



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

THIAGO DE LAVÔR PAES BARRETO

ESTUDOS DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO AQUOSO DA
COSTUS SPICATUS

RECIFE – PE
2011

THIAGO DE LAVÔR PAES BARRETO

ESTUDOS DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO AQUOSO DA
COSTUS SPICATUS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Co-Orientador: Profa. Dra. Simey de Souza Leão Pereira Magnata

RECIFE – PE
2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 31 de maio de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 31 de maio de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE ORIENTADOR E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª.

Dr^ª. Simey de Souza Leão Pereira Magnata.

(Núcleo de Ciências Biológicas do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antônio – CAV - UFPE).

Assinatura:

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Ivone Antônia de Souza.

(Dept^o de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura:

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão.

(Núcleo de Nutrição Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco CAV - UFPE).

Assinatura:

Barreto, Thiago de Lavôr Paes

Estudos dos efeitos biológicos do extrato aquoso da *Costus spicatus* / Thiago de Lavôr Paes Barreto. – Recife: O Autor, 2011.

75 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Cana de macaco. 2. Antiinflamatório. 3. Toxidade aguda. 4. Antioxidante. 5. Antimicrobiana.
I. Catanho, Maria Teresa Jansem de Almeida.
II. Título.

615.32

CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2012-032



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Pedro José Rolim Neto

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Beate Saegesser Santos

CORPO DOCENTE

Alexandre José da Silva Góes

Almir Gonçalves Wanderley

Ana Cristina Lima Leite

Antônio Rodolfo de Faria

Beate Saegesser Santos

Dalci José Brondani

Davi Pereira de Santana

Elba Lúcia Cavalcanti Amorim

Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Haroudo Satiro Xavier

Ivone Antonia de Souza

Jane Sheila Higino

Janete Magali de Araújo

Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

Maria do Carmo Alves de Lima

Maria Nelly Caetano Pisciotano

Maria Teresa Jansen de Almeida Catanho
Miracy Muniz de Albuquerque
Nereide Stela Santos Magalhães
Pedro José Rolim Neto
Simone Sette Lopes Lafayette
Rui Oliveira Macedo
José Gildo de Lima
Maria Inês Ré
Sebastião José de Melo
Ulysses Paulino de Albuquerque

Dedico este trabalho à minha família que sempre me acompanhou e incentivou em todos os momentos de minha vida, me dando a força e o apoio necessários.
Eles são, sem dúvida, a causa e o objetivo dessa grande luta que é a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e minha família pelo apoio, conforto e diminuição do fardo.

A Professora Tereza Jansen e Simey Magnata pela disponibilidade, incentivo, amizade e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela chance de ser aluno e me desenvolver cientificamente.

Ao CNPq, órgão financiador da minha bolsa de mestrado.

Aos colegas de laboratório pela disponibilidade, incentivo, ajuda e disposição.

Aos amigos que durante esse processo sempre ajudaram e incentivaram.

Aos demais e não menos importantes que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

"É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores,
mesmo correndo o risco de perder tudo,
do que permanecer estático, como os pobres de espírito,
que não lutam, mas também não vencem,
que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros.
Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra
não agradecem a Deus por terem vivido,
mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida..."

(Winston Churchill)

RESUMO

BARRETO, T. L. P. Estudo dos efeitos biológicos do extrato aquoso da *Costus spicatus*. 2011. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco Brasil.

Costus spicatus (Jacq.), é uma espécie nativa encontrada em florestas costeiras do sul do México, Yucatán e na Costa Rica, ao norte da Colômbia e no Brasil. Popularmente conhecida como “cana do brejo” ou “cana-de-macaco”, esta planta é usada na medicina popular para nefrite, distúrbios renais e urolitíase; como diurético, para o controle da diabetes, inflamação na bexiga, para anemia, febre e dores no fígado; para hérnia, gonorréia, sífilis, disenteria e também como laxante. Este estudo teve como objetivo realizar uma análise fotoquímica preliminar do extrato bruto aquoso (EBACS) da *Costus spicatus* assim como a avaliação da toxicidade aguda (DL50) oral com a análise histológica dos rins e fígado, potencial antiinflamatório, antioxidante e antimicrobiano. Na determinação da DL50, foram utilizados camundongos Swiss e tratados com doses únicas do EBACS (250mg/kg; 500 mg/kg; 1000 mg/kg), por via oral e observados por 48h; após o tratamento foram retirados os rins e fígado para análise histológica. Quanto à avaliação da atividade antiinflamatória foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. A determinação do potencial antioxidante foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio; e a atividade antimicrobiano foi analisado pelo método de difusão em disco e pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Os resultados mostram a presença de flavonóides (quercertina e campferol) e derivados cinâmicos no EBACS. Não foram observadas letalidade e sinais de toxicidade aguda na DL50. A análise histológica mostrou nos rins e no fígado a presença de infiltrado inflamatório. O EBACS nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg mostrou um efeito inibitório significativo no edema de pata induzido por carragenina (42,46% na dose de 100 mg/kg e 46,15% na dose de 250 mg/kg) quando comparado com o percentual controle. A atividade antioxidante total do extrato bruto aquoso apresentou uma atividade de $34,56 \pm 3,81\%$ em relação à atividade do ácido ascórbico. Não foi observada atividade contra as diferentes cepas pelo método de difusão em disco, entretanto os valores na MIC variaram de 0,195 a 6,25 mg/ml. Conclui-se que o EBACS não possui toxicidade aguda por via oral e apresenta propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, sendo necessário estudos complementares no sentido de extrair e/ou isolar as substâncias que podem ser responsáveis por essa atividade.

Palavras-chave: cana de macaco, antiinflamatório, toxicidade aguda, antioxidante, antimicrobiano.

ABSTRACT

BARRETO, T. L. P. Study of the biological effects of aqueous extract of *Costus spicatus*. 2011. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco Brasil.

Costus spicatus (Jacq.) is a native species found in coastal forests of southern Mexico, Yucatan and Costa Rica to northern Colombia and Brazil. Popularly known as "cana-do-brejo" or "cana-de-macaco", this plant is used in popular medicine for kidney stone, nephritis, kidney disorders and urolithiasis; as a diuretic, for diabetes control, bladder inflammation, for anemia, fever and pains in the liver; for hernia, gonorrhea, syphilis, colic, dysentery and also as a laxative. This study aimed to perform a preliminary analysis photochemistry of aqueous crude extract (EBACS) *Costus spicatus* well as the evaluation of oral acute toxicity (LD50), anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potential. In determining the DL50, Swiss mice were used and treated with single doses of EBACS (250mg/kg, 500 mg / kg, 1000 mg / kg) orally and observed for 48 hours; after treatment were removed from the kidneys and liver for histological. Regarding the evaluation of antiinflammatory activity, we used the model of paw edema induced by carrageenin. The determination of antioxidant potential was evaluated by the phosphomolybdenum assay, and the antimicrobial activity was examined by the disk diffusion method and by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The results show the presence of flavonoids (Quercetin and kaempferol) and cinnamic derivatives in EBACS. There were no signs of toxicity and lethality by DL50. The results showed histological sections of kidneys and liver with inflammatory infiltrate. The EBACS at doses of 50, 100 and 250 mg/kg showed a significant inhibitory effect on paw edema induced by carrageenan (42,46% in dose of 100 mg/kg and 46,15% in dose of 250 mg/kg) compared with the percentage control. Total antioxidant activity of crude aqueous extract showed an activity of $34.56 \pm 3.81\%$ compared to the activity of ascorbic acid. No activity was observed against different strains by disk diffusion method, but the MIC values ranged from 0.195 to 6.25 mg/ml. We conclude that the EBACS has no acute oral toxicity and has anti-inflammatory properties, antioxidants and antimicrobial properties, necessitating further studies in order to extract or isolate the substance that may be responsible for this activity.

Keywords: cana de macaco, inflammatory effects, toxicity, antioxidant, antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Haste e Flor da *Costus spicatus*. 19

Figura 2: Gerador molibidênio-99/tecnécio-99m. 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS- Organização Mundial de Saúde

PNPIC- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS- Sistema Único de saúde

RMR- Região Metropolitana do Recife

FAP- Fator de Ativação Plaquetária

NO- Óxido Nítrico

NOS- Óxido Nítrico sintetase

SPECT- Single Photon Emission Computed Tomography

PET- Positron Emission Tomography

$^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ - Gerador molibidênio-99/tecnécio-99m

^{99m}Tc - Tecnécio-99m

ATP- Adenosina Trifosfato

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

ERO_s- Espécies reativas de oxigênio

O₂⁻- Ânion superóxido

HO⁻- Radical hidroxila

ROO⁻- Radical peroxila

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

¹O₂- Oxigênio singlete

BHA- Butil-hidroxianisol

BHT- Butil-hidroxitolueno

FPM- Força próton motriz

CCF- Cromatografia de camada fina

ESFA- Escola Superior São Francisco de Assis

GMPC- Guanosina monofosfato cíclico

AMPC- Adenosina monofosfato cíclico

COX- Ciclo-oxigenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 <i>Costus spicatus</i>	17
2.3 Inflamação	21
2.3.1 Dinâmica da inflamação	22
2.3.2 Mediadores da inflamação.....	23
2.3.3 Terapêutica antiinflamatória.....	24
2.4 Radionuclídeos, radiofármacos e radiobiocomplexos.....	25
2.4.1 Tecnécio-99m	26
2.5 Radicais livres e oxidantes	27
2.5.1 Espécies reativas de oxigênio.....	28
2.5.2 Antioxidantes.....	29
2.5.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante	30
2.6 Antimicrobianos	31
2.6.1 Resistência a antimicrobianos	31
2.6.2 Produtos naturais e atividade antimicrobiana.....	33
3. ANEXAÇÃO DE ARTIGOS	36
Biological activity of <i>Costus spicatus</i> aqueous extract	36
Antimicrobiol and antioxidant activity of <i>Costus spicatus</i> aqueous extract	49
4 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	74
Anexo A – Sistemas, padrões e reveladores da triagem fitoquímica do extrato aquoso da <i>Costus spicatus</i>	75

1 INTRODUÇÃO

A relação entre o conhecimento popular e científico pode ser enquadrada dentro de uma mesma discussão. O conhecimento popular é fundamentado em bases empíricas e em resultados práticos, que contribuem para a solução de problemas do cotidiano, se contrapondo ao conhecimento científico, o qual se fundamenta em teorias comprovadas experimentalmente através de métodos validados pela comunidade científica. Por outro lado, tem-se nos estudos das plantas medicinais o estabelecimento de uma relação racional entre o uso das mesmas e a cura das doenças por meio de substâncias bioativas obtidas das plantas (CASTRO & FERREIRA, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS, 80% da humanidade dependem da medicina tradicional para tratamento de doenças. Isto corresponde a aproximadamente cinco bilhões de pessoas, e ainda 85% desta medicina tradicional envolvem o uso de extratos vegetais (SANTOS, LIMA & FERREIRA, 2008).

As estimativas nacionais apontam que 82% da população brasileira utilizam produtos a base de ervas, e o setor fitoterápico conta com duzentas empresas movimentando em torno de 400 milhões de dólares, o que representa 6,7% das vendas de medicamentos em toda sua cadeia produtiva, e emprega mais de cem mil pessoas no país, sendo um mercado promissor e em franca expansão (ALVES et al., 2008).

Os medicamentos fitoterápicos possuem grande importância no mercado farmacêutico europeu, respondendo por 24% do mercado total de medicamentos de venda livre (OTC – Over the Counter). Somente na Alemanha, o faturamento dos medicamentos fitoterápicos foi de US\$ 2,7 bilhões em 2001 (participação de 39,7%), seguido pela França, com faturamento de US\$ 1,6 bilhões (participação de 23,5%), de acordo com Silva (2002).

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao ser humano, exercendo algum tipo de ação farmacológica, ou se é precursora para semi-síntese química/farmacêutica ou, ainda, se é utilizada de forma correta e atende às recomendações da OMS quanto ao seu aproveitamento nos sistemas de Saúde Pública, diminuindo os custos e ampliando os benefícios a países em desenvolvimento (SILVA & CARVALHO, 2004; CALIXTO, 2000; MATOS, 1999).

Em todo o mundo, apenas 17% das plantas tem sido estudadas quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para

a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (HOSTETTMANN et al., 2003; NODARI & GUERRA, 1999; CRAGG & NEWMAN, 1999; HAMBURGER et al., 1991).

Existem entre cento e vinte mil (Di stasi et al., 1994) e duzentas mil (Martins et al., 2000) espécies vegetais no Brasil, sendo provável que, pelo menos, a metade possua propriedade terapêutica útil a população. Contudo, por falta de apoio e investimento do poder publico apenas 1% teve suas propriedades medicamentosas estudadas; apesar da importância para a segurança nacional e para preservação dos ecossistemas onde ocorrem (MARTINS et al., 2000).

O emprego das plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial, utilizada pelo homem moderno. No final do século XIX, com o advento da síntese química, iniciou-se uma fase de desenvolvimento vertiginosa. Na década passada, conseqüentemente, várias pesquisas têm focado na avaliação científica de drogas tradicionais de plantas (LORENZI & MATOS, 2002; GROVER, YADAV, 2004).

Dos medicamentos produzidos nos países do primeiro mundo, 60% são originados de síntese e os demais 40% são procedentes de recursos naturais (30% de plantas e 10% de animais e microorganismos). Essa distribuição pode variar dependendo do local: nesse período em que os dados foram obtidos, 82% da população da França utilizavam medicamentos naturais e na Alemanha os fitoterápicos correspondiam a cerca de 50% dos medicamentos adotados pelo receituário medico (CALIXTO, 2005).

Aproximadamente 80% da população brasileira não têm acesso aos medicamentos mais essenciais. Como as plantas medicinais apresentam maior facilidade quanto ao acesso, custo e manipulação, passam a atuar como a primeira ou talvez única escolha ao acesso à saúde. O fator que favorece a área de produtos naturais, no Brasil, é o conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico da população brasileira, com a miscigenação tendo sido um fator primordial para este conhecimento. Negros e europeus trouxeram para o Brasil o seu conhecimento sobre o uso de plantas, o qual somou ao dos índios. A difusão desse conhecimento no seio da população facilita a aceitação popular de fitoterápicos e a aderência terapêutica. Entretanto, existe um elevado grau de internacionalização da indústria farmacêutica: algo como 70% das vendas pertence a empresas estrangeiras (GALLOTE, RIBEIRO, 2005).

O ministério da Saúde estabeleceu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que trata da implementação de ações e serviços relativos a práticas medicinais complementares, dentre elas a fitoterapia. Essa política tem um papel importante na saúde pública brasileira, pois fortalece e amplia as ações voltadas para a utilização racional das práticas complementares (BRASIL, 2006).

