápicos no SUS, destacando ainda que caberá aos gestores municipais, entre outros compromissos, estabelecer parcerias com instituições de pesquisa e sociedade organizada com a finalidade de validar e acompanhar o uso clínico

de medicamentos fitoterápicos dentro da rede do SUS, como também coordenar e executar a assistência farmacêutica com plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no seu âmbito (Brasil, 2007).

Como resultados dessa iniciativa, foram publicadas pelo governo federal em maio de 2006, a Portaria 971 e a Resolução 5.813 que aprovam a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), bem como a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Esses instrumentos legais são elementares para manutenção e criação de inúmeros programas de fitoterapia nas redes básicas de saúde do Brasil inteiro (Marques *et al.*, 2007).

Para embasar ainda mais as ações de fitoterapia nas políticas públicas de saúde, a Anvisa lançou em fevereiro de 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que contempla 71 espécies medicinais. Dessa maneira, espera-se que a utilização dessas plantas bioativas seja realizada de maneira mais racional e padronizada (Brasil, 2009).

Na lista de plantas medicinais da RENISUS, há várias nativas de nosso país e outras aclimatadas como, a *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) e a *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).

2.4 Aspectos gerais de *Alpinia zerumbet*

A espécie *A. zerumbet* é originária do leste asiático, sendo muito abundante na China e ilhas do continente (Almeida, 1993).

Esse vegetal é classificado segundo a nomenclatura científica (Albuquerque, 2004) em:

Classe: Equisetopsida C. Agardh.

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Lillanae Takht.

Ordem: Zingiberales Griseb.

Família: Zingiberaceae Martinov

Gênero: *Alpinia* Roxb.

Espécie: *A. zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm.

Zingiberaceae é a maior família da ordem Zingiberales, constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central. Suas espécies, principalmente da floresta primária, crescem em locais sombreados, ricos em húmus (Albuquerque *et al.*, 2004).

Entre as sinonímias científicas, destacam-se *Alpinia speciosa* (J.C. Wendl.) K. Schum.; *Zerumbet speciosum* J.C. Wendl.; *Languas speciosa* (J.C. Wendl.) Small e *Costus zerumbet* Pers. (Lorenzi & Matos, 2002).

Em outros países é conhecida popularmente como *flor del paraíso*, *paraíso*, *ilusion* (Venezuela); *boca de dragón* (República Dominicana), *shell ginger*, *shell flower*, *ginger lily* (em países de língua inglesa) (Almeida, 1993).

No Brasil essa espécie é conhecida popularmente na região Nordeste como falso-cardamomo, pacová e colônia. No Rio de Janeiro é chamada de gengibre-concha e jardineiro. No Pará recebe o nome de louro-de-baiano, alpinia, falsa-noz-moscada e vindivá (Lorenzi & Matos, 2002).

Apresenta-se como herbácea, perene, rizomatosa com caule aéreo curto que pode alcançar até 3 m de altura (Figura 2 A). As flores são campanuladas, coloridas de róseo, marrom e branco, dispostas em belas inflorescências semipendentes (Figura 2 B). Suas folhas são lisas, aromáticas de consistência coriácea, com coloração verde escura na face ventral e verde clara na face dorsal e quando desidratadas, apresentam coloração amarelo-acastanhada (Figura 3). (Lorenzi & Matos, 2002, Albuquerque & Neves 2004; Correa *et al.*, 2010).

Kriek *et al.* (2008) e Barcelos *et al.* (2010) relataram que essa espécie pode ter chegado ao Brasil por acaso, vindo os seus rizomas misturados à areia que servia como lastro às caravelas portuguesas que voltavam das Índias, ou proposital, já que a mesma foi trazida ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro para presentear a Princesa Isabel após a abolição da escravatura.

Conforme levantamentos etnofarmacológicos, folhas, flores e rizomas são utilizados para fins medicinais no tratamento da hipertensão, no combate a males cardíacos, nos reumatismos, nos distúrbios gástricos, na ansiedade, na inflamação e úteis no tratamento anti-histeria. (Almeida, 1993; Lorenzi & Matos, 2002).



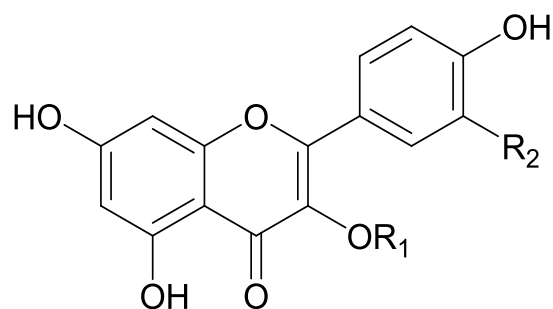
Figura 2. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): A. Aspectos gerais no habitat; B. Inflorescência.



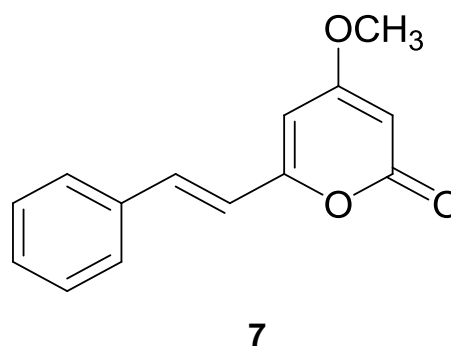
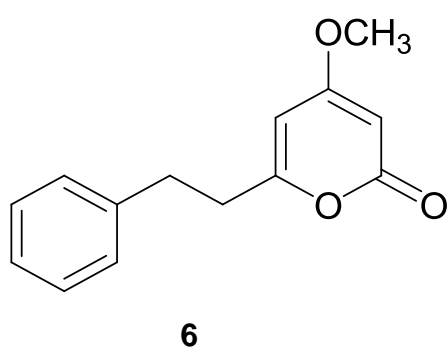
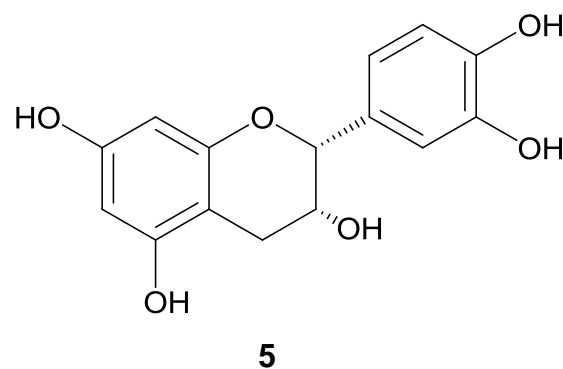
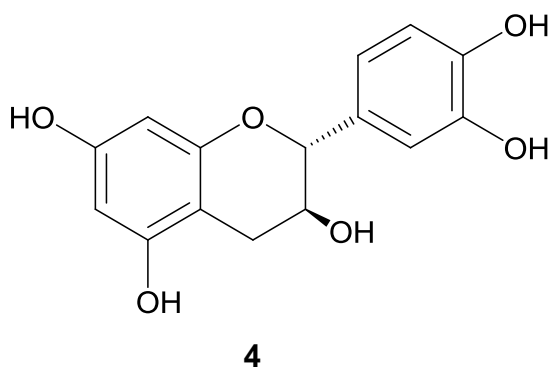
Figura 3. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): características do material vegetal desidratado.

2.4.1 Constituintes químicos

Mpalantinos *et al.* (1998) isolaram das folhas de *A. zerumbet* rutina (1), canferol-3-O-rutinosídeo (2), canferol-3-O-glucoronídeo (3), catequina (4), epicatequina (5), di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK) (6) e 5,6-de-hidrocavaína (DK) (7).



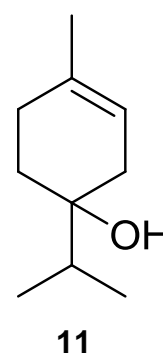
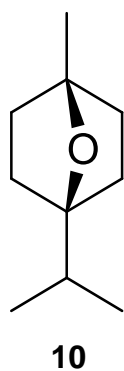
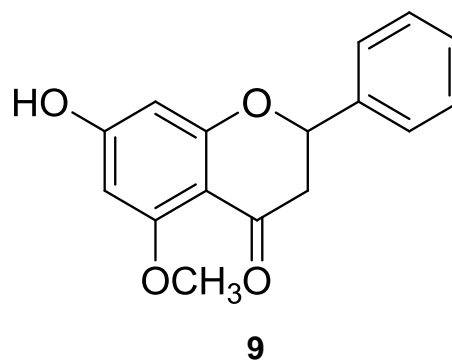
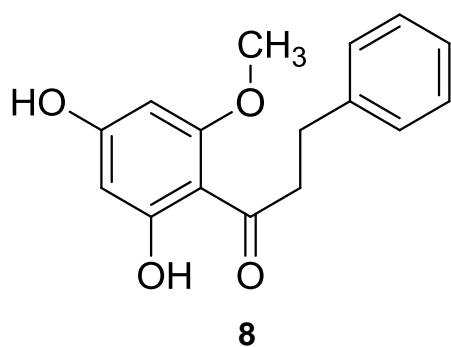
- | | |
|---------------------------------------|---------------------|
| 1. R ₁ = Rutinosídeo | R ₂ = OH |
| 2. R ₁ = Rutinosídeo | R ₂ = H |
| 3. R ₁ = Ácido glucurônico | R ₂ = H |



Zoghbi *et al.* (1999) identificaram o terpeno-4-ol dentre os principais componentes do óleo essencial das folhas e flores de *A. speciosa*. Nas folhas além do terpeno-4-ol, que corresponde a 22,7% dos compostos, há presença do limoneno (25,1%) e do terpineno (17,4%). Para as flores os terpenos majoritários identificados foram o 1,8-cineol (23,1%) e sabineno (14,5%).

Elzaawely *et al.* (2007) descreveram que a *A. zerumbet* possui nas folhas aproximadamente 1% de óleo essencial com diferentes componentes (mono e sesquiterpenos), sendo abundantes o terpeno-4-ol, 1,8-cineol e metil-eugenol. Cardamonina (**8**) e alpinetina (**9**) foram detectadas nas sementes. Nestas os autores identificaram como constituintes voláteis mais abundantes o α -cadinol, *T*-murolol, α -terpineol, α -cadineno, terpinen-4-ol e DK. No óleo essencial das flores, 1,8-cineol (**10**), cânfora, metil-cinamato e borneol se destacaram como as substâncias em maior quantidade. O extrato hexânico dessa parte do vegetal apresentou ainda, DDK. O extrato acetato de etila das flores e sementes revelaram por CLAE ácido *p*-hidroxibenzoico, ácidos ferúlico e siríngico.

Das sementes de *A. zerumbet* extraídas por Soxhlet utilizando metanol como solvente, foram isolados por Xu *et al.* (1996) os diterpenos zerumina A e zerumina B, juntamente com a coronarina E. Murakami *et al.* (2009) descreveram que os monoterpênos estão presentes em 95% do óleo essencial e o *p*-cimeno é o composto majoritário seguido pelo 1,8-cineol e o terpeno-4-ol (**11**). Os sesquiterpenos estão presentes no óleo em pequenas quantidades representados por α e β cariofilenos.



2.4.2 Atividades farmacológicas

O efeito antinociceptivo do óleo essencial de *A. zerumbet* foi avaliado em camundongos pelos métodos de chapa aquecida, indução com ácido acético e formalina. Observou-se efeito dose-dependente somente em elevadas concentrações e o mecanismo de ação proposto parece envolver a participação de receptores opioides (Araújo-Pinho *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante utilizando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi aplicada para o óleo essencial das flores e sementes da planta (Elzaawely *et al.*, 2007) e a atividade biológica foi relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos (ácido ferúlico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico) presentes na fração acetato de etila.

Jantan *et al.* (2008) observaram para alpinetina e cardamonina presentes no extrato metanólico dos frutos de *Alpinia mutica* Roxb., espécie que possui substâncias químicas semelhantes a *A. zerumbet*, atividade de inibição de agregação plaquetária *in vitro*, utilizando aspirina como controle positivo.

Em estudo clínico realizado por Laranja *et al.* (1992) com o chá das folhas de *A. zerumbet* obtido por decocção, foi observado pequena diurese com efeito hipotensor sem afetar as funções renais.

Mpalantinos *et al.* (1998) descreveram que as atividades hipotensoras do extrato aquoso dessa planta não podem ser atribuídas às ações autonômicas periféricas, mas parecem estar relacionadas aos antagonistas da atividade transmembrana para fluxos de cálcio e relataram que os flavonoides podem ser os responsáveis por esse efeito biológico.

Lahlou *et al.* (2002) contribuíram para o conhecimento do mecanismo de ação hipotensora de *A. zerumbet* ao administrar via intravenosa em ratos, o óleo essencial da planta e terpeno-4-ol (constituente do óleo essencial). Os autores concluíram que o óleo essencial e terpeno-4-ol promoveram significativa hipotensão em ratos anestesiados ou conscientes e que esse efeito pode estar relacionado a uma ação vasorrelaxante direta, independente das atividades do sistema nervoso simpático. Lahlou *et al.* (2003) também analisaram as respostas hipotensivas do óleo essencial e terpeno-4-ol em ratos com hipertensão induzida por sal de deoxicorticosterona (DOCA-sal). Os resultados mostraram que o tratamento intravenoso com óleo essencial de

Alpinia ou com terpeno-4-ol dose dependente, diminuíram a pressão sanguínea nos ratos hipertensos. Moura *et al.* (2005) utilizando o mesmo modelo de hipertensão DOCA-sal, mas empregando como tratamento o extrato hidroalcoólico de *A. zerumbet*, verificaram efeito anti-hipertensivo crônico.

O efeito vasorrelaxante para óleo essencial de *A. zerumbet* e 1,8-cineol, um dos componentes majoritários do óleo, foi observado em aorta de ratos com endotélio intacto. O potente efeito vasorrelaxante parece estar relacionado ao óleo essencial e não somente ao 1,8-cineol. Essa atividade biológica depende da integridade da função vascular do endotélio e, segundo Pinto *et al.* (2009), esses dados corroboram o uso popular da espécie medicinal para o tratamento da hipertensão.

Lin *et al.* (2008) relataram a atividade hipolipidêmica de extratos aquosos e alcoólicos das sementes de *A. zerumbet*, e observaram um aumento da taxa de HDL-colesterol. Os autores relacionaram esse efeito biológico *in vivo*, ao conteúdo fenólico e de fibras presentes nas sementes.

Mendonça *et al.* (1991) destacaram que as preparações aquosas de *A. zerumbet* geralmente utilizadas na medicina popular são praticamente atóxicas.

2.5 Aspectos gerais de *Solidago chilensis*

A origem do nome *Solidago* é do latim *solidus* = sólido e *ago* = fazer. Ou seja, “fazer sólido” uma expressão antiga equivalente a curar. Uma alusão de longa data ao uso medicinal desse gênero. Já o epíteto *chilensis* está relacionado ao país Chile, onde o vegetal é facilmente encontrado (Kissmann & Groth, 1999).

Essa planta é nativa do chamado Cone da América do Sul ocorrendo na Argentina e Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil, podendo ser encontrada na maior parte do nosso país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Lorenzi & Matos, 2002).

Segundo a nomenclatura botânica esse vegetal é classificado como:

Classe: Equisetopsida C. Agardh.

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Asterales Link.

Família: Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Gênero: *Solidago*

Espécie: *S. chilensis* Meyen

A família Asteraceae é a maior das famílias botânicas, compreendendo 1535 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies. Segundo levantamentos florísticos no Brasil, aproximadamente 10% das espécies vasculares estão classificados nela. Entre as sinonímias científicas observa-se referência a *Solidago linearifolia* DC.; *Solidago linearifolia* var. *brachypoda* Speg. e *Solidago microglossa* var. *linearifolia* (DC.) Baker (Kissmann & Groth, 1999).

Essa planta é mais conhecida no Brasil pela sinonímia *Solidago microglossa*, nome que lhe foi atribuído por De Condole em 1836. Pelas regras de nomenclatura botânica hoje estabelecidas, quando ocorrerem sinônimos emprega-se sempre o nome mais antigo em conformidade e, nesse caso, *Solidago chilensis* foi nome dado ao vegetal por Meyen em 1834 e por isso é o nome válido. Ocorrem duas variedades de *Solidago*, a *chilensis* Meyen que se apresenta como planta glabra (Figura 4 A) e a variedade *megapotamica* (DC.) Cabrera, com ramos e folhas densamente pubescentes (Kissmann & Groth, 1999).

Várias espécies de *Solidago* são encontradas em diferentes áreas do planeta, dentre as mais representativas destacam-se *Solidago virgaurea* L. na Ásia e Europa, *Solidago canadensis* L., *Solidago odora* Ait. e *Solidago gigantea* L. na América do Norte (Kissmann & Groth, 1999).

Esse vegetal é conhecido popularmente nas diversas regiões brasileiras como arnica, arnica-brasileira, arnica-do-campo, arnica-silvestre, erva-de-lagarto, erva-lanceta, espiga-de-ouro, marcela-miúda, rabo-de-rojão e sapé-macho (Lorenzi & Matos, 2002).

É um subarbusto ereto, perene, não ramificado, rizomatoso, levemente aromático, de 80 a 100 cm de altura (Figura 4 B) (Alonso, 2006).

O caule é ereto geralmente simples, cilíndrico com consistência fibro-lenhosa. Em alguns indivíduos observa-se ramificação ascendente a partir das partes baixas e em exemplares maiores pode ocorrer ramificação na parte mais elevada. Suas folhas são inteiras, simples, alternas, sésseis em toda extensão do caule, separadas a curta distância entre si e inseridas de forma helicoidal. O tamanho das folhas é variado. Na parte inferior da planta as folhas são maiores com tamanho em torno de 8 a 10 cm de comprimento e 3 cm de largura. A

consistência das folhas é membranácea, apresentando tonalidade violácea quando jovem. Em geral a coloração verde mais intensa predomina na face adaxial e observa-se tonalidade verde mais clara na face abaxial (Silva, 1929; Kissmann & Groth, 1999).

Conforme Chicourel *et al.* (1998), a folha pode atingir até 10 cm e a inflorescência até 20 cm. A folha apresenta-se lanceolada, com ápice agudo e base atenuada. Suas margens são lisas, mas próximo ao ápice, pode apresentar 2 a 4 minúsculos dentes agudos de ponta voltada para frente (Figura 4 C).

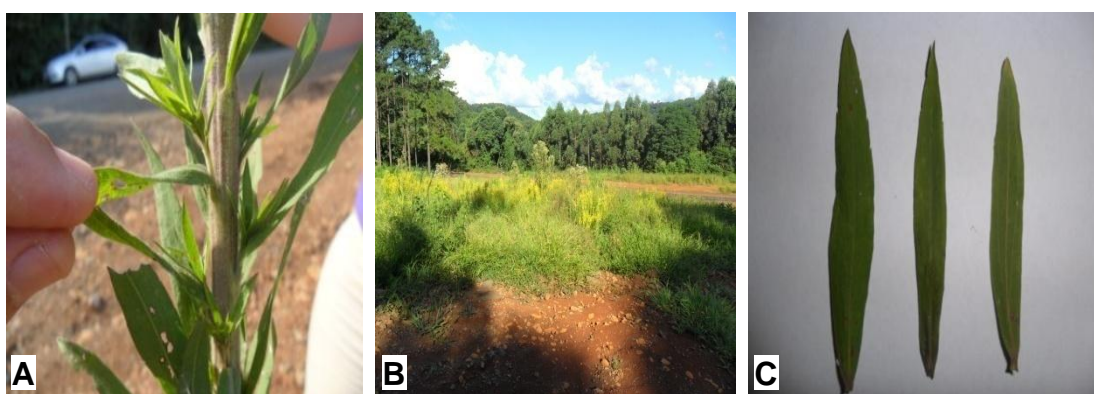


Figura 4. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae): A. Caule e folhas pubescentes; B. Aspectos gerais e habitat; C. Forma das folhas.

Pedroso *et al.* (2009) descreveram que na parte terminal dos caules observa-se inflorescência paniculada em forma de cone apresentando flores de cor amarelo intenso (Figura 5 A). Na parte apical ocorrem capítulos isolados e sucessivamente para baixo, capítulos florais sobre racemos de comprimentos crescentes dispostos de forma helicoidal à volta do eixo. Os racemos maiores podem apresentar cinquenta a sessenta capítulos que se dispõem em linha com o eixo do pedúnculo filiforme. Junto à base de cada pedúnculo ocorre minúscula bráctea foliar, com alguns milímetros de comprimento. A abertura das flores é escalonada, sendo o período de florescimento relativamente longo.

As flores possuem formato campanulado, com cerca de 8 mm de altura, involúcro verde-amarelado formado por duas séries de filárias. No capítulo ocorrem flósculos periféricos femininos e flósculos centrais hermafroditos (Oliveira *et al.*, 1996). Após a desidratação, as partes aéreas apresentam coloração amarela-acinzentada (Figura 5 B).

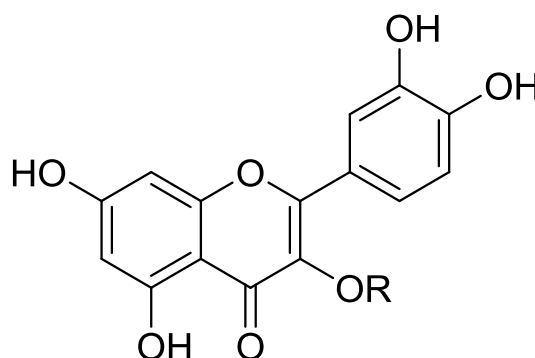


Figura 5. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae): A. Inflorescência; B. Material vegetal desidratado.

Na medicina popular, essa planta tem sido utilizada como diurético, analgésico, anti-inflamatório, antirreumático, cicatrizante e no tratamento de queimaduras. É empregada externamente no combate das escoriações, ferimentos, traumatismos e contusões em substituição à arnica-verdadeira (*Arnica montana* L.) (Lorenzi & Matos, 2002).

2.5.1 Constituintes químicos

A partir das inflorescências de *S. chilensis*, Soares-Valverde *et al.* (2009) identificaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o diterpeno solidagenona e propuseram o mesmo como parâmetro nas análises de controle de qualidade. Torres *et al.* (1987) isolaram na fração hexânica das partes aéreas, isolaram o β -farneseno e a α -amirina e no extrato etanólico, os autores obtiveram o flavonoide quercetrina (**12**) em maior quantidade, também α -epinasterilglicopiranosídeo, ácido cafeico e clorogênico.



R = Ramnapirosídeo

12

2.5.2 Atividades farmacológicas

O extrato aquoso das inflorescências de *S. chilensis* apresentou atividade gastroprotetora em modelo de lesão gástrica induzida por ácido clorídrico e etanol em camundongos na concentração de 100 mg/kg (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2002). Bucciarelli *et al.* (2010) observaram atividade gastroprotetora do extrato aquoso das inflorescências sem sinais de toxicidade aguda, nas concentrações de 125 a 2000 mg/kg.

A atividade antioxidante utilizando-se ensaios *in vitro* foi relatada por Apáti *et al.* (2006). Do extrato aquoso dessa planta obtido por decocção, Facury-Neto *et al.* (2004) descreveram atividade cicatrizante em ratos tratados durante 14 dias com ausência de hepatotoxicidade.

Morel *et al.* (2006) observaram atividade antimicrobiana para óleo essencial das folhas e do extrato metanólico das raízes em concentrações superiores a 1 mg/mL. Bagatini *et al.* (2009) relataram para infusões de *S. migroglossa* atividade antiproliferativa na maior concentração testada (14 mg/mL). A atividade anti-inflamatória para a espécie foi descrita por Tamura *et al.* (2009) utilizando os métodos de edema de pata e migração de células polimorfonucleares.

Silva *et al.* (2010) realizaram um estudo clínico com dez pacientes tratados com pomada à base de extrato hidroalcoólico obtido por percolação (5%) das partes aéreas da planta, e observaram uma melhora no tratamento do lumbago.

Martins *et al.* (2009) não descreveram citotoxicidade para tintura de *S. microglossa* em fibroblastos cultivados de mucosa bucal humana.

2.6 Aspectos gerais de *Eugenia uniflora*

A espécie *E. uniflora* pertence à família Myrtaceae, que é bem distribuída na Austrália, no leste asiático e nas Américas. A classificação taxonômica proposta para esse vegetal indica a presença de duas subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae. A classificação mais usual segundo Auricchio & Bacchi (2003) é a seguinte:

- Classe Magnoliopsida
- Subclasse Rosidae
- Ordem Myrtales

- Família Myrtaceae
- Subtribo Eugeniinae
- Gênero: *Eugenia*

O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 encontram-se no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais. Nesse gênero encontra-se *Eugenia uniflora* L. que se apresenta como um arbusto ou árvore semidecídua de 4 a 10 m de altura, com copa estreita, de tronco liso com coloração parda clara (Figura 6 A) (Lorenzi & Matos, 2002).

É uma espécie que cresce na Argentina, no Uruguai, Paraguai e Brasil, sendo cultivada na América Central, nas Antilhas, nos Estados Unidos, na China, Argélia, Tunísia, França e no Sri Lanka, devido a sua grande capacidade de adaptação. No Brasil ocorre de forma abundante nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul, onde é conhecida popularmente como pitanga, pitanga-rósea, pitanga-do-mato, pitangueira-vermelha, ginja e jinja (Lorenzi & Matos, 2002; Fiuza *et al.*, 2008).

De acordo com a F. Bras. IV (1988-2005) e Auricchio *et al.* (2003) as folhas de *E. uniflora* são simples, cartáceas, ovalado-lanceoladas de ápice acuminado e base aguda ou obtusa, com margem inteira lisa de 2 a 6 cm de comprimento e 1 a 2,5 cm de largura. Apresentam-se glabras, membranosas, com pontos translúcidos mais visíveis na face abaxial. A face adaxial é verde-escura, brilhante, e a face abaxial um pouco mais clara, opaca (Figura 6 B). As nervuras secundárias e terciárias terminam em uma nervura próxima ao bordo da lâmina. Quando amassadas, exalam um forte aroma característico e o vegetal desidratado apresenta coloração verde-acinzentado (Figura 6 C).

Auricchio *et al.* (2003) descreveram que as flores de *E. uniflora* são brancas e pequenas, e os frutos são do tipo drupa, globosos, sulcados, brilhantes e de cor vermelha, amarela ou preta, com polpa carnosa e agridoce, contendo uma ou duas sementes.

Na medicina popular, *E. uniflora* é utilizada como antidiarreica, febrífuga, hipotensora, antirreumática e vermífuga (Lorenzi & Matos, 2002).

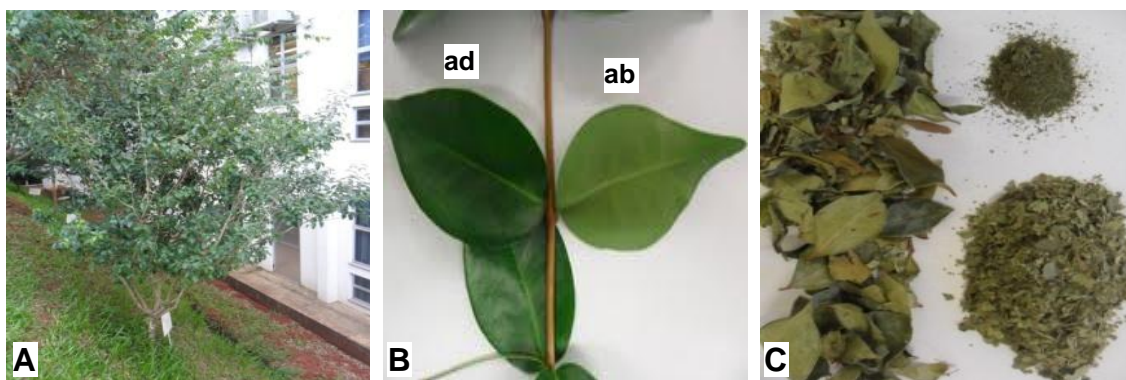


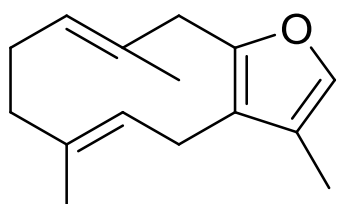
Figura 6. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): A. Habitat; B. Folhas com destaque para as faces abaxial e adaxial; C. Material vegetal desidratado.

Abreviaturas: ab – abaxial, ad – adaxial.

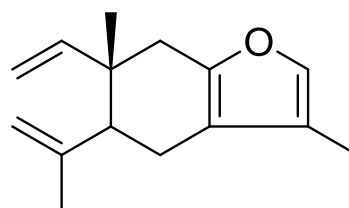
2.6.1 Constituintes químicos

Auricchio & Bacchi (2003) descreveram um rendimento para o óleo essencial em torno de 1,8% e a presença de germacreno B (**13**) e *cis trans* curzerenos (**14**), como substâncias mais abundantes na folha. Apontaram ainda, a presença de taninos macrocíclicos hidrolisáveis, alcaloides, saponinas e flavonoides quercetina (**15**) e miricetina como substâncias bioativas majoritárias para essa espécie.

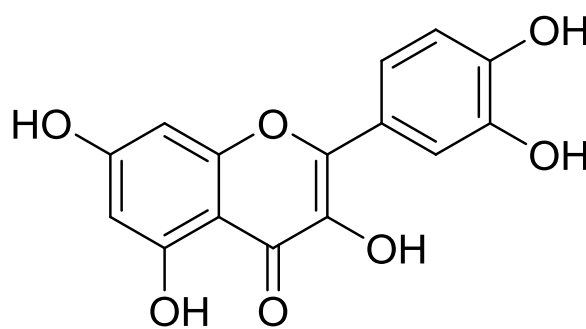
Galhiane *et al.* (2006) avaliaram o rendimento dos óleos essenciais e isolaram linalol das folhas frescas de *E. uniflora* por meio de técnicas cromatográficas.



13



14



15

2.6.2 Atividades farmacológicas

O extrato aquoso da planta (8 mg/dL; *i.p*) reduziu a pressão sanguínea em ratos normotensos utilizando modelo de indução com epinefrina. Os mecanismos de ação propostos foram o antagonismo α adrenérgico e a ação vasodilatadora direta. A diurese observada pode estar relacionada, a um aumento no fluxo renal (Consolini, 1999).

Consolini *et al.* (2002) observaram efeitos inotrópico e cronotrópicos no músculo cardíaco de ratos tratados com extrato aquoso de *E. uniflora* (0,6 e 1,2% respectivamente). Essas atividades foram relacionadas à liberação de catecolaminas com ação β adrenérgica e bloqueio de cálcio. Essas ações farmacológicas podem estar relacionadas à hipotensão já descrita para o vegetal, sendo importante também para as reações adversas e interações medicamentosas que os extratos aquosos de *E. uniflora* podem apresentar.

Velázquez *et al.* (2003) descreveram atividade antioxidante para extrato metanólico frente à peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em membranas microssomais de ratos. Também relataram efeitos antioxidantes nos métodos de superóxido desmutase e DPPH.

Coelho de Souza *et al.* (2004) relataram efeito antimicrobiano com inibição do crescimento de *S.aureus*, *B. subtilis* e *Micrococcus luteus* em ágar sólido, utilizando extrato metanólico das folhas *E. uniflora*.

A atividade antinociceptiva foi avaliada por Amorim *et al.* (2009) empregando o óleo essencial das folhas de *E. uniflora*. Observaram-se efeito hipotérmico no método de chapa quente e diminuição nas contorções abdominais induzidas por ácido acético nas doses de 100 e 200 mg/kg (*p.o*). Ambas as atividades parecem envolver os compostos conhecidos como furano-sesquiterpenos.

2.7 Parâmetros de qualidade e pesquisa fitoquímica

Os ensaios de controle de qualidade têm por objetivo avaliar as características morfoanatômicas, físicas, químicas e microbiológicas das matérias-primas, embalagens, produtos em processo e produtos acabados. A conformidade das especificações deve ser vista como um requisito necessário para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto, e não somente como exigência regulatória (Marques, 2001; Leite, 2009).

Partindo do princípio que uma planta é um ser vivo, seus metabólitos secundários responsáveis pelas atividades farmacológicas estão presentes em uma forma dinâmica. Por essa razão, fatores como clima, solo, local, e hora da colheita podem alterar significativamente o teor de substâncias de determinada planta. Portanto, é de extrema importância que seja realizada a análise da qualidade da droga vegetal e do material fitoterápico que se pretende usar na terapêutica (Calixto, 2000; Leite, 2009).

Dentre os ensaios preconizados nas farmacopeias para drogas vegetais e extratos, encontram-se características organolépticas ou sensoriais, macroscopia e microscopia, identificação de marcadores químicos, ensaios de pureza (matéria orgânica estranha, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e perda por dessecação), doseamento e ensaios físico-químicos (pH, resíduo seco, densidade relativa e solubilidade) (Farias, 2001).

Os principais problemas relacionados à qualidade da matéria-prima vegetal são as falsificações, sendo comum a troca da espécie *Panax ginseng* C.A. Mey. por espécies do gênero *Pfaffia* (ginseng brasileiro); as substituições realizadas com espécies de atividade farmacológica semelhante, por exemplo, as passifloras; e as sofisticações quando se acrescenta substâncias sintéticas a extratos de plantas com o objetivo de enganar o controle de qualidade. Esta última já foi observada em extratos de guaraná com adição de cafeína ou de *Ginkgo biloba* L. com misturas de rutina (Leite, 2009).

Esse quadro desfavorável vem configurando na área de fitoterápicos um panorama semelhante ao que já ocorre no mercado de produtos farmacêuticos em geral, com enorme dependência da importação de drogas e alto custo para as empresas e consumidores (Guilhermino *et al.*, 2010).

2.8 Extratos de plantas medicinais frente às atividades biológicas hipolipidêmica, ansiolítica, antidepressiva, antioxidante e antimicrobiana

2.8.1 Atividade hipolipidêmica

Durante os últimos anos, um número crescente de estudos tem relacionado os flavonoides aos promissores fármacos naturais, uma vez que têm sido atribuídos a esses a capacidade de modificar a biossíntese de eicosanoides (resposta anti prostoide e anti-inflamatória), proteger o colesterol LDL da oxidação (inibindo a formação da placa aterosclerótica), prevenir a

agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos) e promover o relaxamento de músculo liso (efeito anti-hipertensivo e anti-iscuêmico). Dietas ricas em flavonoides podem resultar numa variedade de efeitos produzidos por diferentes mecanismos, protegendo contra doenças cardiovasculares, necessitando, portanto, de maiores investigações e entendimentos científicos (Oliveira *et al.*, 2010).

Dentre os diversos alvos farmacológicos dos flavonoides pode-se citar a redução das dislipidemias. As dislipidemias são caracterizadas por distúrbios nos níveis de lipídeos (colesterol, triacilglicérides, fosfolipídeos e ácidos graxos livres) com ou sem repercussão sobre o território vascular, associadas a manifestações clínicas diversas. Em adultos, a concentração aumentada de colesterol total (CT), triacilglicérides (TG) e da fração de colesterol ligada à lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) aliada com a diminuição da fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), a hipertensão arterial, o diabetes, o tabagismo e a obesidade estão associados a lesões avançadas de aterosclerose e maior risco de manifestações clínicas da doença aterosclerótica (Coelho *et al.*, 2005).

Triacilglicérides

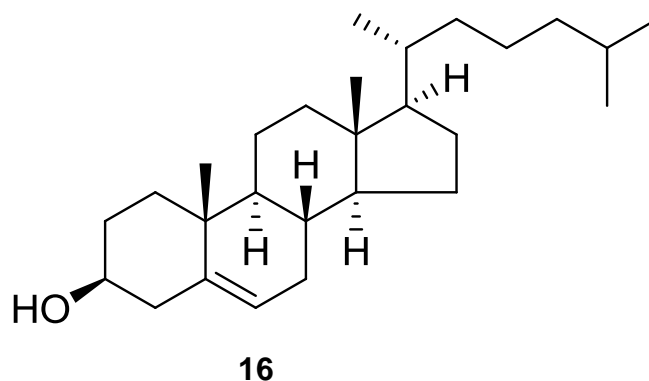
Os triacilglicérides obtidos da alimentação são transportados do intestino para o fígado, onde são transformados em ácidos graxos. Os ácidos graxos são armazenados principalmente no tecido adiposo na forma de triacilglicérides, que são definidos como ésteres de glicerol ligados a ácidos graxos. O glicerol pode ser esterificado por uma, duas ou até três moléculas de ácidos graxos diferentes (Devlin, 2007).

Uma vez que os triacilglicérides são totalmente hidrofóbicos e não podem formar micelas estáveis por si próprios, eles coalescem dentro dos adipócitos para formar gotas oleosas, quase anidras. Essas gotas de lipídeos depositadas no citosol das células do tecido adiposo são as principais reservas de energia do organismo e, se necessário, essas moléculas podem ser liberadas pelas enzimas lipases para uso no fígado e nos músculos (Baynes & Dominiczak, 2007), quando o corpo requer combustível. No fígado, pouco triacilglicérido é armazenado e, em vez disso, a maior parte é exportada, embalada em

colesterol e ésteres de colesterol, fosfolípido e proteína para formar partículas de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (Champe *et al.*, 2009).

Colesterol

O colesterol é um composto alicíclico, cuja estrutura inclui o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, com seus quatro anéis fundidos, uma única hidroxila, uma cadeia hidrocarbônica ramificada de oito membros e dois grupos metilas (**16**). É o componente essencial das membranas estruturais de todas as células, sendo um intermediário chave na biossíntese de uma série de esteroides importantes, incluindo os ácidos biliares, hormônios adrenocorticais, estrógenos, andrógenos e a progesterona (Devlin, 2007).



Aproximadamente 70% do colesterol do organismo originam-se de sua biossíntese, sendo o restante fornecido pela dieta. A síntese de colesterol ocorre em quase todas as células, porém a capacidade é maior no fígado, intestino, córtex da adrenal e tecidos reprodutores. Os átomos de carbono são derivados do acetato e o poder redutor na forma de NADPH é fornecido principalmente pela glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase. A velocidade dessa rota de síntese responde a mudanças na concentração de colesterol. Um desequilíbrio nessa regulação pode elevar os níveis de colesterol plasmático na circulação, com risco potencial de doença coronariana (Devlin, 2007, Champe *et al.*, 2009).

Em humanos a estrutura cíclica do colesterol não pode ser degradada, dessa forma o núcleo é convertido em ácidos e sais biliares excretados nas fezes, ou transportado para a vesícula biliar pela secreção da bile, até a eliminação (Champe *et al.*, 2009). Um nível plasmático inferior a 200 mg/dL de

colesterol total é considerado desejável, enquanto acima de 240 mg/dL requer a análise das lipoproteínas, uma vez que há uma relação direta entre o aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade e doenças coronarianas (Champe *et al.*, 2009).

Lipoproteínas

Como os triacilglicérides e o colesterol são relativamente insolúveis em água e, conseqüentemente também no sangue, eles são encontrados no plasma na forma de lipoproteínas (partículas esféricas que possuem superfície exterior composta principalmente por proteínas hidrossolúveis) ou, no caso dos ácidos graxos livres, ligados a albumina (Quintão, 1992).

As lipoproteínas são complexos macromoleculares sintetizados no fígado e no intestino delgado, cuja função é transportar o colesterol e os triacilglicérides pela corrente circulatória. São formadas por quatro constituintes básicos, os triacilglicérides, ésteres de colesterol, fosfolipídeos e apolipoproteínas (Figura 7) (Henry, 2008).

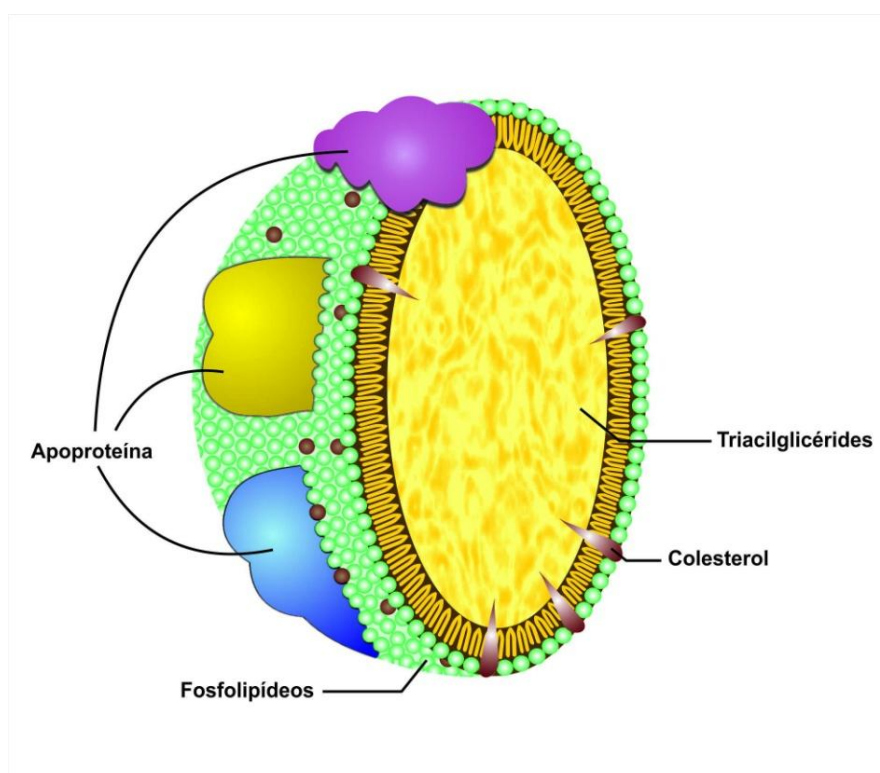


Figura 7. Constituintes das lipoproteínas: apolipoproteína, fosfolipídeos, colesterol e triacilglicérides.

As partes proteicas das lipoproteínas são compostas de várias proteínas denominadas de apolipoproteínas. Cada fração de lipoproteína possui uma composição particular e relativamente constante de apolipoproteína. As apolipoproteínas exercem importante papel no metabolismo das lipoproteínas, ativando ou inibindo enzimas e/ou ligando as lipoproteínas a receptores celulares (Baynes & Dominiczak, 2007).

As apoproteínas encontram-se divididas em várias frações, sendo algumas destas ainda, subdivididas em: Apo A (I, II e III), Apo B (48 e 100), Apo C (I, II e III), Apo D e Apo E (Garcia & Kanaan, 2008).

Segundo as suas características físico-químicas, as partículas de lipoproteínas se dividem em quilomícrons, as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), as lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e as lipoproteínas de densidade alta (HDL) (Champe *et al.*, 2009).

Quilomícrons são grandes partículas produzidas pelas células intestinais, compostas por aproximadamente 90% de triacilglicerídeos originários da dieta (exógeno), pequena quantidade de colesterol livre, fosfolipídios, e 1 a 2% de proteínas (Champe *et al.*, 2009).

As lipoproteínas VLDL são produzidas no fígado, apresentando-se como partículas grandes, porém menores do que as partículas dos quilomícrons. São constituídas por 50% de triacilglicerídeos, 40% de colesterol e fosfolipídios, e 10% de proteínas, principalmente Apo B-100, Apo C e alguma Apo E. Têm como função o transporte dos triacilglicerídeos endógenos e do colesterol para os tecidos periféricos para serem armazenados ou utilizados como fonte de energia (Gianinni, 1998).

A LDL representa 50% da massa total de lipoproteínas circulantes. São partículas bem menores, tão pequenas, que mesmo quando em grande quantidade não são capazes de turvar o plasma. O colesterol representa metade da massa da LDL. Cerca de 25% são proteínas, especialmente Apo B-100 e pequenas quantidades de Apo C; o restante é constituído de fosfolipídios e triacilglicerídeos. É a lipoproteína que mais carrega colesterol. Tem a função de transportá-lo para locais onde ele exerce uma função fisiológica, como por exemplo, a síntese de esteroides. São, em sua maior parte, produzidas a partir das lipoproteínas VLDL. Sua concentração sérica guarda relação direta com o aumento do risco de aterogênese (Champe *et al.*, 2009).

As HDL são pequenas partículas constituídas por cerca de 50% de proteína, especialmente Apo A I e II, e pouca quantidade de Apo C e Apo E, 20% de colesterol, 30% de triacilglicerídeos e traços de fosfolípido. A HDL pode ser separada em duas subclasses principais: HDL 2 e HDL 3, que diferem em tamanho, densidade e composição, especialmente em relação ao tipo de apoproteínas. Cumprem o importante papel de levar o colesterol até o fígado diretamente ou transferindo ésteres de colesterol para outras lipoproteínas, especialmente as VLDL. É atribuído à fração HDL 2 o papel de proteção do desenvolvimento da aterosclerose (Champe *et al.*, 2009).

Metabolismo lipídico

Inclui três fases interligadas que para melhor entendimento podem ser divididas em fase exógena, endógena e de transporte metabólico reverso (Gianinni, 1998).

A fase exógena inicia-se pela absorção intestinal de gorduras ingeridas da dieta e sua incorporação nos quilomícrons (QM). Os QM caracterizam-se por transportar o colesterol da dieta e serem ricos em triacilglicérides (TG), tendo como apolipoproteína fundamental a B 48. Os QM entram na circulação linfática e depois na corrente circulatória através do ducto torácico, podendo receber apolipoproteínas (A, C e E). Nos capilares os QM sofrem ação da enzima lipase lipoproteica (LLP), que ativada pela apo C II, age especificamente sobre os triacilglicérides (TG), cindindo-os em ácidos graxos livres e glicerol. Essa ação reduz o conteúdo de TG dos QM, tornando-os partículas menores chamadas de quilomícrons remanescentes (R-QM). Os R-QM possuem na sua estrutura apoproteínas (apo B 48 e apo E), que são reconhecidas por receptores presentes nas células hepáticas. Desse modo, os QM são retirados da circulação e seu catabolismo fornece às células colesterol, TG e ácidos graxos provenientes do meio exterior (Forti & Diament, 2006).

A fase endógena é representada pela síntese hepática das VLDL, as quais contêm TG e as apos B 100, E e C, que transportam TG produzidos no fígado. As VLDL na circulação também sofrem ação das LLP com diminuição do conteúdo de TG, resultando na formação de VLDL remanescentes ou lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Essas partículas seguem dois caminhos: cerca de dois terços das IDL podem ser captadas no fígado pelos

receptores de apo (B e E) e sofrerem degradação em seus componentes. O terço restante sofre ação da lipase hepática, formando as LDL. Tanto as LDL como as IDL são retiradas da circulação pelos receptores celulares B/E, existentes principalmente no fígado. Vale salientar que as LDL são as principais carreadoras de colesterol para os tecidos periféricos (Figura 8) (Leança *et al.*, 2010).

