

Universidade de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Mestrado em Biotecnologia

Ana Paula de Oliveira

**Inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase pela ação de extratos e flavonoides isolados de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe**

Ribeirão Preto

2015

Ana Paula de Oliveira

**Inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase pela ação de extratos e flavonoides isolados de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe**

Dissertação apresentada à Universidade de  
Ribeirão Preto-UNAERP, como requisito  
para obtenção do grau de mestre em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Taleb Contini  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Soares Pereira

Ribeirão Preto  
2015

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

O48i Oliveira, Ana Paula de, 1980-  
Inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase pela ação de extratos e  
flavonoides isolados de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe / Ana Paula  
de Oliveira. - - Ribeirão Preto, 2015.  
61 f.: il. color.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Helena Taleb Contini.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2015.

1. *Costus spiralis*. 2. Diabetes. 3. Flavonoides. I. Título.

CDD 660

ANA PAULA DE OLIVEIRA

INIBIÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ - GLICOSIDASE PELA AÇÃO DE EXTRATOS E  
FLAVONOIDES ISOLADOS DE *COSTUS SPIRALIS* (JACQ.) ROSCOE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão  
Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 04 de dezembro de 2015

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dra. Silvia Helena Taleb Contini  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

  
Prof. Dra. Adriana Aparecida Lopes  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

  
Prof. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2015

*“Dedico este trabalho aos meus pais e minhas irmãs que em todos os momentos me incentivaram e apoiaram. Amo vocês!”*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me conduzido e permitido a realização deste trabalho.

A todos do laboratório de Química de Produtos Naturais pelo apoio e suporte no desenvolvimento desta pesquisa.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Silvia Helena Taleb Contini por toda a orientação, auxílio e contribuição dada a este trabalho. E também agradeço pela sua amizade, paciência e compreensão em todos os momentos de desafios que passamos.

À minha coorientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Soares Pereira por todo o suporte e ajuda dada na realização deste trabalho.

A todos os membros da Unidade de Biotecnologia e do programa de pós-graduação em Biotecnologia pela amizade e auxílio direto ou indiretamente na realização deste trabalho.

A PROSUP/CAPES/UNAERP pela concessão da bolsa.

## RESUMO

A espécie *Costus spiralis*, conhecida como cana-do-brejo é utilizada pela medicina tradicional como depurativo, adstringente e diurético, além haver estudos do gênero como hipoglicemiante. Estudos químicos e farmacológicos, realizados com espécies vegetais com propriedades hipoglicemiantes, têm demonstrado que tais espécies são importantes fontes de substâncias químicas, que podem ser utilizadas como modelos para novos agentes terapêuticos. Dentre as classes dos metabólitos isolados, com propriedades antidiabéticas, podemos citar os flavonoides, os quais têm apresentado potente inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, responsável pela digestão dos carboidratos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase pela ação de extratos e substâncias isoladas de *C. spiralis*. Para tanto, foram realizados o estudo químico, visando o isolamento e identificação de substâncias, presentes no extrato clorofórmico de *C. spiralis*, e a análise do teor de macro e micronutrientes presentes na planta e nos extratos. Posteriormente, foram realizadas as avaliações da ação de inibição dos extratos e substâncias isoladas de *C. spiralis*, sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase. O estudo químico de *C. spiralis* resultou no isolamento e identificação estrutural de duas flavonas C-glicosiladas, escafosídeo e isoescafosídeo, as quais apresentaram ação inibitória frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase. Observou-se também que a espécie *C. spiralis* acumula quantidades significativas de constituintes inorgânicos como cálcio, magnésio, cobre, manganês, zinco e cromo os quais são importantes para o controle do diabetes. Os resultados obtidos contribuirão, significativamente, com os estudos farmacológicos desta planta medicinal.

Palavras Chave: *Costus spiralis*. Diabetes.  $\alpha$ -glicosidase. Flavonoides.