As pesquisas sistêmicas para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica podem ser executadas por meio de vários processos, entre os quais os mais utilizados são: a síntese de novas moléculas; a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas; a extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, que se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. As plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápicos padronizados e eficazes (DI STASI, 1996).

Diante dos fatos comentados, o referido projeto vai trazer a comunidade informações e conhecimentos de cunho científico, necessários para uma correta utilização das plantas medicinais, visando proporcionar a comunidade uma forma acessível e segura de auxiliar no tratamento de doenças, promovendo assim uma melhora na qualidade de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

A utilização das plantas medicinais no Brasil teve início com seus primeiros habitantes, os grupos indígenas, que utilizavam as espécies nativas e faziam uma seleção das plantas que serviam para curar doenças, distinguindo-as das venenosas. Com o descobrimento do nosso país, surgiram novas plantas trazidas de vários países como Europa, Ásia, Índia, África, que hoje fazem parte da nossa flora, constituindo desta forma as plantas denominadas exóticas (BRITO, 2009).

As pessoas tendem a utilizar uma grande diversidade de plantas oriundas de diversos sítios ecológicos naturais ou manejados pelo homem, tais como áreas de vegetação nativa, zonas antropogênicas e totalmente descaracterizadas, e também os quintais. A preferência por determinada fonte de recurso pode refletir os aspectos sócio-culturais da comunidade, bem como as modificações antrópicas do ambiente. Diversos trabalhos etnobotânicos retrataram o uso de plantas medicinais, tanto nativas quanto cultivadas, em diferentes regiões brasileiras, como na Amazônia, na Floresta Atlântica, em comunidades rurais e urbanas do interior do Brasil (SILVA, 2008).

Foi evidenciado também que o uso das plantas faz parte da rotina da maioria das populações, desde aquelas que ainda mantêm costumes antigos até o homem atual que tem acesso aos grandes avanços tecnológicos. Assim pôde-se perceber que grande parte da população do assentamento Ezequias dos Reis, por exemplo, faz uso de plantas medicinais quando necessitam, o que se torna um hábito, já que essa população é carente e não tem atendimento médico-hospitalar no assentamento. Com isso, as plantas medicinais tornaram-se de extrema importância para essa população no que tange ao atendimento básico. Observou-se também que, ainda hoje, a transmissão do conhecimento popular sobre o uso de plantas é necessária, para que novas gerações também herdem essa cultura que é milenar e tão importante, não só para o homem do campo, mas para o homem urbano (SILVA, 2006).

Em estudo realizado sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas, durante as entrevistas, os raizeiros afirmaram que os conhecimentos sobre as plantas medicinais foram adquiridos pela vivência com parentes (pais, avós) que as empregavam em uso próprio ou para curar outras pessoas, sendo que alguns admitiram fazer a

consulta a livros sobre o assunto. Foi constatado que para a maioria deles, predomina a idéia das plantas atuarem apenas como medicamento, sem, contudo mencionarem qualquer efeito adverso ou condição imprópria para a utilização de uma planta ou garrafada. Também ficou demonstrado um desconhecimento total dos riscos das misturas “milagrosas” preparadas com um número muito grande de plantas, algumas vezes 30 plantas (TRESVENOL, 2006).

Com maior frequência, as pesquisas etnobotânicas além de abordarem populações tradicionais, como indígenas e caiçaras, também se concentram em populações de cidades e de pequenos núcleos urbanos com origem rural. Nestas populações, tem sido observada a utilização das plantas como um dos poucos recursos terapêuticos para tratar suas doenças mais freqüentes. Apesar do sistema de saúde oficial gratuito atualmente estender-se à zona rural, ele não consegue atender de forma adequada à demanda e estas populações não têm poder aquisitivo suficiente para pagar um profissional de saúde. Além disso, medicamentos industrializados são caros e as pessoas se rendem à facilidade de se obter as plantas medicinais, que muitas vezes são cultivadas nos quintais de suas casas (PILLA, 2006).

Para o estado de Pernambuco, os estudos etnobotânicos ainda são escassos, apesar de haver esforços nesse sentido. Os mesmos enfocam geralmente a utilização de plantas medicinais e/ou ritualísticas em áreas de caatinga (TEIXEIRA, 2006).

2.2 *Costus spicatus*

A família *Costaceae* pertence à ordem *Zingiberales*, que consiste de oito famílias de monocotiledôneas: *Zingiberaceae*, *Ostaceae*, *Marantaceae*, *Cannaceae*, *Lowiaceae*, *Musaceae*, *Heliconiaceae* e *Strelitziaceae* (Nakai, 1941; APG II, 2003; Judd et al., 2009). Quatro gêneros constituem a família *Costaceae*: *Costus*, *Monocostus*, *Dimerocostus* e *Tapcinochielas*, os quais são encontrados em áreas tropicais e subtropicais através do Novo e do Velho Mundo, em florestas pluviais e outros ambientes úmidos (STEVENSON, 2004; ARAÚJO, 2007).

Plantas da família *Costaceae* já podem ser encontradas no comércio, sendo suas inflorescências utilizadas em arranjos florais. Atualmente, dentre os quatro gêneros citados, sem dúvida, o mais importante comercialmente é o *Costus*, com 125-175 espécies de distribuição pantropical, mas a maioria de suas espécies ocorre nos Neotrópicos (CASTRO, 1995; ARAÚJO, 2007).

O gênero *Costus* é composto por plantas altas ou acaulescentes (Wanderley et al., 2003). Suas folhas são distribuídas em arranjos espirais ao redor do caule e as inflorescências

são estrobiláceas a capitadas, terminais em uma haste enfolhada ou em uma haste separada, curta, sem folhas. As brácteas possuem coloração verde, amarela ou alaranjada a avermelhada; são coriáceas, frequentemente providas de apêndices foliáceos de cor vermelha ou verde. A corola pode apresentar coloração branca, amarela, alaranjada ou vermelha. As sementes são pretas ou marrons brilhantes (Criley, 1995); no entanto, a maioria das espécies multiplica-se facilmente por estacas e por divisão de touceira (LORENZI & SOUZA, 1999).

Algumas espécies de *Costus*, além de serem cultivadas como ornamental, tanto para jardins como para produção de flor de corte podem ter suas folhas, hastes e rizomas empregados na medicina tradicional, como é o caso de *C. spiralis* (Jacq.) Roscoe, *C. cuspidatus* (Nee&Mart.) e *C. spicatus* (Jacq.). Às preparações são atribuídas propriedades depurativas, adstringentes e diuréticas. Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas como diuréticos, tônicos, enquanto o extrato da haste diluído em água tem uso contra gonorréia, sífilis, nefrite, laxante, problemas de bexiga e diabetes, embora a eficácia e segurança de seu uso ainda não tenham sido confirmadas experimentalmente. Em sua composição química é registrada a presença de inulina, ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens e pectinas, sendo que uma ou mais saponinas têm a glicona diosgenina, que é uma substância usada como matéria prima importante para a síntese de hormônios esteroidais. Além das propriedades medicinais, espécies de *Costus* também podem ser usadas como alimento, como por exemplo, os rizomas de *Costus speciosus* (Koenig) que são consumidos pelos indianos (LORENZI & MATOS, 2002; LIN, HANQUET & DUBOIS, 1996; SILVA, BERNARDO & PARENTE, 2000; CORRÊA, 1984; VIMALA & NAMBISAN, 2005).

A *Costus spicatus* (Jacq), popularmente conhecida como “cana-de-macaco” ou “cana do brejo” (Fig.1), é uma planta herbácea, de haste dura, com folhas alternas, invaginantes, verde-escuras, com bainha pilosa e avermelhada nas margens. Suas flores são amarelas com brácteas cor de carmim.



Figura 1: Haste e Flor da *Costus spicatus* (<http://pokoklandskap.blogspot.com/2010/03/costus-spicatus-pokok-lipstik-landscape.html>)

Em estudo realizado na Escola Superior São Fransisco de Assis – ESFA, em Santa Teresa, no Espírito Santo, é tida como depurativa, adstrigente, diurético, diaforético; utilizado na gonorréia, sífilis e nefrite; para picadas de insetos, diabetes, problemas de bexiga, irritações vaginais, leucorréia, cólicas, disenteria e também como laxante (GALLOTE, 2005).

Na Unidade de Saúde Pública de Santa Teresa e Marilândia-ES, é utilizada como diurético, para tratar cistite e afecções dos rins de modo geral (Taufner, 2006). É utilizada para afecções dos rins de modo geral também no município de Santa Bárbara do Pará, estado do Pará. É utilizada para cálculo renal no município de Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro (Medeiros, 2005). Em Quissamã, Estado do Rio de Janeiro, é utilizada para dor no fígado, antiulcerosa assim como citostática (LEÃO, FERREIRA & JARDIM 2007; BOSCOLO, 2008).

Em estudo realizado na área urbana do município de Bandeirantes-PR, é indicado em afecções dos rins de modo geral (Lima, 2007). Tem ainda indicação para leucorreia, além de ser antifúngico (Fenner, 2006). O rizoma da planta *Costus spicatus* (Jacq) é utilizada para o tratamento das reclamações da bexiga e uretra e para expelir pedras nos rins. Uma infusão da parte aérea é utilizada para o tratamento de constipações, dor na garganta, disenteria e diarreia (SILVA, BERNARDO & PARENTE, 2000; SILVA & PARENTE, 2003).

A *Costus Spicatus* está relacionada como uma das principais plantas medicinais utilizadas em trabalho que teve como objetivo determinar as relações entre comunidades e vegetação na Zona da Mata de Pernambuco. Dessa forma, foram selecionadas para o estudo de comunidades situadas na Região Metropolitana do Recife (RMR), Zona do Litoral-Mata de Pernambuco, por estarem próximas a Unidades de Conservação (UC) (SILVA, 2005).

Análise fotoquímica do rizoma e folhas mostraram a presença de flavonóides (Williams & Harbone, 1977), glicosídeos e flavonóides (Silva, Bernardo & Parente, 2000), saponinas e sapogeninas (Silva, Bernardo & Parente, 1999a, 1999b). Foi também evidenciada atividade contra bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cerues* *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica sorovar typhimurium* (Bouzada, 2007). Flavonóides exibiram propriedades anti-inflamatorias (Silva, Bernardo & Parente, 2000) e também demonstraram atividade inibitória da produção do óxido nítrico por macrófagos ativados (Silva, Bernardo & Parente, 2000). Recentemente, saponinas isoladas do rizoma da planta mostraram um leve efeito hemolítico (SILVA & PARENTE, 2003).

Conforme Silva & Parente (2003), polissacarídeos extraídos da espécie inibiram a permeabilidade capilar e demonstraram atividades estimulantes da fagocitose. O extrato metanólico demonstrou atividade antinoceptiva e efeito antiinflamatório em roedores (Quintas Júnior et al., 2010). O extrato aquoso, em ratos normotensos não-anestesiados, induziu hipotensão associada a taquicardia. Em anéis intactos ou sem endotélio da artéria mesentérica superior de rato, provocou relaxamento do tônus induzido por fenilefrina. Demonstrou também baixa toxicidade aguda em camundongos (MENEZES, et al., 2007)

Podem ser consideradas como fontes de suplementação dos metais cobre, ferro e zinco, ao se comparar com outras fontes de alimentos de origem vegetal (Andrade, Alves & Takase, 2005). Em estudo realizado com o rizoma da *Costus spicatus* sobre a modulação das bombas de sódio por saponinas estereoidais, descobriu-se que elas inibem especificamente a atividade do trocador Na^+ -ATPase (Souza, 2004). Além de sido relacionada com o tratamento empírico de doenças com sintomatologia de câncer e está entre as principais plantas relatadas como hipoglicêmica, utilizada no tratamento da diabetes, no México (ALONSO-CASTRO et al., 2011; ANDRADE-CETTO & HEINRICH, 2005).

2.3 Inflamação

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (Cruvinel et al., 2010) (Fig.2). Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão.

A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência, tentando proteger o organismo de estímulos nocivos (Cotran et al., 2000). Durante a inflamação, vários sistemas bioquímicos, como cascata do Sistema Complemento e da coagulação, são ativados, auxiliando no estabelecimento, evolução e resolução do processo. Adicionalmente, substâncias solúveis de meia-vida curta são liberadas, exercem sua ação e são degradadas. A finalidade desse processo é a mobilização das defesas corporais, com o intuito de remover o estímulo indutor da resposta, neutralizando e/ou destruindo o agente causador da lesão celular (microorganismo, toxina) e as conseqüências dessa lesão, como células e tecidos necrosados (Pereira et al., 1998; Storey & Jordan, 2008); e iniciar a recuperação tecidual local, através de um processo de regulação que mantenha o equilíbrio das diversas funções e composições químicas do corpo (SANTOS JUNIOR, 2003).

As causas para as reações inflamatórias são muito variadas, entretanto os mecanismos de surgimento deste processo são comuns. As causas podem ser classificadas em: endógenas e exógenas. As endógenas seriam aquelas derivadas de degenerações ou necroses tissulares e as derivadas de alterações na resposta imunológica (por imunocomplexo ou autoimune). Enquanto que as exógenas poderiam ser causadas por agentes físicos (calor e frio; eletricidade, radiações; sons e ultra-sons, magnetismo, gravidade, traumas mecânicos e atritos) e agentes químicos (inorgânicos e orgânicos), ou até mesmo agentes biológicos, infecciosos ou parasitários, como por exemplo fungos, bactérias, vírus ou protozoários (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

O processo inflamatório caracteriza-se pela sua complexidade e dinamismo, sendo multimediado com a participação de eventos interdependentes, podendo manifestar-se de forma diversa tanto no tocante à duração quanto na intensidade da resposta inflamatória, que por sua vez depende do tipo de injúria ou estímulo nocivo (WERNER & GROSE, 2003).

A resposta inflamatória aguda é um tipo de resposta relativamente inespecífica e suas funções mais importantes estão relacionadas com a eliminação dos tecidos mortos, proteção

contra infecções locais, assim como, permitir o acesso do sistema imune à área danificada. Havendo persistência do agente lesivo, inicia-se a inflamação crônica; nesse processo há destruição contínua dos tecidos e tentativas de cicatrização, por reparo fibroso, além de respostas imunes concomitantes (STEVENS & LOWE, 1998).

Na inflamação aguda, predominam elementos da resposta imune inata e as principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos. Na inflamação crônica, em geral ocasionada por persistência do estímulo tóxico, o processo inflamatório se mantém e sofre alterações qualitativas, caracterizadas por mudança progressiva nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido. A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo, havendo concomitância de destruição e reparo tecidual. Na inflamação crônica, o tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (CRUVINEL et al, 2010).