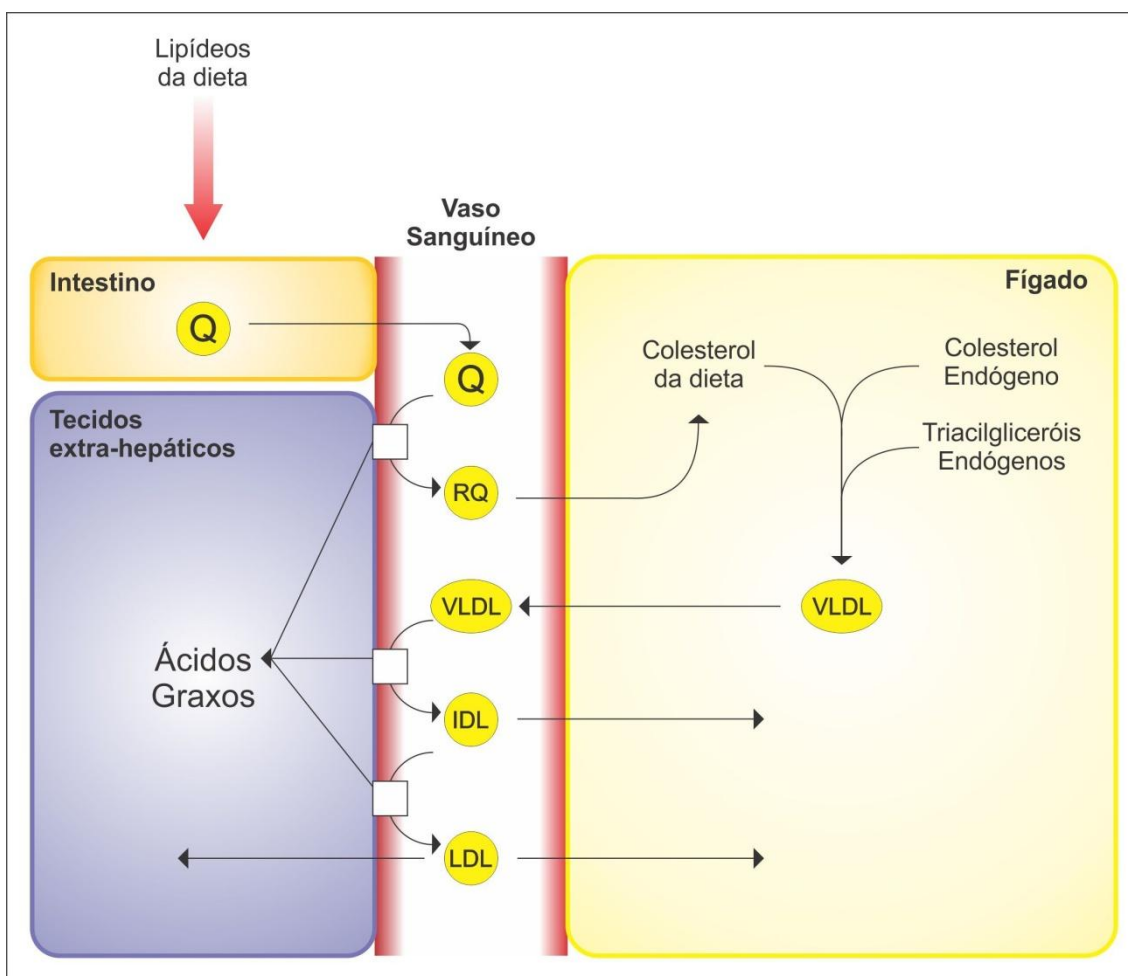


Figura 8. Transporte de lipídeos aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas.

Abreviaturas: Os quadrados brancos no lúmen do vaso representam a enzima lipase lipoproteica. Q – quilomícrom, RQ – quilomícrom remanescente, VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa, IDL - lipoproteína de densidade intermediária, LDL - lipoproteína de baixa densidade.

Uma vez no interior das células, essas lipoproteínas são fragmentadas, liberando colesterol e aminoácidos. A síntese de colesterol e dos receptores B/E pela célula varia na razão inversa da concentração de colesterol livre intracelular. A síntese de colesterol se inicia com a utilização de moléculas de acetilcoenzima A e três dessas dão origem a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima

(HMGCoA). A HMGCoA por sua vez, se transforma em ácido mevalônico por ação da enzima HMGCoA redutase e, a partir dele, sucede uma cascata de reações que dá origem ao colesterol. A atividade dessa enzima é importante na regulação da biossíntese do colesterol, pois o bloqueio de sua ação resulta da redução na síntese do esteroide (Fluxograma 2). O aumento da concentração de colesterol livre dentro da célula após o catabolismo das LDL ativa mecanismos importantes, que objetivam reduzir a síntese de colesterol por inibição da HMGCoA redutase, armazenar o excesso de colesterol sob a forma de ésteres utilizando a enzima acil-colesterol-acil transferase (ACAT), e diminuir a formação de LDL-receptores evitando maior influxo de colesterol (Quintão, 1992; Leança, *et al.*, 2010) (Figura 9).

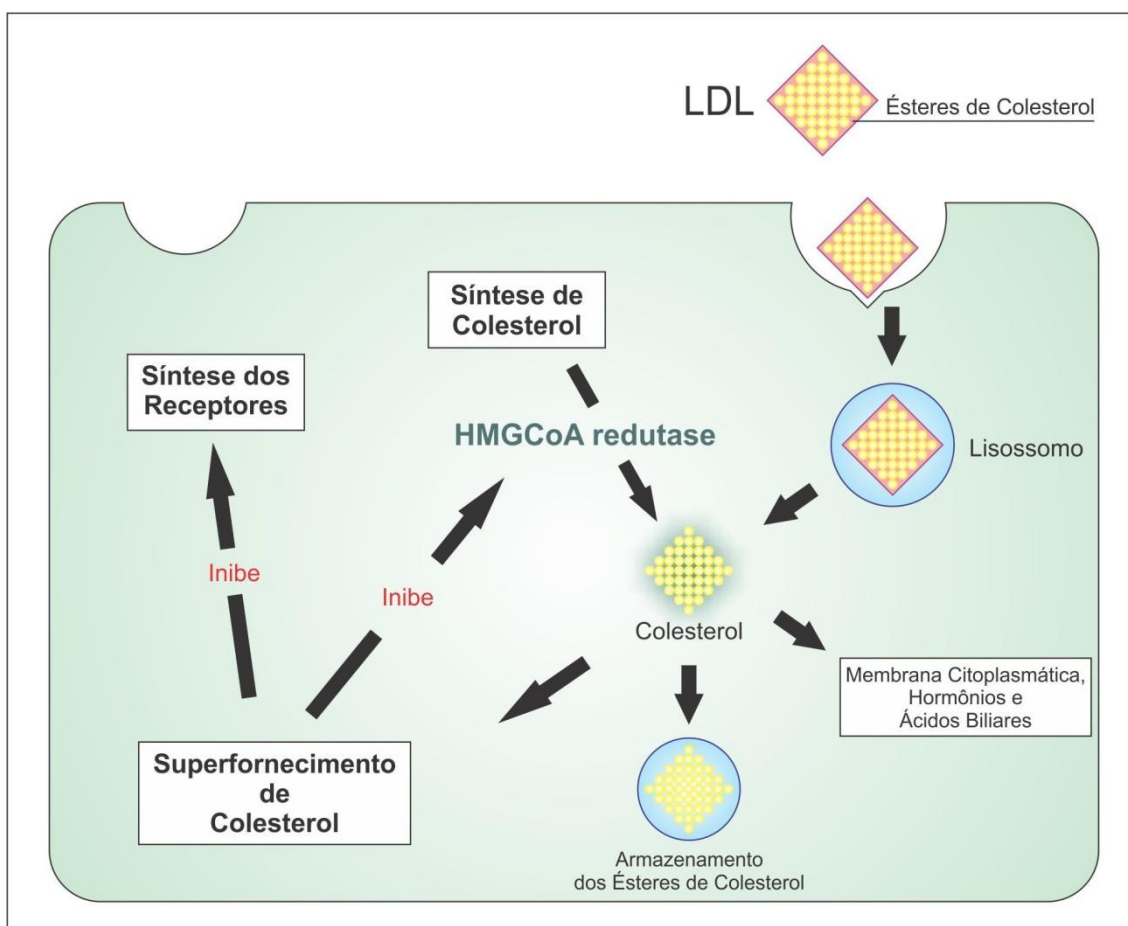
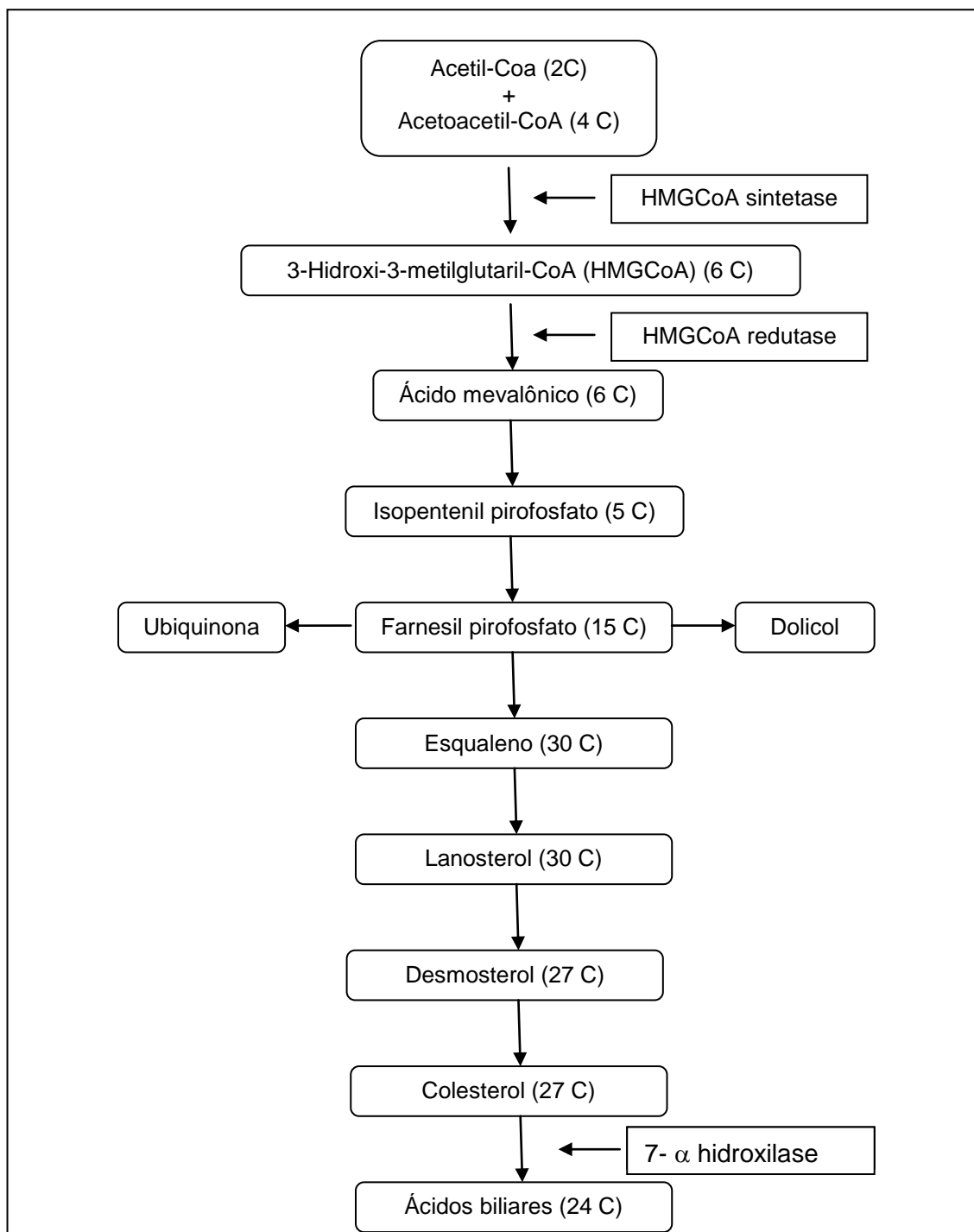


Figura 9. Captação e a regulação exógena do colesterol.

Parte do material liberado pela ação da LLP sobre os QM e as VLDL é utilizada na fabricação de outra lipoproteína: HDL (lipoproteínas de alta densidade). As partículas de HDL têm como componentes principais a apo A I

(adquirida principalmente no fígado) e os fosfolipídeos. As HDL têm grande importância no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (transporte reverso de colesterol) (Gianinni, 1998).



Fluxograma 2. Via metabólica para sínteses de colesterol e ácidos biliares.
Fonte: Quintão (1992).

Na fase do transporte metabólico reverso de colesterol, as HDL nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação

da enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), formando as HDL maduras. Estas levam o colesterol para o fígado por duas vias: 1) diretamente e 2) transferindo os ésteres de colesterol para outras lipoproteínas (principalmente as VLDL), pela ação de uma proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP – *cholesterol ester transfer protein*). Uma vez no fígado, o colesterol proveniente dos tecidos pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou excretado na bile (principal via de eliminação), com reabsorção de cerca de dois terços do mesmo (ciclo êntero-hepático) (Forti & Diament, 2006).

As desordens no metabolismo lipídico são denominadas de dislipidemias e podem estar diretamente relacionadas com incidência de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão e esteatose hepática. De acordo com o documento IV Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, publicado em 2007, as dislipidemias podem obter classificação fenotípica ou bioquímica considerando os valores do CT, LDL, TG e do HDL (Quadro 1) (Sposito *et al.*, 2007).

Quadro 1. Classificação das dislipidemias.

Hipercolesterolemia isolada	Caracteriza-se pela elevação isolada do LDL
Hipertrigliceridemia isolada	Caracteriza-se pela elevação isolada dos TG, que reflete no aumento do volume de partículas ricas em TG como VLDL, IDL e quilomícrons
Hiperlipidemia mista	Caracteriza-se pelos valores aumentados de LDL e TG. Nestes indivíduos, pode-se também utilizar a diminuição do LDL como indicador e meta terapêutica
HDL Reduzido	Caracteriza-se pela diminuição do HDL isolado ou associado com aumento de LDL ou de TG

Segundo Sposito *et al.* (2007) as dislipidemias podem ainda ser classificadas quanto a sua etiologia, sendo divididas em primárias e

secundárias. As dislipidemias primárias possuem consequência genética e podem se manifestar em função da influência de fatores ambientais, devido à dieta inadequada e/ou ao sedentarismo. Essas englobam as hiperlipidemias (aumentos nos níveis plasmáticos de lipídeos) e as hipolipidemias (diminuições nos níveis plasmáticos de lipídeos). As dislipidemias secundárias possuem três etiologias diferentes:

- Dislipidemias secundárias a doenças (diabetes melito tipo II, hipotireoidismo, síndrome nefrótica, hepatopatias, entre outras);
- Dislipidemias secundárias a medicamentos (anti-hipertensivos, corticosteroides, estrógenos, entre outros);
- Dislipidemias secundárias a hábitos de vida inadequados (dieta, tabagismo e etilismo).

Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Batlouni, 1997).

A formação da placa aterosclerótica tem início com a agressão ao endotélio vascular, devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, R-QM), hipertensão arterial e tabagismo. Dessa forma, pode ocorrer disfunção endotelial aumentando a permeabilidade da íntima às lipoproteínas aterogênicas favorecendo assim a retenção das mesmas no espaço subendotelial (Sposito *et al.*, 2007; Garcia & Kanaan, 2008).

Nos vasos sanguíneos, as partículas de LDL retidas poderão sofrer oxidação, causando assim exposição de diversos neoepítomos, que as tornam imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial promoverá a adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial induzidas por proteínas quimiotáticas. Os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados células espumosas e são o

principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Essas lesões podem acabar obstruindo as artérias coronárias ocasionando uma isquemia, que poderá levar ao infarto agudo do miocárdio, ou poderão se desprender do vaso obstruindo veias de menor calibre formado assim êmbolos (Sposito *et al.*, 2007) (Figura 10).

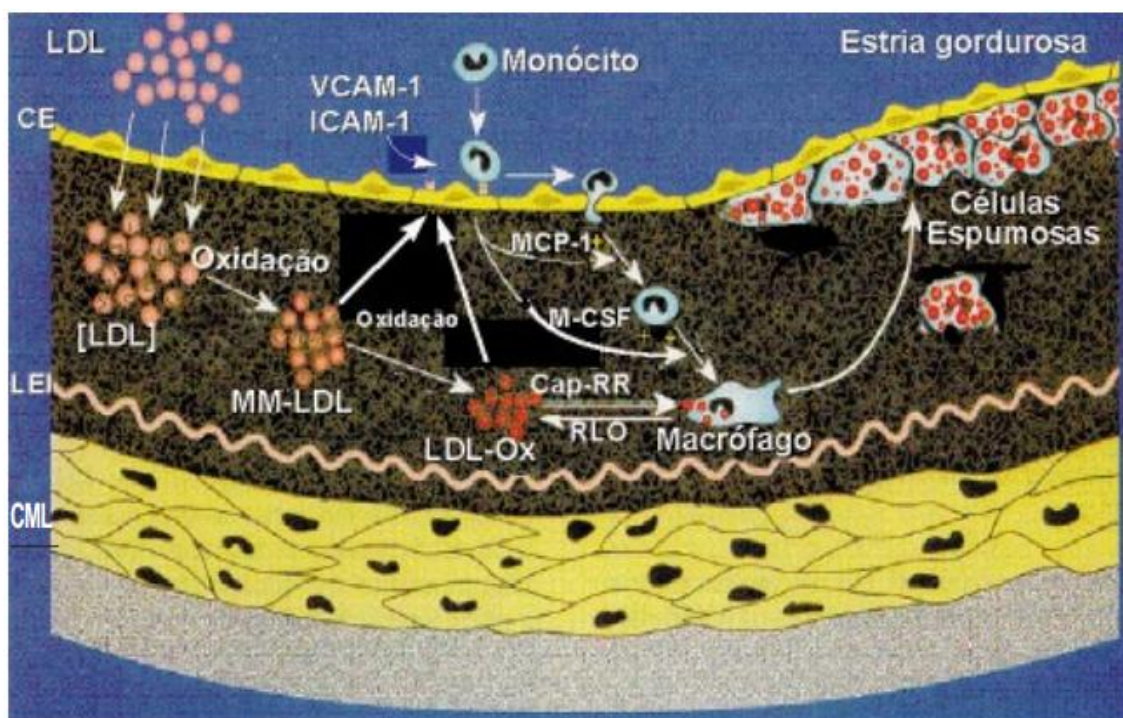


Figura 10. Representação esquemática da hipótese oxidativa e do papel das LDL-oxidadas no processo de aterogênese. LDL-oxidada estimula a quimiotaxia de monócitos e macrófagos favorecendo a formação de células espumosas e ateromas. CE: célula endotelial; LEI: lâmina elástica interna; CML: célula muscular lisa; MM-LDL: LDL minimamente oxidada; LDL-OX: LDL oxidada; VCAM-1: molécula de adesão das células vasculares; ICAM-1: molécula de adesão da célula intracelular; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos (entrada na intima); MCSF: fator estimulador das colônias de monócitos (diferenciação); CAP-RR: captação pelos receptores removedores dos macrófagos; RLD: radicais livres de oxigênio.

Fonte: adaptado de Batlouni (1997).

Terapia medicamentosa

Vários fármacos reduzem o LDL plasmático sendo utilizados juntamente com a prática de exercícios físicos e dieta recomendada (Rang *et al.*, 2007). Os principais agentes usados clinicamente são: estatinas (Inibidores da 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima (HMGCoA redutase) os fibratos, Inibidores da absorção do colesterol e os derivados do óleo de peixe.

As estatinas são os agentes mais efetivos e mais bem tolerados para o tratamento das dislipidemias. Esses fármacos são responsáveis pela inibição enzimática competitiva da HMGCoA redutase, que catalisa a conversão de HMGCoA a ácido mevalônico, sendo uma etapa limitante na síntese de colesterol. A diminuição da síntese hepática de colesterol regula para cima a síntese do receptor LDL, aumentando a remoção do mesmo do plasma para os hepatócitos. Portanto, sua principal função é reduzir o LDL plasmático (Rang *et al.*, 2007).

As estatinas mais potentes como a sinvastatina e atorvastatina, em doses mais altas, podem reduzir os níveis de triacilglicérides originados pela elevação da VLDL plasmática (Witztun, 1996).

As estatinas afetam os níveis de colesterol ao inibirem a síntese hepática de colesterol, resultando em um aumento da expressão do gene do receptor de LDL. O maior número de receptores LDL sobre a superfície dos hepatócitos resulta em remoção aumentada das LDL do sangue, diminuindo assim os níveis de LDL (Witztun, 1996).

Os triacilglicérides são consideravelmente reduzidos pelas estatinas sendo o percentual semelhante dos níveis de LDL (Witztun, 1996).

Entre os efeitos adversos das estatinas pode-se destacar a hepatotoxicidade, miopatia, rabdomiólise. Esses aumentam proporcionalmente com as concentrações plasmáticas de estatinas e o uso concomitante de outros fármacos, como fibratos, macrolídeos, warfarin, ciclosporina, antifúngicos imidazólicos e digoxina (Witztun, 1996).

O mecanismo de miopatia induzida por estatina ainda não foi bem esclarecido. Existem várias hipóteses na literatura sobre o exato mecanismo da miotoxicidade, como indução de apoptose celular, depleção de metabólitos intermediários da síntese de colesterol e alterações nos canais de condutância ao cloro dentro dos miócitos. Uma consequência grave da miopatia é a rabdomiólise, que pode levar a óbito se o quadro evoluir para insuficiência renal. A depleção de volume resulta em isquemia renal, obstrução tubular, devido aos cilindros pigmentados e ao ferro livre e quelado (Siqueira *et al.*, 2008)

Para destacar a importância da hiperlipidemia na população brasileira, um estudo conduzido em nove capitais, envolvendo 8045 indivíduos com idade

mediana de 35 ± 10 anos, no ano de 1998, revelou que 38% dos homens e 42% das mulheres possuem colesterol e triacilglicérides maior que 200 mg/dL. A pesquisa concluiu ainda que os valores de colesterol total foram mais altos no sexo feminino e nas faixas etárias mais elevadas (Henry, 2008).

De acordo com Wegener (2002), um efeito favorável sobre os lipídios séricos pode ser obtido pelo emprego de plantas medicinais ou derivados fitoterápicos, mas estes devem ser administrados em dosagem suficientemente elevada e por um período de tempo longo. Sua eficácia é menor se comparada a dos medicamentos sintéticos, mas sua tolerabilidade é maior.

Alguns fitoterápicos são úteis na prevenção ou no tratamento sintomático de aterosclerose e suas sequelas, que estão intimamente relacionadas com a taxa elevada de colesterol e triacilglicérides no sangue. Um valor especial é atribuído a espécie *Allium cepa* L. que além de agir no combate aos ateromas, também apresenta efeitos pleiotrópicos com ações vasodilatadoras e redutoras dos níveis de lipídeos (Schulz *et al.*, 2001).

2.8.2 Transtornos da ansiedade e do humor

Transtornos da ansiedade

De forma sumarizada, tem sido sugerido que os transtornos de ansiedade são causados por uma detecção falha e, por consequência, a expressão inadequada de comportamentos defensivos, gerando respostas fisiológicas (ex. taquicardia, sudorose e midríase) e psicológicas intensas (medo, por exemplo). Uma classificação por meio das características sintomatológicas divide os transtornos de ansiedade em: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade social e fobia simples (Carobrez, 2003).

Dentre os tratamentos atuais para o transtorno da ansiedade são utilizados os benzodiazepínicos e a buspirona. Para os benzodiazepínicos, o mecanismo de ação parece envolver o receptor ômega no sistema nervoso central (SNC) e o ácido gama-amino-butírico ($GABA_A$). Este último ao ser estimulado facilita a ação de GABA no receptor neuronal, promovendo hiperpolarização celular devido a um influxo de cloro. No Brasil, a buspirona, única droga ansiolítica pertencente a classe das azapironas comercializada,

tem seu mecanismo de ação explicado pelo agonismo parcial junto aos receptores 5-HT_{1A} pré e pós-sinápticos, reduzindo os disparos neuronais de serotina e conseqüentemente sua eficácia na estimulação nervosa (Andreatini *et al.*, 2001).

Os transtornos de ansiedade, assim como outras patologias neuropsiquiátricas, são de caráter multifatorial, prevalência elevada e alta morbidade, e se manifestam na maioria das vezes de forma crônica. Dessa forma, tem crescido a necessidade de se pesquisar novos tratamentos que sejam eficazes em reduzirem os sintomas (Ravindram & Stein, 2010).

No entanto, um fator limitante na pesquisa da ansiedade é a ausência de análogos no animal. Isso porque a ansiedade é um conceito que descreve um estado subjetivo, sendo este uma característica humana. Por isso, na melhor das hipóteses, ela pode ser apenas modelada e não reproduzida em animais. Porém, com o objetivo de mimetizar características comportamentais e patológicas da síndrome da ansiedade, vários modelos animais têm sido validados farmacologicamente utilizando benzodiazepínicos como padrão de ansiolíticos frente a drogas testes (Andreatini *et al.*, 2001).

Recentemente plantas medicinais incluindo *Ginkgo biloba* L., *Hipericum perforatum* L. e *Piper methysticum* G. Forst. têm sido amplamente investigadas e utilizadas para o tratamento de desordens mentais. Dentre as patologias tratadas estão os distúrbios do humor (depressão) e transtornos da ansiedade (Araújo *et al.*, 2009).

Transtorno do humor

Os transtornos de humor são desordens psiquiátricas em que há um predomínio de alterações de humor e sintomas vegetativos associados (mudanças no apetite, sono, peso e na libido), que perduram por semanas a meses. Entre os transtornos de humor, encontram-se aqueles em que predominam sintomas de tristeza e anedonia (depressão), e aqueles em que há excitação e euforia (mania). Na depressão, segundo critérios internacionais, deve haver obrigatoriamente presença de humor depressivo ou perda de interesse ou prazer durante pelo menos duas semanas, além de uma série de outros sintomas relacionados, tais como alterações psicomotoras e de sono,

redução no grau de concentração, variação de peso corporal e perda de energia (Vismari *et al.*, 2008).

Por mais de três décadas a etiologia da depressão tem sido explicada pela hipótese monoaminérgica. Essa teoria propõe que a depressão seja consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais em particular de serotonina, noradrenalina e dopamina (Vismari *et al.*, 2008).

O primeiro grupo fármacos utilizado para o tratamento dessa patologia surgiu na década de 1960 e foi denominado de tricíclicos (imipramina, amitriptilina etc). Na sequência, surgiram os inibidores da monoamina oxidase (por exemplo, iproniazida) e no ano de 1987 foi lançada no mercado a fluoxetina, droga pioneira cujo mecanismo de ação está relacionado com atividade inibidora seletiva da recaptação de serotonina (Campigotto *et al.*, 2008).

Apesar do recente progresso no desenvolvimento de drogas antidepressivas com relevância clínica, as terapias disponíveis não são totalmente eficazes e também estão associadas a indesejáveis efeitos colaterais (Whooley & Simon, 2000). Além disso, somente 60% dos pacientes são responsivos ao tratamento com os antidepressivos disponíveis atualmente no mercado (Gareri *et al.*, 2000). Por esta razão, pesquisas por novas substâncias que controlem os sintomas associados com as desordens depressivas são imprescindíveis.

2.8.3 Atividade antioxidante

Uma substância antioxidante pode ser definida como uma substância química que inibe o processo de oxidação. Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações, que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (Sousa *et al.*, 2007; Lima, 2008).

2.8.4 Atividade antimicrobiana

Atividade antibacteriana

A investigação sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido amplamente divulgada no meio científico. Em baixas

concentrações essas amostras vegetais exercem inibição sobre o crescimento de bactérias tanto Gram positivas como Gram negativas, sendo ativas também frente a leveduras e fungos filamentosos. Assim, extratos vegetais apresentam perspectivas na produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos, que possam ser usados na terapêutica de processos infecciosos (Edeltrudes, 2001).

Atividade antifúngica

O tratamento das infecções fúngicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos, representa um grande desafio para a clínica. Os fármacos disponíveis no mercado até o momento possuem além da toxicidade marcante (não diferencia célula-alvo de outras não infectadas), tendência à resistência. Essas são razões pelas quais permanentemente se prospectam novos agentes antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, menos tóxicos que os utilizados atualmente (Edeltrudes, 2001). Seguindo essa linha de raciocínio, várias substâncias bioativas são constantemente avaliadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais, equipamentos e solventes

Na microscopia vegetal foi utilizado micrótomo Leica® modelo 2145 no preparo das lâminas permanentes. Na análise ultraestrutural de superfície utilizou-se o equipamento Bal-Tec® modelo CPD 030 para realização do ponto crítico (CO₂) e a metalização com ouro foi realizada em equipamento SCD-030 Balzers Union® FL 9496. A observação dos fragmentos foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV.

Nas análises cromatográficas por CLAE utilizou-se cromatógrafo Varian® Pro-Star com injetor manual (alça de 20 µL), gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm). Os padrões analíticos utilizados foram rutina (CLAE ≥ 94%), quercetrina (CLAE ≥ 78%) e quercetina (CLAE ≥ 95%) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®, USA.

Na extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de extração SPE Phenomenex® Stracta C18-E (500 mg/3 mL).

No processo de filtração de amostras e solventes foram utilizados filtros Micropore® de teflon (0,45 µm).

Os solventes (MeOH, H₃PO₄, AcOH e HCO₂H) utilizados para as análises em CLAE foram adquiridos da J.T. Baker® grau HPLC. A água foi obtida por ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente. Os solventes MeOH, AcOEt, *n*-hexano, DCM, EtOH e CHCl₃ utilizados na análises fitoquímicas foram adquiridos da Tedia®, USA.

As análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de prótons (400 MHz) e de carbono (100 MHz) foram realizadas em equipamento Bruker® modelo DRX 400. A identificação das substâncias em espectrometria de massas foi obtida por meio de análise por infusão direta em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems® modelo API 3200) equipado com uma bomba seringa (Harvard Apparatus®, modelo Harvard 22 Dual) e fonte de ionização por eletrospray (ESI).

Os métodos espectrofotométricos de radiação ultravioleta e visível foram realizados (UV/Vis) em fotômetro digital semiautomático (BioSystems®, modelo BTS 310).

3.2 Desenvolvimento dos métodos

3.2.1 Coleta dos materiais vegetais e preparação de exsicatas

Realizou-se a coleta de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) em diferentes cidades (Chapecó, Pinhalzinho, Seara, Serra Alta e Abreu e Lima), meses e anos (Quadro 2).

Quadro 2. Locais e épocas das coletas para os materiais vegetais.

Planta medicinal	Cidade/latitude e longitude	Mes/ano	Amostra
<i>A. zerumbet</i>	Chapecó (26° 58' 36,06" S e 52° 44' 27,18" O)	out/2009	AZ1
	Pinhalzinho (26° 49' 19,16" S e 53° 00' 59,52" O)	fev/2010	AZ2
	Chapecó (26° 58' 36,06" S e 52° 44' 27,18" O)	jan/2011	AZ3
	Seara (26° 58' 36,06" S e 52° 44' 27,18" O)	ago/2011	AZ4
	Chapecó (26° 58' 36,06" S e 52° 44' 27,18" O)	ago/2011	AZ5
	Seara (26° 58' 36,06" S e 52° 44' 27,18" O)	jan/2012	AZ6
	Chapecó (26° 58' 36,06" S e 52° 44' 27,18" O)	jan/2012	AZ7
<i>S. chilensis</i>	Chapecó (27° 06' 38,83" S e 52° 34' 26,52" O)	abr/2010	SC1
	Chapecó (26° 56' 57,76" S e 52° 31' 47,76" O)	abr/2010	SC2
	Chapecó (26° 59' 31,03" S e 52° 41' 17,89" O)	abr/2011	SC3
	Chapecó (27° 06' 38,83" S e 52° 34' 26,52" O)	abr/2012	SC4
	Chapecó (26° 59' 31,03" S e 52° 41' 17,89" O)	abr/2012	SC5
<i>E. uniflora</i>	Chapecó (27° 05' 26,30" S e 52° 36' 19,46" O)	out/2009	EU1
	Serra Alta (23° 43' 07,95" S e 52° 58' 51,88" O)	nov/2010	EU2
	Chapecó (27° 05' 41,43" S e 52° 39' 39,19" O)	ago/2011	EU3
	Chapecó (27° 05' 41,43" S e 52° 39' 39,19" O)	jan/2012	EU4
	*Abreu e Lima (54° 42' 42" S e 34° 54' 10" O)	jan/2012	EU5

*Abreu e Lima está localizada no estado do Pernambuco. As demais cidades localizam-se no estado de Santa Catarina

Os materiais vegetais coletados foram identificados no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR, por Osmar dos Santos Ribas e as exsicatas estão depositadas sob o registro MBM 306196 (*A. zerumbet*), MBM 356792 (*S. chilensis*) e MBM 316818 (*E. uniflora*). O material foi devidamente preparado para a realização dos estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas.

3.2.2 Estudo morfoanatômico

Folhas desenvolvidas a partir do quarto nó de *A. zerumbet*, *S. chilensis* e *E. uniflora* juntamente com fragmentos dos caules obtidos entre 5 a 30 cm do ápice caulinar de *S. chilensis* e *E. uniflora* foram fixados em FAA 70 (formol: ácido acético: etanol 70% v/v 5:5:90 v/v) (Johansen, 1940) e estocados em etanol a 70% (v/v) em temperatura ambiente (Berlin & Miksche, 1976).

Preparo de lâminas semipermanentes

Lâminas semipermanentes foram obtidas a partir de secções transversais e longitudinais realizadas à mão livre, dos caules e do terço inferior das folhas (Quintas, 1963). Os cortes foram corados com azul de Astra e fucsina básica (Roeser, 1972) e montadas com glicerina a 50% (v/v) utilizando como lutagem esmalte incolor (Beçak & Paulete, 1976)

Preparo de lâminas permanentes

As lâminas permanentes foram obtidas a partir dos materiais vegetais desidratados em série etanólica (70 a 100% v/v) e emblocados em glicol-metacrilato (Leica Historesin®). Os cortes obtidos no micrótomo foram corados com azul de toluidina e montados com Entellan® (Kraus & Arduin, 1997).

Microscopia eletrônica de varredura

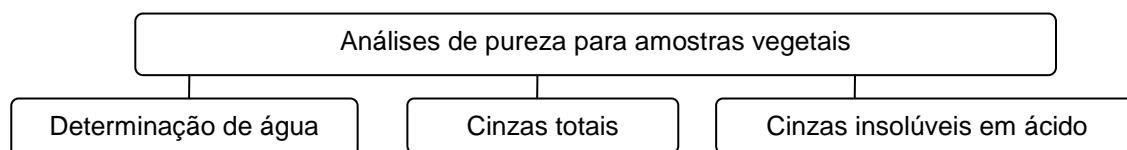
Para a análise ultraestrutural de superfície (microscopia eletrônica de varredura – MEV), foram utilizadas as amostras fixadas dos fragmentos vegetais que sofreram desidratação com concentrações crescentes de etanol pelo ponto crítico de CO₂. Na sequência, estas foram aderidas em suporte e realizou-se a metalização com ouro. As amostras metalizadas foram submetidas a alto vácuo e avaliadas em microscópio eletrônico (Souza, 1998).

3.2.3 Preparo dos materiais vegetais para análises químicas e farmacológicas

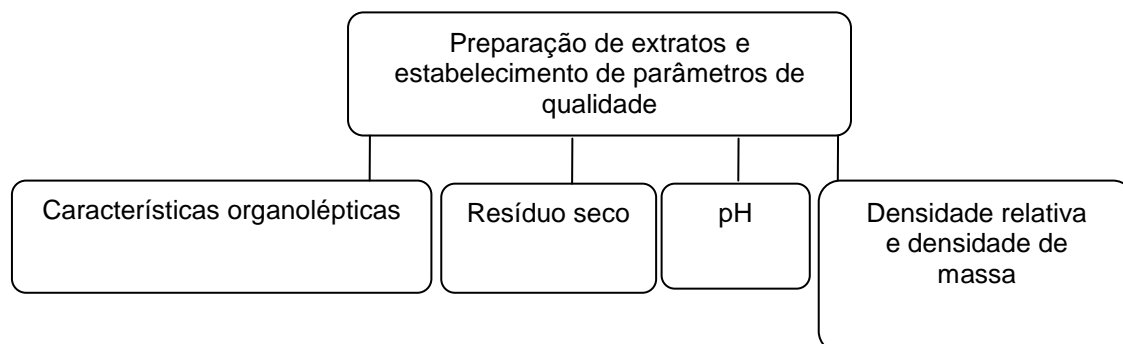
Os materiais vegetais coletados (folhas de *A. zerumbet* e *E. uniflora* e as partes aéreas vegetativas e reprodutivas de *S. chilensis*) foram transferidos para o Laboratório de Farmacognosia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó. Estes foram reduzidos a pequenos fragmentos e submetidos à secagem em temperatura ambiente, protegidos da luz direta e umidade. Na

sequência as espécies vegetais desidratadas foram trituradas em moinho de facas, selecionados em tamis de 425 μm (35 Tyler/Mesh), identificados e armazenados ao abrigo da luz.

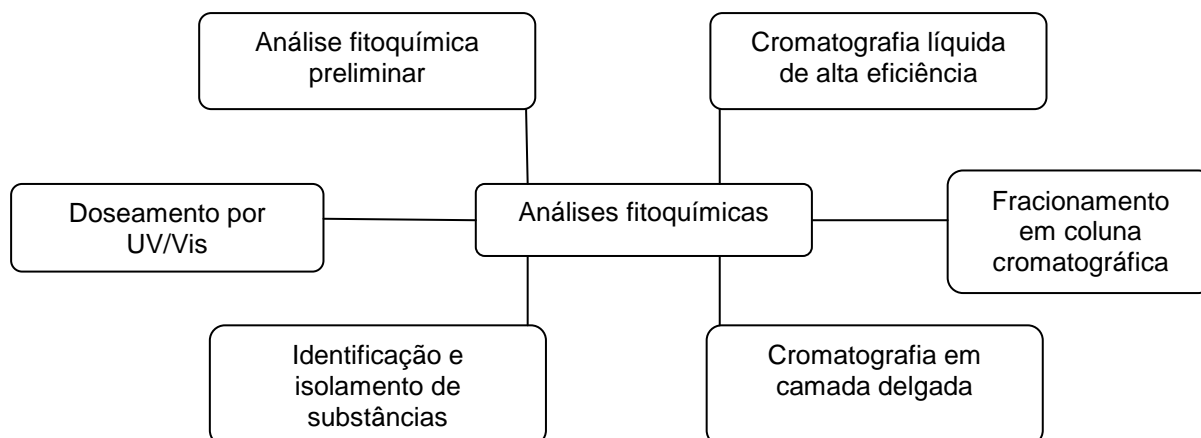
Com esses materiais vegetais realizaram-se pesquisas divididas em quatro etapas: 1) Análises de pureza para amostras vegetais (Fluxograma 3); 2) Elaboração e parâmetros de qualidade para os extratos vegetais (Fluxograma 4); 3) Análises fitoquímicas (Fluxograma 5); 4) Ensaio biológicos *in vitro* e *in vivo* (Fluxograma 6).



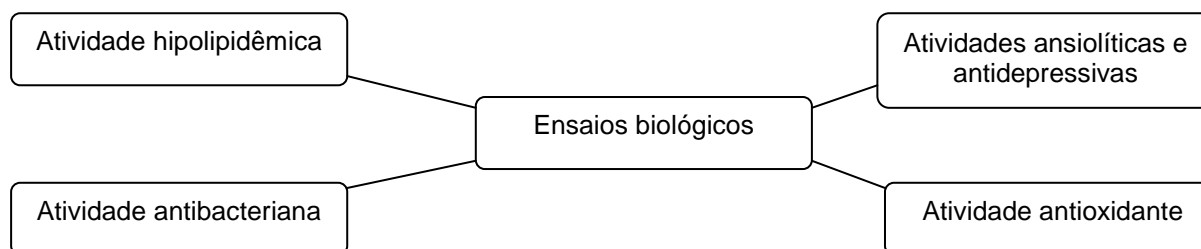
Fluxograma 3. Análises de pureza para as amostras vegetais.



Fluxograma 4. Preparação dos extratos e determinação de parâmetros de qualidade.



Fluxograma 5. Análises fitoquímicas.



Fluxograma 6. Ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

3.2.4 Análises de pureza para amostras vegetais

Determinação de água em drogas vegetais

Para cada amostra utilizou-se material vegetal (2 g) pulverizado com granulometria de 425 μm e realizaram-se oito repetições. Essas análises foram desenvolvidas por meio de método gravimétrico utilizando-se pesa-filtros previamente mantidos à estufa a 105 °C por duas horas e estocados em dessecador (FB 5, 2010). A porcentagem do teor de água foi obtida com relação ao material vegetal seco.

Determinação de cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas pesaram-se em triplicata as amostras vegetais (3 g) em cadinho de porcelana e realizou-se a análise conforme método farmacopeico (FB 5, 2010). A porcentagem do teor de cinzas foi obtida com relação ao material vegetal seco.

Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Nessa etapa ferveu-se o material obtido na determinação de cinzas totais e realizou-se análise conforme método farmacopeico (FB 5, 2010). Calculou-se a quantidade de cinzas insolúveis em relação ao material vegetal seco.

3.2.5 Preparação e determinação de parâmetros de qualidade para os extratos vegetais

Os extratos fluidos foram obtidos por percolação hidroalcoólica (etanol a 70% v/v) utilizando material vegetal dessecado de *A. zerumbet* (AZ1), *S. chilensis* (SC1) e *E. uniflora* (EU1) (500 g, 500 g e 200 g respectivamente) conforme preconizado pela FB 5 (2010). Com o mesmo método foram elaborados extratos fluidos para *S. chilensis* utilizando diferentes partes do vegetal dessecado (10 g de inflorescências, caules e folhas).

Ao final foram retiradas algumas alíquotas dos extratos fluidos obtidos para análises de controle de qualidade e o restante de cada extrato foi concentrado em rotavapor na pressão reduzida, liofilizado, pesado, identificado e estocado em freezer a -20 °C para posteriores ensaios.

Características organolépticas e sensoriais

Os extratos (10 mL) foram avaliados quanto aos aspectos sensoriais (cor, odor e sabor) utilizando fitas de papel-filtro (10 cm) impregnadas com as amostras (FB 5, 2010).

Determinação do resíduo seco

Nessa etapa os extratos (2 mL) foram transferidos para pesa-filtros previamente pesados e as amostras foram evaporadas até secura em estufa a 105 °C por três horas segundo método farmacopeico (FB 5, 2010) com cinco repetições para cada extrato. Calculou-se o resíduo seco em percentagem sobre o volume inicial.

Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A determinação do pH foi realizada em equipamento Quimis® Q-400A utilizando soluções calibradas (Quimis®) de pH 4,0, 6,8 e 11,4 para ajuste do

aparelho. Realizou-se avaliação com cinco repetições para cada extrato (10 mL) (FB 5, 2010).

Determinação da densidade relativa e densidade de massa

Para determinação da densidade relativa (D_{20}) utilizou-se picnômetro volumétrico (10 mL) Dist® e o experimento foi realizado sob temperatura controlada de 20 °C com três repetições para cada extrato. O método consiste em determinar inicialmente a massa de água e após a massa dos extratos fluidos (FB 5, 2010).

A densidade relativa (D_{20}) de cada extrato foi obtida pela fórmula:

$$D_{20} = \text{massa do extrato} / \text{massa de água}$$

Com os valores de densidade relativa obtidos, determinaram-se as respectivas densidades de massa (ρ_{20}) pela equação:

$$\rho_{20} = 0,99703 \cdot D_{20} + 0,0012$$

3.2.6 Análises fitoquímicas

Análise fitoquímica preliminar

Realizou-se análise fitoquímica para os seguintes grupos químicos: flavonoides, antraquinonas, cumarinas, saponinas, alcaloides, fenóis, taninos, glicosídeos cardiotônicos e óleos essenciais (Matos, 1997).

Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) para todos os extratos fluidos vegetais foi realizada aplicando-se 20 μ L em placa de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck® (lote HX772843) juntamente com 5 μ L dos padrões analíticos (quercetrina, ácido clorogênico, quercetina, rutina, apigenina, ácido tanico e ácido cafeico) diluídos em MeOH. O sistema eluente utilizado foi uma mistura das soluções: AcOEt:HCO₂H: AcOH:H₂O (100:11:11:27 v/v). As placas foram secas em temperatura ambiente, reveladas com difenilboriloxidietilamina a 1% em MeOH (m/v) e as bandas foram observadas em 366 nm em câmara de UV/Vis (Wagner & Bladt, 1996).

Para o extrato de *A. zerumbet* realizou-se também CCD aplicando-se 20 µL em placa de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck® (lote HX772843) juntamente com 5 µL dos padrões. O sistema eluente utilizado foi composto pela mistura das seguintes soluções: AcOEt:HCO₂H:H₂O (90:5:5 v/v). A placa foi seca ao ar em capela de exaustão e revelada com anisaldeído (1% v/v) e aquecida em estufa a 100 °C por 5 min (Wagner & Bladt, 1996).

Doseamento por espectrofotometria no UV/Vis

Doseamento de flavonoides nas amostras de *A. zerumbet* e *E. uniflora*

A quantificação de flavonoides nas diferentes amostras de *A. zerumbet* (AZ1 a AZ7) e *E. uniflora* (EU1 a EU5) foi realizada de acordo com Harnafi *et al.* (2007) com adequações. Nesse método 1 g das amostras vegetais de mesma granulometria (425 µm) e 75 mL da solução MeOH:H₂O:AcOH (140:50:10 v/v) foram submetidos a extração sob refluxo (30 min). Após a filtração os filtrados foram completados em balão volumétrico de 100 mL com o mesmo solvente. Uma alíquota de 5 mL dessa solução foi homogeneizada com 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio (0,5 g de cloreto de alumínio e 0,1 g de acetato de sódio diluídos em 100 mL de metanol) e a solução foi protegida da luz direta. Após 30 min realizou-se leitura em espectrofotômetro de UV/Vis a 425 nm utilizando como branco 5 mL da solução analisada misturada com 2 mL de água. Os resultados foram representados como mg de quercetina/100 g de material vegetal seco com seis repetições para cada amostra vegetal.

Doseamento de flavonoides nas amostras de *Solidago chilensis*

Realizou-se doseamento de flavonoides para todas as amostras de *S. chilensis* (SC1 a SC5) e para diferentes partes da planta (folhas, inflorescências e partes aéreas), da amostra SC1 conforme método farmacopeico (F. Bras IV, 1988-2005) com três repetições e obteve-se a porcentagem de flavonoides totais segundo a fórmula:

$$\text{TFT} = \frac{\text{Abs.62,500}}{500.m.(100 - PD)} (\%; p / p)$$

Em que

Abs = absorvância;

m = massa da droga (g);

PD = perda por dessecação (%; p/p)

O resultado é fornecido em porcentual (p/p) de flavonoides totais calculados como hiperosídeo (C₂₁H₂₀O₁₂).

Determinação de fenóis totais de *Alpinia zerumbet*, *Solidago chilensis* e *Eugenia uniflora*

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada conforme Souza *et al.* (2007). Dessa forma, para os extratos fluidos das espécies estudadas, empregou-se o método de Folin–Ciocalteu na região do visível com modificações. Os extratos liofilizados (0,1 g) foram dissolvidos em MeOH e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final nos balões foi completado com o mesmo solvente. Uma alíquota de 7,5 mL de cada solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e esta segunda solução foi completada com MeOH. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min e na sequência, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% (m/v) foram adicionados à mistura que foi agitada por 30 s. Por fim, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada.