## ABSTRACT

The species *Costus spiralis*, known as the swamp cane is used by traditional medicine as cleanser, astringent and diuretic besides there are studies of the gender as hypoglycaemic. Chemical and pharmacological studies carried out with plant species with hypoglycaemic properties, have shown that these species are important source of chemical substances which can be used as templates for new therapeutic agents. Among the classes of the isolated metabolites with antidiabetic properties, we can mention flavonoids, which have shown powerful inhibition of  $\alpha$ -glucosidase enzyme, responsible for the digestion of carbohydrates. The purpose of this study was to evaluate the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase enzyme by the action of extracts and substances isolated from *C. spiralis*. To this end, the chemical study was performed in order to isolate and identify substances present in the chloroform extract of *C. spiralis*, and the analysis of macro and micronutrient content present in the plant and extracts. Later, there were evaluations of the inhibition action of the extracts and isolated substances of *C. spiralis* on the enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Chemical studies of *C. spiralis* resulted in the isolation and structural identification of two *C-glycosides* flavone, schaftoside and isoschaftoside, which have shown inhibitory action of  $\alpha$ -glucosidase. It was also observed that the species *C. spiralis* accumulates significant amounts of inorganic components such as calcium, magnesium, copper, manganese, zinc and chromium which are important for the control of diabetes. The results will contribute significantly to the pharmacological studies of this medicinal plant.

Keywords: *Costus spiralis*. Diabetes.  $\alpha$ -glucosidase. Flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da acarbose, miglitol e voglibose .....	14
Figura 2- <i>Costus spiralis</i> (Jack.) Roscoe.....	16
Figura 3- Quercetina 3-O- $\alpha$ -arabinosideo .....	17
Figura 4- Fluxograma do fracionamento do extrato e purificação .....	21
Figura 5- Análise em CCDC dos extratos de <i>C. spiralis</i> .....	25
Figura 6- Cromatograma e espectro de UV obtido por CLAE da subfração C9-4 de <i>C. spiralis</i> .....	26
Figura 7- Cromatograma e espectro de UV obtido por CLAE da subfração C11 de <i>C. spiralis</i> .....	26
Figura 8a - Espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-11 .....	29
Figura 8b - Ampliação do espectro de RMN 1H da mostra C-11 .....	29
Figura 8c - Ampliação do espectro de RMN 1H da amostra C-11.....	30
Figura 9a- Mapa de correlações (HMQC) da amostra C-11 .....	30
Figura 9b- Ampliação do mapa de correlações (HMQC) da amostra C-11.....	31
Figura 10a- Espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-9-4.....	31
Figura 10b- Ampliação do espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-9-4.....	32
Figura 10c- Ampliação do espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-9-4.....	32
Figura 11a- Mapa de correlações (HMQC) da amostra C-9-4.....	33
Figura 11b- Ampliação do mapa de correlações (HMQC) da amostra C-9-4.....	33
Figura 12- Espectro de massas em alta resolução (modo negativo) da amostra C9-4.....	34
Figura 13- Espectro de massas em alta resolução (modo negativo) da amostra C-11.....	35
Figura 14- Espectro de MS/MS em alta resolução (modo negativo) do íon m/z 563.1599 .....	36
Figura 15- Espectro de MS/MS em alta resolução (modo negativo) do íon m/z 563.1384.....	37
Figura 16- Flavonoides C-glicosilados: escafosideo (1) e isoescafosideo (2) isolados de <i>C. spiralis</i> .....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero <i>Costus</i> (Anexo1)	53
Tabela 2- Dados obtidos a partir dos espectros de RMN 1H e HMQC da amostra C-11	28
Tabela 3a- Média do teor de macro e micronutrientes de folhas de <i>C. spiralis</i>	40
Tabela 3b- (Continuação) Média do teor de macro e micronutrientes de folhas de <i>C. spiralis</i>	41
Tabela 4- IC <sub>50</sub> dos extratos e compostos isolados de <i>C. spiralis</i>	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAW	Butanol, ácido acético e água
C18	Octadecil- sílica
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
EC	Enzyme Commission
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IC <sub>50</sub>	Concentração de Inibição Média
IDF	International Diabetes Federation
MS/MS	Espectro de Massas de Segunda Ordem
NP/PEG	Natural Products- Polyethylene glycol
ρNPG	ρ-nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 ENZIMA <math>\alpha</math>-GLICOSIDASE</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 O GÊNERO <i>Costus</i> E A ESPÉCIE <i>C. spiralis</i> (JACQ.) ROSCOE</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 MACRO E MICRONUTRIENTES</b> .....	<b>17</b>
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 MATERIAL VEGETAL</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 EXTRATO BRUTO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 PURIFICAÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	<b>22</b>
<b>3.6 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO TEOR DE MACRO E MICRONUTRIENTES DE <i>C. spiralis</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b> .....	<b>23</b>
3.7.1 Preparo das Amostras para a Realização do Ensaio Enzimático.....	23
3.7.2 Preparo das Soluções: .....	23
3.7.3 Ensaio Enzimático .....	23
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS AMOSTRAS C9-4 E C-11</b> .....	<b>27</b>
<b>5.3 ANÁLISE DO TEOR DE MACRO E MICRONUTRIENTES</b> .....	<b>39</b>
<b>5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b> .....	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 *DIABETES MELLITUS*