Muito embora esse mecanismo de defesa seja benéfico, efeitos indesejáveis são comuns. Estes são ocasionados por uma resposta excessiva que pode causar lesão tecidual progressiva; em alguns casos a utilização de fármacos antiinflamatórios ou imunossupressivos podem ser necessários para modular o processo antiinflamatório (CECCON & VAZ, 2004)

2.3.1 Dinâmica da inflamação

A princípio, desenvolve-se a fase vascular da inflamação, caracterizada por vasodilatação, que confere o aspecto avermelhado ao tecido e o calor a região, bem como, o aumento da permeabilidade vascular. Esses eventos facilitam a passagem de proteínas plasmáticas para o tecido, carreando, conseqüentemente, uma grande quantidade de água, o que origina o edema.

A fase celular ocorre concomitante à fase vascular, devido às alterações do fluxo sanguíneo. Nesta fase, verifica-se a marginalização leucocitária no leito vascular e a passagem destes para o tecido através de diapedese. O tipo celular predominante nesta fase são células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), quando diante de um processo inflamatório agudo, ou de células mononucleares (monócitos e linfócitos), em um processo inflamatório crônico. Outras células tais como as células endoteliais, macrófagos, mastócitos e plaquetas podem estar envolvidas (LEES et al., 2004).

Os leucócitos são atraídos ao local da lesão por mediadores inflamatórios com atividade quimiotática, denominados mediadores químicos (Werner e Grose, 2003). A migração leucocitária para dentro dos tecidos é essencial para a defesa contra patógenos e antígenos estranhos ao organismo. No entanto, este mesmo fenômeno pode produzir inflamação inapropriada e destruição tecidual em vários tipos de doenças inflamatórias crônicas, agudas e auto-imunes (JAAKKOLA et al., 2000).

A ativação leucocitária, liberação de radicais livres, proteases, metabólitos do ácido aracdônico, citocinas inflamatórias e antiinflamatórias liberadas no local inflamado podem induzir a secreção de quimiocinas e substâncias imunomoduladoras pelas células endoteliais, epiteliais e células intersticiais, criando uma resposta inflamatória local exacerbada (AGOURIDAKIS et al., 2002).

2.3.2 Mediadores da inflamação

A resposta inflamatória é iniciada pela liberação de mediadores químicos pelo tecido destruído, antígenos e proteínas do sistema complemento. Macrófagos e neutrófilos migram rapidamente para o sítio da agressão e lá iniciam o processo de fagocitose com a produção de diversos mediadores com o objetivo de atrair outros leucócitos e amplificar a resposta (DEMPSEY, VAIDY & CHENG, 2003).

Seus sinais e sintomas são produzidos através de mediadores químicos constituindo uma “orquestra biológica”. Vários tipos de células são ativadas nos tecidos danificados ou infectados, promovendo a liberação de diversos mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, eicosanóides, aminas biogênicas e neuropeptídeos. No local da inflamação, esses mediadores têm efeitos vasculares, promovendo a vasodilatação, a estase vascular e o aumento da permeabilidade capilar; garantem também a migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e coordenam ainda as variadas respostas de defesa local (ROTH et al., 2009).

Podem ser classificados de acordo com sua função: aqueles com propriedades vasoativas e propriedades de contração dos músculos lisos, tais como a histamina, prostaglandinas, leucotrienos e o fator de ativação das plaquetas (FAP); com fatores quimiotáticos, tais como os fragmentos do complemento (C5a) e citocinas (IL-8); proteases do plasma capazes de ativar o complemento e os componentes do sistema de coagulação, bem

como, moléculas reativas e citocinas liberadas dos leucócitos que, uma vez liberadas para o meio extracelular, são capazes de danificar o tecido adjacente (PORTH & KUNERT, 2004).

Mediadores químicos têm diferentes origens no organismo e exercem funções diversas na cascata inflamatória, podendo ser provenientes de células - histamina, serotonina, enzimas lisossomais, prostaglandinas, leucotrienos, fatores ativadores de plaquetas, citocininas, nitrato e óxido nítrico e/ou mediadores provenientes do plasma - o complemento, as cininas bradicinina e os fatores de coagulação (CUZZOCREA, 2005; WANG, ALJAROUDI & NEWBY, 2005; SARKAR & FISHER, 2006; SPINOSA et al., 2006; GILMAN et al., 2006).

2.3.3 Terapêutica antiinflamatória

Os eventos seguintes das interações humorais/celulares são importantes para a iniciação e propagação da resposta inflamatória e podem ser responsável por injúrias teciduais (Strieter, Kunkel, 1994). Por fim, o órgão pode sofrer lesão funcional grave. A terapêutica antiinflamatória nestes casos é essencial.

A terapia antiinflamatória atual baseia-se na necessidade de controlar os sinais cardinais da inflamação. A maioria dos antiinflamatórios estudados são chaves de bloqueio ou antagonismo de vias de mediadores pró-inflamatórios, os quais estão envolvidos na iniciação de uma resposta inflamatória aguda (SERHAN et al., 2007).

Nas últimas décadas tem-se verificado o crescimento dos conhecimentos tanto do processo inflamatório em si como de potenciais substâncias que possam, de alguma forma, interferir com o mesmo, muitas delas de origem vegetal. Muitos metabólitos secundários derivados de plantas já foram identificados por interagirem direta ou indiretamente com os mediadores inflamatórios, como os metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros; por participarem da produção de segundos mensageiros (GMPc, AMPc, cinases de proteínas, cálcio), com fatores de expressão ou de transcrição (AP-1, NF-K κ) e por intermediarem a expressão de moléculas pró-inflamatórias como NO sintetase (NOS) indutível, COX- 2, citocinas (IL-1 α , TNF- α), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO, OTUKI & SANTOS, 2003).

2.4 Radionuclídeos, radiofármacos e radiobiocomplexos

Os radionuclídeos, quando utilizados na área biomédica, têm possibilitado a elucidação de inúmeros fenômenos que ocorrem nos seres vivos, inclusive no homem, os quais são utilizados na medicina nuclear como fonte de radiação e como traçadores (Perkins & Frier, 1999; Saha, 2004). No primeiro caso, o material biológico recebe apenas as radiações emitidas pelo radionuclídeo usado; no segundo, são administrados como radiofármacos (radiobiocomplexos), que são células ou moléculas marcadas com o radionuclídeo, amplamente utilizadas em medicina nuclear, para diagnóstico e para terapia (Perkins & Frier, 1999; Van de Wiele et al., 2003, Saha, 2004), através da obtenção de imagens, SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) ou PET (Positron Emission Tomography). A utilização em medicina nuclear é interessante pelo fato das doses administradas em diagnóstico acarretarem uma baixa exposição do paciente e produzirem imagens de excelentes qualidade (Propper et al, 2003), permitindo avaliar a morfologia e a fisiologia do órgão estudado (HLADIK & SAHA, 1987).

Logo, os radiofármacos em Medicina Nuclear são utilizados para obtenção de imagens com seletividade por um órgão e/ou sistema e a radiação emitida é captada externamente, transformada ou registrada em papel, filme ou monitor de vídeo (Saha, 2004). A escolha de um radionuclídeo para uso na medicina nuclear depende de vários fatores físicos como: a meia vida física, a meia vida efetiva, a energia da radiação emitida e o tipo de decaimento (KNOLL, 1989).

Existem duas fontes principais para a produção de radionuclídeos. A fonte primária que consiste na produção direta de radionuclídeos através de reatores nucleares e aceleradores de partículas e a fonte secundária que consiste no método indireto através dos geradores de radionuclídeos. A importância dos geradores de radionuclídeos consiste no fato de que eles são facilmente transportados, ocupam pouco espaço e, ao contrário dos reatores e aceleradores de partículas, podem ser instalados facilmente em clínicas, hospitais ou centros diagnósticos. Um gerador é construído com base na relação entre o decaimento de um radionuclídeo pai (meia vida longa) e o aumento de um radionuclídeo filho (meia vida curta). O radionuclídeo filho é separado do radionuclídeo pai como resultado de suas diferenças químicas. O mais importante e mais utilizado é o gerador molibidênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) (Figura 2) (EARLY & SODEE, 1995; OWUNWANNE, 1995; SAHA, 1998).



Figura 2: Gerador molibidênio-99/tecnécio-99m.

Fonte: <http://www.fsc.ufsc.br/~canzian/imagem/abril-08-gerador-de-tecnecio.html>

2.4.1 Tecnécio-99m

O radionuclídeo Tecnécio-99m (^{99m}Tc) é amplamente utilizado para obtenção de imagens cintilográficas na medicina nuclear tipo SPECT (single photon emission computed tomography) (Tahmasebi et al., 2005; Duvall et al, 2006). É um dos isótopos do elemento tecnécio, que é classificado como um metal de transição do grupo VII. (KOWALSKY & PERRY, 1987).

A relevância do ^{99m}Tc para a Medicina Nuclear deve-se a uma série de características de natureza química, física, econômica, médica e ambiental. É um radionuclídeo artificial originado da desintegração do molibdênio-99, um isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio. É obtido com tecnologia desenvolvida no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Comissão Nacional de Energia Nuclear do Brasil, que o distribui para todos os Serviços de Medicina Nuclear do país, tornando sua disponibilidade de baixo custo, e com atividade diluída (BERNARDO-FILHO et al, 2005).

Apresenta uma meia vida de 6,01 horas, emite energia da radiação gama e energia de radiação de 140 keV. Por apresentar características como alta disponibilidade, facilidade de se ligar às hemácias, possibilidade de marcar espécies biológicas e estruturas celulares ou moleculares, baixo custo e impacto ambiental desprezível, tornou-se o isótopo mais utilizado

na marcação de radiofármacos em Medicina Nuclear (EARLY & SODEE, 1995; OWUNWANNE, PATEL & SADEK, 1998; OLIVEIRA ET AL, 2006).

É amplamente utilizado em estudos estáticos e dinâmicos por meio de cintilografia. Tem tendência a se acumular onde existe uma excessiva neovascularização, exemplo disso, os tumores cerebrais. Após administração na corrente circulatória, seu tempo de permanência no sangue permite estudos de hemodinâmica, de lesões orgânicas e estudos vasculares. É também largamente utilizado no diagnóstico de doenças dos rins, bexiga, fígado, pulmões, intestinos, ossos, tireóide, fluxo sanguíneo, coração, e outros órgãos (SAMPSON, 1996; BRITTO et al., 1998).

2.5 Radicais livres e oxidantes

Os radicais livres são moléculas ou átomos que possuem a capacidade de existir independentemente, contendo um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxidorredução, isto é, ou cedem elétron, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2003).

O O₂ tem um significado fundamental para os organismos aeróbios, pois participa na obtenção de energia na forma de ATP, através da cadeia respiratória, comoceptor final de elétrons. Participa também de varias reações metabólicas como a biossíntese de prostaglandinas e esteroides e na oxidação de muitas substancias aromáticas, entre outras (ROCHA et al., 2007).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais (Roesler et al., 2007). Os radicais livres produzidos pelos macrófagos e neutrófilos são empregados contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva a estes microrganismos. Estes também podem ser formados pela exposição do organismo a fatores exógenos, como ozônio, radiações gama e ultravioleta, tabaco, substâncias tóxicas presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, aflatoxinas, etc), alto consumo de gorduras saturadas (frituras, embutidos, etc) e de certos medicamentos (HALLIWELL & GUTTERIDGE 2000).

Os óleos, as gorduras e os alimentos que os contêm estão sujeitos, durante o processamento e a estocagem, a reações químicas que podem alterar, de modo indesejável, as características do produto final. Hidrólises e oxidações podem ser responsáveis por esse processo, sobretudo a oxidação dos lipídeos (MORAIS et al., 2006).

O excesso de radicais livres leva a importantes alterações em nível molecular que estão associadas a danos das macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA, gerando alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatoide entre outras (HALLIWELL & GUTTERIDGE 2000).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, como a superóxido dismutase, ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUZA et al., 2007).

2.5.1 Espécies reativas de oxigênio

O termo “espécies reativas de oxigênio” (EROs) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($HO^\bullet$), o radical peroxila ($ROO^\bullet$) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), os quais são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos (ANDRADE et al., 2007)

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é inevitável no metabolismo aeróbico do organismo. Nas células, as EROs podem causar a oxidação de lipídios e proteínas, a quebra na fita de DNA e a modificação nas bases e na modulação da expressão gênica. A condição de estresse oxidativo pode ser definida como o acúmulo intracelular de níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio por meio da saturação do sistema de defesa antioxidante. Mecanismos de defesa antioxidante do organismo humano, como as enzimas antioxidantes e os antioxidantes presentes nos alimentos estão ligados uns aos outros e equilibram as EROs. Quando os mecanismos da proteção antioxidante se tornam ineficientes

por fatores como idade, a deterioração das funções fisiológicas pode ocorrer, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento (LEE et al., 2004; Moraes et al, 2006).

2.5.2 Antioxidantes

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável; retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al, 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados, em relação ao mecanismo de ação, como primários ou secundários. Antioxidantes primários atuam como doadores de prótons e impedem o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres, ao convertê-los em produtos mais estáveis termodinamicamente. Em contrapartida os antioxidantes secundários atuam bloqueando a decomposição dos radicais peróxidos e hidroperóxidos, por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcooxila (SHAHIDI & NACZK, 2004).

Frutas e outros vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antiocianinas, além dos já conhecidos; vitaminas C, E e carotenóides, contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos. Somando-se a isto, estudos têm demonstrado que polifenóis naturais possuem efeitos significativos na redução do câncer, e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos fontes de substâncias fenólicas, possivelmente por suas propriedades antioxidantes (BROINIZII et al., 2007)

Antioxidantes são importantes na prevenção de doenças, tanto para plantas quanto para animais, inibindo ou atrasando a oxidação das biomoléculas por meio da prevenção da iniciação ou da propagação da cadeia de reações de oxidação. Agentes redutores, cuja função é transferir átomos de hidrogênio, como o ácido ascórbico, são considerados antioxidantes. Alguns antioxidantes também são capazes de quelar íons metálicos como cobre e ferro, os quais catalisam a oxidação lipídica (KAUR & KAPOOR, 2001).

Adicionalmente, os antioxidantes podem ser subdivididos em sintéticos e naturais. Antioxidantes sintéticos são geralmente utilizados em óleos e comidas gordurosas para retardar sua autooxidação. Alguns antioxidantes como butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), bastante utilizados em alimentos, revelaram-se tóxicos em altas doses. Dessa forma, a pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado bastante nos últimos anos (MORAIS et al, 2006).