Após 2 h, as absorvâncias das amostras foram medidas a 750 nm utilizando-se cubetas de quartzo, tendo como controle o MeOH e todos os reagentes, menos os extratos. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação das absorvâncias das amostras em curva analítica obtida com padrão de ácido gálico (2,5 a 50 µg/mL) e expresso como miligramas de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato com três repetições.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para os extratos fluidos

Análise cromatográfica por CLAE de *Alpinia zerumbet*

O extrato fluido obtido de *A. zerumbet* foi submetido à partição com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano e AcOEt). As análises cromatográficas foram realizadas com amostras da fração AcOEt de acordo com Victório *et al.* (2009) com modificações. Utilizou-se cromatógrafo Varian®

Pró-Star com injetor manual (20 μ L), gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5 μ m) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C.

Duas misturas de solventes foram utilizadas: H₂O:H₃PO₄ (0,1% v/v) (solvente **A**) e MeOH (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 70% de **A** por 5 min, 60% de **A** 10 min e 100% de **B** por 20 min. A vazão foi de 1 mL/min. A detecção foi realizada em 254 nm e os resultados foram comparados com padrão externo autêntico com tempos de retenção seguidos de espectro de UV.

Para elaboração de curva analítica foram utilizadas as soluções metanólicas de rutina (Sigma-Aldrich® $\geq 94\%$ USA, lote: BCBB6174) nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ g/mL, sendo as análises cromatográficas em CLAE realizadas em triplicata.

Como amostras, além da fração AcOEt (FAC) que foi dissolvida em MeOH (10 mg/mL), também foi utilizada fração AcOEt (10 mg/mL) submetida a cartucho de extração por fase sólida SPE Phenomenex® Stracta C18-E (500 mg/3 mL) (FAFSA) com eluente de solvatação e limpeza MeOH 5% (v/v) e de extração MeOH 100%. As amostras e solventes foram filtradas em filtros Micropore® (0,45 μ m) antes de serem injetadas no cromatógrafo.

Análise cromatográfica por CLAE de *Solidago chilensis*

Foram realizadas análises por CLAE para extratos fluidos das inflorescências (INF), partes aéreas (PA), folhas e caules (FC), obtidos de amostras do vegetal seco (10 g). Os ensaios foram realizados de acordo com Apáti *et al.* (2006) com modificações e utilizou-se cromatógrafo Varian® Pró-Star com injetor manual (20 μ L), gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5 μ m) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C.

Dois sistemas de solventes foram utilizados, H₂O:AcOH (40:1 v/v) (solvente **A**) e CH₃CN (solvente **B**). A análise foi realizada em temperatura de 22 °C com vazão de 1 mL/min. O gradiente utilizado foi 86% de **A** por 15 min, 65% de **A** por 30 min e 100% de **B** por 2 min. A detecção foi realizada em 360

nm e os resultados foram comparados com padrão externo autêntico com tempos de retenção seguido de espectro de UV.

Para obtenção de curva analítica foram utilizadas soluções metanólicas do padrão quercetrina (78%≥ Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 450 µg/mL sendo o perfil cromatográfico em CLAE realizado em triplicata.

As amostras foram dissolvidas em metanol (1 mg/mL) filtradas como os solventes em filtros Micropore® (0,45 µm) antes da análise.

Análise cromatográfica por CLAE de *Eugenia uniflora*

As análises cromatográficas foram realizadas conforme Hoffmann-Ribani & Rodrigues-Amaya (2008) com adequações e utilizou-se a fração AcOEt (10 mg/mL) obtida da partição com o extrato fluido. Essa amostra foi submetida à extração por fase sólida em cartucho SPE Phenomenex® Stracta C18-E (500 mg/3 mL) (FAFSE) e utilizou-se como eluente de aplicação e limpeza MeOH a 5% (v/v) e de extração de MeOH. Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo Varian® Pró-Star com injetor manual (20 µL), gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm) em temperatura de 24±2 °C.

Dois sistemas de solventes foram utilizados, MeOH (solvente **A**): H₂O (HCO₂H 0,3% v/v) (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 20% de **A** por 6 min, 52% de **A** por 15 min, 72% de **A** por 27 min e 10% de **A** por 30 min. A vazão foi de 0,8 mL/min. A detecção foi realizada em 370 nm e foi utilizado padrão externo autêntico com tempos de retenção seguido de espectro de UV.

Para elaboração de curva analítica foram utilizadas soluções metanólicas do padrão quercetina (anidra Sigma-Aldrich® USA, lote: 020M1566) nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL, sendo as análises cromatográficas em CLAE realizadas em triplicata.

Todos os extratos e solventes foram filtrados em filtros Micropore® (0,45 µm) antes do perfil cromatográfico.

Fracionamento dos extratos em colunas cromatográficas

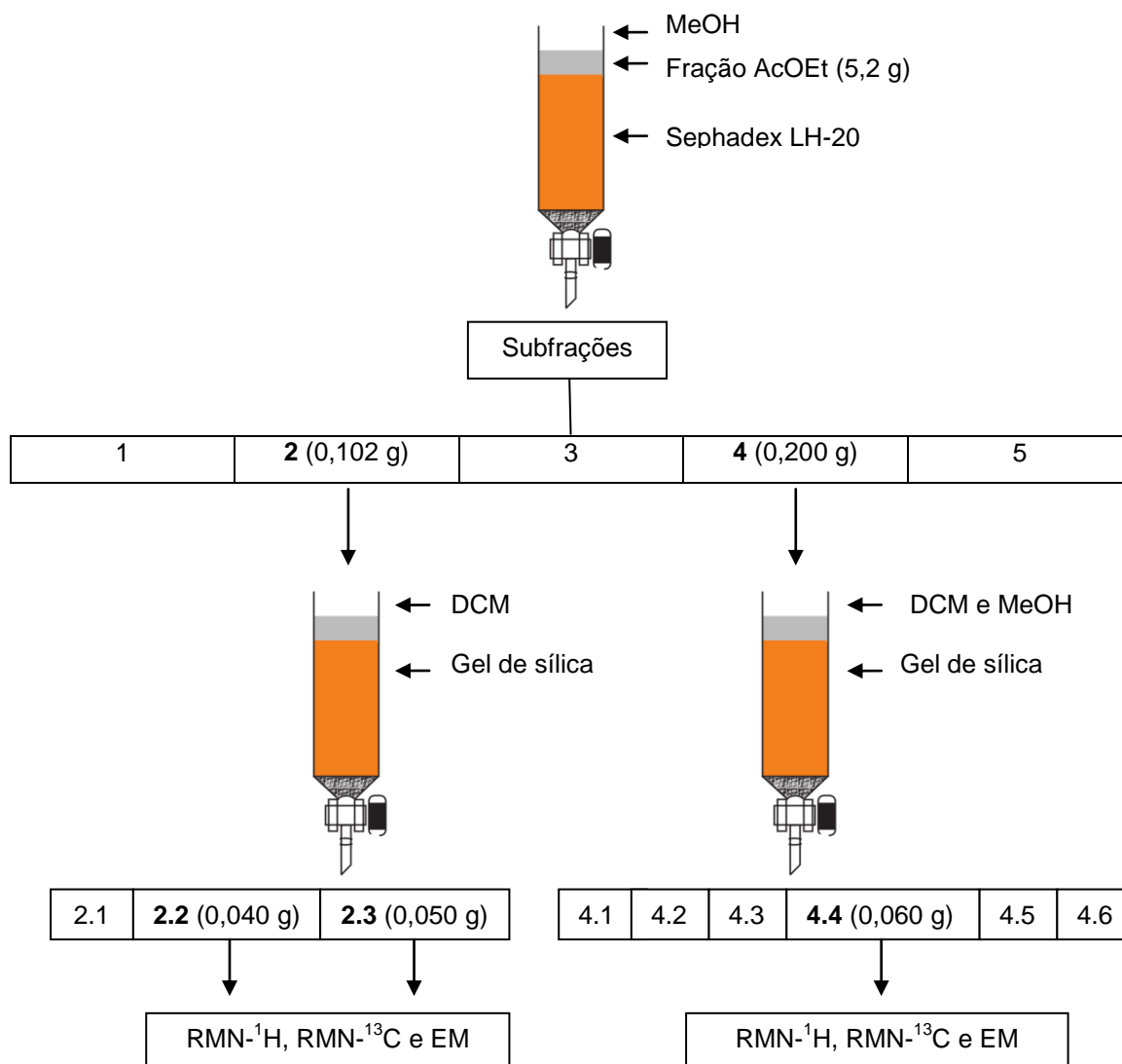
Fracionamento de *Alpinia zerumbet*

Uma amostra vegetal (500 g) com granulometria de 800 μm foi adicionada ao percolador (Permuton®) e foi realizada extração com etanol a 70% (v/v). Após a exaustão, o extrato obtido foi concentrado até o volume de 500 mL em rotavapor sob pressão reduzida e realizada partição em funil de separação com *n*-hexano e AcOEt. A fração AcOEt foi concentrada até resíduo (6,7 g) e uma amostra dessa fração (5,2 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e MeOH como eluente.

Foram obtidas cinco subfrações que foram reunidas por apresentarem semelhança através da análise em CCD utilizando fase móvel DCM e MeOH (90:10 v/v) com visualização em câmara de UV 254 nm.

A subfração 2 (0,102 g) apresentou bandas em CCD com extinção de fluorescência a 254 nm e foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária gel de sílica e eluente o DCM. Foram reunidas duas subfrações 2.2 (0,040 g) e 2.3 (0,050 g) que foram submetidas a análises espectroscópicas de RMN-¹H, RMN-¹³C (Bruker® 400 MHz e 100 MHz, respectivamente) e EM (ESI).

A subfração 4 (0,200 g) analisada por CCD e revelada com cloreto de alumínio a 1% (m/v) em MeOH com posterior análise em câmara de UV a 366 nm, indicou banda fluorescente ($R_f \pm 0,9$) evidenciando substâncias fenólicas. Essa subfração foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária gel de sílica e como eluente mistura em polaridade crescente de DCM e MeOH (2,5 a 50% v/v). Foram reunidas por semelhança em CCD 6 subfrações. A subfração 4.4 (0,060 g) evidenciou perfil cromatográfico de apenas uma substância e foi encaminhada para análises espectroscópicas de RMN-¹H e RMN-¹³C. Uma observação mais didática desta etapa de fracionamento pode ser observada no esquema 1.



Esquema 1. Fracionamento da fração acetato de etila das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) e obtenção de subfrações.

Fracionamento de *Solidago chilensis*

Uma amostra do extrato fluido liofilizado (50 g) das partes aéreas foi diluída em béquer com água (500 mL) e agitada por 20 min. Posteriormente a solução foi transferida para o funil de separação e efetuaram-se partições (n=10) com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano e AcOEt). Observou-se na fração AcOEt formação de um precipitado amarelo que foi lavado com o mesmo solvente e submetido a análises espectroscópicas de RMN-¹H, RMN-¹³C e EM (ESI).

Uma amostra de 1,0 g da fração AcOEt foi dissolvida em quantidade suficiente de CHCl_3 e submetida à cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária gel de sílica (Merck®).

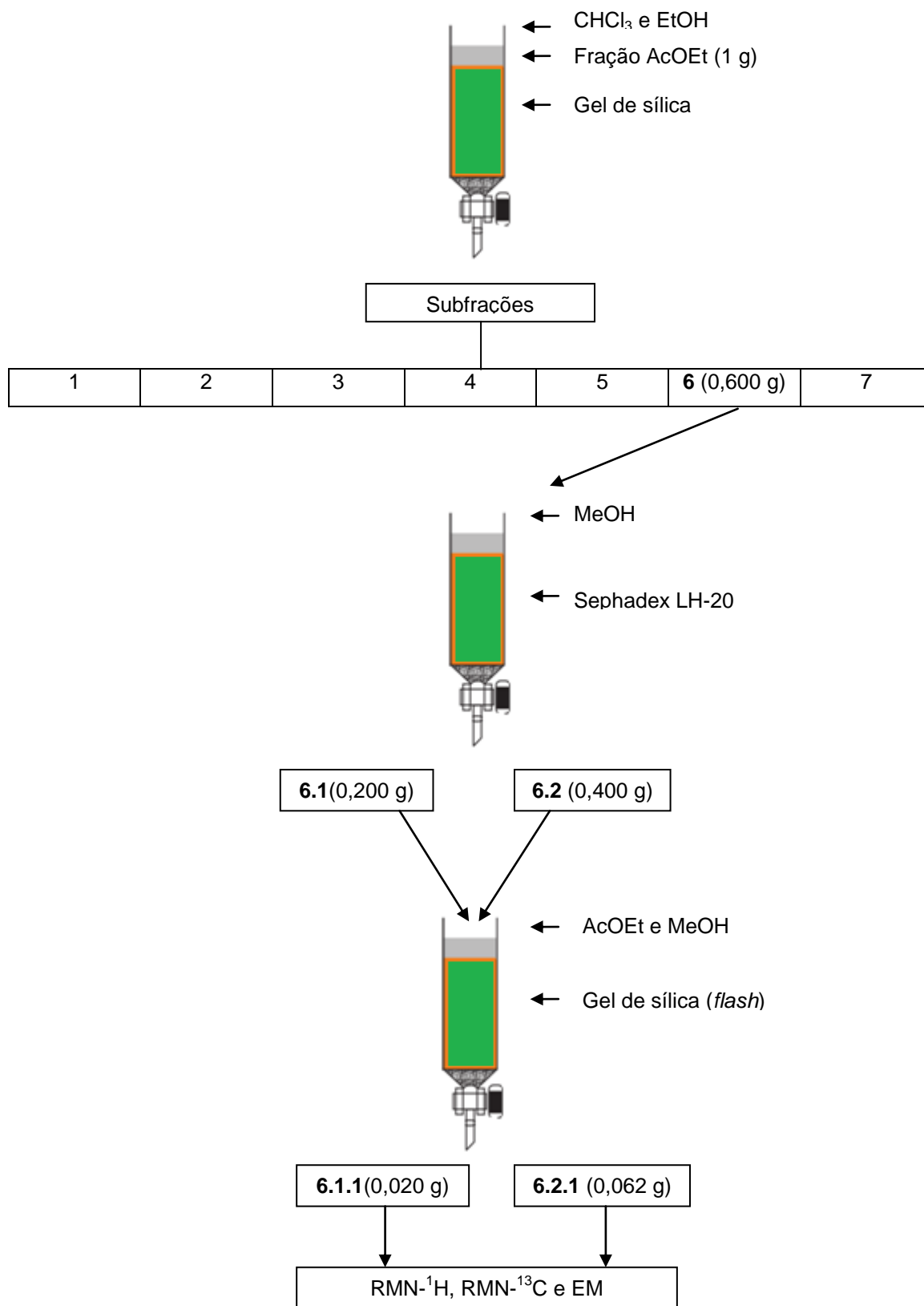
A eluição da coluna foi realizada com alíquotas de 50 mL de CHCl_3 e EtOH em polaridade crescente até EtOH 50% (v/v). As subfrações foram reunidas por semelhança em CCD empregando como fase móvel AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10 v/v) e analisadas em câmara de UV/Vis a 366 nm. Obtiveram-se sete subfrações que foram concentradas em rotavapor sob pressão reduzida, pesadas e acondicionadas em frasco âmbar.

A subfração 6 (6= 0,600 g) foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 (Fluka®) e fase móvel MeOH. O monitoramento das subfrações foi efetuado por CCD com análises em câmara de UV/Vis a 366 nm. Obteve-se por semelhança cromatográfica duas subfrações denominadas 6.1 e 6.2.

A subfração 6.1 (0,200 g) foi submetida para coluna cromatográfica (*flash*) e o fracionamento foi obtido com a fase móvel AcOEt e MeOH em polaridade crescente. A subfração 6.1.1 (0,020 g) foi encaminhada para análises espectroscópicas de RMN-¹H, RMN-¹³C e EM (ESI).

A subfração 6.2 (0,400 g) foi fracionada a coluna cromatográfica (*flash*) e realizou-se o fracionamento com a mistura dos solventes AcOEt e MeOH em polaridade crescente. A subfração 6.2.1 (0,062 g) foi encaminhada para análises espectroscópicas de RMN-¹H, RMN-¹³C e EM (ESI).

Uma visão mais didática do fracionamento da fração AcOEt de *S. chilensis* pode ser obtida no esquema 2.



Esquema 2. Fracionamento da fração acetato de etila das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) e obtenção de subfrações.

3.2.7 Ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*

Atividades antimicrobianas

As atividades biológicas antibacterianas e antifúngicas *in vitro* visando determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentrações Bactericidas e Fungicidas Mínimas (CBM e CFM) foram realizadas em triplicata e estão de acordo com o método preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/NCCLS, 2005) e Holetz *et al.* (2002). Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), os extratos fluidos liofilizados das espécies medicinais (folhas para *A. zerumbet* e *E. uniflora* e partes aéreas de *S. chilensis*) (10 mg) foram diluídos em DMSO (2% v/v), filtrados e novamente diluídos em 1/5 em caldo Mueller-Hinton (CMH), resultando em uma concentração final de 2 mg/mL (Solução Mãe - SM). Utilizaram-se placas de microdiluição estéreis com 96 orifícios, contendo em cada orifício 100 µL de CMH.

Na sequência adicionaram-se 100 µL de SM ao primeiro orifício (1 mg/mL). Após a homogeneização da amostra, transferiram-se 100 µL do primeiro para o segundo orifício (500 µg/mL) e assim, sucessivamente até o sétimo orifício. As concentrações finais, do primeiro até o sétimo orifício foram as seguintes: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL. O oitavo orifício foi destinado ao controle positivo de crescimento (CMH e o micro-organismo avaliado) e o último orifício recebeu solução de DMSO (2% v/v). Em todos os orifícios foram adicionados 5 µL da suspensão de micro-organismos teste padronizada e, em seguida a placa foi incubada a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 e 48 h.

A CIM foi evidenciada pela ausência de 80% do crescimento no orifício da placa de microdiluição, onde se observou a menor concentração da amostra teste comparado com o padrão de crescimento.

Os micro-organismos da *American Type and Culture Collection* (ATCC) utilizados no teste antibacteriano foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) disponibilizados pelo Laboratório de Microbiologia da UNOCHAPECÓ.

Na padronização dos micro-organismos foram acrescidas alíquotas de caldo Mueller-Hinton a um tubo de ensaio contendo solução salina até

obtenção de turvação igual à solução referência (escala Mcfarland: suspensão de BaSO₄ 1,5 x 10⁸ UFC/mL). O passo seguinte foi diluir 100 µL da solução salina em 900 µL de caldo Mueller-Hinton.

Os antibióticos de referência foram: penicilina (Sigma®) para *S. aureus*. (5 µg/mL); tetraciclina e vancomicina (Sigma®) para *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (25 µg/mL).

A concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada após a observação da CIM caracterizada pela ausência de crescimento no orifício da microplaca de diluição, na menor concentração da amostra teste. O passo seguinte foi realizar plaqueamento da concentração da droga teste, com o orifício que apresentar a menor CIM, e de dois orifícios posteriores sem crescimento microbiano, em placa com meio ágar Mueller-Hinton (AMH). Para tanto com auxílio de alça de sementeira cerca de 10 µL de amostra foram transferidas do orifício isento de crescimento para placa de petri com meio nutriente. Após incubação da placa em estufa bacteriológica por 24 e 48 h a 37 °C realizou-se a leitura da mesma considerando a CBM, quando ocorre morte de 99,9% do micro-organismo.

Na avaliação da atividade antifúngica para os extratos liofilizados amostras (10 mg) foram diluídas em solvente adequado (DMSO 2% v/v), e em seguida novamente diluídas em caldo dextrose Sabouraud (CDS), originando uma concentração final de 2 mg/mL (Solução Mãe - SM). A todos os 96 orifícios da placa estéril de microdiluição foram adicionados 100 µL de CDS. Na sequência foram adicionados 100 µL da SM para o primeiro orifício contendo 100 µL de CDS. Realizou-se homogeneização e transferiram-se 100 µL para o segundo orifício (500 µg/mL) e assim, sucessivamente até o sétimo orifício obtendo-se as respectivas concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL. O oitavo orifício foi destinado ao controle positivo de crescimento, onde se encontra apenas o CDS e o micro-organismo teste e o último orifício recebeu solução de DMSO (2% v/v). Em todos os orifícios foram adicionados 5 µL da suspensão de microrganismo padronizada. Em seguida a placa foi incubada a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 e 48 h.

A CIM foi observada após o período de tempo, pela ausência de crescimento no orifício da microplaca de diluição na menor concentração da

droga. O micro-organismo utilizado no teste antifúngico foi *Candida albicans*, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia da Unochapecó.

Para a padronização do micro-organismo as amostras foram cultivadas em CDS por 24 h a 37 °C, a partir de colônia isolada em placa de petri. Realizou-se padronização do tubo a 0,5 da escala Mcfarland $1,5 \times 10^6$ UFC/mL e conseqüente diluição 1/10 (v/v) da suspensão de fungos em CDS.

Para o padrão com antibiótico utilizou-se Micostatin® (Nistatina). Pesou-se 1 mg da amostra e diluiu-se em 50 µL de DMSO acrescentando-se 950 µL de água destilada, denominada de solução **A** (concentração de 1 mg/mL). A solução **A** foi novamente diluída 1/20 (v/v) em CDS originando a solução **B** (concentração de 50 µg/mL). A solução **B** foi diluída a 50% (v/v) com meio de crescimento no orifício, com concentração de 25 µg/mL. Micostatin® (Nistatina) possui valor de referência para CIM de 1,56.

Determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM) pela subcultura do orifício sem crescimento no teste de determinação do CIM, que foi transferida com auxílio de uma alça de semeadura (cerca de 10 µL) para placa de petri contendo ágar dextrose Sabourand (ADS). As amostras foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 48 h. Considera-se a concentração fungicida mínima quando essa subcultura com amostra mata 99,9% do micro-organismo.

Atividade antioxidante

Neste trabalho optou-se pelo método baseado na transferência de elétrons de uma substância antioxidante para o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) que ao se reduzir, perde a sua coloração púrpura, tornando-se amarelo. Os ensaios realizados em triplicata seguiram a metodologia descrita na literatura (Bianco & Santos, 2010; Sousa *et al.*, 2007) e o consumo de DPPH foi monitorado através da medida do decréscimo da absorvância das soluções das amostras, em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu a 518 nm. Os extratos fluidos foram diluídos em etanol, obtendo-se soluções nas concentrações: 1,25; 2,5; 5,0; 12,5; 25; 50; 100 e 150 µg/mL que foram adicionadas (2,5 mL) à solução de DPPH/etanol (1,0 mL; 0,3 mmol/L). O controle se deu apenas pela reação de etanol (2,5 mL) com a solução de DPPH/etanol (1,0 mL; 0,3 mmol/L), enquanto que o branco apenas pela mistura

de etanol (1 mL) com as soluções tratamentos (2,5 mL), de modo que, para cada concentração existiu um branco. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e nas mesmas condições de análise (30 min; 25 °C) e os resultados foram expressos a partir da seguinte base de cálculo:

$$AA\% = \{ [(Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})) \cdot 100] / Abs_{controle} \}$$

Onde:

Abs = absorvância. Para comparação foram utilizados como controles positivos os padrões de quercetina e rutina.

A concentração eficiente (CE₅₀), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% foi determinada usando o programa GraphPad Prism®, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (mg/mL) e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente.

Atividade hipolipidêmica

O protocolo experimental foi aprovado junto ao comitê de ética no uso de animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (n° 574) (Anexo 1). Os ratos com aproximadamente 80 dias de vida foram acondicionados individualmente em gaiolas biológicas de 17 x 33,5/40,5 cm na sala de experimentação. Estes foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), com ruídos mínimos, temperatura ambiente de aproximadamente 22 °C±2 °C, e umidade mantida por sistema de ar condicionado. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores Nutrilab CR1 (Nuvital®) e água *ad libitum*.

Protocolo experimental

A população de animais utilizados foi de 48 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (*albinus*), machos, jovens, pesando aproximadamente 250 g. Esse número de animais se justifica, pois o modelo biológico escolhido pode possibilitar variações nos parâmetros bioquímicos alcançados em virtude da fisiologia de cada animal (Pankaj *et al.*, 2010).

As gaiolas contendo os animais foram distribuídas de modo randômico na sala de experimentação e por sorteio simples, três destas formaram o grupo normal (N) que prosseguiu se alimentando com ração Nuvilab® e água. Os animais das demais gaiolas formaram o grupo induzido (I) e foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica (ração acrescida de 1% de colesterol + 0,1% de ácido cólico Sigma-Aldrich®).

No primeiro e 15 dias após o início do experimento, retirou-se dos animais de ambos os grupos através da veia caudal, aproximadamente 1 mL de sangue para realização de análises bioquímicas.

Após 15 dias de alimentação os animais do grupo I foram divididos de forma randômica em sete grupos de seis animais cada grupo. Os tratamentos nos grupos (com administração via oral, intragástrica) tiveram duração de 30 dias e foram os seguintes: controle (água destilada 0,5 mL) (C), extratos fluidos de *S. chilensis* (150, 300 e 600 mg/kg respectivamente) (HE 150, HE 300 e HE 600), quercetrina (10 mg/kg) (QRT), extrato fluido de *A. zerumbet* (300 mg/kg) (ALP) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV).

O quadro 3 apresenta uma observação mais didática do modelo experimental proposto.

Quadro 3. Modelo experimental hipolipidêmico: tratamentos (n=6) com administração oral intragástrica por 30 dias.

Dieta dos animais	Grupos	Tratamento por 30 dias
Normal	N	-
Hipercolesterolêmica (ração Nuvilab® acrescida de 1% de colesterol + 0,1% de ácido cólico)	C	Água
	HE 150	Extrato <i>S. chilensis</i> (150 mg/kg)
	HE 300	Extrato <i>S. chilensis</i> (300 mg/kg)
	HE 600	Extrato <i>S. chilensis</i> (600 mg/kg)
	QRT	Quercetrina (10 mg/kg)
	ALP	Extrato <i>A. zerumbet</i> (600 mg/kg)
	SINV	Sinvastatina (4 mg/kg)

O tempo total em que os animais foram submetidos à pesquisa foi de 45 dias e após o encerramento do protocolo de experimentação, todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (*i.p*) com uma mistura na mesma

seringa de quetamina e xilasina (75 e 10 mg/kg, respectivamente) e foram retiradas amostras de sangue por punção cardíaca e imediatamente foi realizada eutanásia com superdosagem do anestésico.

As alíquotas de sangue foram centrifugadas (3000 x g) para a obtenção do soro e avaliação de parâmetros bioquímicos como triacilglicérides (TG), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade colesterol (HDL-C) e alanina aminotransferase (ALT). Lipoproteínas de baixa densidade colesterol (LDL-C) foram calculadas a partir da equação de Friedewald $LDL-C = TC - HDL-C - (TG/5)$ e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) foram calculadas a partir do colesterol total $(CT - HDL-C - LDL-C = VLDL)$ (Sposito *et al.*, 2007). O índice aterogênico (IA) foi calculado segundo o método descrito por Xia *et al.* (2011) $(CT/HDL-C)$. Esses ensaios foram realizados com Kits comerciais Labtest® através de métodos espectrofotométricos de radiação ultravioleta e visível (UV/Vis) em fotômetro digital semiautomático (BioSystems®, modelo BTS 310) disponível no laboratório de Bioquímica da UNOCHAPECÓ. Alíquotas de soro também foram empregadas na quantificação de interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), proteína C reativa (PCR), LDL-colesterol oxidada (LDL-ox) e auto-anticorpos anti LDL-oxidada (anti LDL-ox).

Foram retirados de todos os animais, após procedimento de eutanásia, os fígados para pesagem, análises histopatológicas, antioxidantes e a avaliação de atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMGCoA) redutase.

Atividade da HMGCoA redutase

A atividade da HMGCoA redutase foi indiretamente mensurada nos termos da razão entre HMCoA e mevalonato (Rao & Ramakrishnan, 1975). Amostras dos tecidos hepáticos foram rapidamente removidas dos animais e preparadas em homogenato (solução de salina arseniato 10% massa/volume). A HMGCoA foi determinada pela reação com hidroxilamina em pH alcalino e subsequente análise colorimétrica do ácido hidroxânico resultante da formação de complexos com sais de ferro em 540 nm. O mevalonato foi estimado pela reação com o mesmo reagente, mas em pH 2,1. Neste pH a forma lactona do mevalonato reage rapidamente com hidroxilamina para formar o hidroxamato.

A razão entre HMGC_oA e mevalonato é inversamente proporcional a atividade da enzima HMGC_oA redutase.

Análise do colesterol fecal

O material fecal foi coletado nos últimos três dias do experimento e o método utilizado está de acordo com Kaiek *et al.* (1984) com modificações. As fezes foram secas em estufa a 60 °C por 24 h e as amostras pulverizadas (0,5 g) foram adicionadas de isopropanol. O material foi submetido à agitação e foi estocado a -20 °C por 24 h com subsequente centrifugação (12000 x g). O sobrenadante foi então analisado quanto à concentração de colesterol total de modo semelhante ao soro em 500 nm.

Quantificação de citocinas, LDL-ox e anti LDL-ox

A quantificação de citocinas foi avaliada por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando kits comerciais para uso humano, IL-1, IL-6, IL-10, TNF α e IFN γ , (eBioscience, San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e os níveis de homocisteína ensaiadas pelo analisador Immulite (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Califórnia).

LDL-ox foi determinada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Merckodia AB, Uppsala, Suécia) e como descrito anteriormente por Wu & Lefvert (1995). As amostras de soro foram adicionadas a orifícios de microplacas revestidas com anticorpos de elevada afinidade para LDL-ox. Um anticorpo conjugado com peroxidase e tetrametilbenzidina (TMB) como substrato para a peroxidase foram utilizados. A intensidade da cor amarela, que é diretamente proporcional à concentração de LDL-ox, foi observada a 450 nm. Uma curva padrão foi gerada a partir padrão LDL-ox. Anti LDL-ox foi determinada utilizando ELISA, como descrito por Wu & Lefvert (1995) e Holvoet *et al.* (1998). As amostras de soro foram adicionadas a poços de microplacas revestidas com anticorpos de alta afinidade (LDL-ox). A metodologia foi semelhante ao utilizado para quantificar LDL-ox e a intensidade da cor amarela, que foi diretamente proporcional à concentração anti LDL-ox que foi observada a 450 nm. Uma curva padrão foi gerada a partir do padrão anti LDL-ox.

Atividades farmacológicas no SNC

O projeto foi aprovado pelo CEUA da Universidade Regional Integrada com número de protocolo 091/PGA/2011 (Anexo 2). Foram utilizados camundongos machos albinos (*Mus musculus*) da linhagem CF1 (25-30 g; n=6 cada grupo teste). Os camundongos foram mantidos com água e comida *ad libitum*, ciclo de luz de 12 h (das 7 às 19 h) e temperatura controlada de 22±1 °C. Os grupos testados foram: controle (C) (água destilada 10 mL/kg), extratos padronizados de *A. zerumbet* (200, 400 e 800 mg/kg) (AZ 200, AZ 400 e AZ 800, respectivamente), diazepam (DZP 1) e imipramina (IMI 20) (1 mg e 20 mg/kg via oral e intraperitonal, respectivamente) 60 min antes dos experimentos (Araújo *et al.*, 2009).

Atividade exploratória

Os grupos de animais: C, DZP 1, AZ 200, AZ 400 e AZ 800 foram submetidos por 5 min ao teste de campo aberto (*open field*) para avaliação de atividade exploratória. O aparato consiste em uma arena dividida em doze quadrantes, localizado em ambiente de baixa intensidade luminosa. Avaliaram-se a latência (tempo em que o animal após ser inserido no centro do aparato, inicia a locomoção), a ambulação (número de cruzamentos), levantar das patas (*rearing*), autolimpeza (*grooming*), número de bolos fecais e período de imobilidade. Diazepam (1 mg/kg) foi utilizado como padrão ansiolítico.

Atividade ansiolítica

Utilizou-se o teste de transição claro-escuro (*light/dark Box*) que consiste em um aparato de madeira com dois compartimentos (branco e preto) que se comunicam por uma abertura. Na avaliação, os camundongos foram inseridos no centro do compartimento claro e a latência para entrada no compartimento escuro foi anotada. Os animais dos grupos C, DZP 1, AZ 200, AZ 400 e AZ 800 foram observados por 5 min e avaliou-se também à ambulação em cada compartimento, que é caracterizada quando o animal coloca as quatro patas em determinado espaço. Diazepam administrado por via intraperitoneal 30 min antes da experimentação foi utilizado como padrão ansiolítico.

Avaliação da atividade antidepressiva

Modelo de suspensão pela cauda

Os animais pertencentes aos grupos C, IMI 20, AZ 200, AZ 400 e AZ 800 foram suspensos pela porção terminal de suas caudas a uma altura de 90 cm da superfície. A duração da imobilidade foi anotada em segundos durante 6 min. A imipramina administrada por via intraperitoneal 30 min antes da experimentação foi utilizada como padrão antidepressivo.

3.2.8. Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelos programas de estatística SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., Germany) e GraphPad Prism V.4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Realizaram-se análises estatísticas por meio das análises de variância uma via (ANOVA) seguidas *post hoc* pelo teste de Tukey e os valores foram representados pelas médias \pm desvio padrão (DP). Os resultados para $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfoanatômica

Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae) – folha:

As folhas são simples, lanceoladas em disposição dística, e possuem cerca de 73 cm de comprimento por 12 cm de largura. A base é aguda e o ápice é cuspidado (Figura 11 A, B). O pecíolo é curto, com longa bainha aberta e lígula desenvolvida. A sobreposição das bainhas origina um pseudocaule.

Em vista frontal de ambas as superfícies epidérmicas, as células possuem formato poligonal com paredes espessadas e são revestidas por uma cutícula lisa (Figura 11 C). Ocorrem tricomas tectores unicelulares, de base alargada e ponta aguda, voltados para o ápice foliar (Figura 11 D, E). Estômatos paracíticos e tetracíticos distribuem-se de modo enfileirado em ambas as faces epidérmicas, caracterizando a folha como anfiestomática (Figura 11 F).

Em secção transversal, a epiderme é unisseriada e recoberta por uma cutícula delgada. Os estômatos se inserem no mesmo nível das células adjacentes e exibem cristas cuticulares externas (Figura 12 C, D). Subjacente à face adaxial da epiderme, encontram-se cerca de duas a seis camadas de células parenquimáticas relativamente grandes com imensos vacúolos (células buliformes), cujas paredes anticlinais podem ser sinuosas (Figura 12 A). Na sequência, em organização característica de mesofilo dorsiventral, ocorrem aproximadamente quatro estratos de parênquima paliçádico e seis estratos de parênquima esponjoso. Este corresponde a 40% da altura dos clorênquimas. Nestes distribuem-se regularmente feixes vasculares, do tipo colateral, envoltos sequencialmente por uma bainha parenquimática e uma bainha esclerenquimática. Esta é praticamente completa nos feixes de porte mediano e pode alcançar as células buliformes. Junto à face abaxial, o número de camadas de células buliformes pode variar, chegando a cerca de três ou quatro estratos nas regiões foliares de maior espessura (Figura 12 B).

A região central, em secção transversal, exibe leve concavidade na superfície adaxial e é convexa na face abaxial. Observam-se epiderme unisseriada e várias camadas de células buliformes, além de numerosos feixes vasculares colaterais, distribuídos em cerca de três níveis no parênquima

fundamental (Figura 13 A). Aqueles próximos à face abaxial são maiores e mostram calotas esclerenquimáticas mais desenvolvidas junto ao floema. Nos níveis seguintes, a série de feixes progressivamente diminui de tamanho, localizando-se os menores na superfície adaxial. Os feixes de médio e pequeno porte apresentam calotas esclerenquimáticas apostas ao xilema e ao floema (Figura 13 B, C).

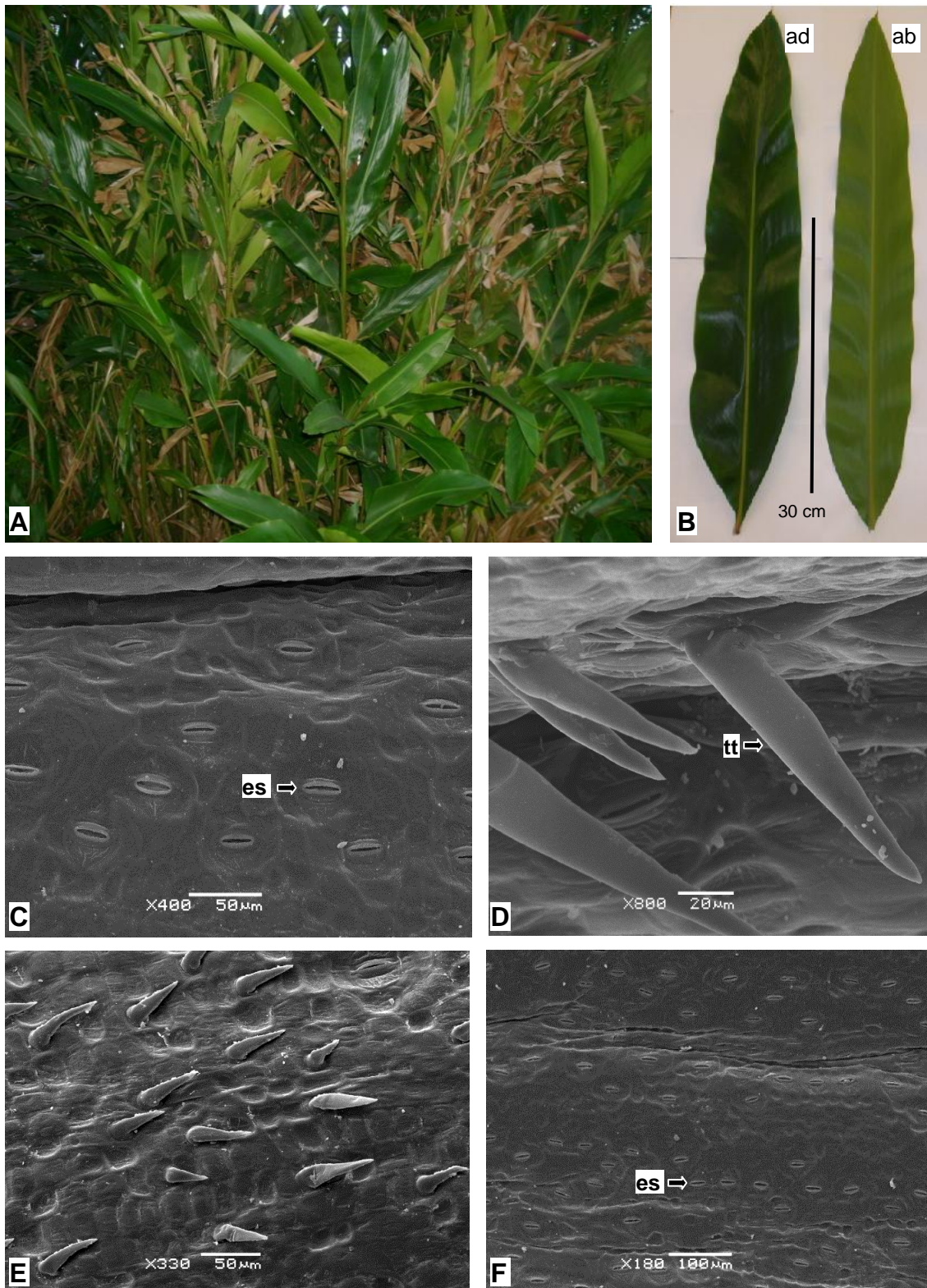


Figura 11. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae): A. Aspecto geral das partes aéreas vegetativas; B. Folhas, faces adaxial e abaxial; C. Face abaxial da epiderme foliar, em vista frontal; D. Detalhe de tricomas tectores na face adaxial da epiderme foliar; E. Numerosos tricomas tectores na face abaxial da epiderme foliar; F. Estômatos distribuídos em fileiras.

Abreviaturas: ab – abaxial, ad – adaxial, es - estômato; tt - tricoma tector.

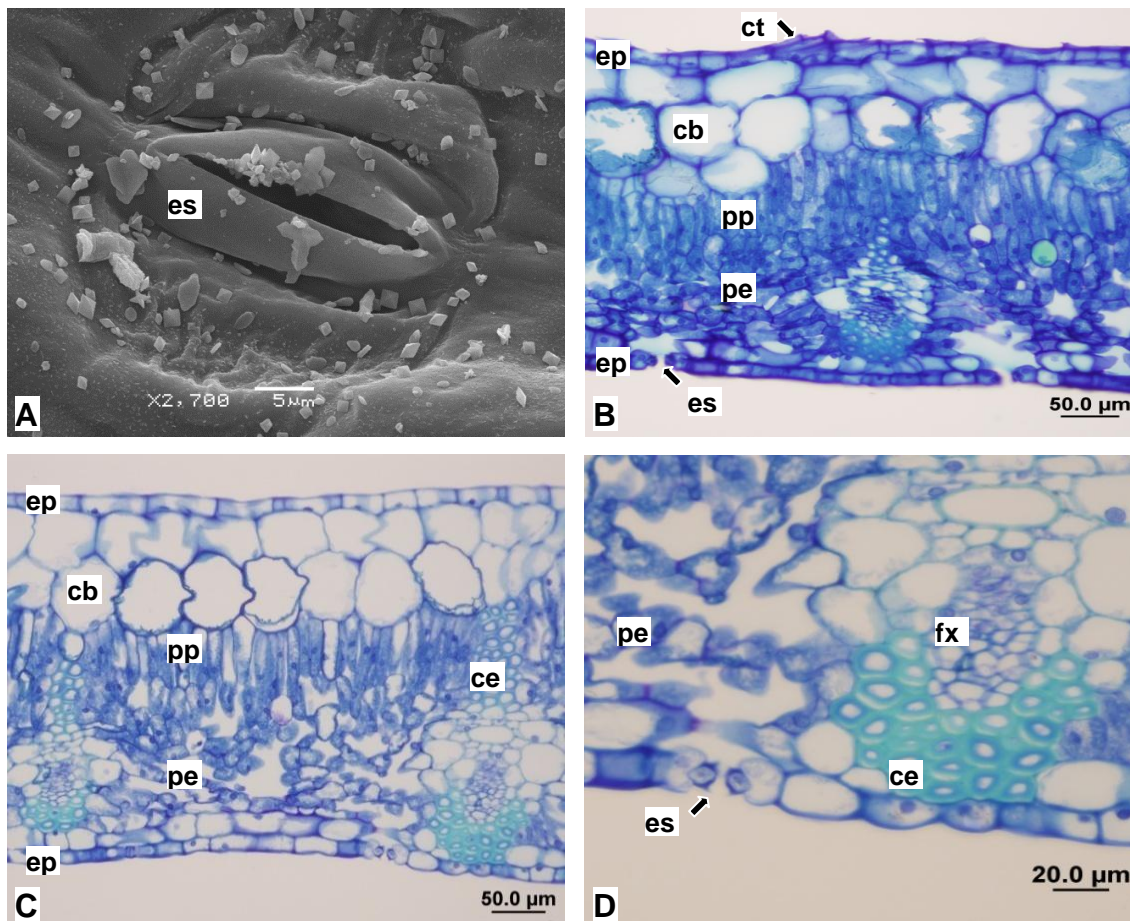


Figura 12. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae). Folha: A. Vista frontal da face abaxial da epiderme com detalhe de um estômato; B, C. Secção transversal do limbo onde se observa organização dorsiventral do mesofilo, com destaque para células buliformes, estômato e feixes vasculares; D. Pormenor de estômato e feixe vascular.

Abreviaturas: cb – célula buliforme, ce – calota esclerenquimática, ct – cutícula, ep – epiderme, es – estômato, fx - feixe vascular, pe – parênquima esponjoso, pp – parênquima paliçádico.

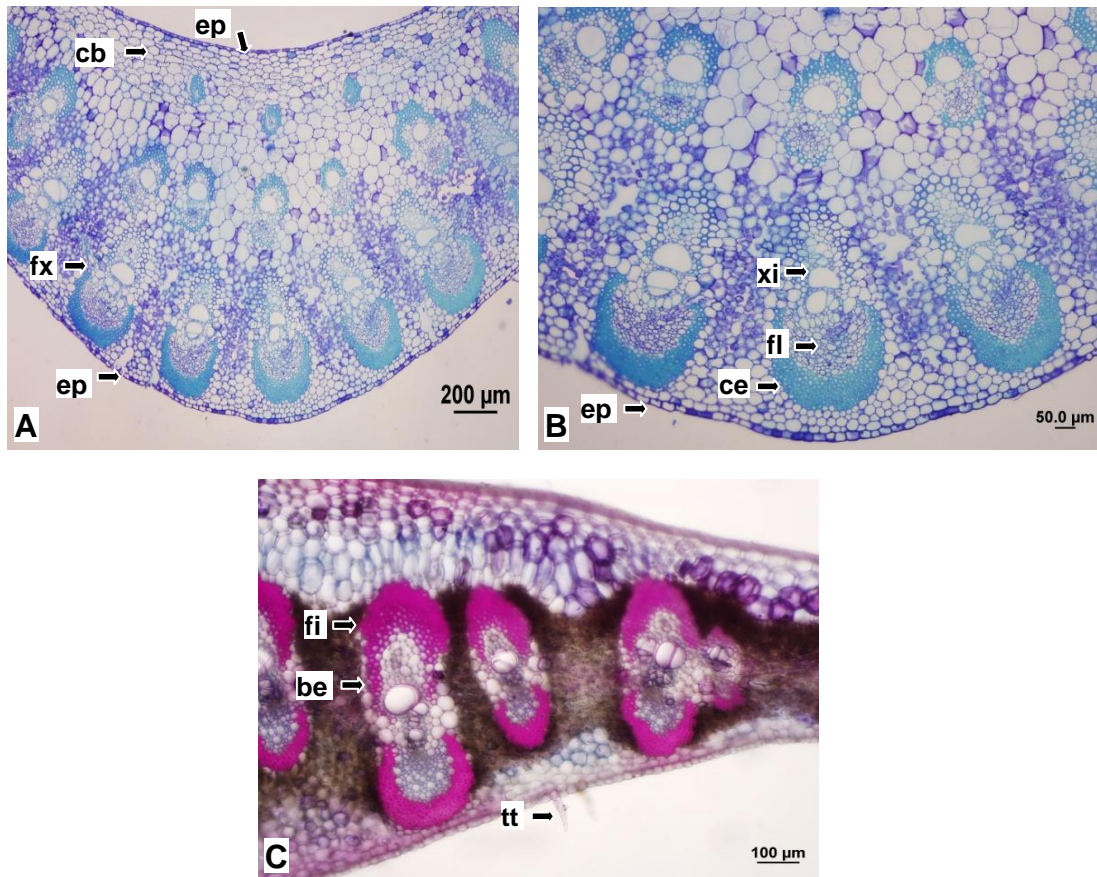


Figura 13. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae), seção transversal da região central foliar: A. Destaque para os três níveis de feixes vasculares e as camadas de células buliformes; B. Xilema, floema e calota esclerenquimática; C. Detalhe da bainha esclerenquimática praticamente completa ao redor dos feixes vasculares.

Abreviaturas: be – bainha esclerenquimática, cb – célula buliforme, ce – calota esclerenquimática, ep – epiderme, fi – fibra, fl – floema, fx – feixe vascular, tt – tricoma tector, xi – xilema.