O uso de plantas medicinais como forma de controle do diabetes iniciou-se antes do advento da insulina exógena e hipoglicemiantes orais. Estudos químicos e farmacológicos vêm sendo realizados com espécies vegetais usadas como antidiabéticas e têm demonstrado que as mesmas são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas, por possuírem constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes terapêuticos.

*Diabetes mellitus* é uma desordem metabólica onde o pâncreas não consegue produzir insulina suficiente ou utilizá-la de forma eficaz, desencadeando um excesso de glicose no sangue (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION- IDF, 2014). O termo diabetes é derivado da palavra grega “Diab”, referindo-se ao ciclo de sede excessiva e frequente micção e ‘mellitus’ é uma palavra latina que significa ‘adoçado com mel’ devido a presença de açúcar na urina (PATEL et al., 2012).

O diabetes pode ser classificado em diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e diabetes gestacional. O diabetes tipo 1 acomete geralmente crianças e jovens adultos e ocorre devido a uma reação autoimune em que o sistema de defesa do corpo ataca as células beta produtoras de insulina do pâncreas. Desta forma o corpo não consegue produzir a insulina necessária e o paciente precisa repor diariamente a insulina para controlar os níveis de glicose no sangue. (IDF, 2014).

O diabetes tipo 2 é mais comum em adultos, mas pode ocorrer também em crianças e adolescentes. Ele é caracterizado pela resistência à insulina e pela secreção insuficiente da insulina. A hiperglicemia dá-se de forma gradual e assintomática o que favorece em longo prazo as suas complicações. Defeitos genéticos, hereditariedade, obesidade e estilo de vida estão entre as causas do desenvolvimento da doença (IDF, 2014; SURYA et al., 2014).

Já no diabetes gestacional, a mulher desenvolve resistência à insulina e conseqüentemente a elevação da glicose no sangue. Ele surge provavelmente devido à ação de hormônios produzidos pela placenta. A doença surge geralmente na 24<sup>a</sup> semana de gravidez e caso não haja o devido acompanhamento, pode gerar conseqüências graves tanto para a mãe quanto para o bebê (IDF, 2014).

Segundo o IDF (2015), os maiores índices de pessoas portadoras de diabetes estão na faixa etária entre os 20 e os 59 anos de idade. Estima-se que em 2015 haverá 415 milhões de pessoas adultas com a doença e que em 2040 serão 642 milhões de diabéticos no mundo. E o

Brasil se encontra na quarta posição dos países com os maiores índices de pessoas adultas com diabetes (14,3 milhões) (IDF, 2015).