2.5.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias contendo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Esses compostos são metabólitos secundários de plantas que possuem elevada diversidade estrutural; atualmente são conhecidas mais de 8.000 estruturas. Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos e fazem parte integral da dieta humana (MANACH et al., 2005; TULIPANI et al. 2008; MEZADRI et al. 2008, LASKAR et al., 2010).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por retardarem a degradação oxidativa (Sreeramulu & Raghunath, 2010). Acredita-se que a biodisponibilidade e atividade biológica dos polifenóis está diretamente relacionada com sua estrutura química e, além disso, exista uma variabilidade individual sobre o metabolismo e biodistribuição desses compostos em humanos (MONTEIRO et al., 2007).

As atividades biológicas dos compostos fenólicos está inteiramente correlacionada com seu potencial antioxidante, que, por sua vez, é associada à natureza química destes compostos. Dessa forma, os compostos fenólicos representam bons agentes redutores, e juntamente com outros agentes redutores tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos (Vinson e Dabbag, 1998; Prasad et al., 2009). Tais substâncias são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos através da captação de radicais livres, bloqueando reações em cadeia e algumas vezes agindo como quelantes de metais (Shahidi et al., 1992), atuando tanto na etapa de

iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SOARES, 2002).

Além do potencial antioxidante, os fenólicos possuem outras propriedades, dentre elas, atividade antiinflamatória, anti-agregação plaquetária, diurética, antiviral e anticarcinogênica, sendo também benéficos ao sistema cardiovascular por sua participação na vasodilatação (RICE-EVANS, 1996; NEIVA et al., 1999; PRASAD et al., 2009).

2.6 Antimicrobianos

A partir do desenvolvimento da sulfonamidas, na década de 1930, e da penicilina e estreptomicina, em 1940, muitas novas classes de agentes antibacterianos foram desenvolvidas, como a tetraciclina, a quinolona e os aminoglicosídeos (Norrby & Nord, 2005). Existem algumas propriedades que devem ser comuns aos antibacterianos: a) toxicidade seletiva, ou seja, devem agir nas bactérias sem causar danos ao hospedeiro; b) espectro de ação, quando os antimicrobianos que têm atividade em maior número de espécies de microrganismos; c) mecanismo de ação, no qual cada antibiótico atua de maneira diferente na célula-alvo; d) poucos efeitos colaterais (MURRAY et al., 2002).

Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ou membrana celular, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou sínteses de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microrganismos (RANG et al., 1997; TRABULSI et al., 1999).

A introdução e o desenvolvimento do uso de antibióticos configuram, inquestionavelmente, entre as mais importantes intervenções farmacológicas em relação à redução da morbidade e mortalidade humana. O uso intensivo de antibióticos aumentou drasticamente a frequência de resistência dos patógenos humanos, reduzindo drasticamente a possibilidade de tratar eficazmente as infecções e aumenta o risco de complicações e de um desfecho fatal (WOODFORD, N. & LIVERMORE, 2009; LEW et al., 2009, ANDERSSON & HUGHES, 2010).

2.6.1 Resistência a antimicrobianos

Nas últimas décadas o uso irracional de antimicrobianos determinou o surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes, impulsionando a comunidade científica à pesquisa nas áreas de química, farmacologia e microbiologia para descoberta de novos agentes antimicrobianos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL et al., 2002; SOUZA et al., 2003).

Vários são os fatores que contribuem para a ocorrência, frequência e persistência da resistência bacteriana, como: a pressão seletiva pelo uso abusivo dos antibióticos; a utilização de antibióticos para o tratamento e a prevenção de infecções em animais e no controle de infecção bacteriana em frutas e legumes, que aumentam a transmissão de organismos multirresistentes para os seres humanos (COHEN, 1992; VIKSVEEN, 2003).

Os mecanismos do desenvolvimento de resistência das bactérias aos antimicrobianos podem ser naturais ou adquiridos. Os naturais são características intrínsecas de algumas espécies, que conferem resistência a todas as cepas dessa espécie a um determinado antimicrobiano. A resistência adquirida ocorre devido a uma mutação genética, tanto em nível cromossomal, pela alteração do DNA bacteriano, como extracromossomal, pela transferência de DNA, geralmente pelos plasmídios de resistência (NORMARK, NORMARK, 2002).

Os mecanismos químicos de resistência decorrentes dessas mutações podem ser criados por: 1. alterações no alvo ao qual os antimicrobianos se ligam para promover sua ação (ex. eritromicina); 2. alteração da permeabilidade da membrana celular, ocorrendo modificação das proteínas da membrana e impedindo assim, a passagem dos antimicrobianos (ex. quinolonas); 3. desenvolvimento de enzimas que inativam ou destroem o antimicrobiano (ex. β -lactâmicos); 4. alteração de uma enzima que vai permitir a ocorrência de uma reação antes inibida (ex. sulfonamida); 5. alteração de uma via metabólica (ex. sulfas) (BLACK, 2002).

O uso abusivo de antimicrobianos, tendo como principais fatores determinantes a automedicação e a prescrição indevida desses medicamentos pelos profissionais da saúde, favorecem o crescimento de cepas resistentes. Estima-se que cerca de 20 a 50% dos antibióticos prescritos são desnecessários. Um exemplo clássico é a indicação de antibióticos para o tratamento de infecções das vias respiratórias superiores - como resfriado comum, infecção de ouvido (otite média), garganta dolorida, tosse, e bronquites- apesar das evidências de ineficácia desses agentes para essas doenças, por serem frequentemente de etiologia viral (VIKSVEEN, 2003; NORBY & NORD, 2005).

Paralelamente ao aumento da resistência a antimicrobianos, houve uma diminuição no desenvolvimento de novas drogas. A principal razão pela qual as indústrias farmacêuticas

reduziram as pesquisas em drogas antimicrobianas é o pequeno retorno financeiro sobre o investimento, devido aos custos cada vez mais altos. Nesse sentido, recentemente, as plantas tornaram-se objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas propriedades (NORRBY & NORD, 2005).

2.6.2 Produtos naturais e atividade antimicrobiana

A pesquisa de extratos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como uma saída para o combate aos microrganismos, em razão do grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, levando assim à procura dessas novas alternativas terapêuticas (Antunes et al., 2006; Catão et al., 2006; Novais et al., 2003; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Além disso, é também um modelo ecologicamente correto de produção de substâncias que sejam eficazes e menos agressivas, tanto para o meio ambiente como para o homem, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida (DEOUX & DEOUX, 1998).

Os produtos naturais são responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem pode chegar a aproximadamente 70 % (PHILLIPSON, 2001).

Associando-se aspectos como patogenicidade bacteriana, resistência microbiana, incidência de acometimento do patógeno na população, utilização da medicina popular, condição monetária da população, dentre outros aspectos, torna-se substancialmente importante a viabilização de estudos e experimentos que colaborem com a medicina popular, no combate aos microrganismos (PALMEIRA et al., 2010).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (Tavares, 1984; Coelho et al., 2004). Algumas espécies vegetais sintetizam substâncias de defesa, quando são agredidas por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes. Estes compostos são produtos dos seus metabolismos secundários, tendo composição química muito variada, mas tendo interesse de modo particular aos produtos com ação antimicrobiana como: terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonóides), compostos

nitrogenados (alcalóides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora (RESCHKE et al., 2007; SIMÕES et al., 2003).

Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos. Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal (Gonçalves, Alves-Filho & Menezes 2005). Geralmente os mecanismos de ação de compostos naturais são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

As substâncias antimicrobianas nas plantas são detectadas pela observação do crescimento de microrganismos colocados em contato com tecidos e ou extratos, e para detectar estas substâncias são utilizados diversos métodos, diferenciados pela sensibilidade ou princípios. A região ou estrutura da planta e suas características fisiológicas também são determinantes para a medição da atividade antibiótica, bem como a forma de uso: suco, óleo essencial e extração por água ou outros solventes (SOUZA et al., 2000).

Uma variedade de métodos é encontrada para esse efeito e como não são todos baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos serão também profundamente influenciados, não só pelo método escolhido, mas também pelos microrganismos utilizados para realizar o teste, e pelo grau de solubilidade de cada teste (Silveira et al., 2009). Os principais métodos microbiológicos de detecção de atividade antimicrobiana encontrados na literatura tanto para detecção da atividade de bactérias como fungos podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (SILVEIRA et al., 2009).

Os ensaios bioautográficos são aqueles que empregam placas de cromatografia de camada fina (CCF) para a análise. Os compostos separados por CCF são colocados por contato em placas de ágar previamente inoculadas com o microrganismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas. Estes métodos têm importância particular na pesquisa de compostos antimicrobianos vegetais, pois permitem a localização direta dos constituintes ativos a partir de uma matriz complexa sendo, portanto, um método qualitativo (SILVEIRA et al., 2009).

Ensaio de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o microrganismo teste. Após incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA et al., 2009).

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura. A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão, método dos cilindros e método de poços (SILVEIRA et al., 2009).

Quando se trata de extratos vegetais, se aplica um grande número de metodologias para detecção de atividade antimicrobiana, e as técnicas de difusão, aqui inclusive discos e poços são as mais adequadas para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e ou extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar os solventes do disco, antes da colocação deste no meio de cultura e/ou colocar quantidade definida diretamente no poço, aliado ao fato de que a cor não irá interferir na leitura dos resultados (SILVEIRA et al., 2009).

3. ANEXAÇÃO DE ARTIGOS

ARTIGO 1

A ser submetido à revista Journal of Ethnopharmacology

Biological activity of *Costus spicatus* aqueous extract

BARRETO, T.L.P.¹; SILVA, T.R.P.M.¹; SILVA, N.M.B.¹; SILVA, L.C.M.²; ARAÚJO, J.M.³;
MAGNATA, S.S.L.P.¹; CATANHO, M.T.J.¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Laboratório de Biofísica Celular e Molecular, PE, BR

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, PE, BR

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, PE, BR

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses: thiagodlpb@hotmail.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance

Costus spicatus, commonly known as cana-de-macaco or cana-do-brejo, is very famous for its medicinal use in multiple disorders. It is also popular as a remedy against inflammatory disorders and kidney disorders.

Objective of the study

This study aimed to evaluate the acute toxicity (DL₅₀) and anti-inflammatory potential of aqueous crude extract of *Costus spicatus*

Materials and methods

In the investigation of the DL₅₀, Swiss mice were treated orally with single doses of aqueous crude extract (250mg/kg, 500 mg / kg, 1000 mg / kg) observed for 48 hours, and had both kidneys and liver removed for histologic analysis To evaluate the antiinflammatory activity, we used the model of paw edema induced by carrageenin.

Results

No evidence of toxicity was observed by the analyzed parameters. The results showed histological sections of kidneys and liver with inflammatory infiltrate. The extract at doses of 50, 100 and 250 mg/kg showed a inhibitory effect ($P < 0.05$) of 25,54%, 42,46% and 46,15% respectively in paw edema induced by carrageenin.

Conclusion

These results indicate that the aqueous crude extract has no toxicity by the oral route and has anti-inflammatory properties.

1.0 Introduction

Costus spicatus (Jacq.), is a native specie found in wet coastal forests from southern Mexico, Yucatan and Costa Rica to northern Colombia and Brazil. Popularly known as 'cana do brejo' or 'cana-de-macaco', this plant is used in folk medicine in kidney stones, nephritis, kidney disorders, urolithiasis and kidney diseases in general (Gallote, 2005; Taufner, 2006; Leão, 2007; Medeiros, 2005; Boscolo, 2008; Araújo, 2007); as a diuretic (Taufner, 2006; Boscolo, 2008), for the control of diabetes (Gallote, 2005; Araújo, 2007), bladder inflammation (Gallote, 2005; Boscolo, 2008), for anemia, fever, pain in the liver (Boscolo, 2008); for gonorrhea, syphilis, colic, dysentery and also as a laxative (Gallote, 2005).

Phytochemical analysis of *C. spicatus* rhizomes and leaves showed the presence of flavonoids (Williams & Harbone, 1977), flavonol glicosides (Silva *et al*, 2000), saponins and sapogenins (Silva *et al.*, 1999a, 1999b).

Flavonoids exhibited anti-inflammatory properties and also showed inhibitory activity of nitric oxide production by activated macrophages. (Silva, Bernardo, Parente, 2000). Recently, saponins isolated from the rhizome of the plant showed a slight haemolytic effect (Silva and Parente, 2003). Polysaccharides inhibited capillary permeability and stimulating activities demonstrated phagocytosis (Silva and Parente, 2003).

The methanol extract showed antinociceptive activity and anti-inflammatory effect in rodents (Quintas Júnior *et al*, 2010).

The extract in non-anaesthetized normotensive rats, induced hypotension associated with tachycardia. In intact rings or without endothelium of superior mesenteric artery of rats,

caused relaxation of phenylephrine-induced tone. It also demonstrated low acute toxicity in mice (Menezes, et al., 2007). A study of the rhizome of *Costus spicatus* on the modulation of sodium pump by steroids saponins found that they specifically inhibit the activity of Na⁺-ATPase (Souza, 2004).

1.0 Material and Methods

1.1 Plant material

The leaves of *C. spicatus* (Jacq), were collected at Recife, Pernambuco, and identified by Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira. A voucher specimen (No. 84592) is deposited at the herbarium of the Instituto Agronomico de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

1.2 Extration

The harvested fresh leaves were dried at 45 °C for three days, and after drying, they were crushed in a mechanical mill machine, getting 75g. The aqueous extract was obtained from dried leaves (50g of powder) by an infusion with water (500 ml / 100 °C/30 minutes) followed by filtration. The filtrate was lyophilized (aqueous extract) and stored at 18°C.

1.3 Phytochemical Analysis

1.3.1 Saponins

To identify the presence of saponins, resuspend to the aqueous methanol and distilled water and then transferred to a test tube with vigorous stirring to see a foaming.

1.3.2 Polyphenols, alkaloids, proanthocyanidins, terpenes

The phytochemical profile was analyzed by analytical thin layer chromatography (CCDA), using thin-layer plates of silica gel (Merck, Germany) were applied in aliquots of 15 µl of the extract previously prepared. Eluent used was revealing and described in Wagner and Bladt (1996)

1.4 Animals

Females Swiss mice weighing 30±5 g were used for all experiments. The animals were obtained from Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) of the Universidade Federal de Pernambuco. They were housed at 22 ± 2 °C under a 12 hour light/ 12 hour dark cycle and had free access to water and food, before experimentation. Prior to the experiments, the animals were fasted overnight, with water provided ad libitum. The experimental protocols were approved by and were followed in accordance with the guidelines of the Ethical Committee in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pernambuco.

1.5 Determination of acute toxicity (LD50)

Experimental groups of 6 mice received orally doses of 250, 500 and 1000 mg/kg of AECS, while the control group received only vehicle (distilled water). All groups were observed for 48 hours; at the end of this period the mortality was recorded for each group.