No estudo anatômico das folhas de *A. zerumbet*, Albuquerque & Neves (2004) observaram que os estômatos paracíticos e tetracíticos são pouco frequentes na epiderme da face adaxial da lâmina foliar, distribuindo-se preferencialmente, na região intercostal da face abaxial, em concordância com o estudo de Tomlinson (1969). Segundo Esau (1977), o número de estômatos por unidade de superfície é tão variado, que possui pouco valor taxonômico. Entretanto, o aspecto destes em vista frontal, especialmente com referência à natureza e orientação das células subsidiárias, serve como característica taxonômica. Metcalfe (1963) relatou que os tricomas tectores de *A. zerumbet* estão posicionados no bordo da lâmina foliar e na face abaxial próximos da nervura central e que os mesmos em geral, não são ramificados.

Tomlinson (1956) registrou para o gênero *Alpinia* a presença de células buliformes apenas na face adaxial. Porém, na espécie avaliada por Albuquerque & Neves (2004) e também descrita neste trabalho observaram-se não somente células buliformes na face adaxial, como também na abaxial, embora nesta a camada não seja contínua e as células mostrem menores dimensões. Segundo os autores estas células possuem a função de armazenar água e na nervura mediana estão associadas com o desenrolar da folha, atuando como células de expansão.

Para Albuquerque & Neves (2004), *A. zerumbet* tem sido descrita como planta rizomatosa, apresentando folhas diferenciadas em lâmina, pecíolo curto, lígula e bainha. A maioria das lâminas das monocotiledôneas tem organização histológica homogênea do mesofilo, caráter que reforça a origem peciolar da estrutura. A espécie *A. zerumbet*, no entanto, possui organização dorsiventral, típica das lâminas das dicotiledôneas e que pode ser explicada em relação ao posicionamento das folhas, visto que se apresentam patentes, propiciando a especialização em parênquima paliçádico e esponjoso.

A folha de *A. zerumbet* revelou muitas características comuns às mencionadas por Tomlinson (1956; 1959) e Metcalfe (1963) e como as monocotiledôneas são relativamente pouco estudadas, conclui-se que o reconhecimento dos caracteres anatômicos aqui analisados torna-se relevante para o conhecimento da morfologia da espécie, bem como da taxonomia da família.

Solidago chilensis Meyen (Asteraceae) – folha e caule:

As folhas são simples, lanceoladas, alternas, sésseis, e possuem cerca de 8 a 10 cm de comprimento por 2 cm de largura. Apresentam ápice agudo e base atenuada com coloração verde intensa na face adaxial e tonalidade clara na face abaxial. O caule é não ramificado (Figura 14 A, B).

Com relação à anatomia foliar, observa-se em vista frontal que as células da epiderme apresentam formato poligonal e são revestidas por cutícula lisa. Estômatos do tipo anomocítico estão presentes em ambas as faces epidérmicas (folha anfiestomática). Há tricomas tectores pluricelulares, constituídos de três a oito células em série única, com ápice agudo e base alargada (Figura 14 C-F).

Em secção transversal, a epiderme compõe-se de uma camada de células alongadas periclinamente, revestidas por uma cutícula delgada. Os estômatos estão localizados no mesmo nível em relação às células circunvizinhas (Figura 15 A). O mesofilo é isobilateral, consistindo de três a cinco estratos de parênquima paliçádico subjacente a ambas as faces epidérmicas e de uma camada de parênquima esponjoso na posição mediana. As células do parênquima paliçádico são relativamente curtas e as do esponjoso possuem poucos cloroplastos e grandes vacúolos. Percorrendo o mesofilo, há feixes vasculares colaterais, envoltos por bainha parenquimática transcurrente. Junto ao floema de alguns feixes, encontram-se dutos secretores, cujo epitélio é unisseriado (Figura 15 B).

A nervura central possui contorno biconvexo, com leve curvatura na face adaxial. Mergulhado no parênquima fundamental, nota-se um único feixe vascular, do tipo colateral, de formato ovalado e com zona cambial evidente (Figura 15 C). Incipientes calotas esclerenquimáticas apostas ao xilema e ao floema são observadas. Na direção do floema, há duto secretor, com características similares às previamente descritas (Figura 15 D).

O caule em secção transversal é praticamente circular. A epiderme é uniestratificada e longos tricomas tectores pluricelulares e unisseriados estão presentes (Figura 16 A, B). No córtex, ocorrem colênquima lamelar e parênquima cortical. No cilindro vascular, vários feixes vasculares colaterais, com calotas esclerenquimáticas junto ao floema, dispõem-se em círculo e delimitam a região medular, que é parenquimática (Figura 16 C).

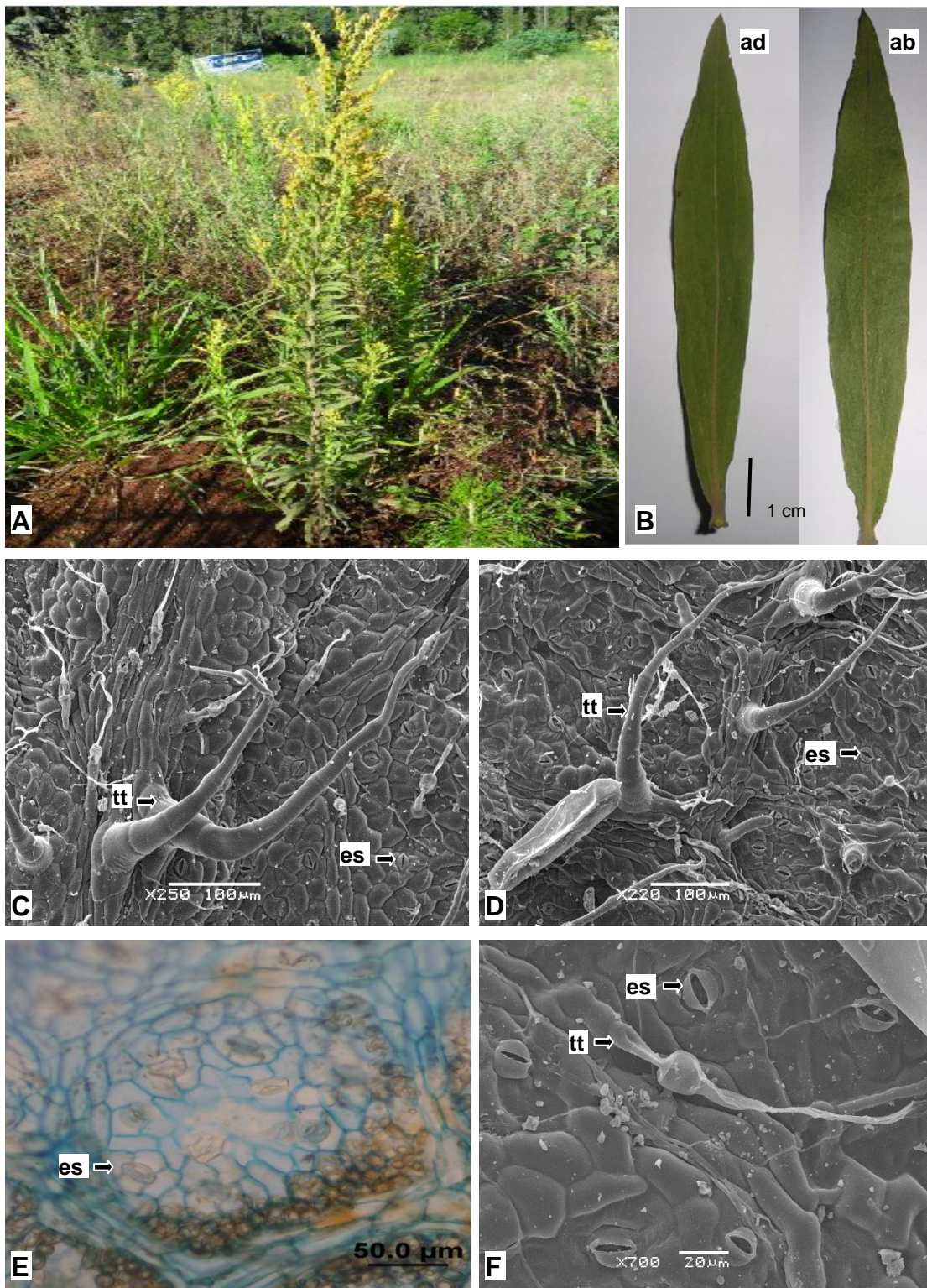


Figura 14. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae): A. Aspecto geral das partes aéreas vegetativas e reprodutivas; B. Folhas, faces adaxial e abaxial; C, D. Vista frontal das faces adaxial e abaxial da epiderme foliar, respectivamente; E. Estômatos anomocíticos na face adaxial da epiderme; F. Destaque para o tricoma tector e estômatos.

Abreviaturas: ab – abaxial, ad – adaxial, es – estômato, tt – tricoma tector.

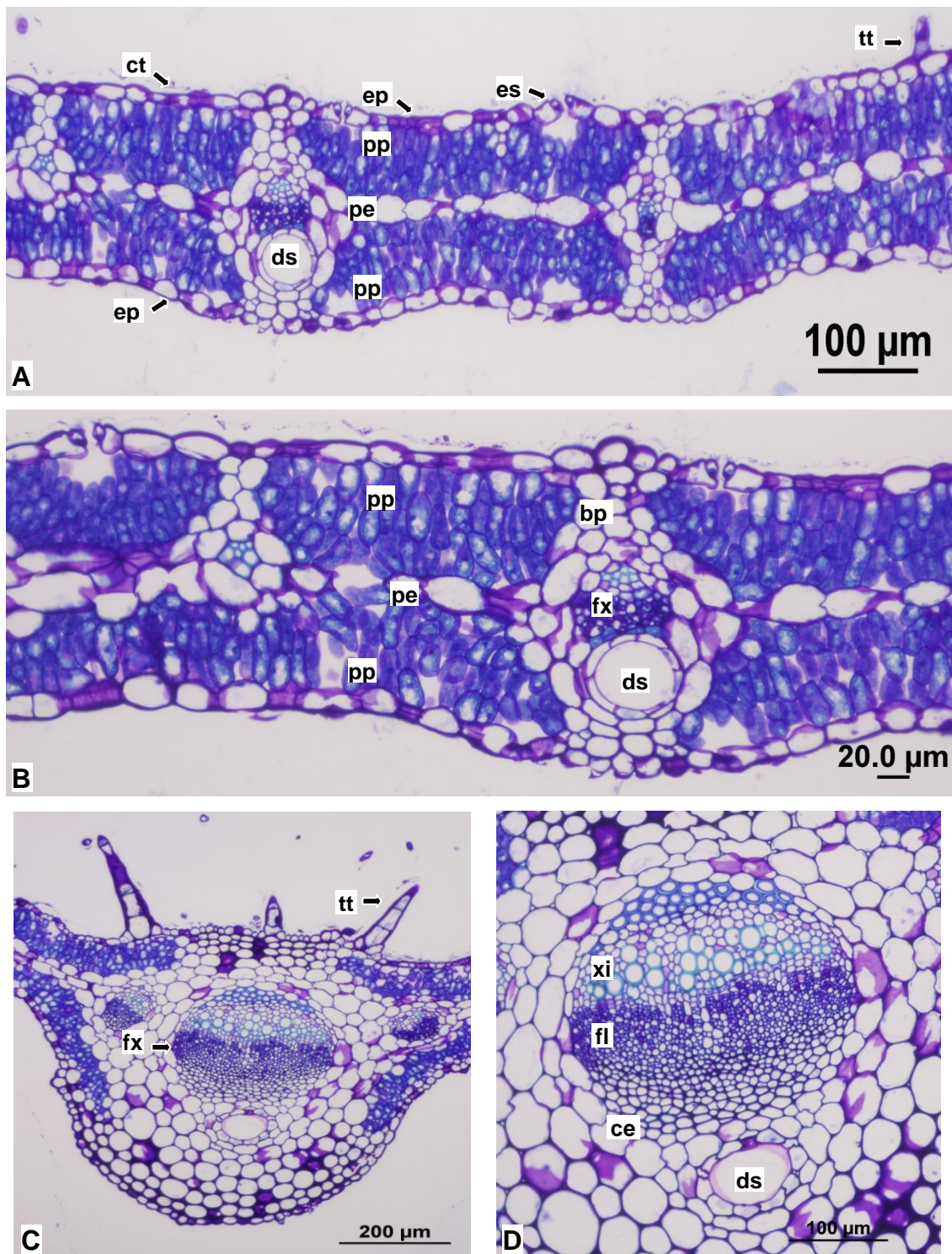


Figura 15. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), secção transversal do limbo: A, B. Organização isobilateral do mesofilo, indicando sistema de revestimento, clorênquimas, feixes vasculares e duto secretor; C, D. Nervura central com destaque para feixe vascular colateral e duto secretor.

Abreviaturas: bp – bainha parenquimática, ce - calota esclerenquimática - ct – cutícula, ds – duto secretor, ep – epiderme, es – estômato, fl – floema, fx – feixe vascular, pe – parênquima esponjoso, pp – parênquima paliçádico, tt – tricoma tector, xi – xilema.

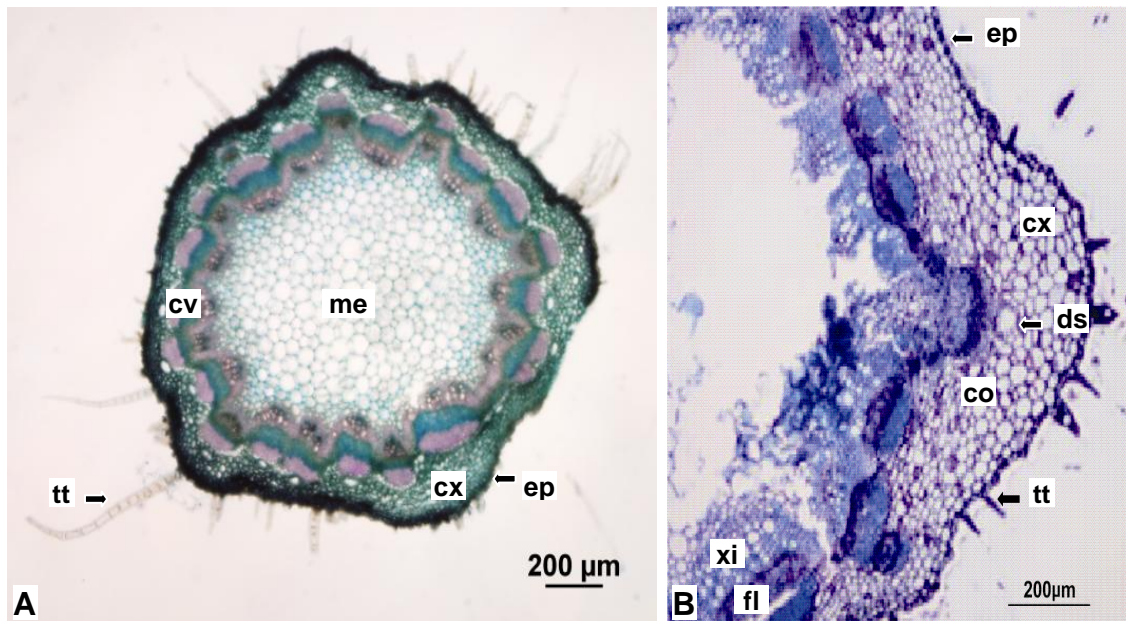


Figura 16. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), secção transversal do caule; A. Aspecto geral da organização caulinar; B. Epiderme uniestratificada, câmbio e sistema vascular com destaque para floema e xilema; C. Córtex, colênquima e duto secretor.

Abreviaturas: co – colênquima, cx – córtex, cv – câmbio vascular, ds – duto secretor, ep – epiderme, fl – floema, me – medula, tt – tricoma tector, xi - xilema.

A folha de *S. chilensis* apresentou alguns caracteres anatômicos comuns à família Asteraceae, tais como epiderme uniestratificada, ocorrência de estômatos frequentemente anomocíticos em ambas as faces epidérmicas e feixes vasculares do tipo colateral (Metcalfe & Chalk, 1950; 1988). Com relação às demais características da espécie, que foram relatadas por Oliveira *et al.* (1996) e Smolarek *et al.* (2009), de um modo geral, as mesmas foram confirmadas nesta análise.

Comparativamente a outros representantes medicinais da família a exemplo das populares arnicas (*Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., *Chaptalia nutans* (L.) Pohl.) estudadas por Duarte *et al.* (2007), merecem destaque como estruturas diagnósticas aquelas relativas ao sistema de revestimento, ao tipo de mesofilo, às estruturas secretoras internas e à disposição do sistema vascular na nervura central. Diferindo de *S. chilensis*, *P. ruderale* possui folha glabra, cutícula lisa e levemente estriada, mesofilo dorsiventral e grandes estruturas secretoras nos bordos foliares, enquanto que *C. nutans*, mostra numerosos tricomas longos na face abaxial, cutícula estriada, mesofilo dorsiventral, e nervura central percorrida por vários feixes vasculares não associados às estruturas secretoras. Segundo Metcalfe & Chalk (1988) a ornamentação cuticular, que se revela de forma diversa nos gêneros, é apontada como uma informação taxonômica relevante.

Oliveira *et al.* (1996) descreveram que o caule de *S. chilensis* apresenta na epiderme anexos semelhantes aos descritos para folha e a região colenquimática subepidérmica é pouco desenvolvida. Os feixes vasculares são distribuídos em anel do tipo colateral aberto relacionados com dutos secretores e protegidos por grupo de fibras. As regiões parenquimáticas são bem desenvolvidas e estas considerações estão de acordo com os resultados observados neste trabalho.

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) – folha e caule:

As folhas são simples, ovalado-lanceoladas, de ápice acuminado e base aguda, sésseis, cartáceas e possuem cerca de 2 a 8 cm de comprimento por 1 a 3 cm de largura. A face adaxial da epiderme é verde-escura e a face abaxial mais clara. O caule é liso, tortuoso e ramificado. (Figura 17 A, B).

Em vista frontal, ambas as superfícies epidérmicas são revestidas por uma cutícula lisa. A lâmina é lisa e hipostomática, formada por células com paredes anticlinais sinuosas. Os estômatos são predominantemente do tipo anomocítico (Figura 17 C, D).

Em secção transversal, a epiderme é unisseriada e recoberta por uma cutícula delgada. Os estômatos se inserem no mesmo nível das células adjacentes. Junto a ambas superfícies epidérmicas, encontram-se cavidades secretoras arredondadas revestidas por epitélio uniestratificado, formado por cerca de seis células (Figura 17 E, F). Ocorre mesofilo dorsiventral, contendo uma camada de parênquima paliçádico e vários estratos de parênquima esponjoso. Nestes distribuem-se regularmente idioblastos contendo drusas e cristais prismáticos. Os feixes vasculares de menor calibre são do tipo colateral (Figura 17 F).

A nervura principal, em secção transversal, exibe leve concavidade na superfície adaxial e é convexa na face abaxial. Observa-se epiderme unisseriada (Figura 18 A) e as cavidades secretoras estão próximas ao sistema vascular em ambas as faces da lâmina foliar. Cristais prismáticos e drusas são observados no parênquima fundamental. O feixe vascular é bicolateral em forma de arco aberto, envolto por uma bainha esclerenquimática completa (Figura 18 B, C).

O caule, em secção transversal, apresenta forma oval, com epiderme uniestratificada, parênquima cortical e colênquima lamelar com até duas camadas de células. O sistema vascular apresenta floema localizado externamente e internamente ao xilema (Figura 18 D-F).

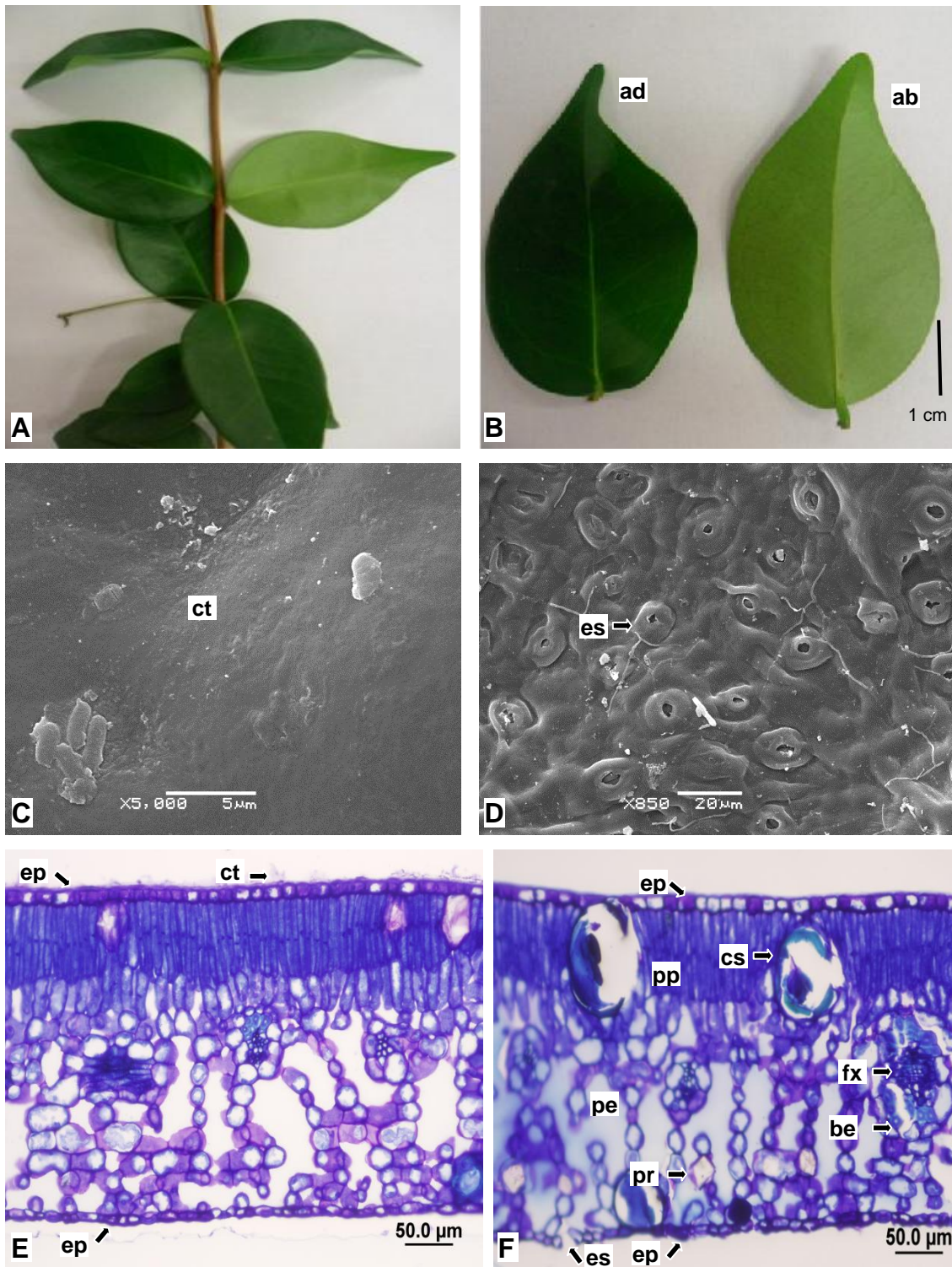


Figura 17. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): A. Aspecto de ramo apical; B. Folhas, faces adaxial e abaxial; C. Face adaxial da epiderme foliar com cutícula lisa; D. Face abaxial da epiderme foliar mostrando estômatos; E, F. Organização foliar mostrando cutícula, epiderme e mesófilo dorsiventral, cavidades secretoras próximas à epiderme, feixes vasculares e cristais prismáticos.

Abreviaturas: ab – abaxial, ad – adaxial, be – bainha esclerenquimática, cs – cavidade secretora, ct – cutícula, ep – epiderme, es – estômato, fx – feixe vascular, pe - parênquima esponjoso, pp – parênquima paliçádico, pr – cristal prismático.

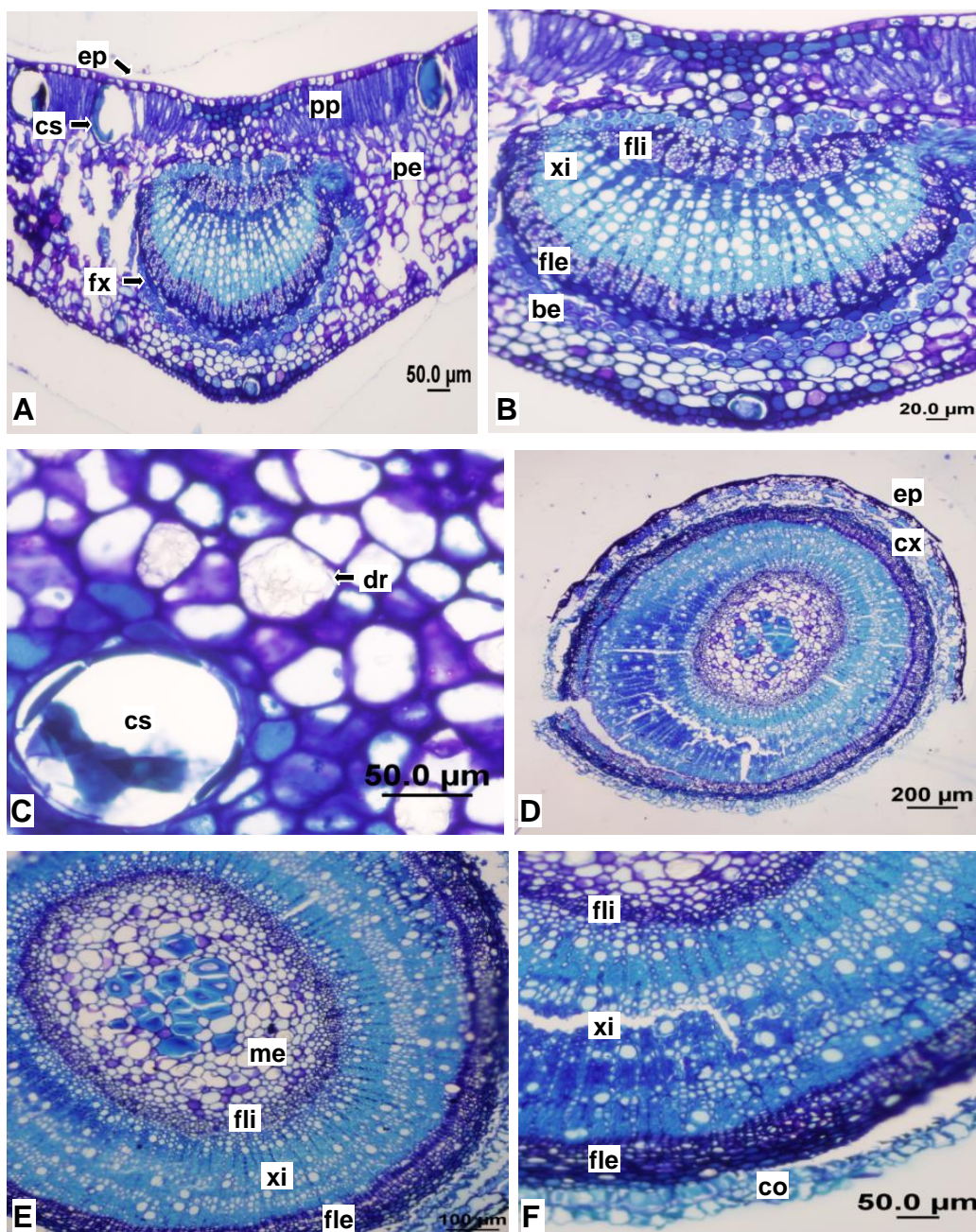


Figura 18. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae); A. Secção transversal da nervura central e região internervural com destaque para epiderme, mesofilo dorsiventral, cavidades secretoras e feixe vascular; B. Detalhe do feixe vascular bicolateral; C. Cavidade secretora e drusa; D. Secção transversal do caule revelando a organização estrutural. E. Cilindro vascular e medula; F. Destaque para colênquima, floemas externo e interno, e xilema.

Abreviaturas: co – colênquima, cs – cavidade secretora, cx – córtex, dr – drusa, ep – epiderme, es – estômato, fle – floema externo, fle – floema externo, fx – feixe vascular, me – medula, pe – parênquima esponjoso, pp – parênquima paliçádico, xi – xilema.

A análise morfoanatômica da folha de *E. uniflora* realizada neste estudo está de acordo com a descrição encontrada na FB 5 (2010) e revelou a presença de características gerais para a família Myrtaceae, como epiderme uniestratificada, folhas hipoestomáticas, estômatos predominantemente anomocíticos, cavidades secretoras em ambas as faces, mesofilo dorsiventral e nervura central com feixes vasculares bicolaterais acompanhados por uma bainha de esclerênquima. Essas estruturas anatômicas são comuns no táxon e foram verificadas em diferentes gêneros, tais como *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg., *Myrcia cordiifolia* DC., *M. decrescens* O. Berg e *M. torta* DC. (Gomes *et al.*, 2009).

Segundo Fiuza *et al.* (2008), as cavidades secretoras são circundadas radialmente por duas ou, raramente, por um conjunto de até seis células epidérmicas. Na FB 5 (2010), há descrição de cavidades secretoras do tipo esquizolisígenas, com gotas de óleo e distribuídas em ambos os parênquimas. De acordo com Donato & Morretes (2007), o conteúdo das cavidades secretoras subepidérmicas no mesofilo das Myrtaceae é típico para espécie, sendo constituído por óleos essenciais importantes para farmacologia e produção de essências.

4.2 Parâmetros de pureza para as amostras vegetais

Teores de água nas amostras de materiais vegetais dessecados

Utilizou-se método gravimétrico para determinação de água. Para *A. zerumbet* obteve-se teores de água que variaram de 10,04 a 10,84%, em *S. chilensis* de 10,24 a 10,48% e para *E. uniflora* de 8,05 a 8,22% (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com o preconizado pela F. Bras. IV (1988-2005) e Solis *et al.* (2005) que estabeleceram um limite para a quantidade de umidade em materiais vegetais que pode variar de 8 a 14%.

Para *A. zerumbet* e *S. chilensis*, não há descrição farmacopeica ou de trabalhos científicos revelando valores de umidade. Para *E. uniflora* a FB 5 (2010) preconiza um máximo de 10% de umidade avaliada pelo método gravimétrico. Os valores reduzidos estabelecidos para as plantas pesquisadas podem estar relacionados ao adequado processo de secagem e estocagem em temperatura ambiente.

A avaliação deste parâmetro é importante em análises de controle de qualidade pois, a presença excessiva de água em materiais vegetais propicia o desenvolvimento de micro-organismos, insetos e hidrólise com consequente deterioração de constituintes da droga (F. Bras. IV, 1988-2005).

Segundo a FB 5 (2010), três métodos são empregados para determinação de água em drogas vegetais: método gravimétrico (dessecação), método azeotrópico (destilação com tolueno) e o método volumétrico (Karl Fischer). O primeiro mais simples e rápido não deve ser aplicável quando a droga possuir substâncias voláteis.

Entretanto, Borges *et al.* (2005), que compararam metodologias para determinação de água em drogas vegetais, relatam que mesmo com dificuldades na reprodutibilidade e outras limitações, o método gravimétrico pode ser utilizado devido suas vantagens relacionadas a quantidade de amostra utilizada e equipamento necessário.

Solis *et al.* (2005) destacaram que se o material vegetal possuir mais que 10 mL/kg (1%) de óleo essencial não deve ser realizada a perda por secagem e deve-se determinar o conteúdo de água por destilação. Como não há descrição da quantidade de óleo essencial presente nas folhas de *A. zerumbet* e partes aéreas de *S. chilensis* e a presença destes constituintes para as folhas de *E. uniflora* é de 0,8% (FB 5, 2010) optou-se pela determinação de umidade pelo método gravimétrico. Esse método é de fato o mais utilizado e observa-se que apesar da FB 5 (2010) preconizar outros métodos de determinação de umidade para plantas medicinais com constituintes voláteis além da água, das 42 monografias farmacopeicas somente *Peumus boldus* Molina, *Datura stramonium* L. e *Citrus aurantium* L. possuem doseamento de água por destilação azeotrópica.

Tabela 1. Determinação de água para as amostras de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) por método gravimétrico (n=8).

Espécies medicinais	Amostras	Teor de água Média ± DP (CV%)
<i>A. zerumbet</i>	AZ1	10,84 ± 0,17 (1,57)
	AZ2	10,61 ± 0,36 (3,39)
	AZ3	10,66 ± 0,53 (4,88)
	AZ4	10,78 ± 0,20 (1,85)
	AZ5	10,63 ± 0,30 (2,82)
	AZ6	10,70 ± 0,35 (3,27)
	AZ7	10,04 ± 0,41 (3,94)
<i>S. chilensis</i>	SC1	10,28 ± 0,19 (1,85)
	SC2	10,24 ± 0,22 (2,15)
	SC3	10,31 ± 0,16 (1,55)
	SC4	10,36 ± 0,27 (2,61)
	SC5	10,48 ± 0,22 (2,10)
<i>E. uniflora</i>	EU1	8,08 ± 0,12 (1,48)
	EU2	8,05 ± 0,07 (0,87)
	EU3	8,13 ± 0,16 (1,97)
	EU4	8,19 ± 0,21 (2,56)
	EU5	8,22 ± 0,17 (2,07)

Teores de cinzas totais

Nessa etapa do trabalho para as três espécies medicinais realizaram-se ensaio em cadinhos de porcelana e mufla conforme a FB 5 (2010). Observou-se para *A. zerumbet* valores de 7,14 a 7,34%, em *S. chilensis* 6,40 a 6,74% e para *E. uniflora* valores de 7,93 a 8,03%. Não há dados na literatura indicando a quantidade de cinzas totais para *A. zerumbet* e *S. chilensis*. Na farmacopeia (FB 5, 2010) as folhas de *E. uniflora* devem conter no máximo 11% de cinzas totais. O conteúdo de cinzas totais estabelece a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração, contemplando as cinzas derivadas de tecido vegetal (fisiológicas) e de materiais estranhos como, areia e terra aderidos à droga (não fisiológicas) (FB 5, 2010). A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis

que podem estar presentes como contaminantes (Farias, 2003) geralmente relacionadas aos processos de coleta e armazenamento (Rocha, 2000). A pequena variação percentual observada entre as amostras vegetais analisadas (Tabela 3) pode estar relacionada com as diferentes épocas e locais de coleta porém, fornece subsídios para o estabelecimento de um limite para este parâmetro de qualidade.

Teores de cinzas insolúveis em ácido

Para as espécies medicinais realizou-se ensaio em mufla conforme FB 5 (2010). Os valores variaram em *A. zerumbet* de 0,70 a 0,83%, em *S. chilensis* 0,32 a 0,34% e para *E. uniflora* de 0,58 a 0,62% (Tabela 2).

Quando as cinzas totais são acrescidas de ácido clorídrico as cinzas fisiológicas ou orgânicas são consumidas restando constituintes silicosos no material. O método destina-se portanto, à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga (FB 5, 2010) como, terra, areia e outros materiais que podem comprometer a qualidade do farmacógeno pesquisado (Farias, 2003) evidenciando adulteração ou condições inadequadas de cultivo.

Não existem teores máximos de cinzas insolúveis em ácido descritos oficialmente para as espécies *A. zerumbet* e *S. chilensis*. Porém, Solis *et al.* (2005) verificaram que para materiais vegetais os valores não devem exceder a 2%. Avaliando parâmetros de qualidade para quatro espécies de Asteraceae, a mesma família de *S. chilensis*, e utilizando também as partes aéreas dos vegetais, Budel *et al.* (2004) obtiveram valores que variaram de 0,75 a 1,06%. Para folhas *E. uniflora* coletadas em Goiânia (Goias) nos meses de fevereiro a abril de 2005, Fiuza *et al.* (2008) descreveram resultados em torno de 0,57% e a Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010) preconiza um limite máximo de cinzas sulfatadas de 12%. Essas percentagens descritas são maiores ou semelhantes às obtidas para as espécies medicinais pesquisadas e os baixos valores encontrados quando comparados com outras monografias farmacopeicas utilizando os mesmos farmacógenos, demonstram baixa presença de materiais silicosos originalmente presente nas amostras e os cuidados obtidos na obtenção das matérias-primas vegetais.

Tabela 2. Determinação dos teores de cinzas totais (n=5) e insolúveis em ácido (n=3) para as amostras de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas).

Espécies medicinais	Amostras	Cinzas totais Média ± DP (CV)	Cinzas insolúveis em ácido Média ± DP (CV%)
<i>A. zerumbet</i>	AZ1	7,14 ± 0,09 (1,26)	0,76 ± 0,12 (15,79)
	AZ2	7,22 ± 0,06 (0,83)	0,78 ± 0,11 (14,10)
	AZ3	7,25 ± 0,19 (2,62)	0,78 ± 0,22 (28,20)
	AZ4	7,29 ± 0,12 (1,65)	0,75 ± 0,20 (26,70)
	AZ5	7,25 ± 0,20 (2,76)	0,73 ± 0,19 (26,20)
	AZ6	7,33 ± 0,13 (1,77)	0,70 ± 0,11 (15,71)
	AZ7	7,34 ± 0,10 (1,36)	0,83 ± 0,12 (14,46)
<i>S. chilensis</i>	SC1	6,58 ± 0,78 (11,85)	0,34 ± 0,02 (5,88)
	SC2	6,51 ± 0,63 (9,68)	0,35 ± 0,01 (2,86)
	SC3	6,40 ± 0,73 (11,41)	0,32 ± 0,01 (3,12)
	SC4	6,70 ± 0,40 (5,97)	0,33 ± 0,02 (6,06)
	SC5	6,74 ± 0,54 (8,01)	0,33 ± 0,02 (6,06)
<i>E. uniflora</i>	EU1	8,03 ± 0,37 (1,95)	0,58 ± 0,05 (7,02)
	EU2	8,01 ± 0,27 (3,37)	0,58 ± 0,04 (6,90)
	EU3	8,04 ± 0,32 (3,98)	0,59 ± 0,04 (6,78)
	EU4	7,95 ± 0,33 (4,15)	0,62 ± 0,07 (11,29)
	EU5	7,93 ± 0,25 (3,16)	0,62 ± 0,05 (8,06)

4.3 Parâmetros de qualidade para os extratos fluidos

Foram utilizados extratos fluidos (item 3.2.5) elaborados com as amostras de número 1 de cada espécie medicinal (AZ1; 500 mL, SC1; 500 mL e EU1; 200 mL).

Características organolépticas para extratos

Fitas de papel filtro medindo 10 x 2 cm foram impregnadas com extratos fluidos e esses foram avaliados quanto à cor, odor e sabor (Tabela 3).

Tabela 3. Características organoléticas dos extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas).

Extratos	Cor	Odor	Sabor
	Intensidade		
<i>A. zerumbet</i>	Mistura de amarelo e verde (fraco)	Aromático (semelhante à noz-moscada)	Amargo
<i>S. chilensis</i>	Laranja (fraco)	Aromático	Amargo
<i>E. uniflora</i>	Mistura de verde com amarelo (forte)	Aromático	Amargo, cítrico

Segundo Cardoso (2009) as características organolépticas e sensoriais fornecem dados simples, porém bastante relevantes, sobre o material analisado. Farias (2003) destacou que este método pode auxiliar no estabelecimento de parâmetros de qualidade relacionados à identidade e pureza das amostras e que muitas vezes, a análise organoléptica permite a verificação da decomposição das apresentações.

Teores de resíduo seco

Alíquotas dos extratos (2 mL) foram submetidas a estufa (100-105 °C) por 3 h até peso constante (FB 5, 2010). Os valores obtidos podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Teores de resíduo seco para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) (n=5).

Extratos das espécies medicinais	Teores de resíduo seco Média ± DP (CV%)
<i>A. zerumbet</i>	11,48 ± 0,32 (2,78)
<i>S. chilensis</i>	29,42 ± 0,55 (1,87)
<i>E. uniflora</i>	14,28 ± 1,26 (8,82)

Esse ensaio é aplicado a extratos líquidos e está relacionado à quantidade de partículas dissolvidas ou em suspensão e tem por finalidade verificar se o resíduo seco encontra-se dentro dos limites farmacopeicos. Para extratos fluidos o valor mínimo preconizado é de 5% (Cardoso, 2009).

Avaliando extratos de *Arnica montana* L. *Lychnophora pynaster* Mart. e *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão-Filho, plantas pertencentes a família Asteraceae, Maciel *et al.* (2006) obtiveram valores de 5,66, 5,47 e 5,49% respectivamente. Resultados considerados baixos quando comparados aos obtidos com as espécies medicinais desse trabalho, evidenciando para esse estudo, um método extrativo eficiente.

Potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos

Determinou-se os valores de pH dos extratos utilizando-se o método do potenciômetro (Tabela 5).

Tabela 5. Valores do pH para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) (n=5).

Extratos das espécies medicinais	Valores de pH Média ± DP (CV%)
<i>A. zerumbet</i>	6,26 ± 0,005 (0,08)
<i>S. chilensis</i>	5,71 ± 0,007 (0,12)
<i>E. uniflora</i>	5,09 ± 0,001 (0,16)

Os extratos de *S. chilensis* e *E. uniflora* apresentaram resultados mais ácidos, que podem estar relacionados com uma maior presença de compostos fenólicos. O valores de pH representam convencionalmente a concentração dos íons hidrogênio em soluções aquosas e possíveis alterações comparadas a um extrato padrão, podem sugerir degradações químicas. Essa determinação simples e importante, não é comum para matérias-primas vegetais. Portanto, o valor de pH raramente aparece nas monografias farmacopeicas vegetais. A *United States Pharmacopeia*, por exemplo, cita valor de pH apenas para o extrato fluido de alho (Cardoso, 2009).

Valores da densidade relativa e densidade de massa

Na análise dos extratos utilizou-se o método do picnômetro (FB 5, 2010) com três repetições (Tabela 6).

Tabela 6. Densidade relativa para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) (n=3).

Extratos das espécies medicinais	Determinação da densidade relativa (D ²⁰) Média ± DP (CV%)
<i>A. zerumbet</i>	0,9738 ± 0,0031 (0,32)
<i>S. chilensis</i>	0,9594 ± 0,0027 (0,29)
<i>E. uniflora</i>	0,9054 ± 0,0014 (0,16)

Com os dados da densidade relativa foi possível estabelecer a densidade de massa (Tabela 7) pela equação:

$$\rho_{20} = 0,99703 \text{ (densidade da água a } 20^{\circ}\text{C)} \cdot D^{20} \text{ (extratos líquido)} + 0,0012$$

Tabela 7. Densidade de massa para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) (n=3).

Extratos das espécies medicinais	Determinação da densidade de massa Média ± DP (CV%)
<i>A. zerumbet</i>	0,9738 ± 0,0031 (0,32)
<i>S. chilensis</i>	0,9577 ± 0,0027 (0,29)
<i>E. uniflora</i>	0,9039 ± 0,0014 (0,16)

A densidade relativa é a comparação entre a massa específica de duas substâncias. Na avaliação de extratos é tomada em relação à água e tem como finalidade comparar os resultados com os estabelecidos nas farmacopeias (Cardoso, 2009). Nos extratos fluidos avaliados, tanto a densidade relativa como a densidade de massa, os menores valores foram observados para *E. uniflora* e os maiores para *A. zerumbet* indicando que nesta última espécie, os constituintes químicos possuem maior peso molecular.

4.4 Caracterização fitoquímica

Análise fitoquímica preliminar

Essas análises possibilitaram o conhecimento dos grupos químicos presentes nos extratos. *A. zerumbet*, *S. chilensis* e *E. uniflora* apresentaram

presença de fenóis, flavonoides, taninos e óleos essenciais. Em *S. chilensis* observou-se também, a positividade para saponinas (Tabela 8)

Tabela 8. Resultados da análise fitoquímica preliminar para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) (n=3).

Grupos químicos	<i>A. zerumbet</i>	<i>S. chilensis</i>	<i>E. uniflora</i>
Fenóis	(+)	(+)	(+)
Flavonoides	(+)	(+)	(+)
Taninos	(+)	(+)	(+)
Saponinas	(-)	(+)	(-)
Óleos essenciais	(+)	(+)	(+)

(+) positivo; (-) negativo.

Lorenzi & Matos (2002), Elzaawely *et al.* (2007) e Victório *et al.* (2009) confirmaram a positividade em *A. zerumbet* de flavonoides, taninos, terpenos e óleos essenciais. Chicourel *et al.* (1998) e Pedroso *et al.* (2009), corroboram a presença de substâncias polifenólicas (flavonoides, taninos), triterpenos e óleos essenciais para *S. chilensis*. Para este vegetal, Torres *et al.* (1987) reforçaram a presença de saponinas. Consolini *et al.* (2002) e a F. Bras. IV (1988-2005) ratificam para *E. uniflora* os grupos químicos, taninos, flavonoides e óleos essenciais.

Análise dos extratos fluidos em cromatografia de camada delgada (CCD)

Foi possível estabelecer perfis cromatográficos em CCD para os extratos fluidos de *S. chilensis*, *A. zerumbet* e *E. uniflora* (Figuras 19 a 22).

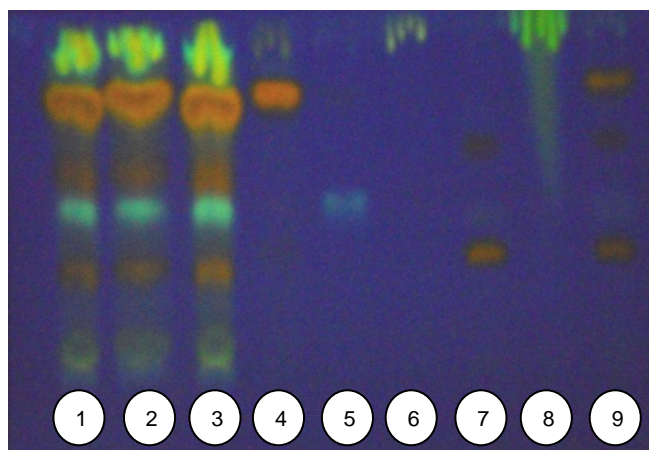


Figura 19. Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) e padrões analíticos: 1, 2 e 3 amostras de extratos; 4. Quercetrina; 5. Ácido clorogênico; 6. Quercetina; 7. Rutina; 8. Apigenina; 9. Quercetrina, rutina e ácido clorogênico. Eluente: AcOEt:HCO₂H:AcOH:H₂O (100:11:11:27 v/v) e revelação com difenilboriloxidietilamina a 1% em MeOH (m/v) com conseqüente observação em 366 nm.

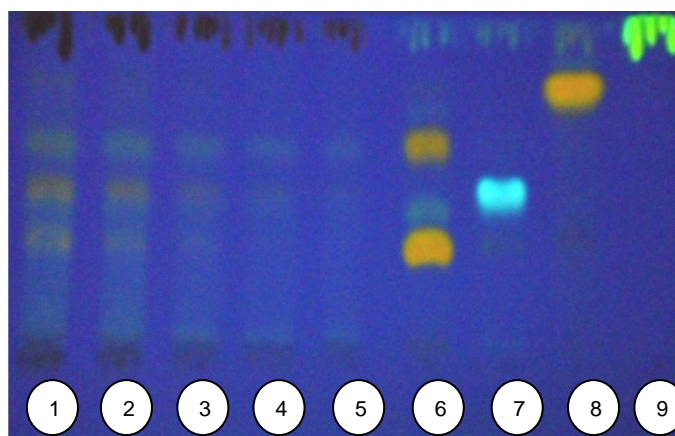


Figura 20. Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas) e padrões analíticos: 1, 2, 3, 4 e 5 amostras de extratos; 6. Rutina; 7. Ácido clorogênico; 8. Quercetrina; 9. Canferol. Eluente: AcOEt:HCO₂H:AcOH:H₂O (100:11:11:27 v/v) e revelação com difenilboriloxidietilamina a 1% em MeOH (m/v) com conseqüente observação em 366 nm.