Além dos sintomas característicos da doença como a poliúria, polidipsia e polifagia, o portador do diabetes pode apresentar outros sintomas como perda de peso, visão turva, taquicardia, hipotensão, infecções frequentes e feridas com cicatrização lenta (SURYA et al., 2014; IDF, 2014). A hiperglicemia é determinante para o desenvolvimento das complicações decorrentes do diabetes (SINGH et al., 2013) como retinopatia, neuropatia, nefropatia, doenças cardiovasculares, mal súbito, doença vascular periférica, coma e morte (PATEL et al., 2012).

Atualmente, há diversos medicamentos comerciais disponíveis para o tratamento do diabetes, como as biguanidas, sulfonilureia, meglitinidas, inibidores da DPP-4, insulina e inibidores da enzima  $\alpha$ -glicosidase (ARULSELVAN et al. 2014).

Esta enzima é responsável pela absorção intestinal dos carboidratos. A redução da absorção da glicose, no trato digestivo, evita ou controla a hiperglicemia pós-prandial em pacientes com diabetes tipo 2 (ARULSELVAN et al., 2014; GULATI et al., 2012; SURYA et al., 2014; TUNDIS et al., 2010).

## 1.2 ENZIMA $\alpha$ -GLICOSIDASE.

A  $\alpha$ -glicosidase ( $\alpha$ -D-glicosídeo glicohidrolase EC. 3.2.1.20) pertence a uma classe diversificada de enzimas de glicosídeo hidrolases, a qual está ligada a membranas localizadas no intestino delgado e é enzima chave para a digestão dos carboidratos. Ela hidrolisa especificamente a ligação  $\alpha$ -glicopiranosídeo ( $\alpha$ -1,4) liberando um  $\alpha$ -D-glicose a partir da extremidade não-redutora do substrato (DU et al., 2006; PATEL et al., 2012; TUNDIS et al., 2010).

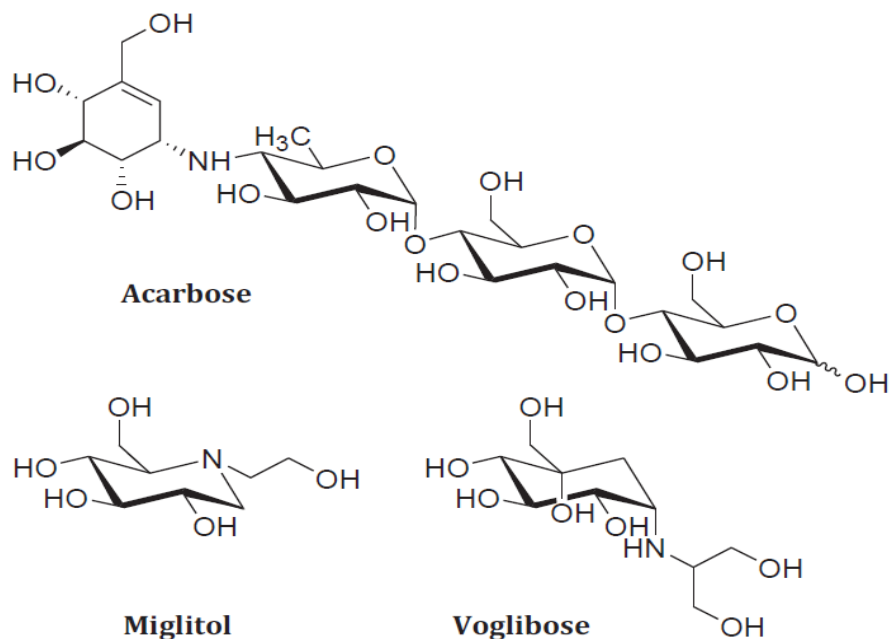
As funções das  $\alpha$ -glicosidases em mamíferos abrangem a degradação do glicogênio, o processamento de oligossacarídeos N-ligado para o dobramento e a maturação da glicoproteína e da digestão intestinal de carboidratos (TUNDIS et al., 2010; GHANI, 2015). Além disso, atuam em diversos processos biológicos como: resposta imune, reconhecimento e diferenciação celular, estabilidade e solubilidade de proteínas, e também no câncer e em processos inflamatórios. As deficiências genéticas destas enzimas podem levar ao diabetes e à obesidade (MELO, 2006).