The results are calculated according Souza (2001), obeying the following formula:

$$\frac{DL_{50} = D_f - (a \times b)}{N}$$

N – number of mice/batch

D_f – numerical doses capable of killing all animals

a – difference between two consecutive doses

b – average of animals killed between two consecutive batches

1.6 Hippocratic screening

Simultaneously the LD₅₀ test, was conducted the observation of the experimental units in time of 30 minutes, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h and 48h, in order to quantify the effects on these parameters: a) State of awareness and provision (general appearance, vocal Frenita, irritability), b) coordination (general activity, response to touch, response to tail clamping, writhing, gait, righting reflex), c) muscle tone (tonus of legs, body tone, strength to grab, ataxia), d) reflexes (ear, cornea), e) activity of the central nervous system (tremors, convulsions, stimulations, a phenomenon of "Straub, sedation, hypnosis, anesthesia) and f) activity of the autonomic nervous system (lacrimation, ptosis, defecation urination, piloerection, hypothermia, breathing).

1.7 Histological analysis

Histopathologic analysis was performed by light microscopy in paraffin material. Portions of the live and both kidneys were harvested, cut into smaller pieces and fixed in formalin 10%. After fixation the sample was washed with water and immersed in 70% ethyl alcohol for 3-4 days. The tissues were infiltrated with paraffin at 58-60 °C and finally immersed and embedded in paraffin. After solidification were performed in microtome sections of rotational 5µm thick and stained with hematoxylin-eosin (HE) and mounted with coverslip and ethelan.

1.8 Biodistribution studies

Biodistribution studies were performed in Swiss mice. The animals received the extract intraperitoneally (control group, 50 mg/kg and 100 mg/kg). After the treatment time (1h), the animals received by tail vein Na^{99m}TcO₄ solution (13 mCi) and after 30 min. were anesthetized and sacrificed for removal of organs (liver, kidney) and blood, which were dried, washed and the radioactivity of each organ measured (Cobra II auto gamma). Moreover, all organs were weighed to establish the %uptake/g

1.9 Assessment of anti-inflammatory activity: the carrageenan-induced edema model

The anti-inflammatory activity of the extracts of *C. spicatus* was measured by the carrageenan-induced rat paw edema model (Winter, Risley and Nuss, 1962). Experimental animals were randomly selected, and divided into five groups consisting of 5 rats in each group. Edema was induced by sub-planter injection of 0.1 mL of 1% suspension of carrageenan in normal saline in the right hind paw of the rats. After 40 minutes of treatment, the test compounds were administered (i.p.) to each group at 5 mg/kg, 10 mg/kg and 25 mg/kg body weight. Another animal group was treated with ibuprofeno at a dose of 250

mg/kg (i.p.) as a reference standard. The saline treated group (0,5 ml) was considered as control.

After 4 h of drug administration, animals are anesthetized, sacrificed and their hind paws removed for weighing. The results will be analyzed according to the percentage of reduction of inflammation according to the method of Levy (1969), Srivastava et al. (2000).

2.0 Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences between the control and treated groups were tested for significance using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's t-test. P values < 0.05 were considered to be significant.

3.0 Results

3.1 Extration

The process of freeze drying resulted in 9g of crude aqueous extract, with a yield of 18%

3.2 Phytochemical Analysis

After the realization of analyzes chromatographic crude aqueous extract from leaves of *Costus spicatus*, have identified the following groups of molecules (Table 1)

METABÓLITOS	EXTRATO
ALCALÓIDES	-
POLIFENÓIS	+
PROANTOCIANIDINA	-
TERPENOS	-
SAPONINAS	-

Tabela 1: phytochemicals results of aqueous extract of *Costus spicatus*.

3.3 Determination of acute toxicity (LD50) and Hippocratic screening

The results (Table 2) of acute toxicity tests showed that, the administration in mice orally of the aqueous extracts from leaves of *Costus spicatus* caused no sign of the toxicity.

Dose (mg/kg)	Via	N	Mortes/Total
250	po	5	0/10
500	po	5	0/10

1000	po	5	0/10
------	----	---	------

Tabela 2: results of the determination of DL₅₀ of *Costus spicatus*

3.4 Histological analysis

The results showed histological sections of kidneys with mild inflammatory infiltrate with predominant lymphocytes (Fig 1a/1b). The sections of the livers showed focal inflammatory infiltrates consisting mononuclear cells and eosinophils (Fig.2a/2b).

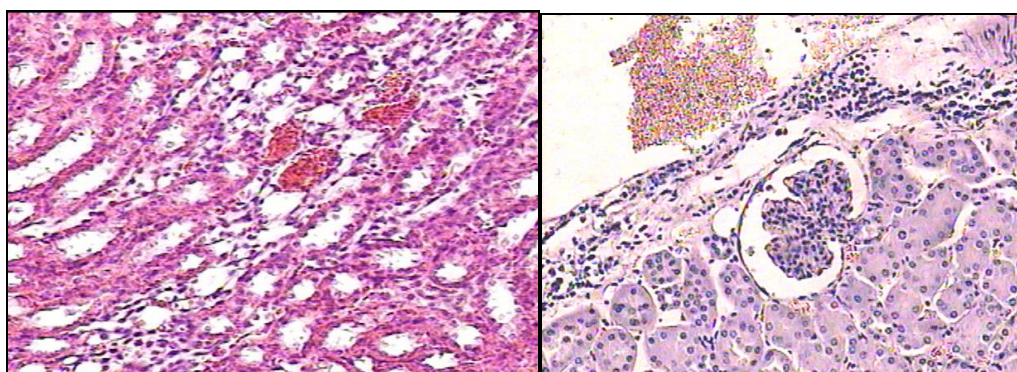


Figure 1a/1b: Histological sections of kidney (HE): the presence of mild inflammatory infiltrate (100x).

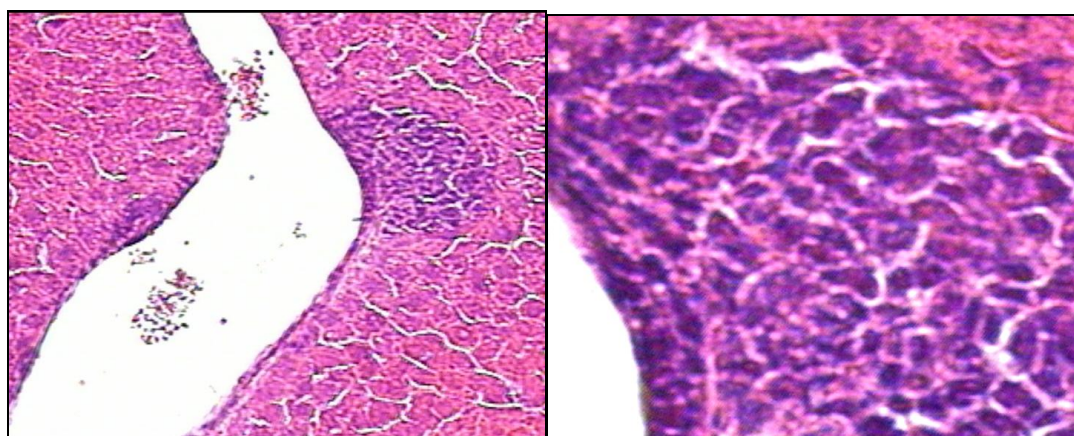


Figure 2: Histological sections of liver (HE): inflammatory infiltration (100x and 400x).

3.5 Biodistribution

Figure 3 shows a decrease in activity of technetium uptake in the right kidney of 44.66% compared % control in the test group T₁ (50 mg / kg) and in T₂ (100mg/kg) showed a reduction of 45, 96%. Since the left kidney was reduced by 26,76% uptake in T₁ and 30.75% in T₂. Regarding the uptake in liver tissue, we observed an increase of 35,63% in T₂ (100 mg / kg).

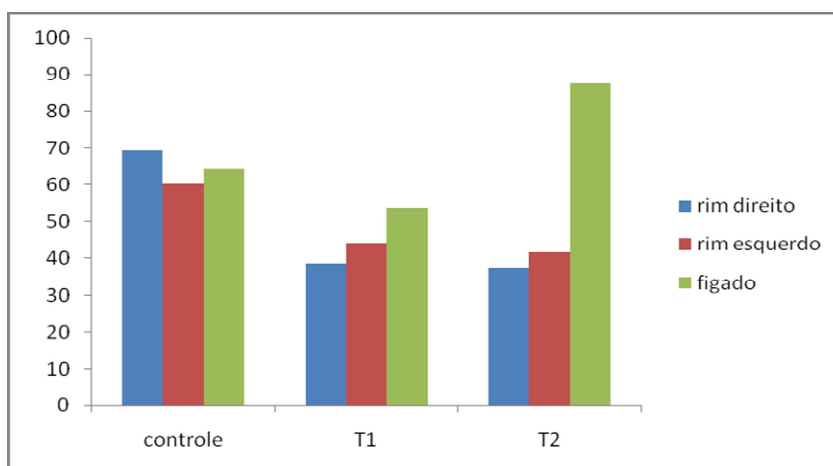


Figure 3: Biodistribution of kidneys and liver tissues.

3.6 Assessment of anti-inflammatory activity: the carrageenan-induced edema model

According to Table 3, the EACS administered via ip caused a decrease in paw edema, at all concentrations, after application of stimulus, and this effect is dose-dependent. Ibuprofen, used as standard drug, induced a significant effect after administration of carrageenan.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Edema (g)	Inibição (%)
Controle		110,94±6,80	
EACS	50	82,6± 9,51	25,54
EACS	100	63,83± 8,67	42,46
EACS	250	60,77± 2,80	46,15
Ibuprofeno	250	72,66± 4,27	34,5

Tabela 3: results of the carrageenan-induced edema assay

4.0 Discussion

Regarding anti-inflammatory activity, flavonoids act by modulating cell involved in inflammation (eg, inhibiting the proliferation of T lymphocytes), inhibiting the production of proinflammatory cytokines (eg TNF- α and IL-1), modulating the activity of enzymes of the pathway of arachidonic acid, such as phospholipase A2, cyclo-oxygenase and lipo-oxygenase, and modulate the enzyme forming nitric oxide, nitric oxide synthase (iNOS) (López-Posadas et AL., 2008; Kim et al., 2004; Middleton, Kandaswami, Theoharides, 2000; Havsteen, 2002; Cazarolli et al., 2008; Biesalski, 2007).

Quercetin and kaempferol - flavonols widely distributed in the plant kingdom - have significant anti-inflammatory action, which can be attributed to the inhibition of the enzymes phospholipase A2 (PLA2), 8 lipo-oxygenase, cyclo-oxygenase and inhibition of nitric oxide production by iNOS.35 modulation of the enzyme (Yoon, Baek, 2005; Santangelo, 2007).

A medicinal plant or its extract, like any medicine, should go through a validation process that includes proof of pharmacological activity and possible toxicity in humans (Lapa et al., 2008). Such studies provide an assessment of the safety and efficacy of medicinal preparations of herbal and involve several steps, among which stand out pre-clinical biological assays (Lapa et al., 2008).

The results obtained from this study indicate that the EACS caused no mortality of animals until 48 h after administration at the doses tested. The lack of lethality may be related to the pharmacokinetic mechanism of absorption in the intestinal tract such as pH, intestinal motility, absorption surface, blood supply (Klaassen and Watkins, 2001) and / or by biotransformation, which may decrease the serum levels necessary to cause the lethal effect (Silva, 2006).

Knowing the large number of reports of the use of the plant to diseases of the kidneys was carried out microscopic analysis of both kidneys and liver, an important body of human metabolism. The presence of the mild inflammatory infiltrate in the kidney is not enough to know if there will be some loss of function in the body, requiring a larger study and for a period of time to obtain further conclusions.

Despite being among the major lymphocyte cell infiltrate found in various human glomerulopathies and of experiments (Riyuzo and Sores, 2002), renal inflammatory infiltrates are not necessarily associated with renal failure or other disfunction (Matos et al, 2008).

Liver lesions that affect only large area of hepatic parenchyma may produce signs of failure, since focal lesions rarely commit sufficient quantities of liver tissue beyond the functional reserves of the body (Matos et al, 2008).

Several authors have demonstrated that the biodistribution of radiopharmaceuticals may be altered by natural and/or synthetic drugs, diets and surgery(Bernardo-Fiho et al, 2005; Holanda et al, 2006; Xavier-Holanda et al, 2002; Santos-Filho, Bernardo-Filho, 2005; Araújo et al, 2007; Amorim et al, 2003; Diré et al, 2001; Lima et al, 2002; Moreno et al, 2002; Moreno et al, 2004; Santos-Filho et al, 2004; Hesslewood and Leung, 1994).

The distribution, fixation and disposal of radiopharmaceuticals in an organism depend on various factors such as blood flow, tissue metabolism and binding to blood elements (Hesslewood and Leung, 1994; Sampson, 1996; Hladik and Saha, 1987; Oliveira et al., 2000; Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 2003). It is possible that substances in the extract, as well as its metabolites, would interact with the sodium pertechnetate or with structures in organ/tissues where these substance/metabolites had high uptake (Diniz et al, 2008).

In this study, the results suggest two hypotheses, that the reduction of technetium uptake by the kidney, especially the right, whether resulting from binding with the extract technetium, thus preventing its uptake. Or occurs a change in renal activity, due to presence of the extract, which resulted in a lower uptake. The findings in the liver tissue may indicate that the extract at a concentration of 100 mg/kg interferes with metabolic activity and causes increased uptake of technetium in the liver.

It is well known that carrageenan induced inflammatory reaction has two phases: early and late phases. The early phase lasts for 60 min and is associated with release of autacoids such as histamine, serotonin and bradykinin (VINGeR *et al.*,1987). The late phase occurs within 60 min after injection and lasts for three hours. This phase depends on the release of prostaglandine (DI ROSA *et al.*, 1971) and also is associated with neutrophil-originated free radicals, such as hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals (Süleyman et al., 2004, Silva et al, 2005). The duration of the phases differs among authors, which can last from

30min-2h (Ara et al, 2010), or from 0-3h (Braggio et al, 2002) in the first step. Other authors also divided the response to carrageenan in three, where the liberation of bradykinin corresponds to the second.

The EACS showed a dose-dependent inhibition, this indicates that it could inhibit different aspects which would be involved in various chemical mediators of inflammation (histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins).

5.0 Conclusions

The results obtained in this study suggest that aqueous extract of *Costus spicatus* administered by gavage has low toxicity. The results of biodistribution show decrease of ^{99m}Tc uptake in kidneys and increase in liver. The aqueous extract shows activity antiedematogenic in models of paw edema; however other studies must be carried out to elucidate the mechanisms involved in these activities. This suggests the use of the plant to treat inflammatory conditions.

6.0 Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq for financial support.