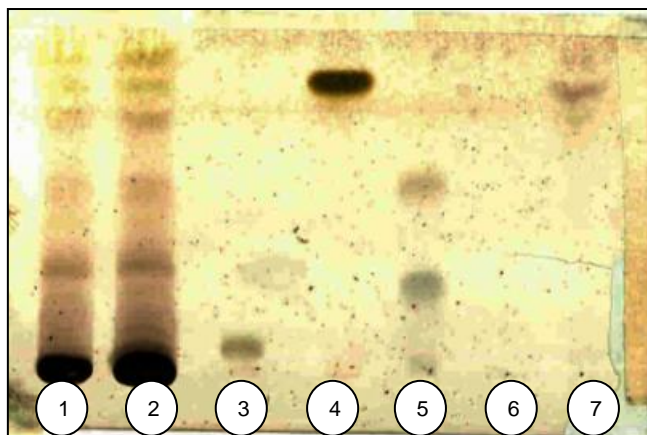


Figura 21. Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas) e padrões analíticos: 1 e 2 amostras de extratos; 3. Rutina; 4 e 7. Quercetina; 5. Ácido clorogênico; 6. Ácido cafeico. Eluente: AcOEt:HCO₂H:H₂O (90:5:5 v/v) e revelação com anisaldeído (1% v/v) seguido de aquecimento em estufa a 100 °C por 5 min.

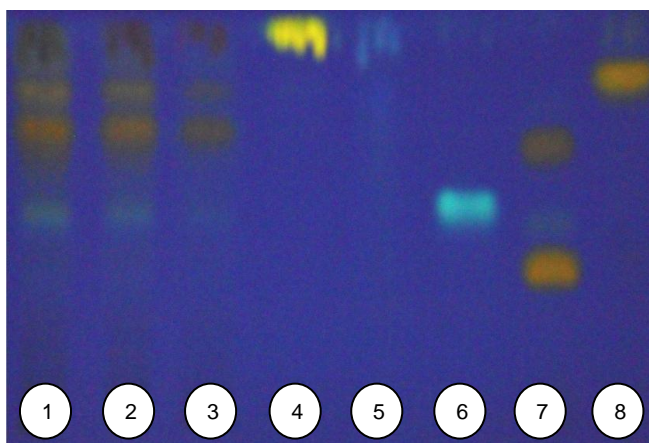


Figura 22. Cromatografia em camada delgada para extrato fluido de *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae (folhas) e padrões analíticos: 1, 2 e 3. Amostras de extratos; 4. Quercetina; 5. Ácido tânico; 6. Ácido clorogênico; 7. Rutina; 8. Quercetrina. Eluente: AcOEt:HCO₂H:AcOH:H₂O (100:11:11:27 v/v) e revelação com difenilboriloxidietilamina a 1% em MeOH (m/v) com consequente observação em 366 nm.

Para o extrato fluido de *S.chilensis* observou-se bandas cromatográficas com deslocamento semelhante aos padrões de quercetrina e ácido clorogênico. Maciel *et al.* (2006) ao avaliarem tinturas à base de arnicas (*Arnica montana* L., *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão e *Lychnophora pinaster* Mart.) pertencentes a Asteraceae, também destacaram a presença de flavonoides em perfil cromatográfico. Para o extrato fluido de *A. zerumbet* Victório *et al.* (2009) citaram que para melhor visualização de rutina, o perfil

cromatográfico adequado seria obtido com eluente AcOEt:HCO₂H:H₂O (65:20:15 v/v). Porém, somente se observou rutina nos extratos desse vegetal, utilizando os sistemas de solventes citados neste trabalho. Para o extrato fluido de *E. uniflora* foi possível detectar a positividade para o flavonoide rutina. Fiuza *et al.* (2008) utilizando eluente CH₃COCH₃:MePh:HCO₂H (3:3:1 v/v) confirmaram a presença de flavonoides além dos taninos.

Quantificação de flavonoides e fenóis totais por espectrofometria no UV/VIS

Quantificação de flavonoides de *Alpinia zerumbet* e *Eugenia uniflora*

Através do método proposto por Harnafi *et al.* (2007) determinou-se para as amostras de *A. zerumbet* e *E. uniflora* a concentração de flavonoides representados como quercetina (Tabela 9).

Tabela 9. Concentrações de flavonoides representados por quercetina quantificados por espectrometria de UV/Vis nas diferentes amostras de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (n=6).

Espécies medicinais	Quercetina (mg/100 g de material vegetal) Média ± DP
<i>A. zerumbet</i>	
AZ1	37,0 ± 0,01
AZ2	12,0 ± 0,00
AZ3	9,0 ± 0,02
AZ4	40,0 ± 0,00
AZ5	42,0 ± 0,03
AZ6	51,0 ± 0,03*
AZ7	54,0 ± 0,02*
<i>E. uniflora</i>	
EU1	183,0 ± 0,01
EU2	142,3 ± 0,00
EU3	90,0 ± 0,00
EU4	169,1 ± 0,03
EU5	189,3 ± 0,02*

* $p < 0,05$ comparado com as amostras da mesma planta.

As concentrações de flavonoides expressos como quercetina variaram nas amostras de *A. zerumbet*. É importante ressaltar que as amostras com menores valores (AZ2 e AZ3) foram constituídas de folhas jovens. As amostras com folhas adultas (AZ6 e AZ7) foram coletadas nos meses de janeiro e revelaram as maiores concentrações dos flavonoides sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) das demais amostras (AZ1, AZ4 e AZ5) coletadas nos meses de outubro e agosto respectivamente.

Para as amostras de *E. uniflora*, observou-se diferenças ($p < 0,05$) nas concentrações de quercetina entre todas as amostras. Porém, a amostra EU3 coletada no inverno apresentou o menor valor e a amostra EU5 no verão o maior valor. As variações encontradas para as amostras das espécies medicinais podem evidenciar diferenças relacionadas à sazonalidade e também, aos fatores edáfico-climáticos. Para Zuanazzi & Montanha (2003) diversas funções são atribuídas aos flavonoides nos vegetais dentre elas, a proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível que são mais intensos no verão. Esse fato pode ajudar a justificar a maior presença destas substâncias químicas nas plantas analisadas, nessa época do ano.

Marques *et al.* (2011) relataram que diversas técnicas são empregadas para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais uma delas, a espectrometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/Vis) alcança grande destaque devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo de execução e ampla disponibilidade nos laboratórios de controle de qualidade. Nesse trabalho, este método apresentou resultados representativos e reproduzíveis.

Harnafi *et al.* (2007) utilizando o mesmo método de doseamento para *A. zerumbet* e *E. uniflora* obtiveram para *Erica multiflora* L. (Ericaceae) a concentração de 13 mg/100 g de material vegetal. Valor considerado baixo pelos autores. Nesse estudo, os valores considerados baixos foram evidenciados somente para amostras de *A. zerumbet* com folhas jovens (amostras EU2 e EU3 com 12,0 e 9,0 mg de quercetina/100 g de planta seca respectivamente). Os demais valores encontrados nas duas espécies variaram de 37,0 a 189,3 mg de quercetina/100 g de planta seca. Dessa forma, os resultados foram considerados elevados para flavonoides representados por quercetina. Cabe salientar, que para *E. uniflora* a farmacopeia (F. Bras. IV,

1988-2005) preconiza por outro método de determinação, uma concentração mínima de 2% de flavonoides representados como quercetina.

Quantificação de flavonoides de *Solidago chilensis*

Através do método farmacopeico proposto nos procedimentos metodológicos foi possível determinar os teores de flavonoides totais (TFT) para todas as amostras (Tabela 10) e para as folhas e caules (FC), inflorescências (INF) e partes aéreas (PA) da amostra SC1 (Tabela 11).

Para as amostras de *S.chilensis*, observou-se diferenças ($p < 0,05$) nas concentrações de flavonoides representados como hiperosídeo, com relação aos locais e datas das coletas. Os valores mais elevados foram observados nos anos de 2010 e 2012 (amostras SC1, SC4 e SC5) e os menores em 2010 e 2011 (amostras 2 e 3, respectivamente). Também se verificou diferenças no teor de flavonoides ($p < 0,05$) para as diferentes partes da planta.

Tabela 10. Teores de flavonoides representados por hiperosídeo nas diferentes amostras das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) quantificados por espectrometria de UV/Vis (n=3).

Amostras de <i>Solidago chilensis</i>	Teor de flavonoides totais Média ± DP (%)
SC1	4,49 ± 0,068*
SC2	2,32 ± 0,37
SC3	3,20 ± 0,27
SC4	5,33 ± 0,25*
SC5	5,20 ± 0,61*

* $p < 0,05$.

Tabela 11. Concentração de flavonoides representados por hiperosídeo nas diferentes partes da planta para amostra SC1 de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) quantificados por espectrometria de UV/VIS (n=3).

Partes da planta de <i>Solidago chilensis</i>	Teor de flavonoides totais Média ± DP (%)
Folhas e caules (FC)	4,98 ± 0,04*
Inflorescências (INF)	4,39 ± 0,02
Partes aéreas (PA)	4,41 ± 0,03

* $p < 0,05$.

Os valores determinados para todas as amostras podem ser considerados elevados se comparados a *Persea americana* Mill. (Laureaceae) e a *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), plantas que nas respectivas monografias farmacopeicas (FB 5, 2010) devem conter no mínimo 0,4% de flavonoides representados como hiperosídeo. Borella & Fontoura (2002) analisaram oito amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) também por método espectrofotométrico e obtiveram valores que oscilaram de 0,12 a 0,66%. Esses dados corroboram a informação que *S. chilensis* possui grande quantidade dessas substâncias nas partes aéreas. As variações nas concentrações de flavonoides nas amostras coletadas nos diferentes locais e períodos de tempo, podem estar relacionadas com fatores como clima e solo de origem e ao contrário do que se estimava, as folhas e caules possuem um incremento no teor de flavonoides em comparação com as inflorescências de forte coloração amarela de *S. chilensis*.

Fenóis totais de *Alpinia zerumbet*, *Solidago chilensis* e *Eugenia uniflora*

Conforme Sousa *et al.* (2007), elaborou-se curva analítica com padrões de ácido gálico (2,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$) e obteve-se a equação da reta ($y = 0,0351x + 0,0063$) e coeficiente de correlação de 0,9998 (Figura 23). Com essas informações quantificou-se o teor de fenóis totais nos extratos (Tabela 12).

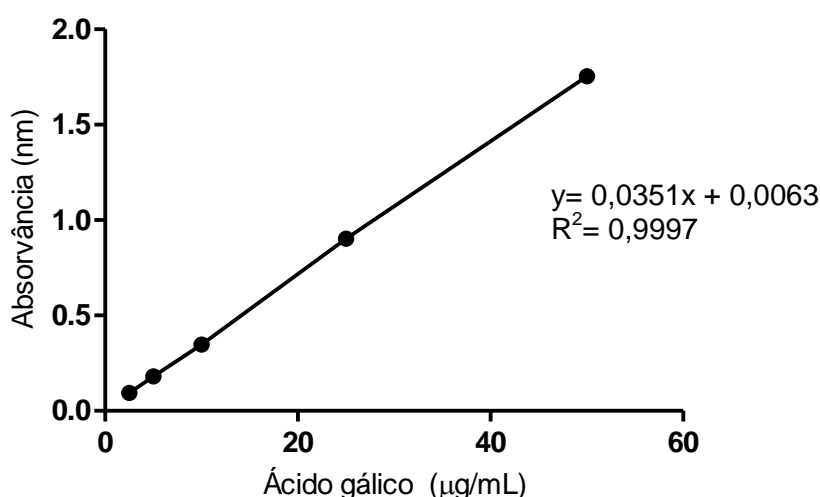


Figura 23. Curva analítica para o padrão ácido gálico (2,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH) utilizando método de Folin–Ciocalteu e absorvância após 2 h em 750 nm (n=3).

Tabela 12. Conteúdo de fenóis totais (FT) representados por equivalentes de ácido gálico (EAG) para os extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen, (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) (n=3).

Extratos das espécies medicinais	Peso (g) dos extratos liofilizados após extração	FT (mg EAG/g de extrato) Média ± DP (CV%)	FT (mg EAG/g de material vegetal seco)
<i>A. zerumbet</i>	38,18	80,16 ± 1,93 (2,41)	6,12
<i>S. chilensis</i>	110,84	102,00 ± 2,26 (2,22)	22,61
<i>E. uniflora</i>	41,11	144,59 ± 2,74 (1,89)	29,70

Sousa *et al.* (2007) avaliaram o teor de fenóis totais utilizando o mesmo método, obtiveram para extratos etanólicos de cinco espécies de plantas medicinais valores que variaram de 250 a 763,63 mg de EAG/g de extrato. Andrade *et al.* (2007), com metodologia semelhante descreveram para o extrato bruto e frações de *Acacia pedalyrii* A. Cunn. ex G. Don. (Leguminosae-Mimosidae) cujo gênero é reconhecido como fonte de compostos fenólicos, concentrações de 206,4 a 338,5 mg de EAG/g de extrato. Elzaawely *et al.* (2007) observaram para extrato aquoso das flores e sementes de *A. zerumbet* 56,7 e 13,7 mg de EAG/g de extrato, respectivamente. Dessa forma, constata-se que os extratos das espécies deste estudo apresentam concentrações consideráveis de substâncias fenólicas.

No entanto, Bueno *et al.* (2012) destacaram que a concentração de polifenóis se modifica quando alterações são realizadas no tempo de reação nas absorvâncias escolhidas, no pH das soluções e nos padrões utilizados sendo portanto necessária, a padronização ou validação do método para cada material vegetal.

Cromatografia líquida de alta eficiência para os extratos vegetais

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de *Alpinia zerumbet*

Realizou-se varredura de UV/Vis (200 a 800 nm) de uma solução metanólica de rutina (200 µg/mL) obtendo-se absorvâncias máximas nos comprimentos de onda de 250 e 360 nm característicos de flavonoides.

Para curva analítica em CLAE utilizou-se rutina diluída em metanol como padrão externo nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ com número de repetições igual a três (Figura 24).

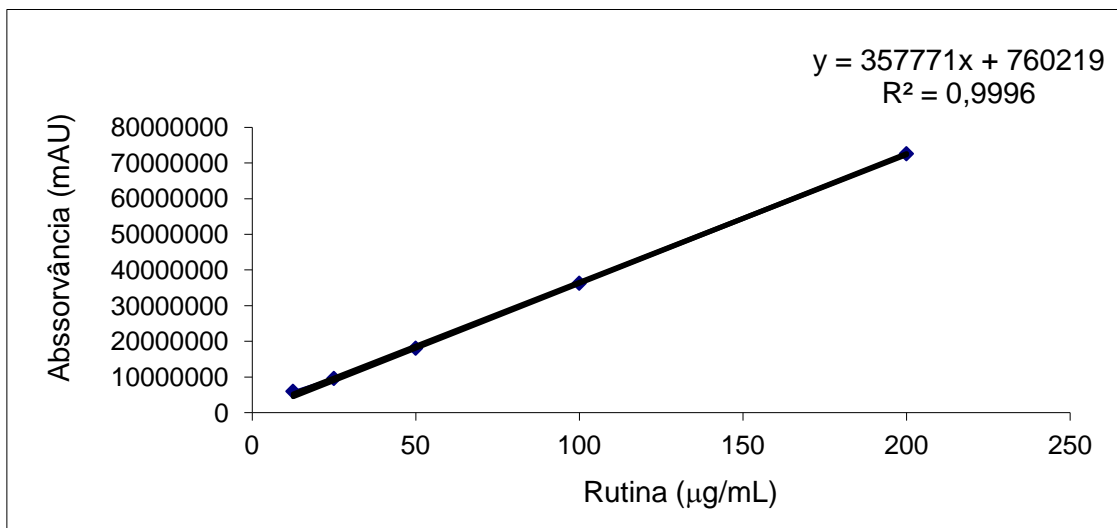


Figura 24. Curva analítica do padrão rutina (12,5 a 200 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 μm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C. Solventes utilizados: $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (0,1% v/v) (solvente **A**) e MeOH (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 70% de **A** por 5 min, 60% de **A** 10 min e 100% de **B** por 20 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 254 nm (n=3).

A análise cromatográfica em CLAE de *A. zerumbet* foi realizada para a fração acetato de etila (AcOEt) das folhas do vegetal (FAE).

Com o objetivo de obter uma análise cromatográfica mais específica para observação de compostos fenólicos, também se realizou CLAE para fração AcOEt submetida a extração em fase sólida (SPE Phenomenex® Stracta C18-E; 500 mg/3 mL) (FAFSA). Ambas as cromatografias podem ser observadas na Figura 25.

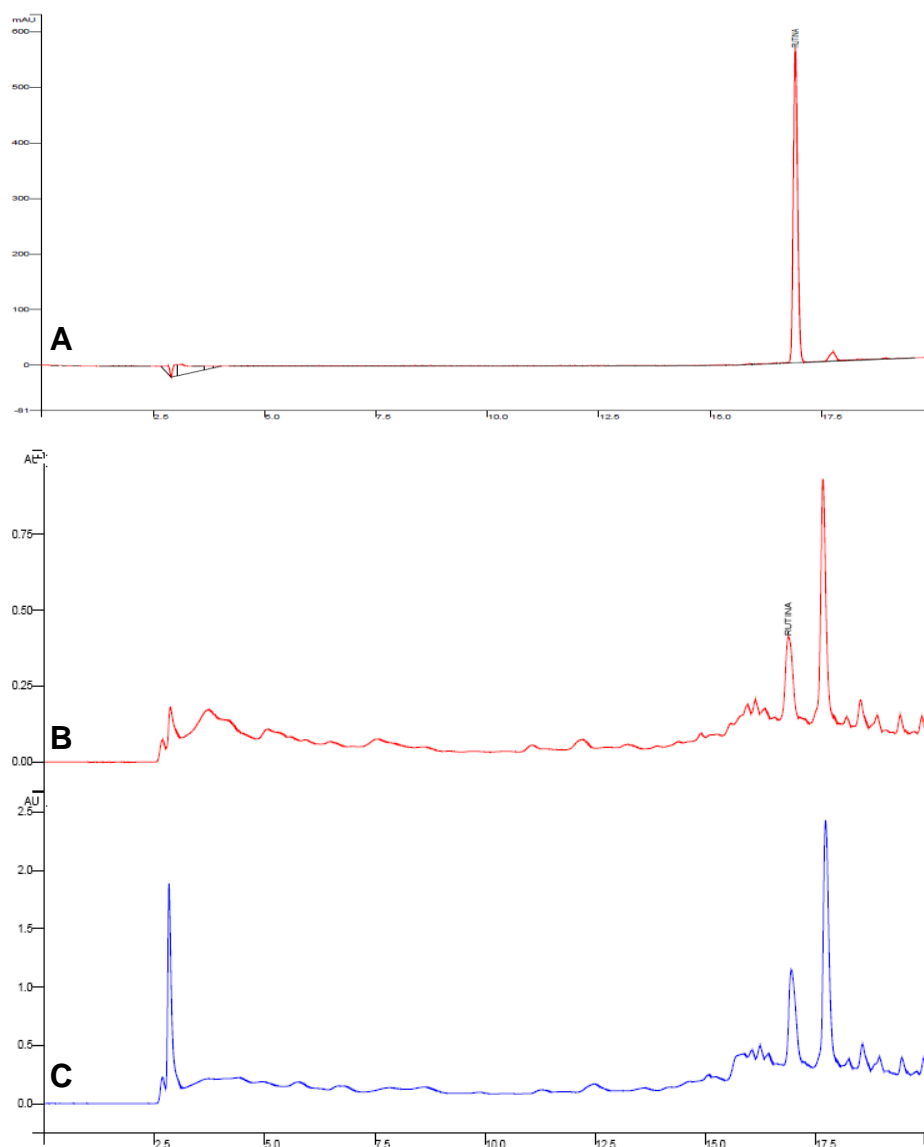


Figura 25. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para fração acetato de etila das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (10 mg/mL em MeOH): A. Padrão rutina (100 µg/mL em MeOH) (Rf: 16,9 min); B. Fração acetato de etila das folhas de *Alpinia zerumbet*; C. Fração acetato de etila das folhas de *Alpinia zerumbet* submetida a extração em fase sólida. Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24±2 °C. Solventes utilizados: H₂O:H₃PO₄ (0,1% v/v) (solvente **A**) e MeOH (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 70% de **A** por 5 min, 60% de **A** 10 min e 100% de **B** por 20 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 254 nm.

Substituindo os valores das absorvâncias das amostras na equação da reta ($y = 357771x + 760219$), quantificou-se o flavonoide rutina nas frações, extrato total e folhas secas de *A. zerumbet* (Tabela 13).

Tabela 13. Concentração de rutina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas frações acetato de etila, extrato fluido e nas folhas secas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae).

Amostras (10 mg/mL)	Concentração (µg/mL)	Rutina (mg) na fração acetato	Rutina (mg) no extrato total	Rutina (mg) na planta seca (100 g)
Fração AcOEt (FAE)	96,00	9,40	35,93	7,19
Fração AcOEt em extração por fase sólida (FAFSA)	81,45	7,98	30,47	6,09

Para a fração AcOEt das folhas de *A. zerumbet*, não se observou melhora representativa da cromatografia em CLAE quando a mesma foi submetida a extração em fase sólida. A extração por fase sólida proporcionou ainda, um decréscimo na quantificação de rutina em torno de 15%.

Lin *et al.* (2008) obtiveram 3,76 e 6,06 mg rutina a cada 100 g de extratos aquoso e etanólico das sementes de *A. zerumbet*. Por meio do método de extração e solventes utilizados neste estudo o valor obtido para de rutina para as folhas de *A. zerumbet* é de 94 mg a cada 100 g de extrato, um aumento de aproximadamente 90%. Victório *et al.* (2009) avaliando a concentração de rutina em extratos hidroalcoólicos (70% v/v) de *A. zerumbet*, conseguiram valores de 1,5 e 1,0 mg/g em folhas secas quando o material vegetal foi extraído por ultrassom e microondas, respectivamente. Em outro estudo, Victório *et al.* (2009) detectaram na fração AcOEt das folhas de *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. 17,8 mg/g de rutina um valor semelhante ao encontrado neste trabalho.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de *Solidago chilensis*

Realizou-se uma varredura em espectrofotômetro de UV/Vis com uma solução de quercetrina (200 µg/mL) com o objetivo de verificar a sensibilidade da substância. Observaram-se absorvâncias representativas em comprimento de onda de 250 e 360 nm característico dos flavonoides. A curva analítica em CLAE foi realizada utilizando-se quercetrina diluída em MeOH como padrão externo nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 450 µg/mL com número

de repetições igual a três (n=3) (Figura 26). A cromatografia em CLAE para o padrão quercetrina (200 µg/mL em MeOH) pode ser visualizada na figura 27.

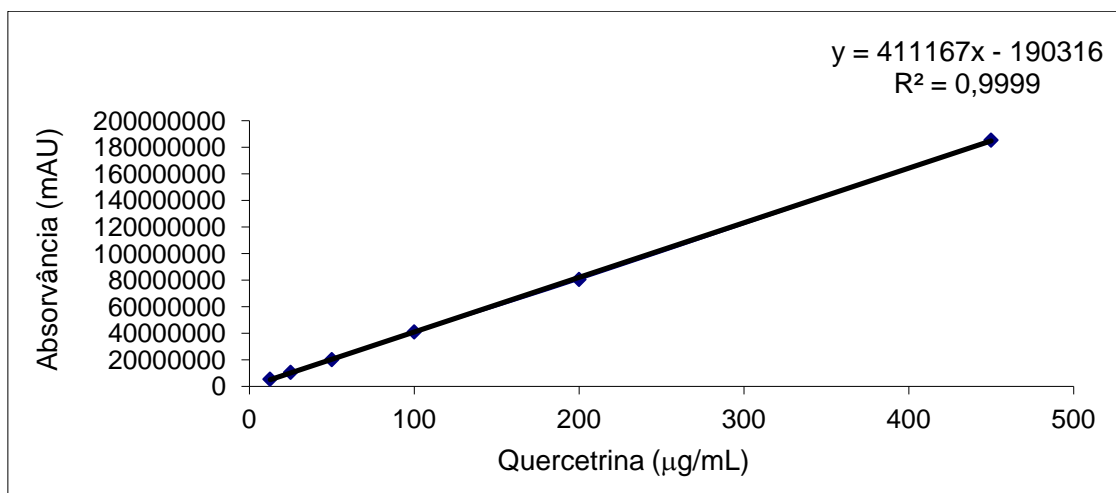


Figura 26. Curva analítica do padrão quercetrina (12,5 a 450 µg/mL em MeOH) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24±2 °C. Solventes utilizados: H₂O:AcOH (40:1 v/v) (solvente **A**) e CH₃CN (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 86% de **A** por 15 min, 65% de **A** por 30 min e 100% de **B** por 2 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 360 nm (n=3).

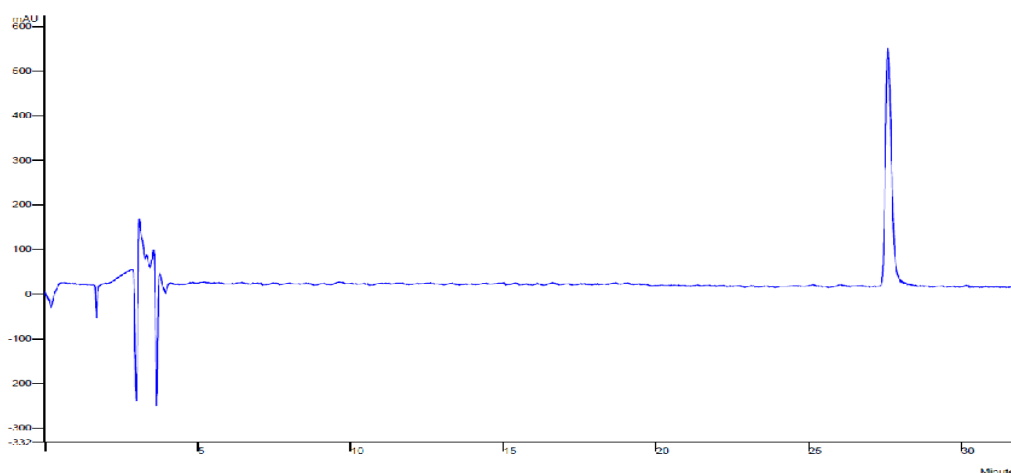


Figura 27. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para padrão quercetrina (200 µg/mL em MeOH) (Rf: 27,6 min). Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24±2 °C. Solventes utilizados: H₂O:AcOH (40:1 v/v) (solvente **A**) e CH₃CN (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 86% de **A** por 15 min, 65% de **A** por 30 min e 100% de **B** por 2 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 360 nm (n=3).

Os cromatogramas para os extratos fluidos das inflorescências (INF), caules e folhas (CF) e partes aéreas (PA) de *S. chilensis* estão representados na figura 28.

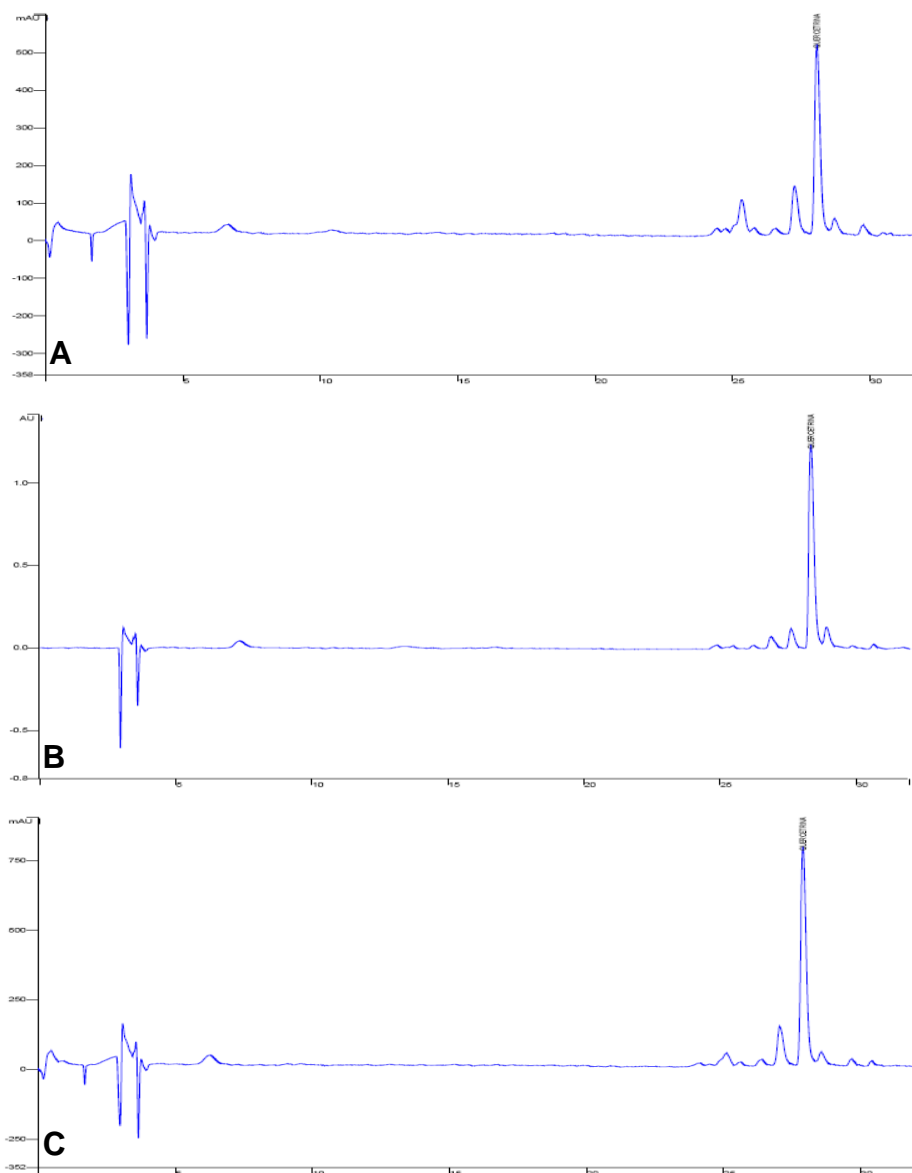


Figura 28. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para extrato fluido de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (1 mg/mL em MeOH): A. Inflorescências (INF); B. Folhas e caules (FC); C. Partes aéreas (PA). Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 μ m) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C. Solventes utilizados: H₂O:H₃PO₄ (0,1% v/v) (solvente **A**) e MeOH (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 70% de **A** por 5 min, 60% de **A** 10 min e 100% de **B** por 20 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 360 nm.

Substituindo as absorvâncias das amostras na equação da reta da curva analítica ($y = 411167x - 190316$), quantificou-se o flavonoide quercetrina nos extratos. Os resultados estão expressos na tabela 14.

Tabela 14. Concentração de quercetrina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nos extratos fluidos e planta seca de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae).

Extratos fluidos (1 mg/mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Quercetrina (g) no extrato total	Quercetrina (g) na planta seca (100 g)
Inflorescência (INF)	177,49	0,5290	5,29
Folhas e caules (FC)	410,30	1,2144	12,1
Partes aéreas (PA)	291,65	0,6473	6,47

Apáti *et al.* (2006) ao avaliarem as partes aéreas de *Solidago canadensis* L. (Asteraceae) obtiveram 5,75 g de quercetrina a cada 100 g de planta, resultado muito próximos aos apontados nesse trabalho. Devido às inflorescências amarelas e abundantes poderia se pensar, que o maior conteúdo de flavonoides estaria nessa parte do vegetal no entanto, a maior quantidade dessa substância está presente nas folhas e caules. Zuanazzi & Montanha (2003) relatam que muitas vezes os flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos das plantas. Descrevem ainda, que o mesmo composto pode ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra e que este fato pode estar relacionado, às diversas funções biológicas que estes metabólitos exercem nas plantas.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de *Eugenia uniflora*

A Varredura em espectrofotômetro de UV/Vis com uma solução metanólica de quercetina (50 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou absorvâncias em 250 e 360 nm características de flavonoides. Soluções metanólicas de quercetina (3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas para elaboração de uma curva analítica em CLAE por meio de padrão externo (Figura 29).

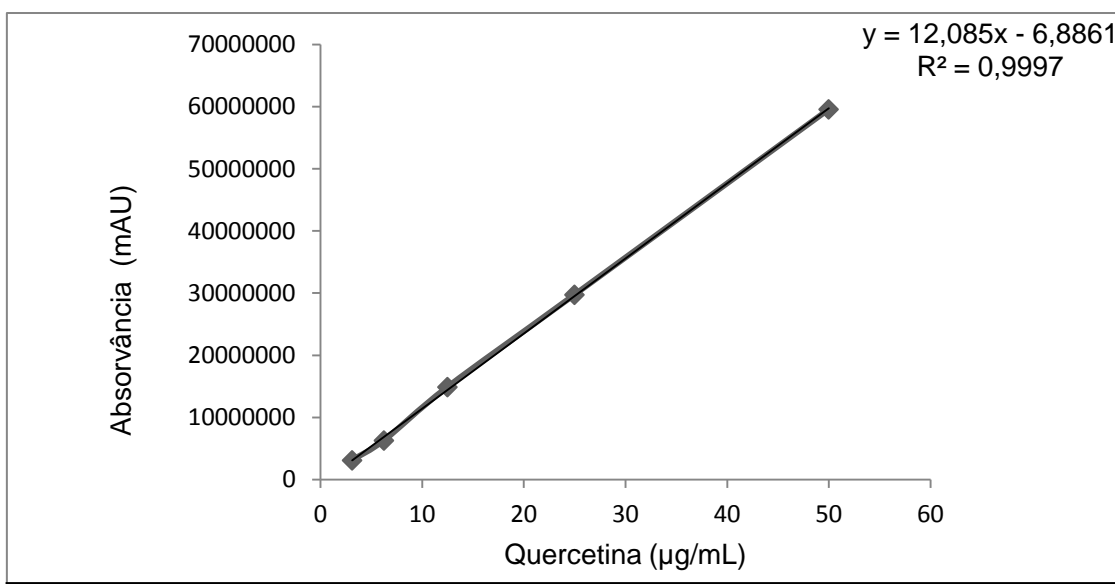


Figura 29. Curva analítica para o padrão quercetina (3,12 a 50 µg/mL em MeOH) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24±2 °C. Solventes utilizados, MeOH (solvente **A**): H₂O (HCO₂H 0,3% v/v) (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 20% de **A** por 6 min, 52% de **A** por 15 min, 72% de **A** por 27 min e 10% de **A** por 30 min. A vazão foi de 0,8 mL/min. A detecção foi realizada em 370 nm (n=3).

Para as folhas de *E. uniflora* realizou-se CLAE utilizando a fração AcOEt submetida a extração por fase sólida (SPE Phenomenex® Stracta C18-E; 500 mg/3 mL) (FAFSE) (Figura 30).

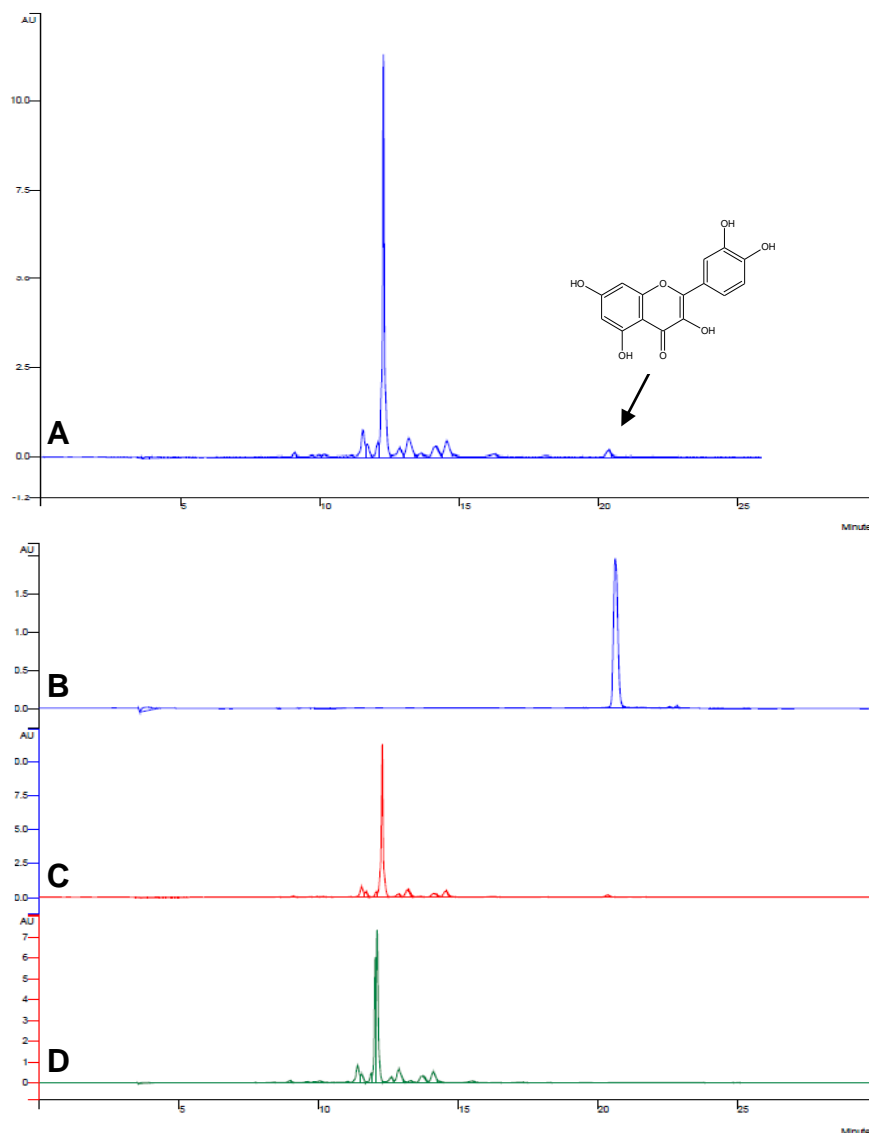


Figura 30. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para fração acetato de etila das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (10 mg/mL em MeOH): A. Destaque para a presença de quercetina na fração acetato de etila submetida a extração em fase sólida; B. Padrão quercetina (12,5 µg/mL em MeOH) (Rf: 20,6 min); C. Fração acetato de etila; submetida a extração em fase sólida; D. Fração acetato de etila. Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24±2 °C. Solventes utilizados MeOH (solvente **A**): H₂O (HCO₂H 0,3% v/v) (solvente **B**). O gradiente utilizado foi 20% de **A** por 6 min, 52% de **A** por 15 min, 72% de **A** por 27 min e 10% de **A** por 30 min. A vazão foi de 0,8 mL/min. A detecção foi realizada em 370 nm.

Aplicando-se a equação da reta ($y = 12,085x - 6,8861$) determinou-se a concentração de quercetina na fração AcOEt, no extrato fluido e na planta seca (Tabela 15).

Tabela 15. Concentração de quercetina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na fração acetato de etila, extrato fluido e planta seca de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).

Amostras (10 mg/mL)	Concentração (µg/mL)	Quercetina (mg) na fração acetato	Quercetina (mg) no extrato fluido	Quercetina (mg) na planta seca (100 g)
FAFSE	25,41	8,28	34,08	17,04

Não há descrição na literatura consultada da utilização de CLAE para quantificação de flavonoides em extratos de *E. uniflora*. Na maioria dos estudos encontram-se a métodos de cromatografia gasosa em conjunto com a espectrometria de massas (CG-MS) para identificação e quantificação de constituintes voláteis. Nesse sentido, Ogunwande *et al.* (2005) destacaram a presença majoritária de curzerenos (19,7%) no óleo essencial de folhas da planta. Cole *et al.* (2007) relataram que podem ocorrer variações na quantificação de substâncias químicas voláteis nas folhas de espécies de *Eugenia* em função da complexidade filogenética. Assim sendo, se justifica a pesquisa de novos métodos como a CLAE para o doseamento de compostos bioativos em *E. uniflora* que podem auxiliar a estabelecer parâmetros de controle de qualidade.

Fracionamento do extrato fluido de *Alpinia zerumbet* em coluna cromatográfica

O extrato fluido de *A. zerumbet* obtido da extração por percolação utilizando solvente hidroalcoólico (16,5 L; EtOH 70% v/v) e 500 g de material vegetal, rendeu após liofilização 38,2 g (7,6%). Essa amostra foi dissolvida em água (500 mL) sob agitação e submetida à partição em funil de separação com solventes em polaridade crescente (*n*-hexano e AcOEt). A fração AcOEt foi concentrada até resíduo (6,7 g) e uma amostra dessa fração (5,2 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando Sephadex LH-20 (Fluka®) como fase estacionária e MeOH como eluente. Foram obtidas 5 subfrações reunidas por semelhança através de CCD.

A subfração 2 (0,1 g) apresentou bandas em CCD com extinção de fluorescência e foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica com rendimento de 2 subfrações (2.2 e 2.3) que foram submetidas a análises

espectroscópicas de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e EM (ESI). Nas análises de RMN de ^1H para 2.2 observou-se deslocamentos químicos próximos a 7,0 ppm (7,19, 7,26 e 7,34) característicos de anel aromático monossustituído. Também se verificou, sinais na região de 2 ppm (2,79 e 2,96 (t; $J = 8$ Hz)) relacionados a radicais etilênicos e 5 ppm (5,51 e 5,96 (d; $J = 2,2$ Hz)) característicos de sistema cíclico contendo lactona insaturada dissustituída. Destaca-se ainda, sinal em 3,81 ppm (s) com características de metoxila (Figura 31 e Tabela 16). Sinais de RMN de ^{13}C em 167,8 e 173,7 ppm evidenciam a presença de carbonos carbonílicos e sinais de 129,4 a 141,2 ppm destacam os carbonos aromáticos. Observou-se também, sinal em 56,8 ppm indicando presença de metoxila (Figura 32 e Tabela 16). Esses dados em comparação com espectros da literatura (Itokawa *et al.*, 1981) permitiram identificar a substância como, di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK) (**17**). Com relação às análises em espectrometria de massas (EM-ESI) observou-se que a fórmula molecular para DDK ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$) indica uma relação m/z de 230,26 Da. Nesse trabalho obteve-se em modo positivo o resultado de $[\text{M} + \text{H}]^+ = 231,1$ que corresponde ao valor esperado para o analito (Figuras 33 e 34).

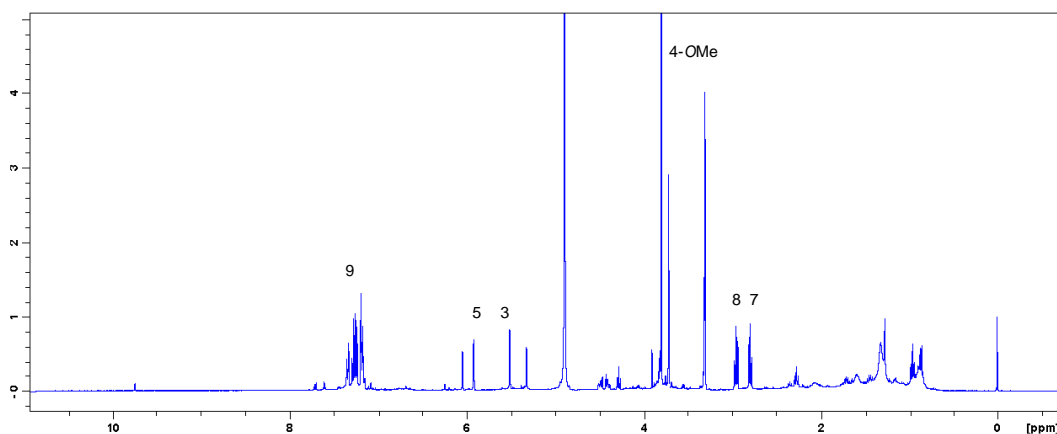
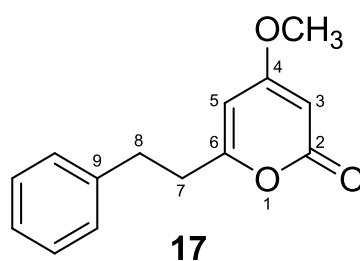


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) para di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK) relativo ao TMS.

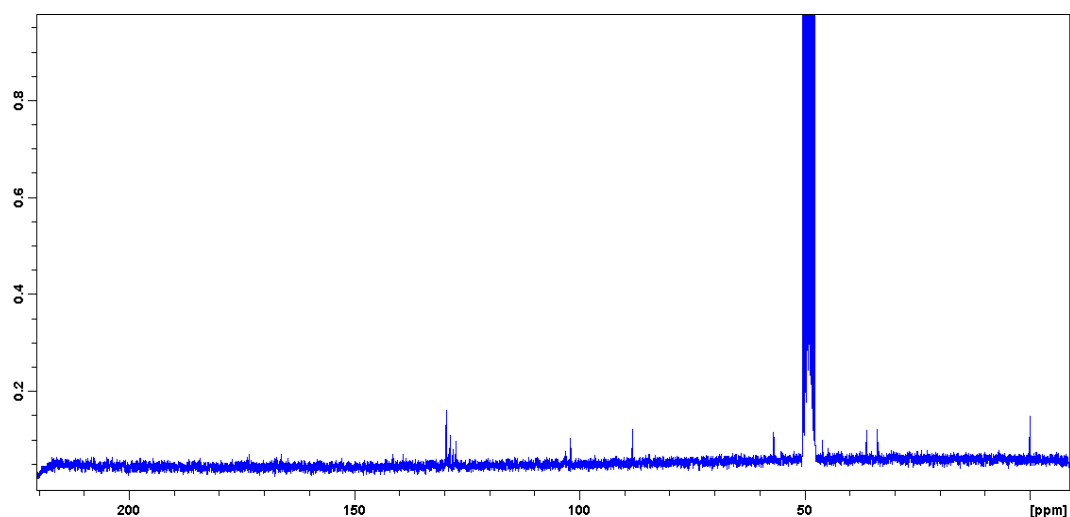


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para di-hidro-5,6-de-hidrocaivaína (DDK) relativo ao TMS.

Tabela 16. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) e RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para di-hidro-5,6-de-hidrocaivaína (DDK).

Posições dos átomos	Deslocamentos de RMN de ^1H ($\delta = \text{ppm}$) (acoplamentos spin-spin)	Deslocamentos de RMN de ^{13}C ($\delta = \text{ppm}$)	Deslocamentos de RMN de ^{13}C ($\delta = \text{ppm}$ em CDCl_3) Itokawa <i>et al.</i> (1981)
1	-	-	-
2	-	167,8	164,2
3	5,51 (d; $J = 2,25 \text{ Hz}$; 1-H)	88,2	87,6
4	-	173,7	171,0
5	5,92 (d; $J = 2,24 \text{ Hz}$; 1-H)	101,9	100,1
6	-	166,2	164,7
7	2,79 (t; $J = 8 \text{ Hz}$; 2-H)	36,1	35,8
8	2,96 (t; $J = 8 \text{ Hz}$; 2-H)	33,7	32,8
9	-	141,2	139,8
10	7,19 (m; 1-H)	129,4	128,2
11	7,26 (m; 1-H)	129,5	128,5
12	7,34 (m; 1-H)	128,5	126,3
13	7,26 (m; 1-H)	129,5	128,5
14	7,19 (m; 1-H)	129,4	128,2
4-OMe	3,81 (s; 3-H)	56,8	55,8

Nota: Em parênteses, s: singleto, d: dupleto; t: tripleto; m: multipeto e constante de acoplamento, J em Hz.