7.0 References

- Amorim LF, Xavier-Holanda CMC, Catanho MTA, Terra DA, Brandão KC, Jales-Jr LH, Britto LML, Gomes ML, Melo VG, Bernardo-Filho M, Jales RLC. 2003 Assessment of the effect of *Punica granatum* (pomegranata) on the bioavailability of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate (^{99m}Tc) in *Wistar* rats. *Cell and Molecular Biology Online*.49:501–7.
- Araújo-Filho I, Rego ACM, Brandão-Neto J, Villarim-Neto A, Egito EST, Azevedo IM, Medeiros A C. Biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate after biliopancreatic bypass with a duodenal switch. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007;50:189-97.
- Áraujo, F. P., Oliveira, P. E. 2007. Floral biology of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) and mechanisms to avoid self-pollination. *Revista Brasileira de Botânica*. 30(1).
- Ara, A., Arifuzzaman, M., Ghosh, C. K., Hashem, A., Ahmad, M. U., Bachar, S. C., Nahar, L., Sarker, S. D, 2010. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20(6): 929-932.

Bernardo-Filho M, Santos-Filho SD, Moura EG, Maiworm AI, Orlando MMC, Penas ME, Cardoso VN, Bernardo LC, Brito LC. 2005 Drug interaction with radiopharmaceuticals: a review. Brazilian Archives of *Biology and Technology*. 48:13-27.

Biesalski, H. K, 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 10, 724.

Boscolo, O. H., Valle, L. S. 2008. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. IHERINGIA, Sér. Bot. 63(2), 263-277.

Braggio, M. M., Lima, M. E. L., Veasey, E. A., Haraguchi, M., 2002. Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (cav.) pers. Arquivos do Instituto Biológico. 69(4), 49-53.

Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S. R. B, 2008. Flavonoids: prospective drug candidates. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 8, 1429.

Diré G, Lima E, Mattos D, Oliveira MB, Pereira MJ, Moreno S, Freitas R, Gomes ML, Bernardo-Filho M. 2001 Effect of chayotte (*Sechium edule*) extract on the biodistribution of technetium-99m and on the morphometry of red blood cells. Journal of *Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 44:648-50.

Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A, 1971. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. Journal of Pharmacology . 104, 15-29.

Diniz, C. L., Carmo, F. S., Almeida, D. S., Santos-Filho, S. D., Missailidis, S. Fonseca, A. S., and Filho, M. B. 2008 Effect of an Extract of *Centella asiatica* on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate (Na^{99m}TcO₄) and on the Fixation of Radioactivity on Blood Constituents. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.51 n. special: 215-219.

Gallote, D. C., Ribeiro, L. F. 2005. Ethnobotanic account of plants from the medicinal garden of Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES 3(1): 19–24.

Havsteen, B. H, 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics. 96, 67.

Hesslewood S, Leung E. 1994 Drug interaction with radiopharmaceuticals. [European Journal of Nuclear Medicine](#). 21:348-56.

Hladik III WB, Saha GB, 1987 Study KT. Essentials of Nuclear Medicine Science. Baltimore-London; Williams & Wilkins.

Holanda CMCX, Leite RCH, Nunes RAS, Oliveira HA, Catanho MTJA, Souza GML, Bernardo-Filho M. 2006 Effect of antimalarial drugs on the bioavailability of the methylenediphosphonic acid labeled with technetium^{99m} (^{99m}Tc-MDP) in *Wistar* rats. Brazilian Archives of *Biology and Technology*. 49:207-14.

Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S, 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. Journal of Pharmacological Sciences. 96, 229.

Klaassen, C. D., Watkins III, J. B. 2001. Absorção, distribuição e excreção dos tóxicos. In.: Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull. 5ª Ed. Lisboa:McGraw-Hill, 79-100.

Lapa, A.J., 2008. Plantas medicinais: métodos de avaliação da atividade farmacológica. Campinas: UNIFESP/EPM.

Leão, R. B. A., Ferreira, M. R. C., Jardim, M. A. G. 2007. Study of therapeutical use plants in municipality of Santa Bárbara do Pará, State of Pará, Brazil. Revista Brasileira de Farmacologia, 88(1): 21-25.

Levy, L., 1969. Carragenan paw edema in the mouse. Life Science. 8, 601-605.

Lima EA, Dire G, Mattos DM, Freitas RS, Gomes ML, Oliveira MB, Faria MV, Jales RL, Bernardo-Filho M. 2002 Effect of an extract of cauliflower (leaf) on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the survival of *Escherichia coli* AB1157 submitted to the treatment with stannous chloride. Food Chemical and Toxicology. 40: 9149-53.

López-Posadas, R., Ballester, I., Abadía-Molina, A. C., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., de Medina, F. S., 2008. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. Biochemical Pharmacology. 76 (4): 495-506.

Matos, M. O. C., Miguel, M. P., Moura, V. M. B. D., Sobestiansky, J., Brito, L. A. B. 2008. Avaliação histológica de fígado, rim, tireóide, paratireóide e osso de suínos em terminação submetidos a diferentes dietas. Ciência Animal Brasileira, 9(4), 1128-1137

Medeiros, M. F. T.; Valle, L. S.; Andreato, R. H. P. 2005. Flora Medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Taxonomia e Aspectos Botânicos. Publ. Avul. Mus. Nac., Rio de Janeiro, 106, 3-24.

Menezes, I. A. C., Carvalho A. A., Antonioli A. R., Santos M. R.V. 2007. Cardiovascular effects and acute toxicity of *Costus spicatus*. Biologia Geral e Experimental. 7(1):9-13.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews. 52, 673.

Moreno SRF, Diré G, Freitas RS, Farah MB, Lima-Filho GL, Rocha EK, Jales RLC Bernardo-Filho M. 2002 Effect of *Ginkgo biloba* on the labeling of blood elements with technetium-99m: *in vitro* study. Revista Brasileira de Farmacognosia. 12:62-3.

Moreno S, Rocha EK, Pereira M, Mandarim-Lacerda C, Freitas RS, Nascimento ALR, Carvalho JJ, Lima-Filho GL, Diré G, Lima EAC, Bernardo-Filho M. Ginkgo Biloba: 2004 Experimental model to evaluate it's action on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the morphometry of red blood cells. Pakistan Journal of Nutrition. 3:68-71.

Oliveira JF, Braga ACS, Ávila ASR, Araújo AC, Cardoso VN, Bezerra RJAC, Bernardo-Filho M. 2000 Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the

labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. Journal of Ethnopharmacology. 72:179-84.

Oliveira JF, Avila AS, Braga ACS, Oliveira MBN, Boasquevisque EM, Jales RL, Cardoso VN, Bernardo-Filho M. 2002 Effect of extract of medicinal plants on the labeling of blood elements with technetium- 99m and on the morphology of red blood cells: I – a study with *Paullinia cupana*. Fitoterapia. 73:305-12.

Oliveira JF, Santos-Filho SD, Catanho MTJ, Srivastava SC, Lima- Filho GL Bernardo-Filho M. 2003 Effect of extract of medicinal plant on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the morphology of red blood cells (RBC): Toxicological action of roast coffee beans (*Coffea arabica*). Indian Journal of Nuclear Medicine. 18:52-6.

Quintans Júnior, L. J., Santana, M T. M., Sousa M. S., Santos D. P., Siqueira I. S., Lima R. S., Silveira T. C., Antonioli G. O., Ribeiro A. R., Santos L. A. A., Santos M. R. V. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. Pharmaceutical Biology (Formerly International journal of pharmacognosy). 48(10), 1097-1102.

Riyuzo, M. c., Soares, V. 2002. Role of inflammatory infiltrate in tubulointerstitial fibrosis and on the outcome of glomerulopathies. Jornal Brasileiro de Nefrologia, 24(1):40-7.

Sampson CB. 1996 Complications and difficulties in radiolabelling blood cells: a review. Nuclear Medicine Communications. 17:648-58.

Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R. 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. 43, 394.

Santos-Filho SD, Bernardo-Filho M. 2005 Efeito de um extrato de Hipérico (*Hypericum perforatum*) na marcação *in vitro* de elementos sanguíneos com tecnécio-99m e na biodisponibilidade do radiofármaco pertecnetato de sódio em ratos Wistar. Acta Cirurgica Brasileira. 20(Supl 1):76-80.

Santos-Filho SD, Diré GL, Lima E, Oliveira MN, Bernardo- Filho M. 2004 Effect of *Mentha crispa* (mint) extract on the labeling of blood elements with technetium-99m: A possible evaluation of free radicals. Journal of Biological Science. 4: 266-70.

Silva, M. G., Oliveira, F. S., Quintans-Júnior, L. J., Medeiros, M. F. T., Valle, L. S., Andreato, R. H. P. 2005. Flora Medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Taxonomia e Aspectos Botânicos. Publicação Avulsa do Museu Nacional. 106, 3-24.

Silva, E. C. B. Avaliação biológica da *Caesalpinia echinata* Lam., Fabaceae- Caesalpinoideae. Usos e riscos. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Silva, B. P., Parente, J. P. 2003. Bioactive polysacharides from *Costus spicatus*. Carbohydrate Polymers 51, 239-242.

Silva, B.P., R.R., Bernardo E J.P. Parente, 1999a. A new steroidal saponin from the rhizomes of *Costus spicatus*. *Planta Medica* 65(3):285-287.

Silva, B.P., R.R. Bernardo E J.P. Parente, 1999b. A furostanol glycoside from the rhizomes of *Costus spicatus*. *Phytochemistry* 51(7):931-935.

Silva, B.P., Bernardo, R.R., Parente, J.P. 2000. Flavonol glycosides from *Costus Spicatus*. *Phytochemistry*. 53, 87-92.

Souza, A. M. S., Lara, L. S., Previatoa, J. O., Lopesa, A. G., Nevesa, C. C., Silva, B. P., Parente J. P. 2004. Modulation of Sodium Pumps by Steroidal Saponins. *Z. Naturforsch.* 59c, 432-436.

Souza, G.M.L. 2001:Estudo dos Efeitos Biológicos do *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) “*in vivo*” e “*in vitro*”. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPE.

Srivastava, R.M., Morais, L.P.F., Catanho, M.T.J.A., Souza, G.M.L., Seabra, G.M., Simas, A.M., Rodrigues, M.A.L.2000. Synthesis and antiinflammatory activity pf 3-aryl-5-isopropyl-1,2,4-oxadiazoles. *Heterocyclic Communications*. 6, 1, 41-48.

Süleyman H, Demircan B, Karagoz Y, Ozatasan N, Süleyman B. 2004. Anti-infl ammatory effects of selective cox-2 inhibitors. *Polish Journal of Pharmacology & Pharmacy*. 56: 775-780.

Taufner, C. F., Ferração, E. B., Ribeiro, L. F. 2006. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia. *Natureza on line* 4(1): 30-39.

Vinger, R., Truax, J. F., Selph, J. L., Johnston, P. R., Venable, A. L., Mckenzie,R.K. 1987. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the limb of rat. *Fed.Proc.* 46, 118- 126.

Xavier-Holanda CMC, Jales RLC, Catanho MTJA, Leite RCH, Brito LML, Jales-Jr LH, Brandão KC, Amorim LF, Brito GGB, Gomes ML, Bernardo-Filho M. 2002 Effects of the glucantime on the kinetic of biodistribution of radiopharmaceuticals in *Wistar* rats. *Cell and Molecular Biology Online*.48:761-5.

Wagner, H., Bladt, S. 1996. *Plant drugs analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlim: Ed. Springer verlag.

Williams, C. A., J.B. Harborne, 1977. The leaf flavonoids of the zingiberales. *Biochemical Systematics and Ecology* 5:221-229.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW 1962. Carrageenaninduced edema in hind paw of rat as an assay for anti-infl ammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 11: 544-547.

Yoon, J. H., Baek, S. J. 2005. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal*. 46, 585.

ARTIGO 2

A ser submetido à revista Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (ECAM)

Antimicrobial and antioxidant activity of *Costus spicatus* aqueous extract

BARRETO, T.L.P.¹; SILVA, T.R.P.M.¹; SILVA, N.M.B.¹; SILVA, L.C.M.²; ARAÚJO, J.M.³; MAGNATA, S.S.L.P.¹; CATANHO, M.T.J.¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Laboratório de Biofísica Celular e Molecular, PE, BR

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, PE, BR

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, PE, BR

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses: thiagodlpb@hotmail.com

Abstract

This study aimed to assess the antioxidant and antimicrobial potential of the aqueous extract of *Costus spicatus* (AECS), a medicinal plant popularly known as "cana de macaco" or "cana do brejo". The crude aqueous extract was tested for antioxidant activity using three tests: Total antioxidant capacity assay by Phosphomolybdenum, Reducing power assay and Hydrogen peroxide radical scavenging assay, and for antimicrobial activity by disc diffusion method and the Determination of the Minimum inhibitory concentration.

1.0 Introduction

Costus spicatus (Jacq.), is a native species found in wet coastal forests from southern Mexico, Yucatan and Costa Rica to northern Colombia and Brazil. Popularly known as 'cana do brejo' or 'cana-de-macaco', this plant is used in folk medicine in kidney stones, nephritis, kidney disorders, urolithiasis and kidney diseases in general [1, 2, 3, 4, 5, 6]; as a diuretic [2, 5], for the control of diabetes [1, 6], bladder inflammation [1, 5], for anemia, fever, pain in the liver (Boscolo, 2008); for gonorrhea, syphilis, colic, dysentery and also as a laxative [1].

Phytochemical analysis of *C. spicatus* rhizomes and leaves showed the presence of flavonoids [7], flavonol glycosides [8], saponins and sapogenins [9, 10].

Flavonoids exhibited anti-inflammatory properties and also showed inhibitory activity of nitric oxide production by activated macrophages [8]. Recently, saponins isolated from the rhizome of the plant showed a slight haemolytic effect [11].

Polysaccharides inhibited capillary permeability and stimulating activities demonstrated phagocytosis [11]. The methanol extract showed antinociceptive activity and anti-inflammatory effect in rodents [12].

The extract in non-anaesthetized normotensive rats, induced hypotension associated with tachycardia. In intact rings or without endothelium of superior mesenteric artery of rats, caused relaxation of phenylephrine-induced tone. It also demonstrated low acute toxicity in mice [13]. A study of the rhizome of *Costus spicatus* on the modulation of sodium pump by steroids saponins found that they specifically inhibit the activity of Na⁺-ATPase [14].

In this work, was made the assess of antioxidant and antimicrobial potential of aqueous crude extract from leaves of *Costus spicatus* (Jacq.).

2.0 Material and Methods

2.1 Plant material

The leaves of *C. spicatus* (Jacq), were collected at Recife, Pernambuco, and identified by Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira. A voucher specimen (No. 84592) is deposited at the herbarium of the Instituto Agronomico de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

2.2 Extration

The harvested fresh leaves were dried at 45 °C for three days, and after drying, they were crushed in a mechanical mill machine, getting 75g. The aqueous extract was obtained from dried leaves (50g of powder) by an infusion with water (500 ml / 100 °C/30 minutes) followed by filtration. The filtrate was lyophilized (aqueous extract) and stored at 18°C.