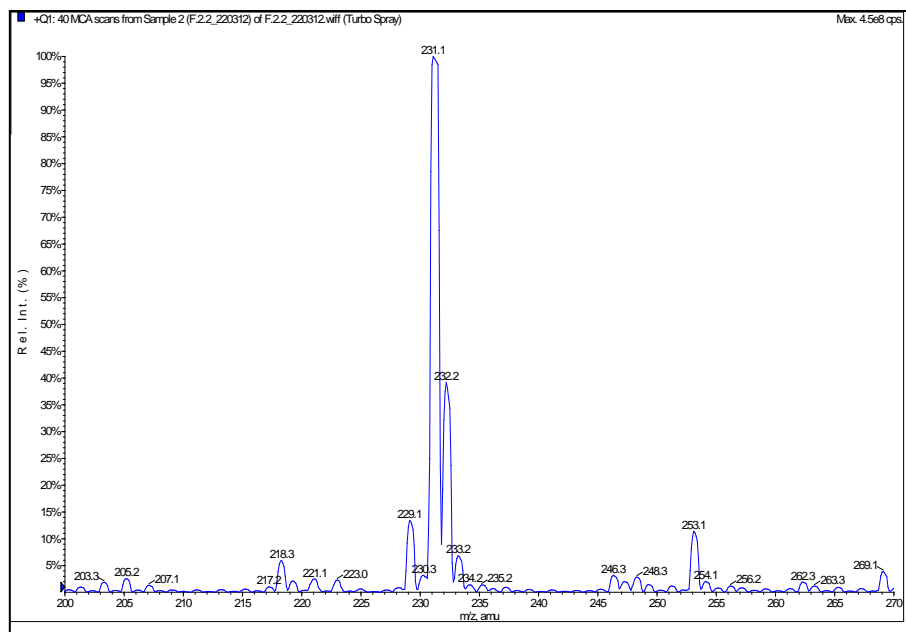


Figura 33. Espectro de varredura (EM-ESI) para di-hidro-5,6-de-hidrocaivaína (DDK) obtido por infusão direta. Destaque para o íon molecular m/z 231,1 Da. Infusão com acetonitrila (0,1% de ácido fórmico). Fonte de ionização eletrospray operada no modo positivo de ionização. Varredura de 200 e 300 Da. Vazão 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posição do capilar 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal, voltagem 5500 V, gás de dessolvatação: 15 psi, *declustering potential* (DP): 40, *entrance potential* (EP): 10.

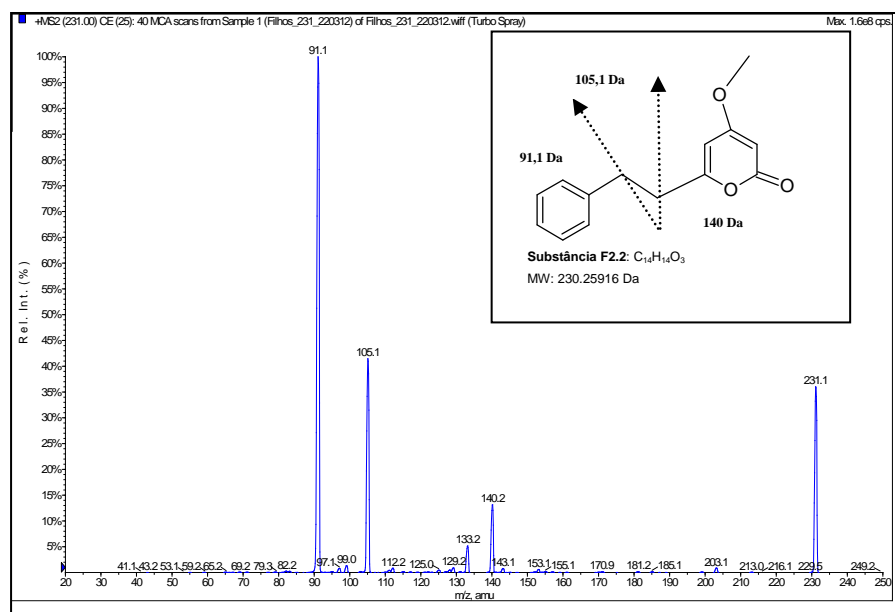


Figura 34. Espectro de massa/massa (ESI) para di-hidro-5,6-de-hidrocaivaína (DDK) obtido por infusão direta. Destaque para os principais fragmentos de íons (91,1, 105,1 e 140,2 Da). Infusão com acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) (*collision energy* = 30). Fonte de ionização eletrospray operada no modo positivo de ionização. Varredura de 200 e 300 Da. Vazão 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posição do capilar 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal, voltagem 5500 V, gás de dessolvatação: 15 psi, *declustering potential* (DP): 40, *entrance potential* (EP): 10.

A subfração 2.3 apresentou deslocamentos químicos próximos a 7,0 ppm (7,36 a 7,59) característicos de substância química aromática monossubstituída. Sinais em 6,86 e 7,43 ppm (d; $J = 16,1$ Hz) estão relacionados a radicais etilênicos insaturados e sinais em 5,62 e 6,24 (d; $J = 2,2$ Hz) possuem características de sistema cíclico contendo lactona insaturada dissustituída. Observou-se também, sinal em 3,87 ppm (s) com características de metoxila (Figura 35 e Tabela 18). Sinais de RMN de ^{13}C em 160,5 e 173 ppm permitem evidenciar a presença de carbonos carbonílicos e sinais na região de 128,1 a 136,3 ppm possuem características de carbonos aromáticos. Foi observado ainda, sinal em 56,6 ppm indicando presença de metoxila (Figura 36). Essas informações comparadas com estudos de Itokawa *et al.* (1981) permitiram identificar a substância como sendo 5,6-de-hidrocavaína (DK) (**18**). Nas análises em espectrometria de massas (EM-ESI) observou-se que a fórmula molecular para DK ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$) indica uma relação m/z de 230,26 Da. A análise em modo negativo apresentou o resultado de $[\text{M} - \text{H}]^+ = m/z$ 229,1 Da de acordo com valor esperado para a substância (Tabela 17 e Figuras 37 e 38).

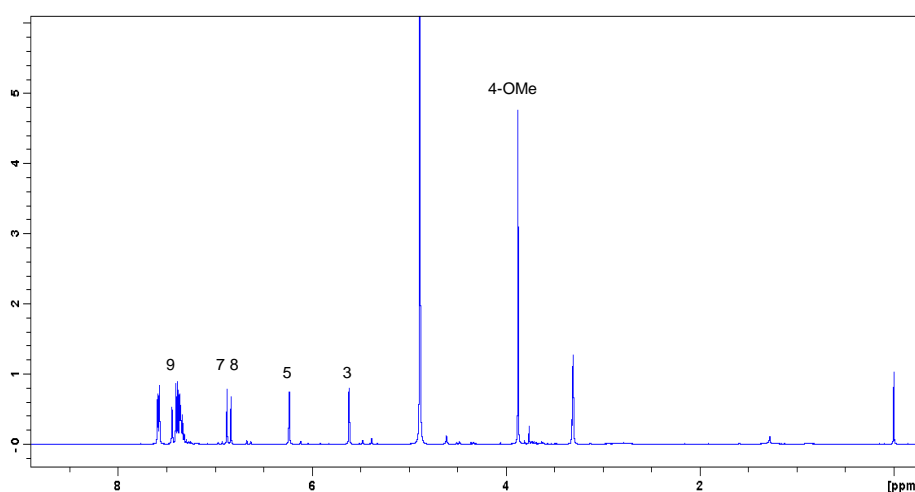
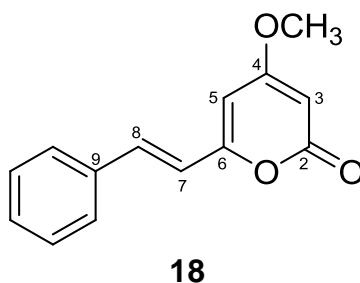


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) para 5,6-de-hidrocavaína (DK) relativo ao TMS.

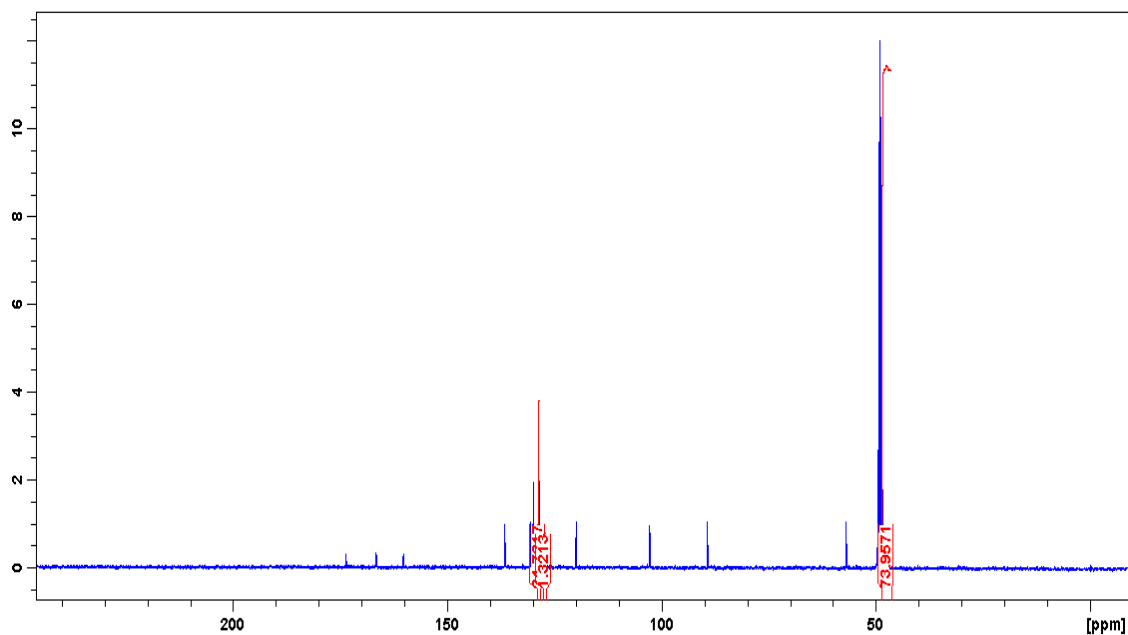


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para 5,6-de-hidrocaivaína (DK) relativo ao TMS.

Tabela 17. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) e RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para 5,6-de-hidrocaivaína (DK).

Posições dos átomos	Deslocamentos de RMN- ^1H (δ = ppm) (acoplamentos spin-spin)	Deslocamentos de RMN- ^{13}C (δ = ppm)	Deslocamentos de RMN- ^{13}C (δ = ppm em CDCl_3) Itokawa <i>et al.</i> (1981)
1	-	-	-
2	-	160,5	158,5
3	5,62 (d; $J = 2,2$ Hz; 1-H)	89,5	88,8
4	-	173,0	171,0
5	6,24 (d; $J = 2,2$ Hz; 1-H)	102,7	101,3
6	-	166,6	163,9
7	7,43 (d; $J = 16,1$ Hz; 1-H)	120,0	118,5
8	6,86 (d; $J = 16,1$ Hz; 1-H)	136,7	135,6
9	-	136,3	135,1
10	7,36 (m; 1-H)	128,4	127,4
11	7,59 (m; 1-H)	129,5	128,8
12	7,59 (m; 1-H)	130,2	129,3
13	7,40 (m; 1-H)	129,4	128,8
14	7,39 (m; 1-H)	128,1	127,4
4-OMe	3,87 (s; 3-H)	56,6	55,9

Nota: Em parênteses, d: duplete; m: multiplete; s: singleto; e constante de acoplamento, J em Hz.

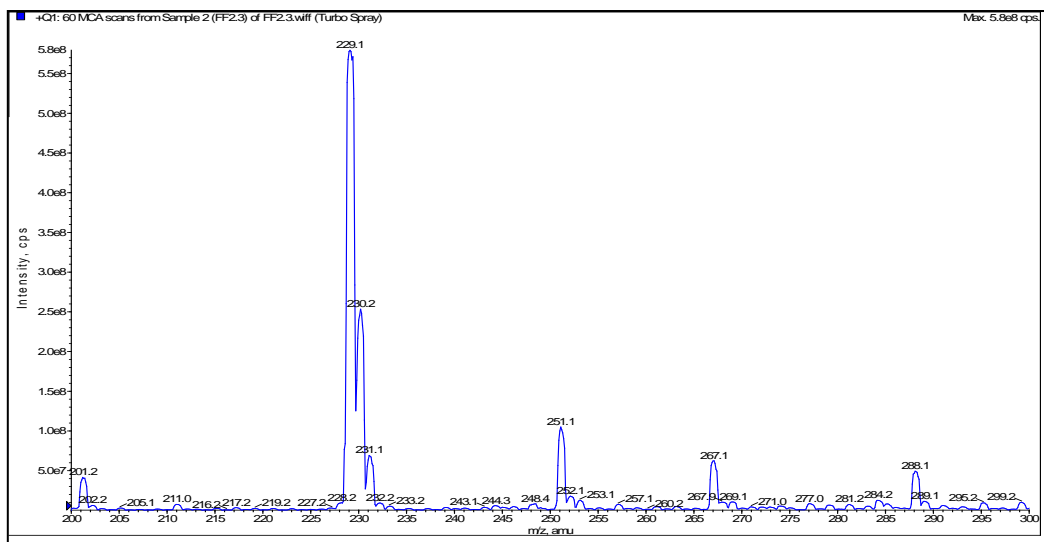


Figura 37. Espectro de varredura (EM-ESI) para 5,6-de-hidrocaivaína (DK) obtido por infusão direta. Destaque para o íon molecular m/z 229,1 Da. Infusão com acetonitrila (0,1% de ácido fórmico). Fonte de ionização eletrospray operada no modo positivo de ionização. Varredura de 200 e 300 Da. Vazão 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posição do capilar 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal, voltagem 5500 V, gás de dessolvatação: 15 psi, *declustering potential* (DP): 40, *entrance potential* (EP): 10.

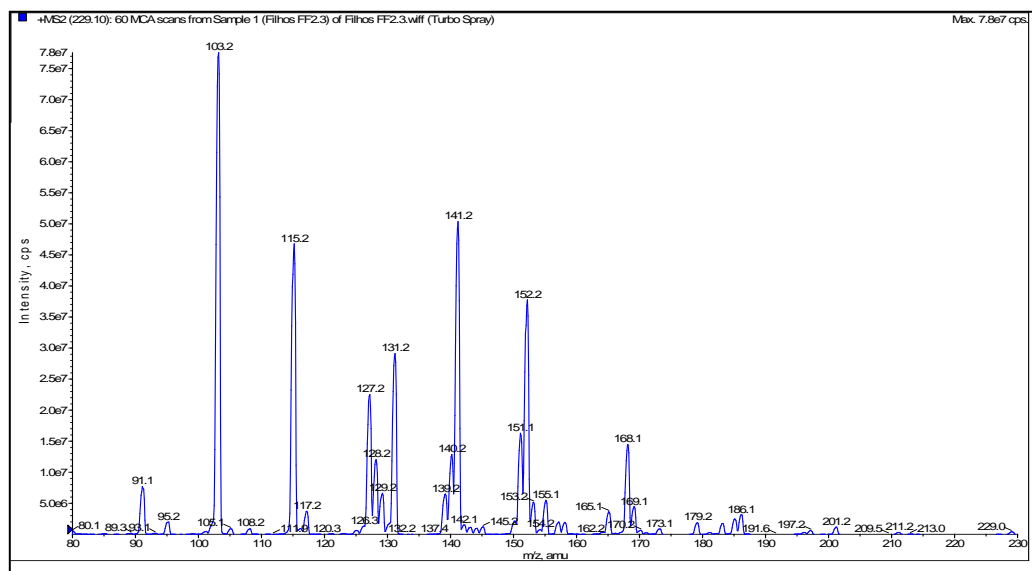
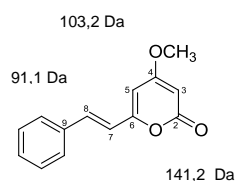
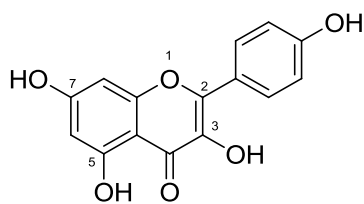


Figura 38. Espectro de massa/massa (ESI) para 5,6-de-hidrocaivaína (DK) obtido por infusão direta. Destaque para os principais fragmentos de íons (91,1, 103,2 e 141,2 Da) Infusão com acetonitrila (0,1% de ácido fórmico). Fonte de ionização eletrospray operada no modo positivo de ionização (*collision energy* = 50). Varredura de 200 e 300 Da. Vazão 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posição do capilar 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal, voltagem 5500 V, gás de dessolvatação: 15 psi, *declustering potential* (DP): 40, *entrance potential* (EP): 10.

As cavalactonas di-hidro-5,6-de-hidrocavaína (DDK) e 5,6-de-hidrocavaína (DK) relatadas neste trabalho, apresentam as mesmas características químicas já descritas por Itokawa *et al.* (1981) nos rizomas de *Alpinia speciosa* K. Schum. Mpalantinos *et al.* (1998) isolaram DK e DDK das folhas de *A. zerumbet* e relataram que estas substâncias apresentaram atividades biológicas antiulcerogênicas e antitrombóticas. Chompoo *et al.* (2011) descreveram que essas moléculas bioativas juntamente com os compostos fenólicos demonstraram atividades antioxidantes e que estes compostos presentes em *A. zerumbet* podem estar relacionados, com efeitos de inibição da neuraminidase e integrase frente ao HIV.

A subfração 4 (0,2 g) foi submetida a CCD e revelada com cloreto de alumínio a 1% em MeOH (p/v) com observação em câmara de UV a 366 nm. A placa apresentou banda fluorescente evidenciando substâncias fenólicas. Essa subfração foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária gel de sílica e como eluente mistura em polaridade crescente de DCM e MeOH (2,5 a 50%). Foram reunidas por CCD 6 subfrações. A subfração 4.4 apresentou perfil cromatográfico de apenas uma substância e foi encaminhada para análises espectroscópicas de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H (CD_3OD) revelou sinais em 6,89 (d; $J = 9,0$ Hz, 2H) e 8,07 ppm (d; $J = 9,0$ Hz, 2H) característicos de anel aromático dissubstituído. O duplete em 8,07 ppm está relacionado aos hidrogênios H-2' e H-6' e o duplete em 6,89 ppm está relacionado com os hidrogênios H-3' e H-5'. Dupletos em 6,17 (d; $J = 2,1$ Hz, 1H) e 6,37 (d; $J = 2,1$ Hz, 1H) ppm foram relacionados aos hidrogênios *meta* H-6 e H-8 do anel A da estrutura fundamental dos flavonoides (Figura 39) (Tabela 18). Sinais de RMN de ^{13}C na região de 40 a 170 ppm evidenciaram carbonos carbonílicos e aromáticos (Figura 40). Comparando esses dados com os espectros obtidos por Markham *et al.* (1978) foi possível identificar a substância como canferol ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$) (**19**).



19

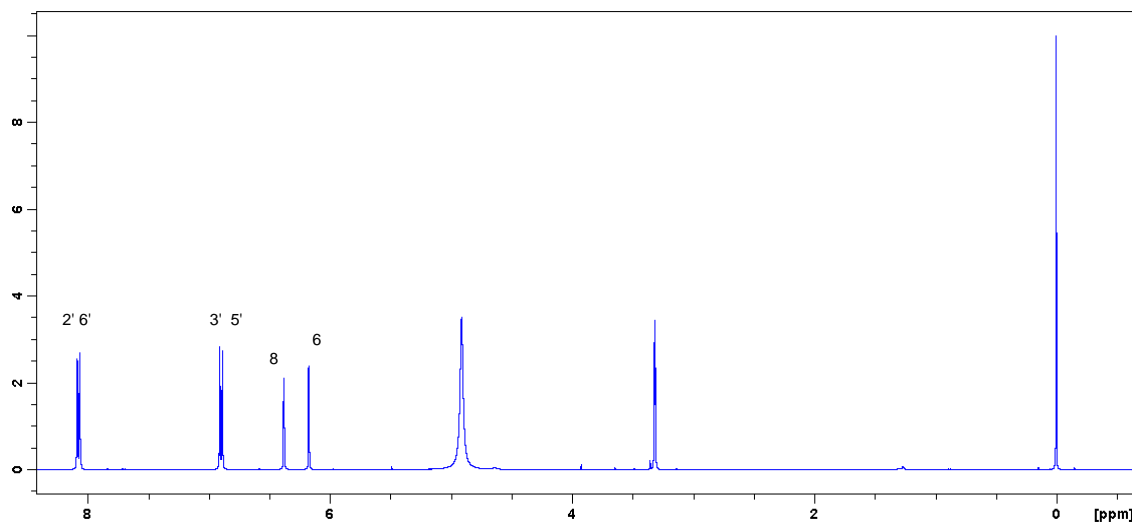


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) para o canferol relativo ao TMS.

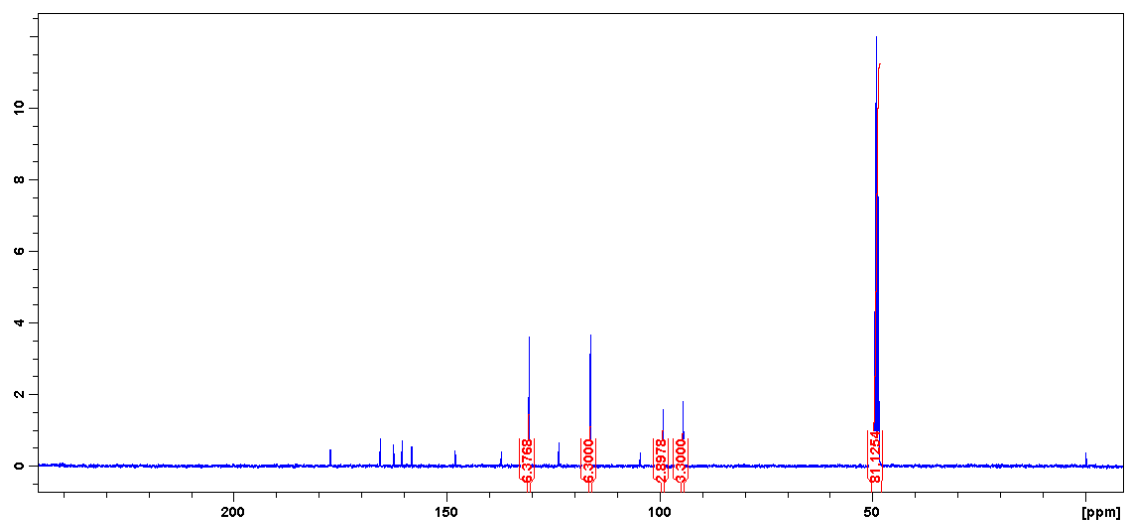


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para o canferol relativo ao TMS.

Tabela 18. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) e RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para o canferol.

Posições dos átomos	Deslocamentos de RMN- ^1H (δ = ppm) (acoplamentos spin-spin)	Deslocamentos de RMN- ^{13}C (δ = ppm)	Deslocamentos de RMN- ^{13}C (δ = ppm em CD_3OD) Markham <i>et al.</i> (1978)
1	-	-	
2	-	148,0	146,8
3	-	137,0	135,6
4	-	177,4	175,6
5	-	162,5	160,7
6	6,17 (d; $J = 2,1$ Hz; 1-H)	99,3	98,2
7	-	165,6	163,9
8	6,37 (d; $J = 2,1$ Hz; 1-H)	94,5	93,5
9	-	158,3	156,2
10	-	104,6	103,1
1'	-	123,7	121,7
2'	8,07 (d; $J = 9,0$ Hz; 1-H)	130,7	129,5
3'	6,89 (d; $J = 9,0$ Hz; 1-H)	116,3	115,4
4'	-	160,6	159,2
5'	6,89 (d; $J = 9,0$ Hz; 1-H)	116,3	115,4
6'	8,07 (d; $J = 9,0$ Hz; 1-H)	130,7	129,5

NOTA: Em parênteses, d; dupletto e constante de acoplamento, J em Hz.

O canferol está classificado no grupo dos flavonóis sendo um flavonoide de ocorrência comum em diversas plantas medicinais. Victório (2011) relatou que a família Zingiberaceae é rica nesses compostos indicando que os mesmos são inclusive, marcadores quimiotaxonômicos para ordem Zingiberales. Descreve ainda, que em virtude da presença de outros polifenólicos, várias são as atividades terapêuticas relatadas às inúmeras espécies. A autora cita também, que dentre os constituintes químicos de *A. zerumbet* encontra-se o canferol isolado por Mpalantinos *et al.* (1998). No entanto, o autor citado isolou outros heterosídeos de flavonoides, taninos e cavalactonas mas, não o canferol. Dessa forma, este é o primeiro estudo que de fato conseguiu isolar essa substância química pura nas folhas de *A. zerumbet*.

Fracionamento do extrato fluido de *Solidago chilensis* em coluna cromatográfica

O extrato obtido da extração por percolação da droga vegetal (500 g) e solvente hidroalcoólico (17 litros; etanol 70% v/v) rendeu 110,8 g (22,2%). Uma amostra deste extrato (20 g) foi solubilizada em H₂O (500 mL; sob agitação) e realizaram-se partições em funil de separação com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano e AcOEt). Nessa etapa observou-se a formação de um precipitado (ppt) amarelo na fração AcOEt que foi encaminhado para análises espectroscópicas de RMN de ¹H e RMN de ¹³C. A fração AcOEt após liofilização rendeu 3,1 g (15,5%). A fração AcOEt (1 g) foi fracionada em coluna cromatográfica contendo gel de sílica (Merck®) como fase estacionária e mistura de solventes CHCl₃:EtOH (v/v) em polaridade crescente e rendeu sete subfrações que foram reunidas por semelhança através de CCD com eluente AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10 v/v) e observadas em câmara de UV/Vis a 366 nm.

A subfração 6 (0,6 g) apresentou positividade para substâncias fenólicas quando revelada com cloreto de alumínio (1% em metanol, p/v) e foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e MeOH como eluente. As subfrações foram monitoradas em CCD e obtiveram-se duas com maior grau de pureza (6.1 e 6.2). A subfração 6.1 (0,2 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica (*flash*) com eluente AcOEt:MeOH com polaridade crescente e monitoramento por CCD. A subfração 6.1.1 evidenciou-se e foi encaminhada para análises espectroscópicas de RMN de ¹H e RMN de ¹³C.

A subfração 6.2 (0,200 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica (*flash*) com eluente AcOEt:MeOH com polaridade crescente e monitoramento por CCD. A subfração 6.2.1 foi encaminhada para análises espectroscópicas de RMN de ¹H e RMN de ¹³C.

Todas as amostras (ppt, 6.1.1 e 6.2.1) apresentaram espectros de RMN de ¹H semelhantes, com dupletos na região de 6,20, 6,37 até 7,31 ppm ($J = 8,3: 2,1$ Hz) característicos de anel aromáticos substituídos. Também se observaram, sinais na região de 0,94 a 5,35 ppm relacionados a presença de açúcar (0,94 ppm: d; $J = 6,1$ Hz típico de ramnose). Os sinais de RMN de ¹³C na região de 17 a 180 ppm evidenciaram carbono metínico, metilênicos e

carbonílas que comparados com a literatura (Correia *et al.*, 2008) auxiliaram a definir a substância química isolada como quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercetrina) (**20**) (Tabela 19 e Figuras 41 e 42). Os espectros de massas (EM-ESI) sugerem a fórmula ($C_{21}H_{20}O_{11}$) e peso molecular de 448,3 Da. Neste trabalho em modo negativo verificou-se o resultado de $[M - H]^+ = 447,0$ Da que está de acordo com Santos *et al.* (2005) sendo considerado o valor esperado para a substância (Figuras 43 e 44).

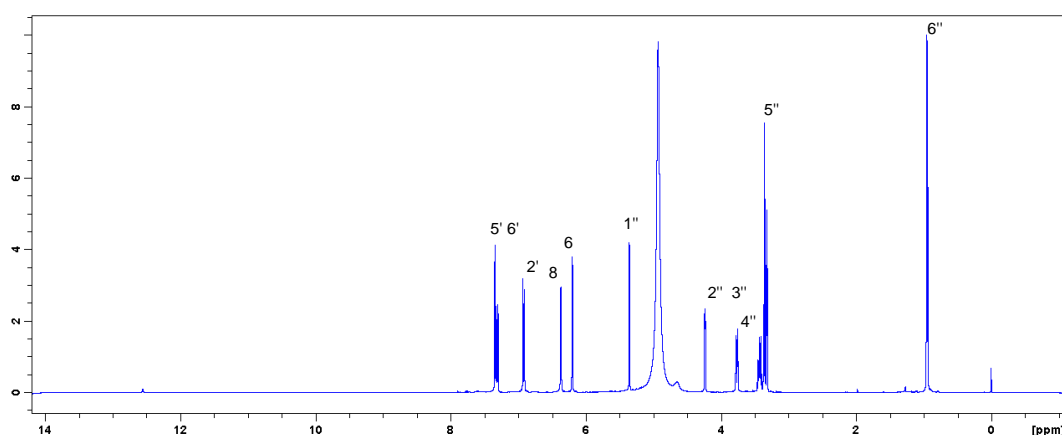
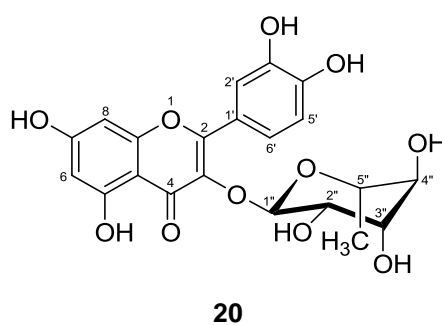


Figura 41. Espectro de RMN de 1H (400 MHz; CD_3OD) para quercetrina relativo ao TMS.

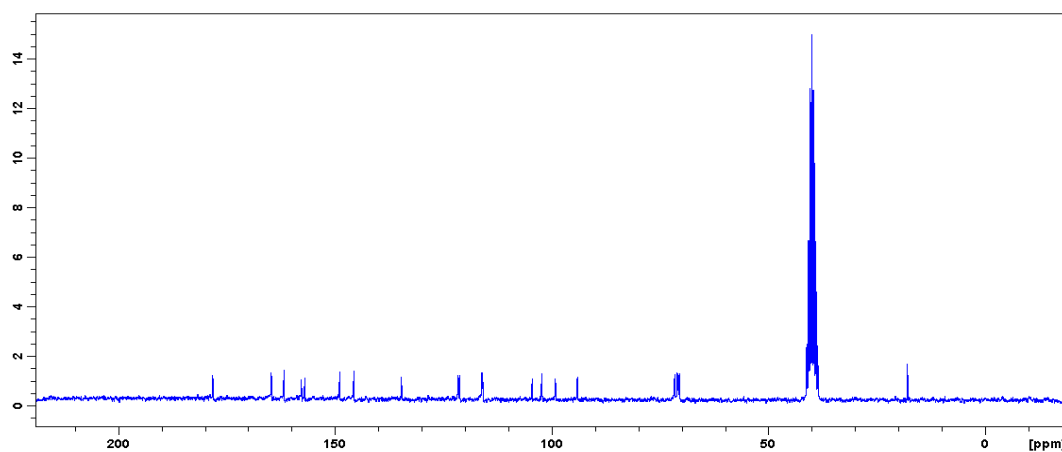


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para quercetrina relativo ao TMS.

Tabela 19. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) e RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) para quercetrina.

Posições dos hidrogênios	Deslocamentos de RMN de ^1H (δ = ppm) (acoplamentos spin-spin)	Deslocamentos de RMN de ^{13}C (δ = ppm)	Deslocamentos de RMN de ^{13}C (δ = ppm em CDCl_3) Correia <i>et al.</i> (2008)
1	-	-	-
2	-	150,0	158,4
3	-	136,4	136,1
4	-	179,8	179,5
5	-	163,4	163,0
6	6,20 (d; $J = 2,1$ Hz; 1-H)	100,0	100,0
7	-	166,0	166,3
8	6,37 (d; $J = 2,1$ Hz; 1-H)	94,9	94,9
9	-	158,7	158,2
10	-	106,0	105,7
1'	-	123,1	122,9
2'	7,34 (d; $J = 2,1$ Hz; 1-H)	117,1	116,4
3'	-	146,5	146,4
4'	-	159,4	149,8
5'	6,91 (d; $J = 8,3$ Hz; 1-H)	116,5	116,9
6'	7,31 (dd; $J = 8,3: 2,1$ Hz; 1-H)	123,0	122,9
1''	5,35 (d; $J = 1,5$ Hz; 1-H)	103,7	103,5
2''	4,23 (dd; $J = 3,4: 1,5$ Hz; 1-H)	72,0	71,9
3''	4,76 (dd; $J = 9,4: 3,4$ Hz; 1-H)	72,2	72,1
4''	3,35 (dd; $J = 9,4: 9,4$ Hz; 1-H)	72,2	73,2
5''	3,43 (dq; $J = 9,4: 6,1$ Hz; 1-H)	73,4	71,9
6''	0,94 (d; $J = 6,1$ Hz; 3-H)	17,8	17,6

Nota: Em parênteses, d: duplete; dd: duplo duplete; dq: duplo quarteto e constante de acoplamento, J em Hz.

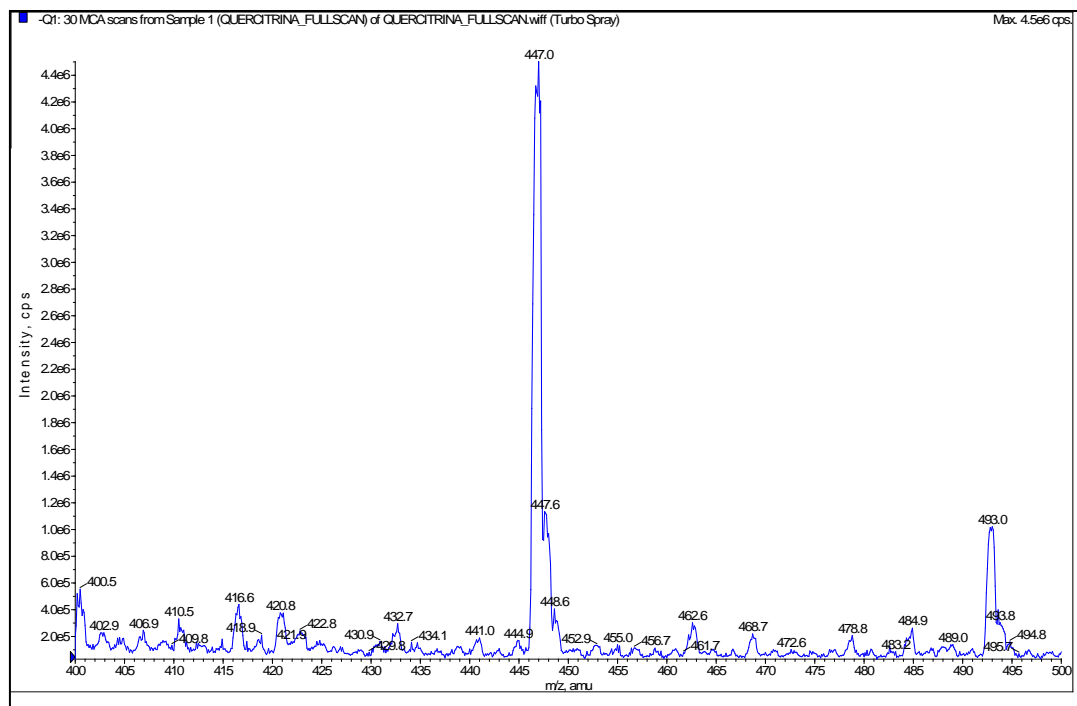


Figura 43. Espectro de varredura (EM-ESI) para quercetrina obtido por infusão direta. Destaque para o pico do íon molecular m/z 447,0 Da. Infusão de 200 ng/mL com acetonitrila:água (70:30 v/v) contendo 5 mM de formiato de amônio. Fonte de ionização eletrospray operada no modo negativo de ionização. Varredura de 400 a 500 Da. Vazão 10 μ L/min. Posição do capilar 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal, voltagem -4500 V, gás de dessolvatação: 15 psi, *declustering potential* (DP): -30, *entrance potential* (EP): -10.

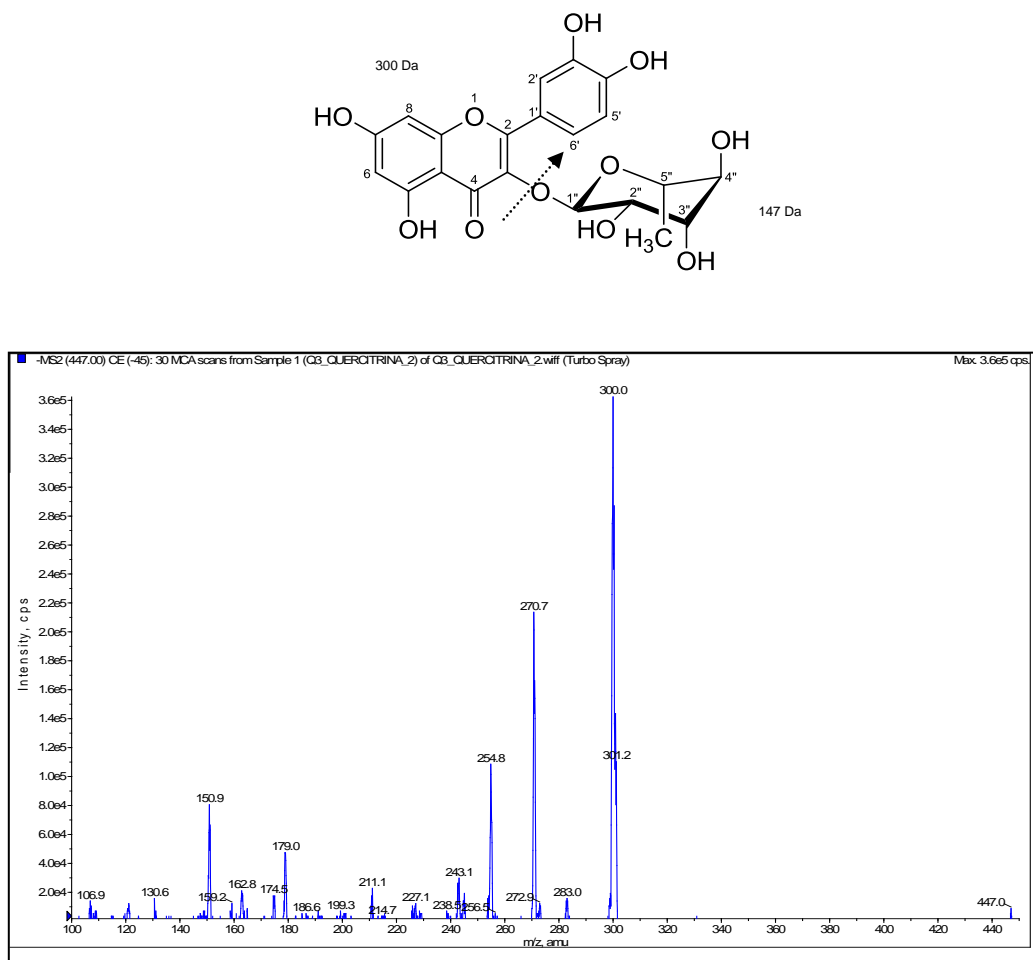


Figura 44. Espectro de massa/massa (ESI) para quercetrina obtido por infusão direta. Destaque para o íon molecular m/z 447,0 Da. Infusão de 200 ng/mL com acetonitrila:água (70:30 v/v) contendo 5 mM de formiato de amônio. Fonte de ionização eletrospray operada no modo negativo de ionização. Varredura de 400 a 500 Da. Vazão 10 μ L/min. Posição do capilar 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal, voltagem -4500 V, gás de dessolvatação: 15 psi, *declustered potential* (DP): -30, *entrance potential* (EP): -10.

A primeira descrição do isolamento de quercetrina em *Solidago microglossa* DC. foi realizada por Torres *et al.* (1987). No artigo os autores descreveram ainda, o isolamento de β -farneseno, α -espinasteril glicopiranosídeo e α -amirina. Conforme Apáti *et al.* (2006), a quercetrina possui atividades anti-inflamatórias e seus mecanismos de ação envolvem atividades antioxidantes. Nesse trabalho, a quercetrina se mostrou a substância majoritária para as partes aéreas de *S. chilensis* sendo isolada como precipitado na fração acetato e em outras duas subfrações obtidas por fracionamentos em colunas cromatográficas.

4.6 Avaliação das atividades biológicas

Atividade antimicrobiana

As propriedades antimicrobianas de espécies medicinais têm sido comprovadas através de intensas pesquisas em todo o mundo. Estas geralmente são avaliadas e confirmadas ou não, primeiramente por ensaios *in vitro*.

Após a incubação dos micro-organismos *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus* observou-se diferentes resultados para os extratos de *A. zerumbet*, *S. chilensis* e *E. uniflora*.

Atividade antimicrobiana de *Alpinia zerumbet*

O extrato de *A. zerumbet* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) em 1000 µg/mL frente a *S. aureus*. Não se observou concentração bactericida mínima (CBM) nessa concentração (Tabela 21). Em levantamento de publicações farmacológicas e químicas para *A. zerumbet* no período de 1987 a 1998 Corrêa *et al.* (2010), citaram os trabalhos desenvolvidos por Lobato *et al.* (1989) que avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *A. zerumbet* sendo o mesmo ativo frente a oito das nove bactérias testadas. Dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella sp.* com halos de inibição variando de 7 a 14 mm. Há referência ao estudo de Sá *et al.* (1994), que verificaram o efeito antimicrobiano de dez extratos medicinais frente a bactérias causadoras de conjuntivite como *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*. Os extratos de *A. zerumbet*, bem como os de *Laurus nobilis*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum* e *Eugenia uniflora* apresentaram atividade antimicrobiana produzindo halos de inibição acima de 10 mm de diâmetro. Costa *et al.* (2008) testaram os extratos metanólico e acetônico de *A. zerumbet* nos quais observaram bons resultados para o extrato acetônico do rizoma frente à *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*, para os quais foram obtidos halos de inibição superiores a 20 mm. A CIM do extrato acetônico do rizoma frente a *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus* foi equivalente a 125 µg/mL.

Esses dados corroboram a inibição do extrato fluido hidroalcoólico frente a *S. aureus*, encontrada neste trabalho.

Atividade antimicrobiana de *Solidago chilensis*

Observou-se para o extrato fluido CIM frente a todos os micro-organismos testados na concentração de 1000 µg/mL. Para *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *C. albicans* obteve-se CIM em 500 µg/mL. Observou-se CBM somente na concentração de 1000 µg/mL frente a *P. aeruginosa* (Tabela 20).

Morel *et al.* (2006) relatam a ausência de atividade antimicrobiana para extrato metanólico das raízes e partes aéreas de *Solidago microglossa* DC. bem como, para compostos isolados da planta frente a micro-organismos Gram positivos e Gram negativos até a concentração de 1000 µg/mL entretanto, o óleo essencial extraído apresentou atividade em concentrações de 0,625 a 1,25 mg/mL frente a micro-organismos Gram positivos, Gram negativos e *C. albicans*.

Atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora*

O extrato fluido da planta apresentou CIM em 1000 µg/mL frente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A CBM foi observada para *P. aeruginosa* em 1000 µg/mL (Tabela 21).

Holetz *et al.* (2002) observaram para extrato hidroetanólico (90% v/v) de *E. uniflora* atividade antimicrobiana moderada contra *S. aureus* (250 µg/mL) e *P. aeruginosa* (500 µg/mL) e baixa frente a *C. albicans* (acima de 1000 µg/mL). Este resultado é especialmente importante considerando que *S. aureus* é uma das principais bactérias causadoras de infecções no homem, podendo atingir diversos tecidos e órgãos, com manifestações das mais brandas às mais invasivas e severas. Coelho de Souza *et al.* (2004), observaram atividade antimicrobiana para preparações caseiras à base de *E. uniflora* frente aos micro-organismos *S. aureus*, *B. subtilis* e *Micrococcus luteus* com halos de inibição de 8-11 e 16-20 mm, respectivamente.

Auricchio *et al.* (2003) relataram que vários extratos preparados de *E. uniflora*, com matérias-primas oriundas de diversos locais e épocas do ano

foram testados. No entanto, a bactéria mais sensível foi *P. aeruginosa*. Essa informação está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho.

Tabela 20. Avaliação da atividade antimicrobiana para os extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae).

Extratos vegetais	Micro-organismos sensíveis	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	Concentração bactericida mínima (µg/mL)
<i>A. zerumbet</i>	<i>S. aureus</i>	1000	-
<i>S. chilensis</i>	<i>Salmonella sp</i>	1000	-
	<i>P. aeruginosa</i>	500	1000
	<i>S. aureus</i>	1000	-
	<i>K. pneumoniae</i>	500	-
	<i>E. coli</i>	500	-
	<i>C. albicans</i>	500	-
<i>E. uniflora</i>	<i>P. aeruginosa</i>	1000	1000
	<i>S. aureus</i>	1000	-

Nota: (-) ausência de atividade antimicrobiana.

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm têm sido utilizadas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas de modo científico apenas recentemente. É fato também, que os micro-organismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (Duarte, 2006).

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos clássicos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições inferiores (Duarte, 2006). Dessa forma, Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição CIM até 500 µg/mL; inibição moderada CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição CIM acima de 1600 µg/mL.

Dessa forma, podemos concluir que o extrato fluido de *S. chilensis* apresentou forte inibição frente à micro-organismos Gram negativos e fungo, e inibição moderada com relação aos Gram positivos corroborando sua utilização

popular para o tratamento anti-infeccioso. Para *A. zerumbet* e *E. uniflora* observou-se apenas resultados moderados frente a micro-organismos Gram positivos e Gram negativos.

Atividade antioxidante

Utilizou-se o método do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), amplamente descrito na literatura para avaliar atividade de antioxidantes naturais (taninos, flavonoides, catequinas, lignanas, fucoxantinas, ácidos fenólicos e terpenos). Os valores obtidos, para os extratos de *A. zerumbet*, *S. chilensis* e *E. uniflora*, confirmam a atividade antioxidante em relação aos padrões quercetina e rutina. O melhor resultado foi alcançado pela *E. uniflora* com atividade antioxidante em torno de 45% (25 $\mu\text{g/mL}$) e EC_{50} em cerca de 21 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 45 e Tabela 21)

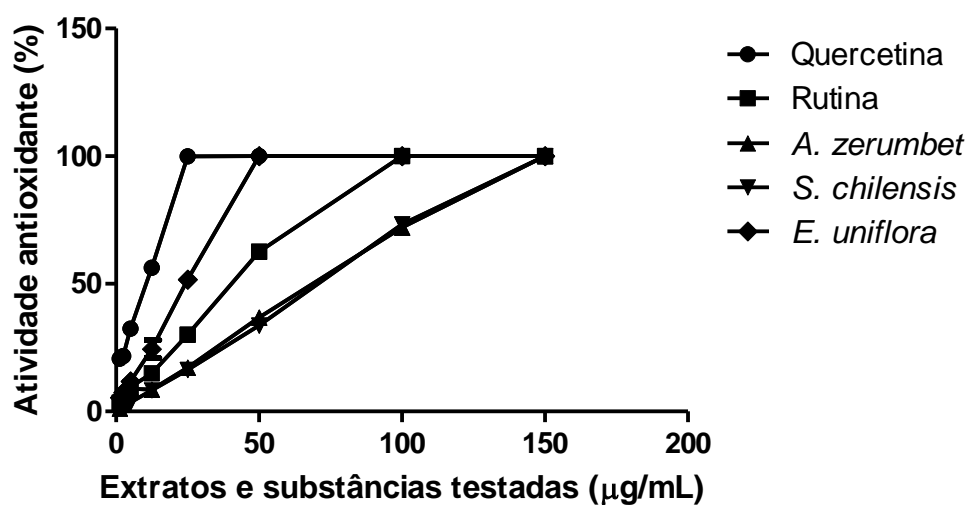


Figura 45. Concentração dos padrões quercetina, rutina e dos extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) e *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) (1,25–150 $\mu\text{g/mL}$) com as respectivas atividades antioxidantes (%). Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

Tabela 21. Atividades antioxidantes para os padrões e extratos fluidos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas) e *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (partes aéreas) (1,25–150 µg/mL). Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Padrões/extratos	Atividade antioxidante% (25 µg/mL) (média ± desvio padrão)	EC ₅₀ (µg/mL) (média ± desvio padrão)
quercetina	100	7,24 ± 0,08
rutina	23,35 ± 0,64	35,43 ± 0,04
<i>A. zerumbet</i>	12,13 ± 0,15	58,96 ± 0,04
<i>S. chilensis</i>	9,85 ± 0,51	61,22 ± 0,03
<i>E. uniflora</i>	45,35 ± 1,39	21,27 ± 0,04

EC₅₀ = concentração efetiva

Elzaawelly *et al.* (2007) observaram EC₅₀ de 80 µg/mL para fração AcOEt das sementes e flores de *A. zerumbet*. Lin *et al.* (2008) relataram atividade antioxidante de 64 a 86% para extratos aquosos e etanólicos das sementes *A. zerumbet* utilizando concentrações consideradas elevadas (2 a 6 mg/mL). Dessa forma, o resultado encontrado para este vegetal neste trabalho, pode ser considerado representativo.

Apáti *et al.* (2006) destaca diferentes valores para atividade antioxidante de tinturas, infusões e decoctos de *Solidago canadensis* L. No entanto, os melhores resultados ocorreram em concentrações mais elevadas. Neste experimento, com extrato fluido obtido por percolação obteve-se um resultado considerado satisfatório para *S. chilensis*. A melhor atividade antioxidante para os extratos avaliados foi observada para o extrato fluido de *E. uniflora* que na concentração de 25 µg/mL apresentou o dobro da atividade obtida pela rutina e 50% da atividade estabelecida para quercetina. Velásquez *et al.* (2003) avaliando extratos metanólicos da planta, também descrevem resultados elevados de atividade antioxidante para o vegetal. Os valores detectados neste experimento são importantes, pois estão diretamente relacionados com o conteúdo fenólico nos extratos e podem ajudar a propor mecanismos de ação para as avaliações *in vivo*.

Atividade hipolipidêmica

Peso corporal e peso dos fígados dos animais

Todos os animais apresentaram um ganho representativo de peso corporal do início ao final do experimento. Porém, durante todo período não se observou diferença de pesos entre os grupos testados. A tabela 22 mostra que o grupo controle (C) formado por ratos alimentados com a dieta hipercalórica (dieta normal acrescida de colesterol 1% e ácido cólico 0,5%) apresentou peso dos fígados significativamente maior quando comparado com o grupo normal (N) (alimentados somente com dieta recomendada para ratos) ($F_{(7, 38)} = 11,73$; $p < 0,05$). O restante dos grupos de ratos que foram alimentados com a dieta hipercalórica e que receberam algum tipo de tratamento (extrato fluido de *S. chilensis* (HE) (150, 300 e 600 mg/kg), quercetrina (10 mg/kg) (QRT), extrato fluido de *A. zerumbet* (300 mg/kg) (ALP) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV)) apresentaram pesos dos fígados diferentes ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo C. Na relação peso dos fígados/peso corporal, os grupos QRT, ALP e SINV apresentaram resultados diferentes ($F_{(7, 36)} = 27,84$; $p < 0,05$) em comparação com C e N (Tabela 22).

Tabela 22. Peso corporal e pesos dos fígados dos animais submetidos à avaliação de atividade hipolipidêmica (média \pm DP) (n=6).

Grupos Experimentais	Peso corporal (g)			Peso dos fígados (g)	Razão peso dos fígados/peso corporal
	inicial	15 dias	45 dias		
N	274,1 \pm 17,9	337,4 \pm 25,5	397,8 \pm 31,2	12,7 \pm 1,4	3,2 \pm 0,3
C	254,7 \pm 28,8	325,3 \pm 39,1	383,1 \pm 50,1	20,1 \pm 2,0*	4,9 \pm 0,3*
HE 150	258,9 \pm 18,9	320,3 \pm 34,6	346,7 \pm 41,0	16,7 \pm 1,4*#	4,9 \pm 0,3*
HE 300	266,6 \pm 20,4	337,5 \pm 29,9	360,3 \pm 28,3	16,8 \pm 1,1*#	4,7 \pm 0,2*
HE 600	259,2 \pm 18,4	326,9 \pm 28,3	356,0 \pm 28,9	16,7 \pm 1,0*#	4,7 \pm 0,2*
QRT	270,9 \pm 18,7	337,9 \pm 28,5	392,4 \pm 38,4	16,6 \pm 1,3*#	4,3 \pm 0,1*#
ALP	274,5 \pm 19,6	342,7 \pm 28,8	394,9 \pm 42,3	16,0 \pm 1,1*#	4,3 \pm 0,2*#
SINV	251,0 \pm 20,6	322,5 \pm 26,8	375,8 \pm 48,8	15,6 \pm 1,1*#	4,3 \pm 0,1*#

Grupos experimentais: N (normal); C (controle); Extrato fluido das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) (150,300 e 600 mg/kg); quercetrina (10 mg/kg); Extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300mg/kg); sinvastatina (SINV) (4mg/kg).

* $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ Comparado com grupo C.

Efeitos dos tratamentos nos parâmetros lipídicos do soro

A figura 46 revela que ao final das quatro semanas de tratamento os grupos C, HE 150 e HE 300 apresentaram valores diferentes de colesterol total (CT) quando comparados com o grupo N ($F_{(7, 45)} = 16,57$; $p < 0,05$). Todos os ratos hiperlipidêmicos tratados (HE 150, HE 300, HE 600, QRT, ALP e SINV) reduziram significativamente o CT (-19,9, -27,5, -31,0, -39,4, -39,7 e -34,2%, respectivamente) com relação ao grupo C ($p < 0,05$) e os grupos QRT e ALP demonstraram diferenças na redução de valores de colesterol total comparados com o grupo HE 150 ($p < 0,05$).

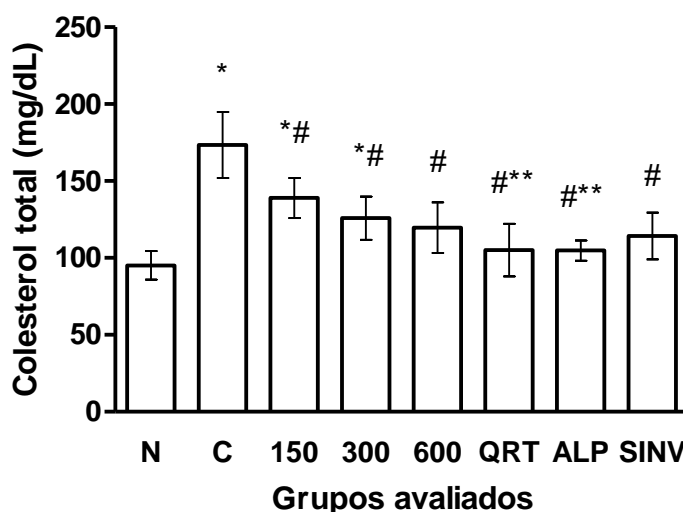


Figura 46. Efeitos dos tratamentos nos valores de colesterol total (média \pm DP) ($n=6$). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT), extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ Comparado com o grupo C. ** $p < 0,05$ Comparado com HE 150.

Na figura 47 observa-se que os grupos C, HE 150, HE 300, HE 600 e SINV apresentaram valores de lipoproteínas de baixa densidade colesterol (LDL-colesterol) diferentes do grupo N ($F_{(7, 45)} = 17,60$; $p < 0,05$). Todos os tratamentos (HE 150, HE 300, HE 600, QRT, ALP e SINV) diminuíram significativamente os valores de LDL-colesterol comparados ao grupo C (-36,0, -37,5, -43,3, -59,4, -55,4 e -44,2%, respectivamente) ($p < 0,05$).

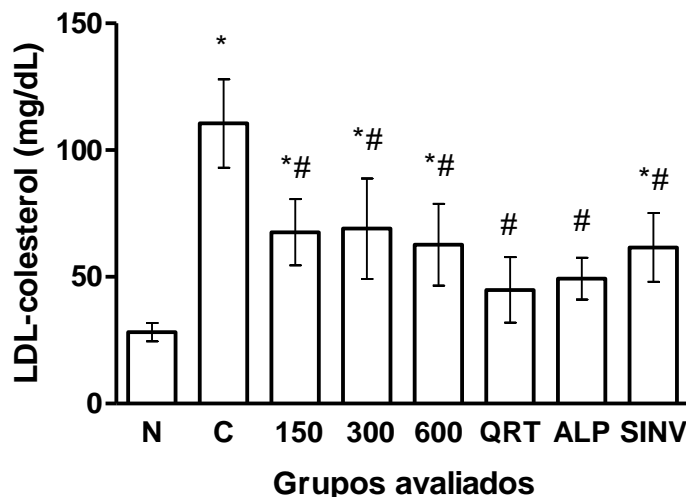


Figura 47. Efeitos dos tratamentos nos valores de LDL-colesterol (média \pm DP). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ Comparado com o grupo C.

A figura 48 mostra que somente o grupo C apresentou valores de triacilglicerídeos (TG) diferentes do grupo N ($F_{(7, 45)} = 8,61$; $p < 0,0001$). Os grupos tratados (HE 300, HE 600, QRT, ALP e SINV) reduziram significativamente as taxas de TG (-23,5, -29,8, -27,2, -32,5 e -32,4%, respectivamente) em relação ao grupo C ($p < 0,05$).

A tabela 23 revela, que na avaliação do índice aterogênico (CT/HDL-colesterol) somente HE 150 e QRT não se diferenciaram do grupo N ($F_{(7, 41)} = 18,68$; $p < 0,05$). Todos os grupos tratados foram diferentes do grupo C ($p < 0,05$). Para os valores de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) observou-se que todos os grupos tratados apresentaram valores diferentes do grupo N ($F_{(7, 45)} = 7,68$; $p < 0,05$) e somente o grupo HE 150 não foi diferente do grupo C ($p < 0,05$). Na dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) não foi observada diferença estatística entre os grupos.

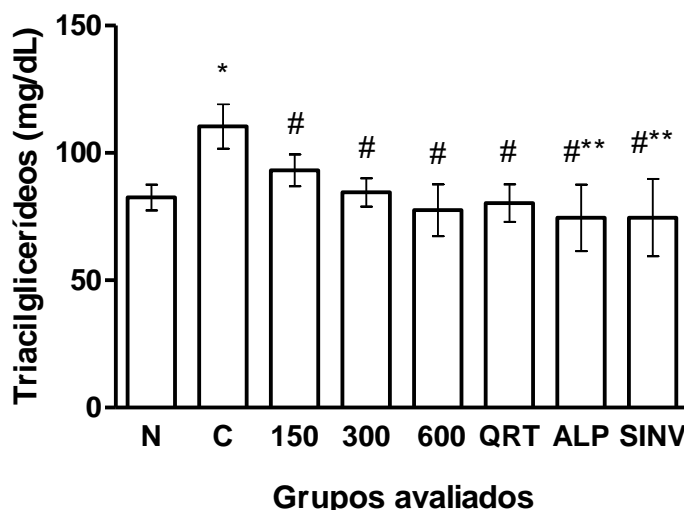


Figura 48. Efeitos dos tratamentos nos valores de triacilglicerídeos (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,0001$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ Comparado com o grupo C. ** $p < 0,05$ Comparado com o grupo HE 150.

Tabela 23. Efeitos dos grupos experimentais nos valores do índice aterogênico, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e alanina aminotransferase (ALT).

Grupos experimentais	Índice aterogênico	VLDL (mg/dL)	ALT (U/L)
N	1,8 \pm 0,2	16,5 \pm 1,0	43,2 \pm 2,8
C	4,5 \pm 0,3*	21,7 \pm 1,7*	42,7 \pm 7,8
HE 150	2,6 \pm 0,3#	18,4 \pm 0,5*	41,5 \pm 4,6
HE 300	2,8 \pm 0,5*#	17,0 \pm 1,4*#	43,5 \pm 6,0
HE 600	2,8 \pm 0,5*#	15,7 \pm 2,2*#	45,3 \pm 5,6
QRT	2,5 \pm 0,5#	16,0 \pm 1,5*#	42,0 \pm 5,2
ALP	2,7 \pm 0,4*#	14,8 \pm 2,6*#	39,2 \pm 8,0
SINV	3,0 \pm 0,3*#	14,0 \pm 3,9*#	41,2 \pm 5,3

Grupos experimentais: N (normal); C (controle); Extrato fluido das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) (150,300 e 600 mg/kg); quercetrina (10 mg/kg); Extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300mg/kg); sinvastatina (SINV) (4mg/kg).

* $p < 0,05$ Comparados com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com C.

Efeitos dos tratamentos na atividade da enzima HMGCoA redutase

Todos os grupos tratados apresentaram valores diferentes do grupo N ($F_{(7, 23)} = 32,50$; $p < 0,05$). Todos os grupos testados demonstraram decréscimos

significativos de atividade enzimática quando comparados com o grupo C ($p < 0,05$) (Figura 49).

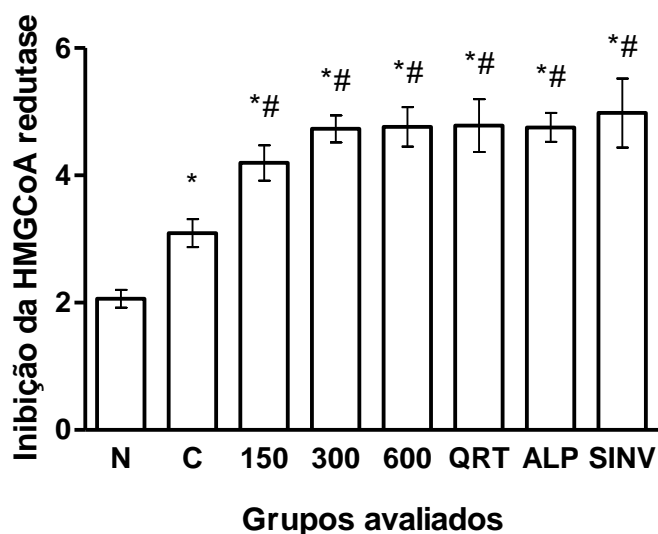


Figura 49. Efeitos dos tratamentos na atividade da enzima HMGCoA redutase (média \pm DP) ($n=6$). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ Comparado com o grupo C.

Excreção fecal de colesterol

Na determinação de colesterol fecal, os grupos tratados foram diferentes do grupo N ($F_{(7, 23)} = 65,79$; $p < 0,05$). Todos os grupos tratados apresentaram maior valor de excreção de colesterol e foram diferentes quando comparados com o grupo C ($p < 0,05$). Os maiores valores foram observados no grupo HE 600 que foi diferente de QRT e HE 150 (Figura 50).

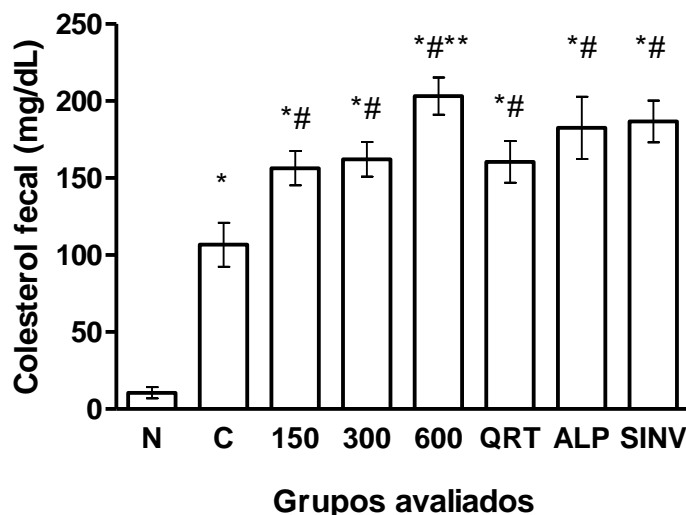


Figura 50. Efeitos dos tratamentos no colesterol fecal (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. ** $p < 0,05$ Comparado com os grupos HE 150 e QRT.

Marcadores para aterosclerose

A figura 51 representa os valores de interleucina 1 (IL-1) e se observa que os grupos QRT e SINV não se diferenciaram do grupo N ($F_{(7, 46)} = 459,1$; $p < 0,05$). Todos os tratamentos HE (150, 300 e 600), QRT, ALP e SINV reduziram a quantidade de IL-1 em comparação com o grupo C.

Na quantificação da interleucina 6 (IL-6) (Figura 52) todos os grupos tratados foram diferentes do grupo N e todos os tratamentos HE (150, 300 e 600), QRT, ALP e SINV foram diferentes do grupo C ($F_{(7, 45)} = 1576$; $p < 0,05$).

Com relação aos dados do fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$) (Figura 53) o grupo C apresentou valores diferentes quando comparados com o grupo N ($F_{(7, 46)} = 70,60$; $p < 0,05$) e os grupos tratados foram diferentes em relação ao grupo C ($p < 0,05$).

Percebe-se na avaliação das Interleucinas que os grupos HE 600, QRT e SINV foram mais eficientes em decrescer as concentrações de IL-1, IL-6 e $TNF\alpha$.

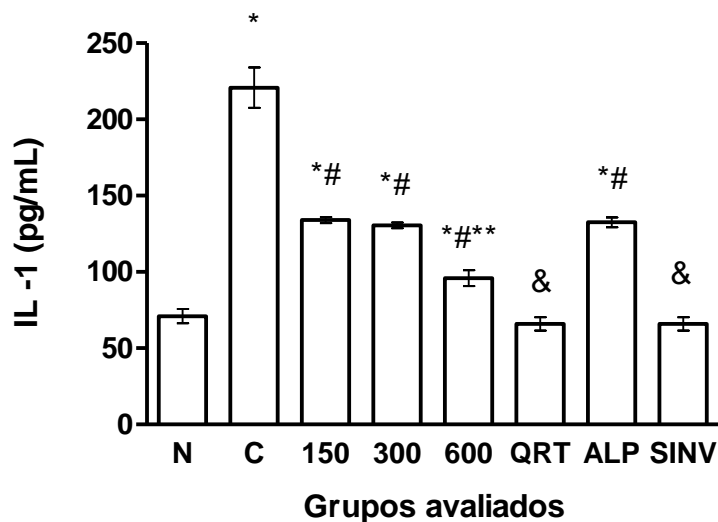


Figura 51. Efeitos dos tratamentos nos valores de IL-1 (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. Sinais diferentes ($p < 0,05$).

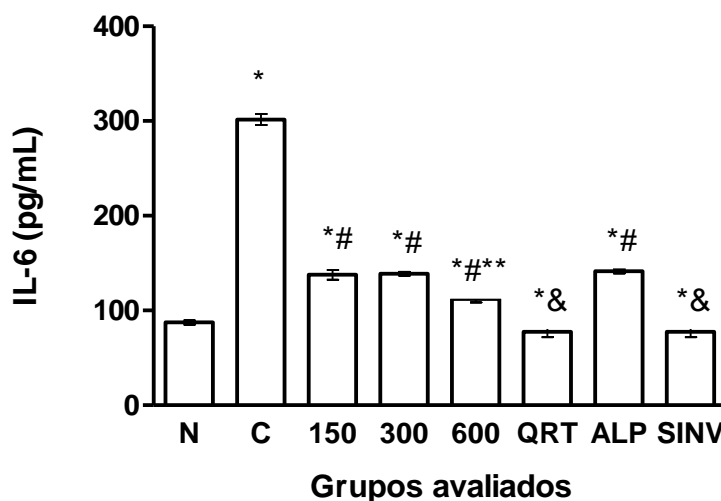


Figura 52. Efeitos dos tratamentos nos valores de IL-6 (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. Sinais diferentes ($p < 0,05$).

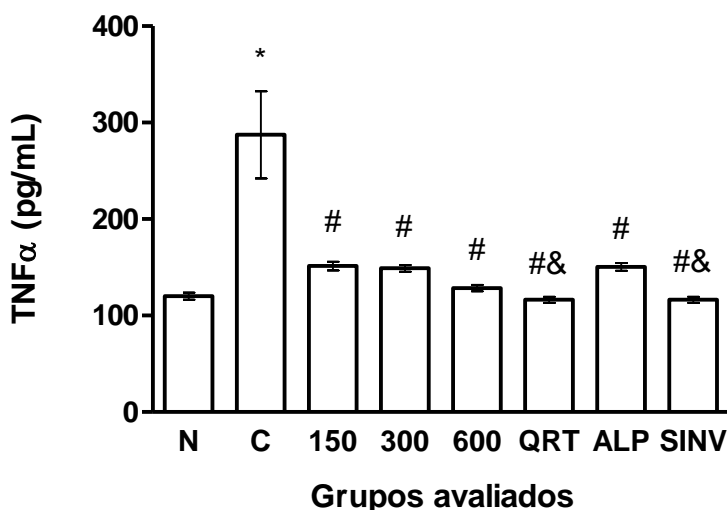


Figura 53. Efeitos dos tratamentos nos valores de TNF α (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. Sinais diferentes ($p < 0,05$).

Todas as substâncias testadas reduziram a concentração do interferon gama (INF γ) em comparação com o grupo C ($F_{(7, 46)} = 149,2$; $p < 0,05$). O grupo HE 150 apresentou resultado menor (-39,0%) e diferente ($p < 0,05$) dos demais grupos que proporcionaram uma redução mais representativa (-50,0%, aproximadamente) (Figura 54).

Na quantificação da interleucina 10 (IL-10) todas as substâncias testes apresentaram aumentos nos valores em comparação com o grupo C ($F_{(7, 46)} = 187,5$; $p < 0,05$). O resultado mais expressivo foi observado no grupo HE 600 (+76,0%) (Figura 55).

A quantidade de proteína C reativa (PCR) foi elevada no grupo C e bastante reduzida nos demais grupos avaliados ($F_{(7, 44)} = 82,44$; $p < 0,05$). Os melhores resultados foram observados nos grupos QRT e SINV (-92%) seguidos de HE 600, ALP, HE 150 e HE 300 em comparação com o grupo C ($p < 0,05$) (Figura 56).

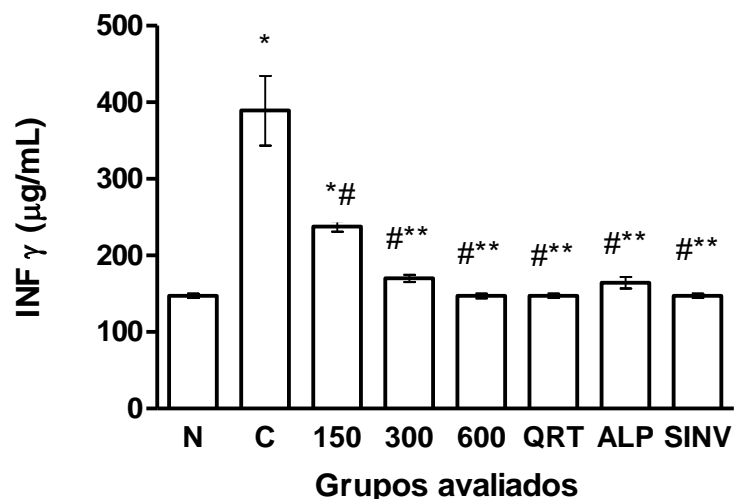


Figura 54. Efeitos dos tratamentos nos valores de INF γ (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. ** $p < 0,05$ Comparado ao grupo HE 150.

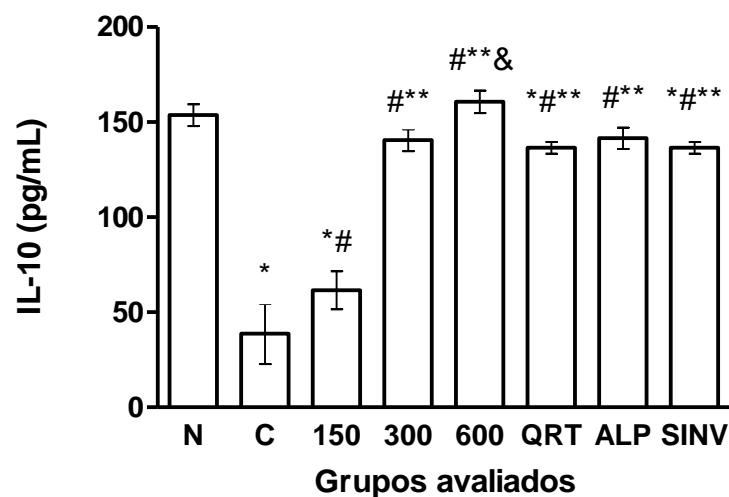


Figura 55. Efeitos dos tratamentos nos valores de IL-10 (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. Sinais diferentes ($p < 0,05$).

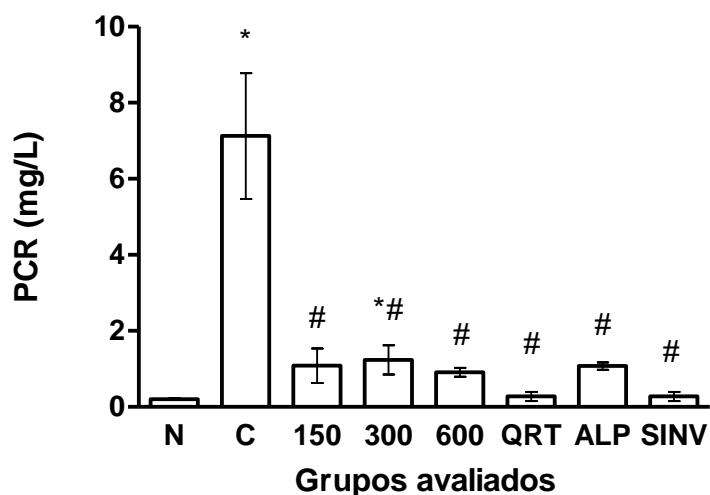


Figura 56. Efeitos dos tratamentos nos valores de PCR (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C.

Na avaliação de LDL-oxidada observaram-se maiores valores para o grupo C comparados aos demais tratamentos ($F_{(7, 42)} = 88,38$; $p < 0,05$). Os melhores resultados foram obtidos nos grupos HE 600 (-95,9%), QRT e SINV (-88,6%) HE 150, HE 300 e ALP (-69,1%) (Figura 57).

Na determinação de anti LDL-oxidada registrou-se os maiores valores para o grupo C em comparação com o grupo N ($F_{(7, 46)} = 336,5$; $p < 0,05$) e as maiores reduções foram observadas nos grupos HE 600 (-97,3%), QRT e SINV (-97,1%) (Figura 58).

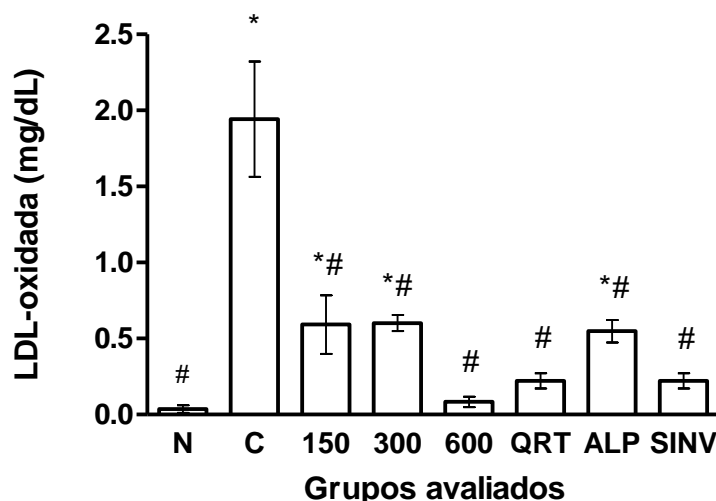


Figura 57. Efeitos dos tratamentos nos valores de LDL-oxidada (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C.

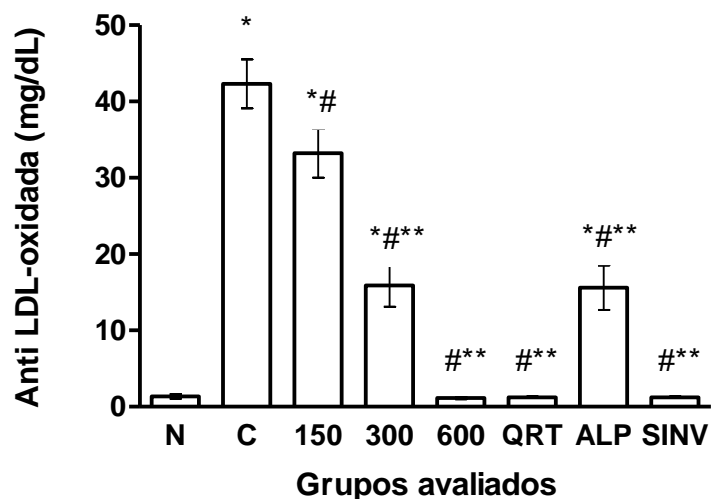


Figura 58. Efeitos dos tratamentos nos valores de anti LDL-oxidada (média \pm DP) (n=6). Ratos com dieta normal (N), ratos com dieta hipercalórica mais tratamentos: água (C); extratos fluidos das partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) (HE) 150, 300 e 600 mg/kg; quercetrina (QRT) 10 mg/kg; extrato fluido das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (ALP) (300 mg/kg) e sinvastatina (4 mg/kg) (SINV). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo N. # $p < 0,05$ comparado com o grupo C. ** $p < 0,05$ Comparado com o grupo HE 150.

Está amplamente estabelecido que níveis elevados de lipídeos no sangue se constituem como o maior fator de risco para aterosclerose e que a pesquisa com novos compostos capazes de inibirem ou regularem essas substâncias receberam a contribuição dos agentes naturais (Martinello *et al.*, 2006). No período experimental, não se observou diferença de peso corporal entre os grupos avaliados dessa forma, há evidências de que a dieta hipercalórica proposta não foi capaz de promover sobrepeso nos animais e os extratos e substâncias testadas não apresentaram atividade significativa na redução de peso. O peso dos fígados nos ratos com dieta hipercalórica foi maior no grupo C comparado com todos os grupos provavelmente, em resposta ao incremento de lipídeos e esse efeito foi controlado com a administração dos tratamentos, principalmente QRT, ALP e SINV quando observada a relação peso dos fígados/peso corporal. Lin *et al.* (2008) relataram em seu estudo hipolipidêmico com extrato hidroalcoólico das sementes e óleo essencial de *A. zerumbet* que ocorreu diferença de peso, somente entre o grupo hiperlipidêmico e os demais grupos testados. Os autores destacaram ainda, que foram observadas diferenças quanto aos pesos dos fígados de todos os grupos com relação ao grupo normal. Resultados semelhantes foram obtidos com relação peso dos fígados/peso corporal e esse efeito pode estar relacionado com atividades hepatoprotetoras exercidas pelas substâncias testadas.

O decréscimo nas taxas de CT observado em todos os tratamentos em comparação com o grupo C foi mais pronunciado nos grupos QRT e ALP que foram diferentes de HE 150. Utilizando metodologia semelhante Pankag *et al.* (2010) encontraram valores para os grupos N, C e SINV de 84,4, 196,8 e 99,2 mg/dL. Resultados muito próximos aos obtidos neste trabalho (95,2, 173,5 e 114,2 mg/dL, respectivamente). Para os extratos de *Moringa oleifera* Lam. os autores descrevem valores de 183,5, 142,6 e 121,2 mg/dL (150, 300 e 600 mg de extrato/kg de animal). Para os extratos de HE avaliados neste estudo obteve-se para as mesmas dosagens, melhores resultados 139,0, 125,8 e 119,7 mg/dL. Para ALP (300 mg/kg) observou-se 104,8 e para QRT 105,1 mg/dL. Hirunpanich *et al.* (2006) estudando a atividade hipocolesterolêmica para partes da flor do *Hibiscus sabdariffa* L. obteve resultados representativos

(118,6 e 115,1 mg/dL), apenas nas concentrações mais elevadas dos extratos (500 e 1000 mg/kg, respectivamente).

Os valores de LDL-colesterol do grupo C foram diferentes dos demais grupos avaliados corroborando os resultados das análises de colesterol total. A diminuição dos valores de LDL-colesterol e VLDL são alvos farmacológicos de diversas drogas hipolipidêmicas e dentre os mecanismos de ação possíveis para explicar esse efeito, sugere-se o aumento da atividade da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) presente na superfície do HDL-colesterol que transporta o colesterol extra-hepático para o fígado acelerando a metabolização (Sudheesh *et al.*, 1997). Outra possibilidade para redução do colesterol é o rápido catabolismo do LDL-colesterol realizado pelos receptores hepáticos e consequente eliminação na forma de conjugados com ácidos biliares, como demonstrado por Khanna *et al.* (2002).

Os extratos HE 300, HE 600, QRT, ALP e SINV promoveram o decréscimo dos valores de TG em comparação com o grupo C. Estes resultados sugerem que os extratos e substâncias teste são hábeis em restaurar pelo menos parcialmente, o catabolismo dos triacilglicérides por meio da estimulação lipolítica envolvendo a lipoproteína lipase do plasma (LPL) como demonstrado por Xie *et al.* (2007). Para auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos hipolipidêmicos observados nesse estudo, Odbayar *et al.* (2006) relatam que flavonoides como a quercetina exercem efeito de diminuição da atividade e também dos níveis de mRNA de várias enzimas envolvidas nas sínteses de ácidos graxos hepáticos.

A razão HMGC_oA/mevalonato está inversamente relacionada com a atividade da enzima HMGC_oA redutase. Resultados desse estudo indicam que a atividade da enzima foi decrescida pelo grupo C em função da alimentação rica em colesterol. Todos os tratamentos demonstraram inibir ainda mais, a atividade da HMGC_oA redutase sugerindo uma possível interação com a enzima e assim diminuir os níveis de colesterol. Tal efeito foi demonstrado por flavonoides isolados de *Embllica officinalis* Gaertn. em ratos hipercolesterolêmicos (Anila & Vijayalakshmi, 2002). Park *et al.* (2002) destacam que os flavonoides glicosilados como a rutina podem reduzir o colesterol, e triacilglicéreis bem como, os níveis de produtos oxidativos no soro não somente suprimindo a atividade de HMGC_oA redutase mas, inibir ainda, a

atividade da acetilcoenzima A colesterol aciltransferase (ACAT) que esterifica o colesterol.

Em todos os grupos avaliados, após quatro semanas de tratamento não se observou elevação nas taxas de HDL-colesterol mas, os extratos HE em todas as concentrações bem como, QRT e ALP reduziram o índice aterogênico (CT/HDL-C) em comparação com o grupo C. O índice aterogênico (IA) é reconhecido como melhor marcador para aterosclerose se comparado com os níveis lipídicos avaliados isoladamente (Silva, 2002).

Na determinação de colesterol nas fezes observou-se um incremento do metabólito nos materiais fecais dos ratos tratados com extratos HE, QRT e ALP comparados ao grupo C. O melhor resultado foi obtido no grupo HE 600 diferente dos demais grupos. Isto pode ser explicado, através do decréscimo na reabsorção do colesterol ou aumento na taxa de excreção dessa substância no meio intestinal ou até mesmo, uma associação desses efeitos (Vasu *et al.*, 2005).

Em todos os grupos de animais não foram observadas diferenças nos valores de ALT. Níveis de ALT são indicadores úteis e poderosos para detecção de possíveis danos a células hepáticas isto porque, estão presentes em concentrações elevadas nos hepatócitos e passam para a circulação quando as membranas celulares são rompidas (Kew, 2000). Dessa forma pode se pensar que extratos HE, QRT e ALP não promoveram hepatotoxicidade nas doses testadas.

Assim sendo, percebe-se que as atividades hipolipidêmicas observadas para os ratos com dieta hipercalórica tratados com extratos HE, QRT e ALP podem ser explicadas pela associação de efeitos biológicos complexos como, catabolismo de LDL e TG, redução dos níveis de mRNA e HMGCoA redutase, inibição da ACAT, atividades antioxidantes bem como, interferências na reabsorção e excreção intestinal de colesterol.

Atualmente entende-se o processo aterosclerótico não apenas como decorrência do acúmulo de lípidos nas paredes dos vasos mas também, como consequência da disfunção endotelial e da ativação do sistema inflamatório (Libby, 2002). A associação da aterosclerose com inflamação é bem estabelecida e nos orienta a investigar marcadores envolvidos no processo inflamatório que possam predizer o risco de doença arterial coronariana (DAC).

Um marcador pode refletir a fisiopatologia subjacente à doença e prever eventos futuros, indicar a presença da afecção ou danos aos órgãos, além de avaliar o progresso do tratamento (Filho *et al.*, 2003).

Observou-se neste experimento, que o grupo de ratos alimentados com dieta hipercalórica e tratados com água (C) apresentou maiores concentrações de IL-1, IL-6, TNF α e INF γ , citocinas e quimiocinas envolvidas nas primeiras fases da resposta inflamatória que culminam com o desenvolvimento do processo aterosclerótico (Corrêa-Camacho *et al.*, 2007). IL-1 e IL-6 desempenham um papel importante na mediação da via de sinalização da inflamação vascular (Brasier, 2010) e o incremento de suas concentrações tem sido associado com uma variedade de doenças incluindo a aterosclerose e doenças cardiovasculares (Wykretowicz *et al.*, 2004). TNF α é um clássico mediador pró-inflamatório induzindo efeitos deletérios em várias doenças inflamatórias (Sarzi-Puttini *et al.*, 2005). É sugerido que TNF α está diretamente envolvida na patofisiologia vascular e que a sua inibição pode conferir uma vantagem generalizada ao organismo (McKellar *et al.*, 2009). O INF γ é considerado como uma das principais citocinas pró-aterogênicas que por ativarem macrófagos favorecem a participação dessas células na resposta inflamatória (Song *et al.*, 2001; Groyer *et al.*, 2006).

Todas as substâncias testadas (HE 150, HE 300, HE 600, QRT, ALP e SINV) foram hábeis na redução desses fatores de risco como os observados por Xu *et al.* (2011) avaliando vegetal rico em polifenóis. Também se observou que o grupo C apresentou valores bastante elevados de PCR um marcador largamente utilizado para evidenciar o processo inflamatório crônico na aterosclerose. Durante a resposta inflamatória da aterosclerose observa-se o envolvimento da PCR no processo de disfunção endotelial, induzindo a produção de moléculas de adesão e quimiocinas pelas células endoteliais, favorecendo o processo de ligação de monócitos ao endotélio, com conseqüente aumento da formação de células espumosas. Assim, a PCR participa diretamente da ampliação da resposta imune levando ao aumento do dano tecidual (Pasceri *et al.*, 2000). Dessa forma percebe-se, que o papel da PCR na aterosclerose é mais complexo e que essa proteína está realmente

envolvida na progressão da doença, não sendo simplesmente um marcador inflamatório, mas um fator de risco (Maat & Trion, 2004).

Todas as substâncias avaliadas reverteram à concentração de PCR com resultados semelhantes ao grupo normal (N). Valores semelhantes foram encontrados por Li *et al.* (2011) e dentre os mecanismos propostos para justificar estas atividades destaca-se a inativação exercida por polifenóis de fatores de transcrição (STAT1) e fator nuclear kappa B (NF- κ B) precursores do processo inflamatório (Valerio & Awad, 2011).

Todavia os processos inflamatórios podem apresentar-se regulados por citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10). A função reguladora da IL-10 foi demonstrada através de sua expressão em algumas lesões ateroscleróticas, bem como na observação de que a IL-10 exógena inibe a liberação de IL-12 induzida por LDL. Essa citocina pode atuar inibindo a ação do NF- κ B, com conseqüente diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, inibição da apoptose de macrófagos, da expressão do fator tecidual, do fibrinogênio e da proliferação de células musculares lisas, mecanismos esses, diretamente relacionados com a progressão da aterosclerose (Heeschen *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*, 2004). Como o grupo experimental C revelou valores bastante reduzidos dessa citocina em comparação com os demais tratamentos pode-se concluir que as substâncias testadas auxiliaram na proteção tecidual.

Quando ocorre um aumento dos níveis de LDL-colesterol, estas partículas são depositadas nas artérias com conseqüente oxidação e formação da LDL-oxidada (LDL-ox). Essas substâncias oxidadas são citotóxicas para células endoteliais resultando em lesões, que estimulam monócitos e macrófagos os quais irão originar células espumosas e conseqüentemente ateromas (Groyer *et al.*, 2006). Nesse estudo, todas as substâncias avaliadas diminuíram os níveis de LDL-ox em comparação com o grupo C. Uma das hipóteses para essa atividade biológica é diminuição dos estresse oxidativo promovido pelos compostos polifenólicos presentes nos extratos ou nas substâncias teste. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Fuhrman *et al.* (2000) que avaliaram o efeito do extrato etanólico de *Zingiber officinale* Roscoe. na inibição das LDL-ox. Para corroborar essas informações foi observado que todos os grupos tratados com substâncias ou extratos

apresentaram valores de auto-anticorpos anti LDL-oxidada em comparação com o grupo C. Segundo Sanches *et al.* (2008) resultados elevados desses anticorpos possuem um potencial indicador bioquímico de risco para síndrome metabólica.

Observados como um todo, os resultados indicam que a função dos extratos e das substâncias testadas em antagonizar o processo aterosclerótico em ratos correlaciona-se com a inibição do conjunto de citocinas, PCR, e efeitos antioxidantes. É fato também, que flavonoides e demais compostos polifenólicos exibem diferentes atividades farmacológicas, incluindo efeitos hipolipidêmicos e antiaterogênicos (Harnafi *et al.*, 2008) e há amplas evidências para sugerir que QRT como substância majoritária no extrato de *S. chilensis* é responsável em grande parte pelas atividades biológicas observadas para o vegetal.

Atividades no sistema nervoso central (SNC)

Open field (campo aberto)

Nesse método avaliou-se a atividade exploratória e o comportamento ansioso de camundongos submetidos à administração de controle negativo água (C), controle positivo diazepam (1mg/kg) e de extrato fluido das folhas de *A. zerumbet* nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/kg. Não se observou diferença ($p < 0,05$) entre os grupos testados quanto ao tempo de imobilidade na parte central do aparelho, número de *crossings* (cruzamentos) e *groomings* (comportamento de autolimpeza) (Figuras 59, 60 e 61).

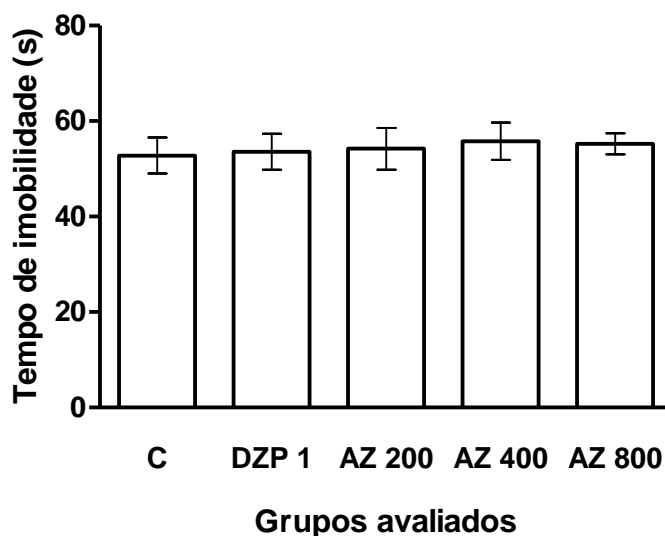


Figura 59. Efeitos dos tratamentos no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao campo aberto (*open field*) (média \pm DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente).

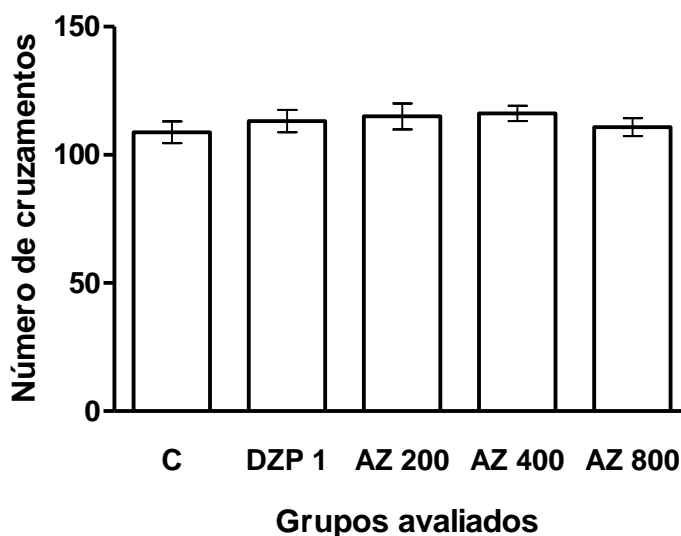


Figura 60. Efeitos dos tratamentos no número de cruzamentos dos camundongos submetidos ao campo aberto (*open field*) (média \pm DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente).

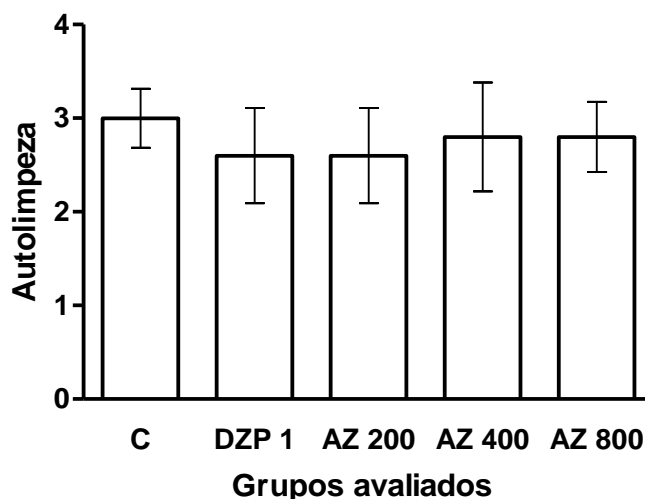


Figura 61. Efeitos dos tratamentos no comportamento de autolimpeza dos camundongos submetidos ao campo aberto (*open field*) (média \pm DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente).