2.3 Determination of total phenol content

The total phenol content of the extract was estimated by Folin-Ciocalteu procedure [15]. Following this method, aliquots (0,1 ml) of fractions were diluted to 1 ml with distilled water. To this solution 0,5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (1:1) and 1,5 ml of 20% sodium carbonate solution was added. The mixture was incubated for 2h at room temperature. The volume was raised to 10 ml with distilled water and the absorbance of blue colored mixture was measured at 765 nm.

The amount of total phenol was calculated as mg/g Gallic Acid Equivalent (GAE) from calibration curve of gallic acid standard solution. For the gallic acid, the curve absorbance versus concentration is described by equation: $y = 1,5221x + 0,0081$ ($r^2 = 0,9712$).

2.4 Total antioxidant capacity by Phosphomolybdenum assay (P–Mo)

The total antioxidant capacity (TAC) was evaluated by the method of Pietro et al. [16]. Aliquot of 0.1 mL of sample solution was combined with 1 mL of reagent solution (600 mM sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were capped and incubated in a boiling water bath at 95°C for 90 min. After the samples had cooled to room temperature, the absorbance was measured at 695 nm. against a blank (1 mL of reagent and 0.1 mL of the solvent). Total antioxidant activity was expressed in relation of ascorbic acid and calculated by following formula:

$$\% \text{ TAC} = (A_s - A_c) \times 100 / (A_{aa} - A_c)$$

Where A_c was the absorbance of the control (blank, without extract), A_s was the absorbance in the presence of the extract and A_{aa} was absorbance of ascorbic acid.

2.5 Antimicrobial assay

2.5.1 Microorganisms

The strains of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris* were provided by Departamento de Antiobióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). All bacteria were maintained in Nutrient Agar (NA) and stored at 4 °C.

2.7 Determination of antibacterial activity using the disc diffusion method

The paper disc diffusion method was used to determinate antibacterial activity [17]. Bacterial strains grown on Mueller-Hinton Agar (MHA) at 37 C for 18h were suspended and adjusted to a turbidity of 0,5 McFarland standard scale (approximately $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). The MHA was poured into petri dishes and inoculated with 100 µl of the suspension in sterile paper discs (diameter 6 mm) punched in the agar. Erythromycin was used as positive controls, and the discs treated with DMSO were used as the negative control. The plates were cultured at 37 C for 18 h. the inhibition zone diameter around each of the discs was measured and recorded at the end of the incubation period.

2.8 Determination of the Minimum inhibitory concentration by dilution test in microplate.

In all wells were placed 100 μ L of Mueller Hinton Broth. After, 50 μ L of the extracts (diluted in sterile distilled water at a concentration of 100 mg/mL) were added in column 3. From this column was performed serial dilution until column 11. Were then added 10 μ L of bacterial suspension (turbidity with respect to the standard 0.5 MacFarland scale) in columns 2-12. Thus the first column is the control of sterility of the culture medium, the second column of the control solvent (water) and column 12 the positive control. The microplates were incubated for 24 hours at 37 °C. The growth inhibition was observed by adding 15 μ L of an aqueous solution of 0.01% resazurin incubation at 37 °C for 4 hours, and was determined as minimum inhibitory concentration to lowest concentration that inhibited bacterial growth. The tests were performed in duplicate.

2.9 Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences between the control and treated groups were tested for significance using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's t-test. P values < 0.05 were considered to be significant.

3.0 Results and Discussion

3.1 Extration

The process of freeze drying resulted in 9g of crude aqueous extract, with a yield of 18%.

3.2 Total phenol content

Phenolic compound contribute to the overall antioxidant activities of plants. These compounds were dosed by assay using Folin-Ciocalteu reagent that reduce yellow hetero polyphosphomolybdate tungstate anions producing blue color, intensity of blue colored complex has relation with the presence of hydrogen donating groups in the phenolic compounds [18]. *Costus spicatus* aqueous extract exhibited the phenol content 60,47 mg/g GAE.

3.3 Total antioxidant capacity by Phosphomolybdenum assay (P–Mo)

The total antioxidant activity was measured by phosphomolybdenum method which is based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the antioxidant compound and the formation of a green phosphate/Mo(V) complex will be formed in the condition of acid pH and could be monitored at 696 nm with a spectrophotometer [16]. Increase of the absorbance indicated the increase of the total antioxidant capacity. The results showed an activity of $34.56 \pm 3.81\%$ compared to the activity of ascorbic acid.

3.4 Antibacterial activity

No activity was observed against different strains by disk diffusion method, but the MIC values ranged from 0.195 to 6.25 mg/ml (Table 1). The result of antibacterial may be caused by limited diffusion of the extracts through agar. This might be due to the use of distilled water as solvent Distilled water might alter pH of agar which limited diffusion of the extracts through agar [19]. Therefore, pH of distilled water must be measured prior to its use to evidently identify the mentioned effect.

It is quite possible that some of the plants that were ineffective in this study do not possess antibiotic properties, or the plant extracts may have contained antibacterial

constituents, just not in sufficient concentrations so as to be effective. It is also possible that the active chemical constituents were not soluble in water. The drying process may have caused conformational changes to occur in some of the chemical constituents found in these plants [20].

<i>Bacteria</i>	MIC (mg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>	1.56
<i>Escherichia coli</i>	3.13
<i>Klebsiella pneumonia</i>	3.13
<i>Micrococcus luteus</i>	0.195
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.56
<i>Proteus vulgaris</i>	3.13

Table 1: Antimicrobial activity of plant extract expressed as minimum inhibitory concentration.

4.0 Conclusions

We conclude that the AECS has antioxidants and antimicrobial properties, necessitating further studies in order to extract or isolate the substance that may be responsible for this activity.

5.0 Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq for financial support.

6.0 References

- 1- GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. 2005. Ethnobotanic account of plants from the medicinal garden of Escola Superior São Fransisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES 3(1): 19–24.
- 2- TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. 2006. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia. *Natureza on line* 4(1): 30-39.
- 3- LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. 2007. Study of therapeutical use plants in municipality of Santa Bárbara do Pará, State of Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 88(1): 21-25.
- 4- MEDEIROS, M. F. T.; VALLE, L. S.; ANDREATA, R. H. P. 2005. Flora Medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba,

- Rio de Janeiro, Brasil. Taxonomia e Aspectos Botânicos. Publ. Avul. Mus. Nac., Rio de Janeiro, n.106, p.3-24.
- 5- BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. 2008. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277.
 - 6- ÁRAUJO, F. P., OLIVEIRA, P. E. 2007. Floral biology of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) and mechanisms to avoid self-pollination. Rev. bras. Bot.vol.30, no.1.
 - 7- WILLIAMS, C. A., J.B. HARBORNE, 1977. The leaf flavonoids of the zingiberales. Biochemical Systematics and Ecology 5:221-229.
 - 8- SILVA, B.P.; BERNARDO, R.R.; PARENTE, J.P. Flavonol glycosides from *Costus Spicatus*. Phytochemistry, Oxford, v. 53, p. 87-92, 2000.
 - 9- SILVA, B.P., R.R., BERNARDO E J.P. PARENTE, 1999a. A new steroidal saponin from the rhizomes of *Costus spicatus*. Planta Medica 65(3):285-287.
 - 10- SILVA, B.P., R.R. BERNARDO E J.P. PARENTE, 1999b. A furostanol glycoside from the rhizomes of *Costus spicatus*. Phytochemistry 51(7):931-935.
 - 11- SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. 2003. Bioactive polysacharides from *Costus spicatus*. Carbohydrate Polymers 51, 239-242.
 - 12- QUINTANS JÚNIOR, L. J., SANTANA, M T. M., SOUSA M. S., SANTOS D. P., SIQUEIRA I. S., LIMA R. S., SILVEIRA T. C., ANTONIOLLI G. O., RIBEIRO A. R., SANTOS L. A. A., SANTOS M. R. V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. Pharmaceutical Biology (Formerly International journal of pharmacognosy: , Volume 48, Number 10, October 2010 , pp. 1097-1102(6)
 - 13- MENEZES, I. A. C., CARVALHO A. A., ANTONIOLLI A. R., SANTOS M. R.V. Cardiovascular effects and acute toxicity of *Costus spicatus*. Biol. Geral Exper., São Cristóvão, SE 7(1):9-13, 2007.
 - 14- SOUZA, A. M. S.; LARA, L. S.; PREVIATO, J. O.; LOPESA, A. G.; NEVES, C. C.; SILVA, B. P.; PARENTE J. P. 2004. Modulation of Sodium Pumps by Steroidal Saponins. Z. Naturforsch. 59c, 432-436.
 - 15- YU, L., HALEY, S., PERRET, J., HARRIS, M., WILSON, J., QIAN, M., 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal of Agricultural and food Chemistry. 50, 1619-1624.
 - 16- PIETRO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M., 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry. 269, 337-341.

- 17-BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M., 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45, 493-6.
- 18-KAUR, R.; ARORA, S.; SINGH, B. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. Bioresource Technology. v. 99, p. 7692–7698, 2008.
- 19-ONGSAKUL, M.; JINDARAT, A.; ROJANAWORARIT, C. Antibacterial effect of crude alcoholic and aqueous extracts of six medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J Health Res 2009, 23(3):153-156
- 20-PAREKH, J.; CHANDA, S. V. In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. Turk J Biol 31 (2007) 53-58.

4 CONCLUSÕES

- A análise fitoquímica do extrato aquoso da *Costus spicatus* mostrou a presença dos compostos fenólicos: flavonóides (percertina e campferol) e derivados cinâmicos;
- Não foi possível obter a DL50 do EACS, o que sugere a falta de toxicidade por via oral, porém foi detectada a presença de infiltrado inflamatório nos rins e fígado;
- O EBACS diminuiu a captação do tecnécio nos rins e aumentou no fígado;
- O EBACS possui um significativo potencial antiinflamatório;
- O EBACS possui atividade antioxidante;
- O EBACS possui um potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

AGOURIDAKIS, P. The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. *Respiratory Research*, v. 3, p. 25, 2002.

ALONSO-CASTRO, A. J.; VILLARREAL, M. L.; SALAZAR-OLIVO, L. A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 945–972, 2011.

ALVES, N.D.D.C.; SANTOS, T.C.D.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO H.C.; LIRA, L.M; DORNELAS, C.B.; CABRAL, L.M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinas do Estado do Rio de Janeiro. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, p. 745-753. 2008.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*. v. 8, n. 4, p. 260-271, 2010.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. B.; VITOR KERBER, A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17(2), p. 231-235, 2007.

ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P.; TAKASE, I. Extração sequencial de cobre, Ferro e Zinco em ervas medicinais. *Ciência, Tecnologia e Alimentação*, Campinas, v. 25(4), p. 844-848, 2005.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 325–348, 2005.

ANTUNES R. M. P.; LIMA E. O.; PEREIRA M. S. V.; CAMARA C. A.; ARRUDA T. A.; CATÃO R. M. R.; BARBOSA T. P.; NUNES X. P.; DIAS C. S.; SILVA, T. M. S. - Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 517-524, 2006.

APG II. New update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society, London, v. 141, p. 399-436, 2003

ÁRAUJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Floral biology of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) and mechanisms to avoid self-pollination. Revista Brasileira de Botânica, v. 30, no.1, 2005.

BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.S.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como indicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n. 3, p. 444-447. 2007.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. V. 41, n.1, p. 27-51, 2005.

BERNARDO-FILHO M.; SANTOS-FILHO S. D.; MOURA E. G.; MAIWORM A. I.; ORLANDO M. M. C.; PENNAS M. E.; CARDOSO V. N.; BERNARDO L. C.; BRITO L. C. Drug Interaction with Radiopharmaceuticals: a Review. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 13-27, 2005.

BLACK, J. G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 13, p. 316-347. Título do original: Microbiology.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.

BOUZADA, M. L. M.; FABRIA, R. L.; DUARTEB, G. G.; SCIOA, E.. Busca de novas drogas antimicrobianas a partir de vegetais. Revista Online-Principia, Caminhos da Iniciação Científica, Minas Gerais, v. 11, 2007.

BRASIL. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. MS. Brasília: Ministério da Saúde 2006.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. Journal of Ethnopharmacology, Ireland, v.39, n.1, p.53-67, 1993.

BRITO, V. F. S.; DANTAS, I. C.; DANTAS, G. D. S. Plantas Medicinais utilizadas pela comissão de mulheres na zona rural no município de Lagoa Seca-PB. Revista de Biologia e Farmácia, v. 03, n. 01, 2009.

BRITO D. M. M.; GOMES M. L.; RODRIGUES P. C.; PAULA E. F.; GUTFILEN B.; BERNARDO-FILHO M. Effect of a chemotherapeutic drug on the biodistribution of 99mTc-DTPA in Balb/c mice. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, v. 17, p. 313-6, 1998.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Naturally Contained in By-products of the Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.). Ciência Tecnologia e Alimentação, Campinas, v. 27(4), p. 902-908, 2007.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, v.94, n.3, 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor Kb (NF-Kb). Planta Medica, v. 69, p. 1-12, 2003.

CALIXTO, J. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. Journal of Ethnopharmacology, v. 100, n. 1-2, p. 131-134.2005.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 33, pp. 179-189; 2000.

CAMARGO, M. T. L.A. Medicina Popular: aspectos metodológicos para pesquisa, garrafada, objeto de pesquisa, componentes medicinais de origem vegetal, animal e mineral. São Paulo: Almed, 1985. 130p.

CASTRO, C.E.F. Inter-relações das famílias das Zingiberales. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, Campinas, v. 1, p. 2-1, 1995.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A. A dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. v. 3, n. 2, p.19 – 21, 2001.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T.A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. – Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre cepas de isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Análises Clínicas, vol.38(2): 111-114, 2006.

CECCON, M.E.J.R.; VAZ, F.A.C. Os mediadores inflamatórios no diagnostico de sepse no recém-nascido. Pediatria, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 110-119, 2004.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI Química Nova, São Paulo, v.23, n. 5, p.680-685, 2000.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Etnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v. 90, p.135-143, 2004.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science, Washington, v. 257, n. 11, p. 1050-1055, 1992.

CORREIA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.1, 1984.

COTRAN, R. S; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*, v. 17 (2), pp. 153-163. 1999.

CRILEY, R.A. Techniques of cultivation in the ornamental Zingiberaceae. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 1, p. 22-32, 1995.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PPAR. *Pharmacological Research*, v. 52, . 72-82, 2005.

DEMPSEY PW; VAIDYA SA; CHENG G. The art of war: innate and adaptative immune responses. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 60, p. 2604-21, 2003.

DEOUX, S.; DEOUX, P. Ecologia é a Saúde: o impacto da deterioração do impacto na saúde. Lisboa: Instituto Piaget, 1998.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 229f, 1996.

DI STASI, L. C. Medicinal plants populary used in Brazilin Amazon. *Fitoterapia*, v.65, n.6, p. 529-540, 1994.

DUVALL W. L.; CROFT L. B.; CORRIEL J. S.; EINSTEIN A. J.; FISHER J. E.; HAYNES P. S.; ROSE R. K.; HENZLOVA M. J. SPECT myocardial perfusion imaging in morbidly obese patients: image quality, hemodynamic response to pharmacologic stress, and diagnostic and prognostic value. *Journal of Nuclear Cardiology*, v. 13, p. 202-209, 2006.

EARLY, P. J.; SODEE, D. B. Principles and Practice of Nuclear Medicine. 2th. New York, 1995.

FARNSWORTH, N. R.; BINGEL, A. S. New natural products and plant drug with pharmacological, biological or therapeutical activity. New York: Springer, p.61 – 73, 1997.

FENNEL, C.W.; LIGHT, M.E.; SPARGS, S.G.; STAFFORS, G.I; VAN STANDEN, J. Assessing Africal medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. Journal of Ethnopharmacology, v. 95, n. 2-3, p. 113-121, 2004.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RARES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 42, n. 3, 2006.

GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. Ethnobotanic account of plants from the medicinal garden of Escola Superior São Fransisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES, v. 3, n. 1, p. 19–24, 2005.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GOMES, L.J. & GOMES, M.A.O. Extrativismo e Biodiversidade: o caso da fava d'anta. Ciência Hoje, n. 161, PP. 66-69; 2000.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005.

GROVER, J. K.; YADAV, S.P. Pharmacological actions and potencial uses of Mormodica charantia: a review. Journal of Ethnopharmacology, 93, pp. 123 – 132; 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 936 p, 2003.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for new drugs of plant origin. *Advances in Drug Research*, 20, pp. 167-169; 1991.

HLADIK W. B.; SAHA G. B. Study T. *Essentials of Nuclear Medicine Science*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1987.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. A importância das plantas medicinais: princípios ativos de plantas superiores. *Serie de textos da Escola de Verão em Química-IV* > São Carlos, SP, EdUFSCar, p. 152. 2003.

JAAKKOLA, K.; NIKULA, T. In vivo detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. *The American Journal of Pathology*, v. 157, p. 463-471, 2000.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed., Porto Alegre, RS, Artmed Editora, 632 p, 2009.

KAUR C; KAPOOR HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36: 703-725, 2001.

KNOLL, G. F. *Radiation detection and measurements*. John Wiley e Sons, Inc., USA, 1989.

KOWALSKY R. J.; PERRY J. R. *Current Practice in Nuclear Medicine*. Appleton e Lange. Los Altos, California, 1987.

LAPA, A.J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões, C.M.O. (org) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, pp. 181-196. 2000.

LAPA, A.J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simoes, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS. Cap. 11. 2004.

LASKAR, R. A.; SK, I.; ROY, N.; BEGUM, N. A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. Food Chemistry. v. 122, n. 1, p. 233–237, 2010.

LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. Study of therapeutical use plants in municipality of Santa Bárbara do Pará, State of Pará, Brazil. Revista Brasileira de Farmacologia, v.88(1), p. 21-25, 2007.

LEE J; KOO N; MIN DB. Rective oxyen species, aging and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food science and Food Safety, v. 3, p. 21-33, 2004.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v.27, p.479-490, 2004.

LEW, W.; PAI, M.; OXLADE, O.; MARTIN, D.; MENZIES, D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. Annals of internal medicine. v. 149, p. 123–134, 2008.

LIMA, C. B.; BELLETTINI, N. M.T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, J. K.; VIEIRA, M. A. V. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 600-602, 2007.

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

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512 p., 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 1072 p., 1999.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA J.R. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. Quimica Nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*. v.16, p.77-84, 2005.

MATOS, F. J. A. Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: EDUFC, 80p., 1999.

MEDEIROS, M. F. T.; VALLE, L. S.; ANDREATA, R. H. P. Flora Medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Taxonomia e Aspectos Botânicos. Publicação Avulsa do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, n.106, p.3-24, 2005.

MENEZES, I. A. C., CARVALHO A. A., ANTONIOLLI A. R., SANTOS M. R.V. Cardiovascular effects and acute toxicity of *Costus spicatus*. *Biologia Geral e Experimental, São Cristóvão, SE*, v. 7(1), p.9-13, 2007.

MEZADRI, T. et al. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and analysis*, v. 21, p. 282-290, 2008

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L. C.; DONANGELO, C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *Nutrition*. V. 137, n. 10, p. 2196-2201, 2007.

MORAIS, S. M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil, *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A.; *Microbiologia médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 604p., 2002.

NAKAI, T. *Notulae ad Plantas Asiae Orientalis (XVI)*. *Journal of Japanese Botany*, Tokyo, v. 17, p. 189-203, 1941.

NEIVA, T. J. C.; MORAIS, L.; POLACK, M.; SIMÕES, C. M. O.; D'AMICO, E. A. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytotherapy Research*. v. 13, p. 597-600, 1999.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geograficos, legais e éticos, Apud: Simões, O.M.C., Schekel, R.P., Gosmann, G., Mello, P.C.J., Mentz, A.L., Petkovic, P.R. *Farmacognosia da planta medicamento*. Editora da UFRGS. 1999.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S.; Evolution and spread of antibiotic resistance; *Journal of Internal Medicine*.; Stockholm; n.252; p. 91-106; 2002.

NORRBY, S. R.; NORD, C. E. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infectious Diseases*, v. 5, p. 115-119, 2005.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13(Supl. 2): p.5-8, 2003.

NUNES, A.P.M.; ARAÚJO, A.C. Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. X Semana de Iniciação Científica da UERJ, Anais. P.15. Rio de Janeiro. 2003.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. - Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16: p.510-516, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA FILHO, R. N. - Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17: p.186-190, 2007.

OLIVEIRA R.; SANTOS D.; FERREIRA D.; COELHO P.; VEIGA F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Brazil Journal of Pharmacology Science*, v. 42, p. 152-164, 2006.

OWUNWANNE A.; PATEL M.; SADEK S. The Handbook of Radiopharmaceuticals. Chapman and Hall Medical, Madras. 1995.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PERKINS A.; FRIER M. Nuclear Medicine Pharmaceutical Research. Taylor & Francis, London, 1999.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. Inflamações In: Patologia. 2nd., cap7, p112-148, 1998. ,STEVENS, A.; LOWE, J. Patologia 2ed. 1998.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. Phytochemistry, v. 56, p.237-243, 2001.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. C. M; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 20(4), p. 789-802, 2006.

PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. Fisiopatologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PRASAD, K. N.; HAO, J.; SHI, J.; LIU, T.; LI, J.; WEI, X.; QIU, S.; XUE, S.; JIANG, Y. Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. Innovative Food Science and Emerging Technologies. v. 10, p. 413–419, 2009.

PROPPER D. J.; DE BONO J.; SALEEM A.; ELLARD S.; FLANAGAN E.; PAUL J.; GENESAN T. S.; TAIBOT D. C.; ABOAGYE E. O.; PRICE P.; HARRIS A.; TWELVES C. Use of positron emission tomography in pharmacokinetic studies to investigate therapeutic advantage in a phase I study of 120-hour intravenous infusion XR5000. Journal of Clinical Oncology, v. 21, p. 203-210, 2003.

QUINTANS JÚNIOR, L. J., SANTANA, M T. M., SOUSA M. S., SANTOS D. P., SIQUEIRA I. S., LIMA R. S., SILVEIRA T. C., ANTONIOLLI G. O., RIBEIRO A. R., SANTOS L. A. A., SANTOS M. R. V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. *Pharmaceutical Biology (Formerly International journal of pharmacognosy)*, v. 48, n. 10, pp. 1097-1102(6), 2010

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 3 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997, 692p.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P. *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod; 1968.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17(4), p. 631-639, 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO1, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A.; PASTORE, G. M. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciência, Tecnologia e Alimentação*, v. 27(1), p. 53-60, 2007.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v.29, p.229- 245, 2009.

SAHA, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 4th ed. New York: Springer- Verlag, 1998.

SAMPSON C. B. Complications and difficulties in radiolabelling blood cells: a review. Nuclear Medicine Communications, v. 17, p. 648-658, 1996.

SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. 2007, 43, 394.

SANTOS MRA; LIMA MR; FERREIRA MGR. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. Horticultura Brasileira, v. 26, p. 244-250, 2008.

SERHAN, C.N.; JAIN, A.; MARLEU, S.; CLISH, C.; KANTARCI, A.; BEHBEHANI, B.; COLGAN, S.P.; STAHL, G.L.; MERCHED, A.; PETASIS, N.A.; CHAN, L.; DYKE, T.E.V. Reduced Inflammation and Tissue Damage in Transgenic Rabbits Overexpressing 15-Lipoxygenase and Endogenous Anti-inflammatory Lipid Mediators. The Journal of Immunology, v. 171, p. 6856-6865, 2003.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, v. 32, p. 67-103, 1992.

SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. Acta Botanica Brasilis, v. 19, n.1, p. 45-60, 2005.

SILVA, A.F. Estrutura e conduta da indústria de medicamentos fitoterápicos do Brasil. Viçosa, 2002. 156p. Dissertação de Mestrado -Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. Carbohydrate Polymers, v. 51, p. 239-242, 2003.

SILVA, B.P., R.R. BERNARDO E J.P. PARENTE. A furostanol glycoside from the rhizomes of *Costus spicatus*. Phytochemistry, v. 51, n. 7, p. 931-935, 1999b.

SILVA, B.P., R.R., BERNARDO E J.P. PARENTE. A new steroidal saponin from the rhizomes of *Costus spicatus*. Planta Medica, v. 65, n. 3, p.285-287, 1999a.

SILVA, B.P.; BERNARDO, R.R.; PARENTE, J.P. Flavonol glycosides from *Costus Spicatus*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 53, p. 87-92, 2000.

SILVA, C. S. P.; PROENÇA, C. E. B. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica. Brasilis*, v. 22, p. 2, p. 481-492, 2008.

SILVA, M.C.; CARVALHO, J.C.T. Plantas medicinais: In: Carvalho, J.C.T. Fitoterapicos antiinflamatórios, aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, Sp, Tecmed, 480 p. 2004.

SILVA, S. M.; LEMOS, J. C. Plantas Medicinais de uso da população do assentamento de reforma agrária Ezequias dos Reis, município Araguari-MG. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2006.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques. *Revista Brasileira. De Farmácia*, v. 90, n. 2, p.124-128, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ed., 2003, 1102p.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S; ARAÚJO, D. S; CAVALCANTE, L. C D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007

SOUZA, A. M. S.; LARA, L. S.; PREVIATOA, J. O.; LOPESA, A. G.; NEVES, C. C.; SILVA, B. P.; PARENTE J. P. Modulation of Sodium Pumps by Steroidal Saponins. *Zeitschrift für Naturforschung A*, v. 59, p. 432-436, 2004.

SOUZA, A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M., Atividades antimicrobianas de *Tagetes minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v.37, n.6, 2000

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KRUEGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R..C. Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed Univali; 2003, 239p.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 239-272, 2006.

STEVENSON, D.W.M.; STEVENSON, J.W. Costaceae (Costus Family). Flowering plants of the neotropics. Princeton: Princeton University Press, 2004. 594 p.

STOREY M; JORDAN S. An overview of the immune system. Nurs Standing, v. 23, p. 47-56, 2008.

STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. Journal of Investigative Medicine, v. 42, p. 640-651, 1994.

TAHMASEBI M. N.; SAGHARI M.; MOSLEHI M.; GHOLAMREZANEZHAD A. Comparison of SPECT bone scintigraphy with MRI for diagnosis of meniscal tears. BMC Nuclear Medicine, v. 5, p.2, 2005.

THARALL J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia. Natureza on line, v. 4, n. 1, p. 30-39, 2006.

TAVARES, W. Manual de antibióticos. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1984, 374 p.

TEIXEIRA, S. A.; MELO, J. I. M. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. Iheringia Série Botânica, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 5-11, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A.F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Study about informal trade of medicinal plants in Goiania and neighboring cities, Brazil. Acta Botanica Brasiliis, v. 20, n. 4, p. 789-802, 2006.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, J.; VOS, C. H. R.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 3, p. 696–704, 2008.

VAN DE WIELE C.; LAHORTE C.; OYEN W.; BOERMAN O.; GOETHALS I.; SLEGGERS G.; DIERCKX R. A. Nuclear medicine imaging to predict response to radiotherapy: a review. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, v. 551, p. 5-15, 2003.

VIKSVEEN, P. Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can omeopathy be an alternative? Journal of Homeopathy, London, v. 92, p. 99-107, 2003.

VIMALA, B.; NAMBIAN, B. Tropical minor tubers crops. Trivandrum: central Tuber Crops Research Institute, 2005, 24 p.

VINSON, J. A.; DABBAG, Y. A. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. Nutrition Research, v. 18, p. 1067-1107, 1998.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drugs analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Ed. Springer verlag, 1996. 384p.

WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo, São Paulo: FAPESP; RiMa, v. 3, 2003.

WANG, T. Y.; ALJROUDI, W. A.; NEWBY, L. K. Markers of Cardiac Ischemia and Inflammation. *Clinical Research in Cardiology*, v. 23, p. 491-501, 2005.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, v. 83, n.3, p. 835-870, 2003.

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

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *Journal of Infection*, v. 59, suppl. 1, p. 4–16, 2009.

ANEXOS

Anexo A – Sistemas, padrões e reveladores da triagem fitoquímica do extrato aquoso da *Costus spicatus*.

METABÓLITOS	COMPOSIÇÃO	
	DO TESTE	
	PADRÃO	PILOCARPINA
ALCALÓIDES	SISTEMA	TOLUENO:ACETATO DE ETILA:DIETILAMINA (70:20:10)
	REVELADOR	DRAGENDORF
	PADRÃO	ALCACHOFRA
POLIFENÓIS	SISTEMA	ACETATO DE ETILA:ÁC. ACÉTICO:ÁC. FÓRMICO:ÁGUA (100:11:11:26)
	REVELADOR	NEU
	PADRÃO	JATOBÁ
PROANTOCIANIDINA	SISTEMA	ACETATO DE ETILA:ÁC. ACÉTICO:ÁC. FÓRMICO:ÁGUA (100:11:11:26)
	REVELADOR	VANILINA CLORÍDRICA
	PADRÃO	TIMOL
TERPENOS	SISTEMA	TOLUENO:ACETATO DE ETILA(90:12)
	REVELADOR	LIEBERMAN-BURCHARD

FONTE: Wagner e Bladt (1996)