O grupo diazepam apresentou menor número de *rearings* (respostas de orientação ou levantar as patas dianteiras) em comparação ao grupo C ($F_{(4, 24)} = 16,21$; $p < 0,05$) e todos os grupos tratados com extrato fluido de *A. zerumbet* revelaram valores diferentes em comparação ao grupo DZP ($p < 0,05$) (Figura 62).

O número de bolos fecais foi maior no grupo C comparado aos demais grupos tratados ($F_{(4, 24)} = 4,45$; $p < 0,05$). Não Houve diferença entre os tratamentos AZ 200, AZ 400, AZ 800 e o padrão positivo DZP.

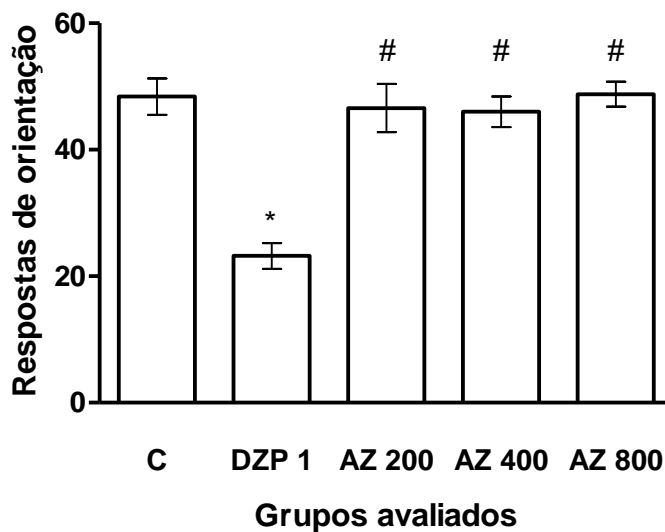


Figura 62. Respostas de orientação dos camundongos submetidos ao campo aberto (*open field*) (média ± DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo C. # $p < 0,05$ Comparado com o grupo DZP.

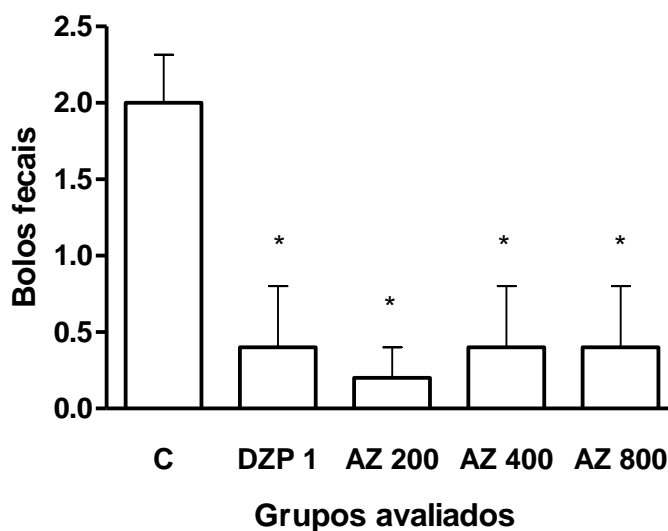


Figura 63. Número de bolos fecais nos camundongos submetidos ao campo aberto (*open field*) (média ± DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo C.

Light/dark box test (teste caixa claro-escuro)

O grupo C apresentou menor tempo de latência para o primeiro cruzamento comparado aos demais grupos avaliados ($F_{(4, 48)} = 7,25$; $p < 0,05$) (Figura 64). Os extratos fluidos de *A. zerumbet* nas concentrações de 400 e 800 mg/kg (AZ 400 e AZ 800) apresentaram resultados semelhantes ao diazepam (DZP) em relação ao tempo de permanência dos animais no lado claro e foram diferentes dos grupos C e AZ 200 ($F_{(4, 49)} = 6,77$; $p < 0,05$) (Figura 65). Os grupos diazepam, AZ 400 e AZ 800 demonstraram resultados semelhantes também, quanto ao número de cruzamentos claro-escuro com resultados diferentes do controle e do grupo AZ 200 ($F_{(4, 49)} = 8,67$; $p < 0,05$) (Figura 66).

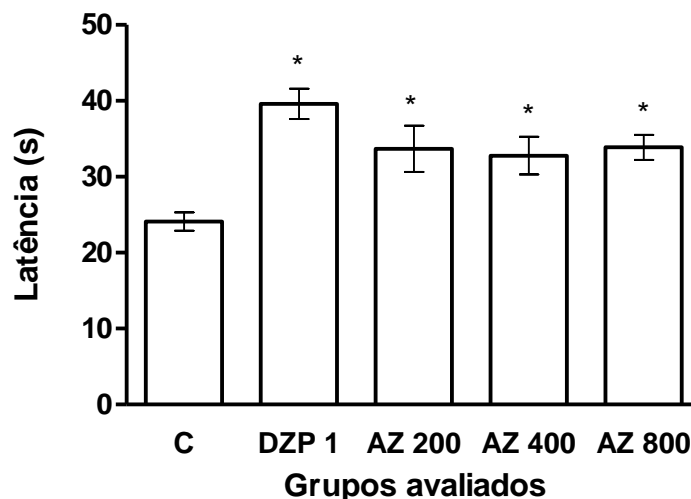


Figura 64. Tempo de latência (s) para os camundongos submetidos a caixa claro-escuro (*Light/dark box*) (média \pm DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo C.

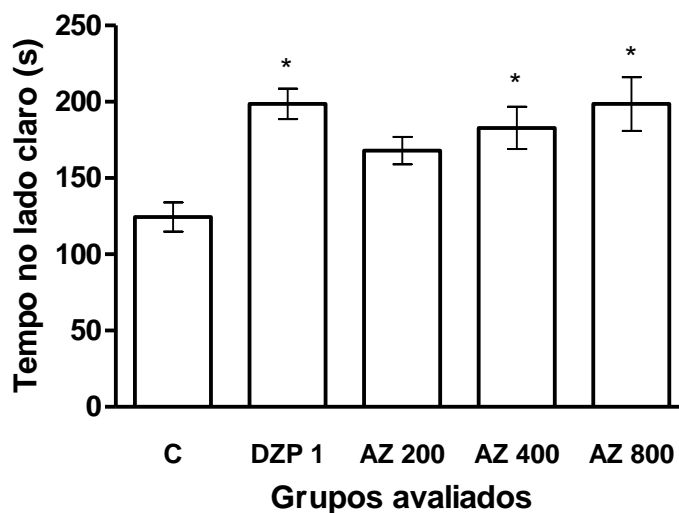


Figura 65. Tempo de permanência no lado claro para os camundongos submetidos a caixa claro-escuro (*Light/dark box*) (média \pm DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo C.

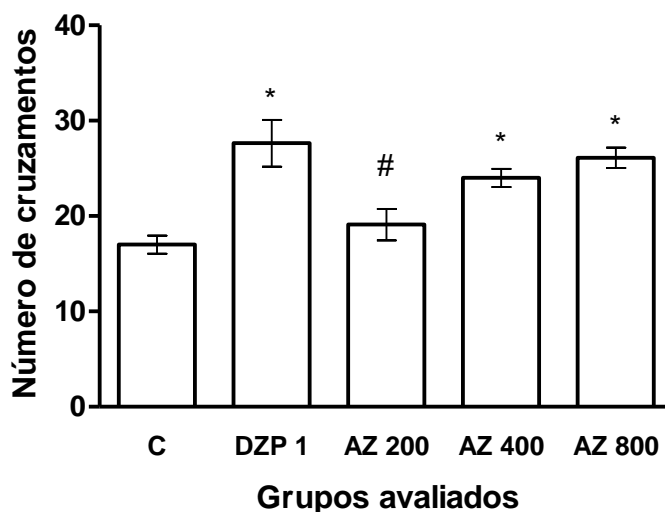


Figura 66. Número de cruzamentos para os camundongos submetidos a caixa claro-escuro (*Light/dark box*) (média \pm DP) (n=6). Tratamentos: água (C); diazepam (1 mg/kg) (DZP 1); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo C. # $p < 0,05$ Comparado com os grupos DZP e AZ 800.

Teste da suspensão pela cauda (*tail suspension test*)

Nesse método avaliou-se o tempo de imobilidade dos animais suspensos pela cauda. As substâncias testes imipramina, AZ 200, AZ 400 e AZ

800 apresentaram resultados diferentes ($p < 0,05$) em comparação com o grupo C. O padrão imipramina revelou resultados semelhantes a AZ 800 e diferentes de AZ 200 e AZ 400 (Figura 67).

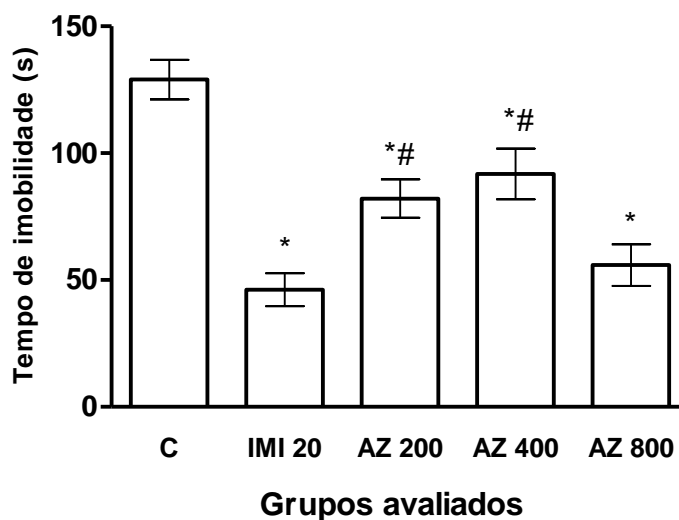


Figura 67. Tempo de imobilidade para os camundongos submetidos a suspensão pela cauda (*tail suspension*) (média \pm DP) ($n=6$). Tratamentos: água (C); imipramina (20 mg/kg); extratos fluidos das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (200, 400 e 800 mg/kg, respectivamente). * $p < 0,05$ Comparado com o grupo C. # $p < 0,05$ Comparado com os grupos IMI e AZ 800.

Estudos comportamentais desempenham um papel importante na avaliação e desenvolvimento de novas substâncias que agem em nível do sistema nervoso central (SNC) (Xu *et al.*, 2008). Dentre os modelos biológicos mais largamente utilizados estão o teste de campo aberto (*open field test*), caixa claro-escuro (*dark/light box*) e teste de suspensão pela cauda (*tail suspension test*) (Cryan *et al.*, 2005).

Observaram-se atividades significativamente diferentes no teste de suspensão de cauda para os extratos de *A.zerumbet* nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/kg (AZ 200, AZ 400 e AZ 800) (-36,4, -28,8 e -56,7%, respectivamente) em comparação com o controle. O tratamento de *A. zerumbet* na concentração mais elevada (AZ 800) apresentou efeito comparável a imipramina (-64,2%) nos termos de ação antidepressiva podendo-se propor que os extratos possivelmente compartilham de alguns mecanismos de ação

farmacológicos como os estabelecidos para droga antidepressiva utilizada neste trabalho.

No entanto, agentes hábeis em aumentar a atividade locomotora como os estimulantes, convulsivantes e anticolinérgicos, juntamente com o fenômeno de hipercinesia tendem a produzir resultados falsos positivos no teste de suspensão pela cauda (Bourin *et al.*, 2001, Takahashi *et al.*, 2008). Com o objetivo de excluir esses possíveis falsos resultados, utilizou-se o teste de campo aberto. Neste teste, a principal diferença entre antidepressivos e psicoestimulantes é que os primeiros provocam incrementos na atividade motora (Borsini & Meli, 1988).

Após a realização do teste de campo aberto, observou-se que o diazepam apresentou um menor número de respostas de orientação em relação aos demais tratamentos talvez relacionado a uma mais rápida adaptação ao ambiente. Todos os grupos tratados tiveram menor número de bolos fecais quando comparados com o controle revelando indícios de atividade ansiolítica. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos no teste de campo aberto quanto ao tempo de imobilidade, número de cruzamentos e autolimpeza permitindo propor que as substâncias utilizadas não foram capazes de promover efeitos psicoestimulantes e de hipercinesia.

O modelo de transição claro-escuro é amplamente utilizado para a avaliação de atividades ansiolíticas e ansiogênicas. O método baseia-se na aversão natural dos roedores a ambientes iluminados. Dessa forma, espera-se que as substâncias ansiolíticas reduzam este comportamento e aumentem o número de cruzamentos entre os dois compartimentos incrementando a atividade exploratória (Ankitkumar *et al.*, 2011).

No teste da caixa claro-escuro AZ 200, AZ 400 e AZ 800 tiveram o tempo de latência no lado claro incrementado com relação ao grupo C (+39,9, +36,0 e +40,6%, respectivamente) e os valores obtidos não diferiram do grupo DZP 1. Nas maiores concentrações testadas de *A. zerumbet* (AZ 400 e AZ 800) observou-se um aumento no tempo de permanência no lado claro (+46,9 e +59,5%, respectivamente) e também no número de cruzamentos (+41,2 e +53,6, respectivamente) comparados ao grupo controle. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com a droga padrão DZP 1 e a ausência de efeitos estimulantes no campo aberto sugerem para essas doses, um efeito ansiolítico

provavelmente relacionado a presença de cavapironas no extrato da planta estabelecido nas análises fitoquímicas desse trabalho. Essas substâncias presentes em plantas como a *Piper methysticum* G. Forst. parecem promover um aumento na atividade dos receptores GABA_A apresentando efeitos ansiolíticos e relaxantes (Schulz *et al.*, 2001).

5. CONCLUSÕES

Por meio de análise morfoanatômica (lâminas semipermanentes, permanentes e microscopia eletrônica de varredura) foi possível caracterizar as amostras vegetais de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.S. Sm. (Zingiberaceae) (folhas), *Solidago chilensis* Meyen, (Asteraceae) (partes aéreas) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (folhas).

Foram realizadas análises físico-químicas com os materiais vegetais desidratados e com os extratos fluidos obtidos. Os dados obtidos servirão de parâmetros de qualidade para programas de fitoterapia e colaboram para o estudo dos produtos naturais.

Na abordagem fitoquímica, foi possível caracterizar os principais grupos químicos das espécies estudadas através de análise fitoquímica preliminar e cromatografia em camada delgada. Flavonoides e polifenóis foram quantificados nos extratos fluidos através de análises em espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV/Vis).

Foi possível obter para os extratos fluidos, cromatogramas em cromatografia líquida de alta eficiência identificando e quantificando rutina para *A. zerumbet*, quercetrina para *S. chilensis* e quercetina para *E. uniflora* que podem ser utilizados como marcadores em análises de controle de qualidade.

Através do fracionamento dos extratos fluidos em colunas cromatográficas e análises espectroscópicas de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e EM (ESI) obteve-se na fração acetato de etila de *A. zerumbet*, a identificação e o isolamento das cavalactonas di-hidro-5,6-dehidrocavaína (DDK) e 5,6-dehidrocavaína (DK) substâncias já descritas na literatura e também, canferol um flavonoide com certa abundância no reino vegetal mas, que pela primeira vez foi descrito para espécie. Além das técnicas cromatográficas e espectroscópicas mencionadas utilizou-se a recristalização para o isolamento de quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercetrina) na fração acetato de etila de *S. chilensis*.

Nos ensaios biológicos os extratos fluidos das espécies avaliadas apresentaram atividades antimicrobianas somente em concentrações elevadas não possuindo portanto, perfis como promissores fitomedicamentos. Porém, as

atividades de *S. chilensis* frente à micro-organismos Gram positivos, Gram negativos e fungos podem corroborar a utilização popular desse vegetal.

A atividade hipolipidêmica observada para os extratos fluidos de *S. chilensis*, *A. zerumbet* e quercetrina provavelmente envolva a inibição da enzima HMGCoA redutase e a diminuição da reabsorção ou aumento da excreção de colesterol via intestinal, estimulada pelo conteúdo fenólico dos tratamentos.

O efeito biológico de prevenção à aterosclerose verificado para os extratos fluidos de *A. zerumbet*, *S. chilensis* e para a quercetrina está relacionado com a inibição de citocinas pró-inflamatórias e possivelmente envolva além dos efeitos alostéricos de interação, atividades antioxidantes que neste trabalho foram verificadas *in vitro*.

Análises realizadas através da dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT) não indicaram toxicidade para as substâncias avaliadas.

As atividades ansiolíticas e antidepressivas descritas para os extratos de *A. zerumbet* por meio dos métodos de caixa claro-escuro e de suspensão pela cauda, possivelmente estejam relacionadas com a ligação das cavalactonas com receptores gaba e com a inibição da recaptção de monoaminas no SNC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque ESB, Neves LJ 2004. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). *Acta Bot Bras* 18: 109-121.
- Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 40: 4168-4170.
- Almeida ER 1993. *Plantas medicinais brasileiras - conhecimentos populares e científicos*. São Paulo: Hemus.
- Alonso J 2006. *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina*. Buenos Aires: Fitociencia.
- Amorim AC, Lima CKF, Miranda ALP, Rezende CM 2009. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine* 16: 923-928.
- Andrade CA, Costa CK, Bora K, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VA 2007. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae. *Rev Bras Farmacogn* 17: 231-235.
- Andreatini R, Boerngen-Lacerda R, Zorzeto-Filho D 2001. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. *Rev Bras Psiquiatr* 23: 233-242.
- Anila L, Vijayalakshmi NR 2002. Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica* effectiveness for dislipidemia. *J Ethnopharmacol* 79: 81-87.
- Ankitkumar A, Ashok M, Jyothisna MV, Radhakrishna B, Shivalinge-Gowda KP 2011. Evaluation of anxiolytic activity of aqueous and alcoholic extracts of leaves of *Crataegus oxyacantha* in mice. *Int J Pharm Biomed Sci* 2: 86-91.
- Apáti P, Houghton PJ, Kite G, Steventon GB, Kery AJ 2006. *In-vitro* effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. *J Pharm Pharmacol* 58: 251-256.
- Araújo FYR, Gomes-Silva MI, Moura BA, Oliveira GV, Moreira-Leal LKA, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Moraes MO, Sousa FCF, Macedo DS 2009. Central nervous system effects of the essential oil of the leaves of *Alpinia zerumbet* in mice. *J Pharm Pharmacol* 61: 1521-1527.
- Araújo-Pinho FVS, Coelho-de-Souza AN, Morais SM, Ferreira-Santos C, Leal-Cardoso JH 2005. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine* 12: 482-486.

- Auricchio MT, Bacchi, EM 2003. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Rev Inst Adolfo Lutz* 62: 55-61.
- Bagatini MD, Fachinetto JM, Ferreira da Silva AC, Tedesco SB 2009. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn* 19: 632-636.
- Barcelos FF, Oliveira ML, Giovaninni MPB, Lins TP, Filomeno CA, Schenider SZ, Pinto VD, Endringuer DC, Andrade TU 2010. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. em ratos. *Rev Bras Plantas Med* 12: 48-56.
- Barreiro EJ 2000. *Química medicinal: as bases moleculares para ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD 2012. *Fitoterápicos*. Porto Alegre: Artmed.
- Batlouni M, 1997. Hipotese Oxidativa da Aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq Bras Cardiol* 68: 53-63.
- Baynes J, Dominiczac MH 2007. *Bioquímica médica*. São Paulo: Elsevier.
- Beçak W, Paulete J 1976. *Técnicas de citologia e histologia*. Livros Técnicos e Científicos. Rio de Janeiro.
- Berlyn GP, Miksche JP 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University.
- Bianco EM, Santos CAM 2010. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. *R Bras Bioci* 8: 238-241.
- Bolzani VDS, Valli M, Pivatto M, Viegas CJ 2012. Natural products from brazilian biodiversity as a souce of new models for medicinal chemistry. *Pure Appl Chem* 84: 1837-1846.
- Borella JC, Fontoura A 2002. Avaliação do perfil cromatográfico e teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) Asteraceae (Carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 12: 63-67.
- Borges DB, Farias MR, Simões SMO, Schenkel EP 2005. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. *Rev Bras Farmacogn* 15: 229-236.

- Borsini F, Meli A 1988. Is the forced swimming test suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94: 147-160.
- Bourin M, Fiocco AJ, Clenet F 2001. How valuable are animal models in defining antidepressant activity? *Hum Psychopharmacol* 16: 9-21.
- Brasier AR 2010. The nuclear factor-kappaB-interleucin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovascular Research* 86: 211-218.
- Brasil 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil 2007. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil 2009. Ministério da Saúde. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. RENISUS <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em julho de 2012.
- Bucciarelli A, Minetti A, Milczakovskig C, Skliar M 2010. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen, (Asteraceae). *Pharmaceut Biol* 48: 1025-1030.
- Budel JM, Duarte MR, Santos CAM, 2004. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Bacharis* spp (Asteraceae). *Rev Bras Farmacogn* 14: 41-48.
- Bueno FG, Machareth MAD, Panizzon GP, Lopes GC, Mello JCP 2012. Development of a UV/VIS spectrometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. *Quim Nova* 35: 822-826.
- Calixto JB 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 33: 179-189.
- Calixto JB 2001. Medicamentos fitoterápicos. In: Yunes RA (org.). *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Ed. Argos, p. 297-317.
- Campigotto KF, Teixeira JJV, Cano FG, Sanches ACC, Cano MFF, Guimarães DSL 2008. Detecção de risco de interações entre fármacos antidepressivos e associados prescritos a pacientes adultos. *Rev Psiq Clin* 35: 01-05.

- Cardoso CMZ 2009. *Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral*. São Paulo: Pharmabooks.
- Carobrez AP 2003. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr* 25: 52-58.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Perfeito AJPS 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 314-319.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR 2009. *Bioquímica ilustrada*. Porto Alegre: Artmed.
- Chicourel EL, Pimenta DS, Jorge LIF, Ferro VO 1998. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 7-8: 59-66.
- Chompoo J, Upadhyay A, Kishimoto W, Makise T, Tawata S 2011. Advanced glycation and products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. *Food Chem* 129: 709-715.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS 2005. *Performance standards for antimicrobial*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement M100-S15. Pennsylvania, USA.
- Coelho-de-Souza G, Haas APS, Von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol* 90: 135-143.
- Coelho VG, Caetano LF, Liberatore-Júnior RDR, Cordeiro JA, Souza DRS 2005. Perfil lipídico e fatores de risco para doenças cardiovasculares em estudantes de medicina. *Arq Bras Cardiol* 85: 57-62.
- Cole RA, Haber WA, Setzer WN 2007. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. *Biochem Syst Ecol* 35: 877-886.
- Consolini AE, Baldini OAN, Amat AG 1999. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J Ethnopharmacol* 66: 33-39.
- Consolini AE, Sarubbio MG 2002. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol* 81: 57-63.
- Cordell GA, Colvard MD 2012. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm. *J Nat Prod* 75: 514-525.
- Correa AJC, Lima CE, Costa MCCD 2010. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas

- farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Rev Bras Plantas Med* 12:113-119.
- Corrêa-Camacho CR, Dias-Melicio LA, Soares AMVC 2007. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc Saúde* 14: 41-48.
- Correia SJ, David JM, Silva EP, David JP, Lopes LMX, Guedes MLS 2008. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. *Quim Nova* 31: 2056-2059.
- Costa M CCD, *et al.* 2008. Determinação da concentração mínima inibitória para extratos brutos de *Alpinia speciosa* K. Shum com boa atividade antimicrobiana. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL São Paulo. **Anais**...São Paulo Eventus. CD ROM p. 903.
- Cragg GM, Newman DJ 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta- General subjects*.
- Cravotto G, Boffa L, Genzini L, Garella D 2010. Phytoterapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. *J Clin Pharm Ther* 35: 11-48.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A 2005. The tail suspension test as a model to assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 571-625.
- Devlin TM 2007. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. São Paulo: Blucher.
- Donato AM, Morretes BL 2007. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) provenientes de área de restinga e de floresta. *Rev Bras Farmacogn* 17: 426-443.
- Duarte MCT, 2006. *Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil*. Campinas. *Multiciência Unicamp*.
- Duarte MR, Siebenrok MCN, Empinotti CB 2007. Anatomia comparada de espécies de arnica: *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Chaptalia nutans* (L.) Pohl. *Rev Cienc Farm Basica Apl* 28: 193-201.
- Edeltrudes OL 2001. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes RA (org.). *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Ed. Argos, p. 481-493.
- Esau K 1977. *Anatomy of seed Plants*. John Wileys and Sons: New York.
- Elzaawely AA, Xuan TD, Koyama H, Tawata S 2007. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem* 104: 1648-1653.

- Facury-Neto MA, Fagundes DJ, Beletti ME, Novo NF, Penha-Silva, YJN 2004. Systemic use of *Solidago microglossa* DC in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. *Braz J Morphol Sci* 21: 207-210.
- Farias MR 2001. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões CMO (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis. Ed. UFSC, p. 199-222.
- Farias MR 2003. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões CMO (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis. Ed. UFSC, p. 263-288.
- Farmacopeia Brasileira 4ª edição 1988-2005. São Paulo: Atheneu.
- Farmacopeia Brasileira, 5ª edição 2010. São Paulo: Atheneu.
- Figueiredo ME, Michelin DC, Sannomiya MS, Santos MA, Almeida LC, Souza Brito LFR, Salgado ARM, Vilegas W 2005. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). *Rev Bras Cien Farm* 41: 79-83.
- Filho AC, Araújo RG, Galvão TG, Chagas ACP 2003. Inflamação e aterosclerose: integração de novas teorias e valorização de novos marcadores. *Rev Bras Cardiol Invas* 11: 14-19.
- Fiuza TS, Rezende MH, Simbóia-Morais SMT, Bara MTF, Tresvensol LMF, Realino de Pula J 2008. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Revista Eletr de Farm* 5: 21-31.
- Forti N, Diament J 2006. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arq Bras Cardiol* 87: 672-679.
- Fuhrman B, Rosemlat M, Hayek T, Coleman R, Aviram M 2000. Ginger Extract Consumption LDL Oxidation and Attenuates Development of Atherosclerosis in Atherosclerotic, Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Nutr* 130: 1124-1131.
- Galhiane MS, Rissato SR, Chierice GO, Almeida, MV, Silva, LC 2006. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. *Talanta* 70: 286-292.
- Garcia MAT, Kanaan S 2008. *Bioquímica clínica*. São Paulo: Atheneu.
- Gareri P, Falconi U, Fazio P, De Sarro G 2000. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Prog Neurobiol* 61: 353-396.
- Ghilhermino JF, Rossi SJ, Villas-Boas GK, Quental CM 2010. Caracterização e Institucionalização do Sistema Nacional das Redesfito: Elementos que

- contribuirão para elaboração de um termo de referência. *Rev Fitos* 5: 4-10.
- Gomes SM, Somavilla NSDN, Gomes-Bezerra KM, Miranda SC, De-Carvalho PS, Graciano-Ribeiro D 2009. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e a filofenia. *Acta Bot Bras* 23: 223-238.
- Gianinni SD 1998. *Aterosclerose e dislipidemias*. São Paulo: BG Cultural.
- Groyer E, Caligiuri G, Laschet-Kahallou J, Nicoletti A 2006. Immunological aspects of atherosclerosis. *Press Med* 35: 475-486.
- Harnafi H, Bouanani NH, Aziz M, Caid HS, Ghalim N, Amrani S 2007. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. *J Ethnopharmacol* 109: 156-160.
- Harnafi H, Caid HS, Bouanani NH, Aziz M, Amrani S 2008. Hypolipidaemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem* 109: 156-160.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML 2003. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 107: 2109-2114.
- Henry JB 2008. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. São Paulo: Manole.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsale A, Suthisisang C 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calix of *Hibiscus sabdariffa* L., in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol* 103: 252-260.
- Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB 2008. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. *Quim Nova* 31: 1378-1384.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Garcia Cortes CV, Nakamura CV, Dias-Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz* 97:1027-1031.
- Holvét P, Stassem JM, Van Cleemput J, Collen D, Venhaecke J 1998. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 18:100-107.

- Hostettmann K, Gupta MP, Marston A, Queiroz EF 2008. *Manual de estratégias para el aislamiento de productos naturales bioactivos*. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología. CYTED.
- Itokawa H, Morita M, Mihashi S 1981. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry* 20: 2503-2506.
- Jantan I, Raweh SM, Sirat HM, Jamil S, Mohd Yasin YH, Jamil J, Jamal JA 2008. Inhibitory effect of compounds from Zingiberaceae species on human platelet aggregation. *Phytomedicine* 15: 306-309.
- Johansen DA 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Kaiek HD, Stellaard F, Kruis W, Paumgartner G 1984. Detection of increase bile acid excretion by determination of bile acid content in simple stool samples. *Clin Chem Acta* 140: 85-90.
- Kew MC 2000. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet* 355: 591-592.
- Khanna AK, Rizvi F, Chander R 2002. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* hyperlipidic rats. *J Ethnopharmacol* 82: 19-22.
- Kissmann KG, Groth D 1999. *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo: Basf.
- Kraus JE, Arduin M 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal São Paulo*. Seropédica: Ebur.
- Kriek C, Finatto T, Müller TS, Guerra MP, Orth AI 2008. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) *Rev Bras Plantas Med* 10: 103-110.
- Lahlou S, Galindo CAB, Leal-Cardoso JH, Fonteles MC, Duarte GP 2002. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. *Planta Med* 68: 1097-1102.
- Lahlou S, Interaminense LF, Leal-Cardoso JH, Fonteles MC, Duarte GP 2003. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 323-330.
- Laranja SMR, Bergamaschi C, Schor NM 1992. Avaliação de três plantas com potencial efeito diurético. *Rev Assoc Med Bras* 38: 13-16.
- Leança CC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintão ECR 2010. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1: 54-59.
- Leite JPV 2009. *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu.

- Li J, Chen CX, Shen YH 2011. Effects total glucosides from paeony (*Paeonia lactiflora*) roots on experimental atherosclerosis in rats *J Ethnopharmacol* 135: 469-475.
- Libby P 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Lima GPP, Zigiotto DC, Takaki M 2008. Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. *Rev Bras Plantas Med* 10: 75-82.
- Lin LY, Peng CC, Liang YJ, Yeh WT, Wang HR, Yu TH, Peng RY 2008. *Alpinia zerumbet* potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in hamsters. *J Agric Food Chem* 56: 4435-4443.
- Lobato AM, et al. 1989. Antimicrobial activity of essential oils from Amazônia. *Acta Amazônica* 19: 355-365.
- Lorenzi H, Matos FJA 2002. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. Sao Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Maciel RL, Moreira-Campos LM, Silva BC, Brandão MGL 2006. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica Montana*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 99-104.
- Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
- Marques GS, Monteiro RPM, Leão WF, Lyra MAM, Peixoto MS, Rolin-Neto PJ, Xavier HS, Soares LAL 2011. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. *Quim Nova* XY: 01-06.
- Marques LC, Petrovick PR, Simões CMO 2001. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: Simões CMO (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. UFSC, p. 261-299.
- Marques LC, Souza CM, Madureira MT, Tada HU, Siani AC 2007. Política nacional de fitoterápicos e plantas medicinais: concepções do setor produtivo. *Rev Fitos* 3: 7-13.
- Martinello F, Soares SM, Franco JJ, Santos AC, Sugohara A, Garcia SB, Curti C, Uyemura SA 2006. Hipolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol* 44: 810-818.
- Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Mesquita-Ferari RA, Pavesi VCS, Wadt NS, Fernandes KP 2009. Citotoxicidade in vitro de extratos de

arnica-brasileira (*Solidago microglossa*) e armica-paulista (*Porophyllum ruderale*). *ConSientiae Saúde* 8: 99-104.

Matos FJA 1997. *Introdução a fitoquímica experimental*. Fortaleza: Ed. UFC.

Matt MP, Trion A 2004. C-reactive protein as a risk factor versus marker. *Currer Opin Lipidol* 15: 651-657.

McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB 2009. Role for TNF in arteriosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nature Reviews Cardiology* 6: 410-417.

Mendonça VLM, Oliveira CLA, Craveiro AA, Rao VS, Fonteles MCL 1991. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Mem I Oswaldo Cruz* 86: 93-97.

Metcalfe CR, Chalk L 1950. *Anatomy of the dicotyledons, leaves, stem, and wood and relation to taxonomy, with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press.

Metcalfe CR 1963. Comparative anatomy as a modern botanical discipline – with special reference to recent advances in the systematic anatomy of monocotyledons. *Adv bot res* 77: 453-455.

Metcalfe CR, Chalk L 1988. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press.

Moreira TMS, Salgado HRN, Pietro RCLR 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 20: 435-440.

Morel AF, Dias GO, Porto C, Simionatto E, Stuker CZ, Dalcol II 2006. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia* 77: 453-455.

Moura RS, Emiliano AF, Carvalho LCRM, Souza MAV, Guedes DC, Tano T, Resende AC 2005. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *J Cardiovasc Pharm* 46: 288-294.

Mpalantinos MA, Soares-de-Moura R, Parente JP, Kuster RM 1998. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytother Res* 12: 442-444.

Murakami S, Li W, Matsuura M, Satou T, Hayashi S, Koike K 2009. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. *J Nat Med* 63: 204-208.

Newman DJ, Cragg GM, Snader K 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.

- Nicolaou KC, Chen JS, Dalby SM 2009. From nature to the laboratory and into the clinic. *Bioorg Med Chem* 17: 2290-2303.
- Odbayar TO, Badamhand D, Kimura T, Takahashi Y, Sushida T, Ide T 2006. Comparative studies of some phenolic compounds (quercetin, rutin, and ferulic acid) affecting hepatic fatty acid synthesis in mice. *J Agric Food Chem* 54: 8261-8265.
- Ogunwande IA, Olawore NO, Schmidt JM, Setzer WN, Ekundayo O, Walker TM 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *Int J of Aromatherapy* 15: 147-152.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK 1996. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu.
- Oliveira TT, Da Silva RR, Dornas WC, Nagem TJ 2010. Flavonoides e aterosclerose. *RBAC* 42: 49-54.
- Panizza ST 2010. *Como preescrever ou recomendar plantas medicinais e fitoterápicos*. São Luís: CONBRAFITO.
- Pankaj GJ, Patil SD, Haswani NG, Girase MV, Surana SJ 2010. Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats. *Rev Bras Farmacogn* 20: 969-973.
- Park SY, Bok SH, Jeon SM, Park YB, Lee SJ, Jeong TS, Choi MS 2002. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutr Res* 22: 283-295.
- Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET 2000. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein of human endothelial cells. *Circulation* 102: 2165-2168.
- Pedroso R, Silva CP, Furlan CM 2009. Comparação dos principais constituintes químicos de duas espécies de arnica: cravorana (*Porophyllum ruderale* [Jacq.] Cass.) e varão-de-ouro (*solidago* sp.). *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 7: 42-49.
- Pinto NV, Assreuy MAS, Coelho-de-Souza AN, Ceccatto VM Magalhães PJC, Lahlou S, Leal-Cardoso JH 2009. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. *Phytomedicine* 16: 1151-1155.
- Quintão ECR 1992. *Colesterol e aterosclerose*. Rio de Janeiro: Qualitymark.
- Quintas AT 1963. Novo material de apoio para cortes histológicos. *Revista da Faculdade de Agronomia da UFRGS* 6: 51-55.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM 2007. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier.

- Rao AV, Ramakrishnan S 1975. Indirect assessment of hydroxymethylglutaril-CoA reductase (NADPH) activity in liver tissue. *Clin Chem* 21: 1523-1525.
- Ravindran LN, Stein MB 2010. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *J Clin Psychiatry* 71: 839-854.
- Rezende HA, Cocco MIM 2002. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Rev Esc Enferm USP* 36: 286-288.
- Rocha LM, 2000. Control de calidad de plantas medicinales. Prescripciones farmacopéicas. In: Sharapin N. (org.). *Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapéuticos*. Santa Fé de Bogotá: Convenio Andres Bello (CBA) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Cyted), p. 143-156.
- Roeser KR 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos* 61: 33-36.
- Rossato AE, Krüger AZ 2005. As políticas de saúde para o uso de plantas medicinais e fitoterápicos na rede pública brasileira. *Rev Cien Saude* 1: 45-58.
- Sá LD, et al. 1994. Estudo sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias causadoras de conjuntivite. *Rev Bras Cien Saúde*. 13: 13-17.
- Sanches LB, Silva IT, Paz AFS, Fisberg M, Cintra IP, Villar BS, Damasceno NRT 2008. Anti-oxLDL autoantibodies and their correlation with lipid profile and nutritional status in adolescents. *J Pediatr* 84: 258-263.
- Sant'Ana PJP, Assad ALD 2004. Programa de pesquisa em produtos naturais: A experiência da Ceme. *Quim Nova* 27: 508-512.
- Santos PML, Schripsema J, Kuster RM 2005. Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill., (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 321-325.
- Santos RL, Guimarães GP, Nobre MSC, Portela AS 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Rev Bras PI Med* 13: 486-491.
- Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Doria A, Iaccarino L, Turiel M 2005. Tumor necrosis factor-alpha, biologic agents and cardiovascular risk. *Lupus* 14: 780-784.
- Schemeda-Hirschmann G, Rodrigues J, Astudillo L 2002. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *J Ethnopharmacol* 81: 111-115.

- Schulz V, Hansel R, Tyler VE 2001. *Fitoterapia racional: Um guia fitoterápico para ciências da saúde*. São Paulo: Manoele.
- Silva AG, De Sousa CPG, Koehler J, Fontana J, Christo AG, Guedes-Bruni RR 2010. Avaliation of an extract of Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen., Asteraceae) in treating lumbago. *Phytoter Res* 24: 283-287.
- Silva JM 2002. Statins, high-density lipoprotein and the low density lipoprotein/high density lipoprotein ratio. *Am J Cardiol* 86: 593-594.
- Silva RAD 1929. Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. Companhia Editora Nacional.
- Siqueira MEM, Francalacci LC, Perreira CG 2008. Insuficiência renal aguda e rbdomiólise induzida pelo uso de estatina. Relato de caso. *Rev Bras Clin Med* 6: 273-275.
- Smolarek FSF, Nunes PMP, Cansian FC, Mercali CA, Carvalho JLS, Dias JFG, Miguel OG 2009. Abordagem fitoquímica e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* D.C. *Visão Acadêmica* 10: 77-82.
- Soares-Valverde SS, Azevedo-Silva RC, Tomassini TCB 2009. Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). *Rev Bras Farm* 9: 196-199.
- Solís P, Solís N de, Gatuso S, Cáceres A 2005. *Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos*. Guatemala, Proyecto OEA/AICD.
- Song L, Leung C, Schindler C 2001. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 108: 251-259.
- Sousa CMM, Rocha-Silva H, Vieira-Jr GM, Cruz MC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Breitner PM, Araújo MS, Chaves BMH 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova* 30: 351-355.
- Souza 1998. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas as ciências biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.
- Sposito AC, Carameli B, Fonseca FAH, Bertolami MC 2007. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 88: 2-19.
- Sudheesh S, Presannakumar G, Vijayalakshmi NR 1997. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanun melogena*. *Plant Foods Hum Nutr* 51: 321-330.

- Takahashi E, Katayama M, Nimii K, Itakura C, 2008. Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB₁ receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests. *Euro J Pharmacol* 589: 149-156.
- Tamura EK, Jimenes JK, Waisman K, Gobbo-Neto L, Peporine-Lopes N, Malpezzi-Marinho EAL, Marinho EAV, Farsky FHP 2009. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen., hydroalcoholic extract on acute inflammation. *J Ethnopharmacol* 122: 478-485.
- Tomlinson PB 1956. Studies in the systematic anatomy of the Zingiberaceae. *J Linn Soc* 55: 547-592.
- Tomlinson PB 1969. Commelinales - Zingiberales. In: Metcalfe CR. *Anatomy of the monocotyledons*. Clarendon press. Oxford.
- Torres LMB, Akisue MK, Roque NF 1987. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a arnica do Brasil. *Rev Farm Bioquim* 23: 33-40.
- Valerio M, Awad AB 2011. Beta sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 11: 1012-1027.
- Vasu VT, Modi H, Thaikootathil JV, Gupta S 2005. Hypolipidaemic and antioxidant effect of *Enicostemma littorale* Blume aqueous extract in cholesterol fed rats. *J Ethnopharmacol* 101: 277-282.
- Velázquez E, Tournier HA, De Buschiazzi PM, Saavedra G, Schinella GR 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74: 91-97.
- Victório CP 2011. Therapeutic value of the genus *Alpinia*, Zingiberaceae *Rev Bras Farmacogn* 21: 194-201.
- Victório CP, Kuster RM, Moura RS, Lage CLS 2009. Vasodilatador activity of extracts of Field *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Shum and *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith cultured *in vitro*. *Rev Bras Cienc Farm* 45: 507-514.
- Victório CP, Lage CLS, Kuster RM, 2009. Flavonoid extraction from *Alpinia zerumbet* (Pers.) et Smith leaves using different techniques and solvents. *Ecl Quím* 34: 19-24.
- Viegas JC, Bolzani VS 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova* 29: 326-337.
- Vismari L, Alves GJ, Palermo-Neto J 2008. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Rev Psiq Clin* 35: 196-204.

- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant drug analysis*. New York: Springer Verlag.
- Wagner H 2007. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: Yunes RA (org.). *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. Itajaí: Ed. Univali, p. 35-47.
- Wegener T 2002. The status of herbal antilipemic agents. *Wiend Med Wochenschr* 152: 412-417.
- Whooley MA, Simon GE 2000. Managing depression in medical outpatients. *N Engl J Med* 343: 1943-1950.
- Witztun J 1996. In: Hardman J, Limbird LE Goodmann & Gilman: *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw e Hill Interamericana do Brasil, p. 643-660.
- Wu R, Lefvert AK 1995. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins (oxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clin Exp Immunol* 102: 174-180.
- Wykretowicz A, Furmaniuk J, Smielecki J, Deskur-Smielecka E, Szczepanik A, Banaszak A 2004. The oxygen stress index and levels of circulating interleukin-10 and interleukin-6 in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 94: 283-287.
- Xia W, Sun C, Zhao Y, Wu L 2011. Hypolipidemic e antioxidant activities of Sanchi (*Radix Notoginseng*) in rats with a high fat diet. *Phytomedicine* 18: 516-520.
- Xie W, Wang W, Su H, Xing D, Cai G, Du L 2007. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: diferent from fibrates but similar of statins. *J Pharmacol Sci* 103: 267-274.
- Xu HX, Dong H, Sims KY 1996. Labdane diterpenes from *alpinia zerumbet*. *Phytochemistry* 42: 149-151.
- Xu J, Zhou X, Deng Q, Huang Q, Yang J, Huang, F 2011. Repeseed oil fortified with micronutrients reduces atherosclerosis risk factors in rats fed a high-fat diet. *Lipids in Health and Disease* 10: 1-8.
- Xu Q, Yi LT, Pan Y, Wang X, Li YC, Li JM, Wang CP, Kong LD 2008. Antidepressant-like effects of mixture of honokiol and magnolol from the barks of *Magnolia officinalis* in stressed rodents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 715-732.
- Yunes RA, Calixto JB 2001. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos.

- Zimmerman MA, Reznikov LL, Raeburn CD, Selzman CH 2004. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. *J Surg Res* 121: 206-213.
- Zoghbi MGB, Andrade EHA, Maia JHS 1999. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. pupurata* (Viell.) Schum. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 411-414.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA 2003. Flavonoides. In: Simões CMO (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis. Ed. UFSC, p. 577-614.

7. ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 574

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.104161/2011-64

APROVADO: 15/12/2011 – R.O. 11/2011

TÍTULO: Estudo farmacognóstico para as espécies medicinais Colônia (*Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith), Erva-Lanceta (*Solidago Chilensis* Meyen.) e Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

AUTORES: Cid Aimbiré de Moraes Santos, Márcia do Rocio Duarte, Walter Antonio Roman Júnior

DEPARTAMENTO: Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEUA



Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação da atividade antidepressiva de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. (Zingiberaceae) em modelo animal		
Pesquisador Responsável: Angelo Luis Stapassoli Piato		
Data da Versão: 16/08/11	Cadastro: 091/PGA/11	Data do Parecer: 06/10/11
Objetivos do Projeto Objetivo Geral Investigar a atividade antidepressiva de um extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i> (Zingiberaceae) em modelo animal.		
Objetivos Específicos a) Produzir um extrato padronizado para a espécie medicinal <i>Alpinia zerumbet</i> e determinar os principais constituintes químicos através de perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência. b) Verificar o efeito do extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i> (Zingiberaceae) no teste de atividade locomotora espontânea em camundongos. c) Avaliar a atividade do extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i> (Zingiberaceae) em modelo animal com valor preditivo para detecção de novas drogas antidepressivas, como o teste de suspensão pela cauda.		
Sumário do Projeto As plantas serão identificadas por um botânico e os vouchers serão depositados em local Adequado. Serão utilizados camundongos albinos machos. Os animais serão divididos em grupos experimentais conforme o tratamento. Os tratamentos serão administrados via intraperitoneal ou oral (30 ou 90 minutos antes do teste, respectivamente). Para a avaliação do extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i> no modelo de suspensão pela cauda: Os animais serão suspensos pela porção terminal de suas caudas a uma altura de 50 cm acima de uma superfície. A duração da imobilidade será anotada durante 6 minutos. Após os experimentos, os animais retornarão à caixa moradia. Atividade Locomotora Espontânea: Após os tratamentos, os animais serão colocados por 10 min no aparato de campo aberto para avaliação de atividade locomotora. O aparato consiste em uma arena dividida em quadrantes. Será avaliado o número de cruzamentos de cada animal que servirá como parâmetro de atividade locomotora.		
Itens Metodológicos e Éticos		
Título: <input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente		
Autores: <input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente		
Local de Origem na Instituição: <input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente		
Projeto elaborado por patrocinador: <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não informado		
Aprovação no País de Origem <input checked="" type="checkbox"/> Não necessita <input type="checkbox"/> Anexo ao projeto <input type="checkbox"/> Não encaminhado <input type="checkbox"/> Comentário		
Local de Realização: <input type="checkbox"/> Própria Instituição <input checked="" type="checkbox"/> Outra (citar comentário) <input type="checkbox"/> Ausente		
Outras Instituições envolvidas <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Projeto Multicêntrico <input type="checkbox"/> Não informado		
Condições para realização <input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Inadequado <input type="checkbox"/> Não informado		
Comentários sobre os itens de identificação		
UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CIAPECO		
Introdução: <input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente		

Comentários sobre a Introdução		
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente
Comentários sobre os Objetivos		
Cronograma	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente
Data de início previsto: 2º trimestre de 2011		
Data de término previsto: 4º trimestre de 2011		
Orçamento	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente
Fonte de financiamento		
Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento		
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentário <input type="checkbox"/> Ausente
Comentários sobre as Referências Bibliográficas		
Recomendação		
<input checked="" type="checkbox"/> Aprovar <input type="checkbox"/> Recaminhar aos Autores <input type="checkbox"/> Não Aprovar		
Comentários Gerais sobre o Projeto		

Considerações: As considerações realizadas pelo CEP foram revistas ou esclarecidas, e prontamente atendidas pelo pesquisador.

Diante do exposto, o CEP/URI-Campus de Erechim, de acordo com as normas éticas para experimentação animal da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e Lei nº. 11.794/08, manifesta-se por aprovar o projeto.

Situação: Projeto Aprovado.

Erechim, 06 de outubro de 2011.



Silvana Souza Roman
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - URI - Campus de Erechim