Nas últimas décadas, houve o crescimento do número de pesquisas envolvendo a enzima  $\alpha$ -glicosidase, devido ao seu potencial como alvo terapêutico, para auxiliar no controle

dos níveis glicêmicos em pacientes com diabetes. Ensaio clínico mostram que o inibidor de  $\alpha$ -glicosidase melhora em longo prazo o controle glicêmico, pela diminuição da hemoglobina (A1c-HbA1c) em pacientes com diabetes tipo 2 e em pacientes com intolerância a glicose (GOODMAN & GILMAN, 2010).

Dentro dos inibidores da enzima  $\alpha$ -glicosidase, disponíveis comercialmente, estão a acarbose, o miglitol e a voglibose (Figura 1). Estes, por inibição competitiva pela enzima são utilizados no tratamento do diabetes, impedindo a hidrólise dos carboidratos no trato digestivo e consequente diminuição da absorção da glicose pelo organismo e a hiperglicemia pós-prandial (TADERA et al., 2006; ANTUNES, 2008; GHANI,2015).

**Figura 1- Estrutura molecular da acarbose, miglitol e voglibose**



Fonte:GHANI, 2015

A acarbose é um pseudotetrassacarídeo produzido pela fermentação de *Actinoplanes* sp (TUNDIS et al.,2010; GHANI, 2015). Foi um dos primeiros inibidores de  $\alpha$ -glicosidase lançados em 1990 para o tratamento do diabetes tipo 2. Além de ser utilizado para a redução da glicemia pós-prandial, este fármaco também é utilizado para redução de infartos, hipertensão e eventos trombóticos (MELO et al., 2006).



Apesar destes fármacos serem utilizados para o tratamento do diabetes eles apresentam reações adversas como dores de cabeça, distúrbios gastrointestinais, fadiga, insônia e vertigem (ARULSELVAN et al., 2014; MARLES, 1995). Diante disto, inúmeras pesquisas com plantas medicinais são realizadas buscando novos compostos ativos com potencial efeito terapêutico e com baixo efeito colateral (CHENG e FANTUS, 2005; ZHAO et al., 2009).

### 1.3 O GÊNERO *Costus* E A ESPÉCIE *C. spiralis* (JACQ.) ROSCOE

Segundo Tomlinson (1962), a família Costaceae, pertencente à ordem Zingiberales, é composta por quatro gêneros: *Costus*, *Monocostus*, *Dimerocostus* e *Tapeinocheilas*. *Costus*, o maior gênero com 125 a 175 espécies, possui a maior diversidade morfológica e a maioria de suas espécies ocorre nos Neotrópicos (SPECHT e STEVENSON, 2006).

As espécies pertencentes ao gênero *Costus* apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana e antidiabética nos ensaios biológicos realizados. Os estudos químicos realizados com as espécies *C. afer*, *C. arabicus*, *C. igneus*, *C. pictus*, *C. speciosus*, *C. spicatus* e *C. spiralis* mostram o isolamento e identificação de metabólitos da classe dos triterpenos, esteroides, saponinas e flavonoides (Tabela 1 - Anexo 1).

A planta *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Figura 2), popularmente conhecida no Brasil como cana-do-brejo, pertence a família Costaceae e é encontrada na América do Sul, em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na região amazônica (LOZENZI e MATOS, 2008). É uma planta perene, rizomatosa, ereta, cespitosa, não ramificada, pode atingir de 50 cm a 2 m de altura. (LORENZI e MATOS, 2008; MAAS, 1972). O pecíolo é grosso e as folhas são espiraladas, invaginantes, obovadas ou elípticas. As folhas são lisas, luzidias, verde escura na página superior e mais clara na página inferior, onde a nervura média é saliente (CORREA, 1984).

A espécie possui inflorescências racemosas em forma de espiga, brácteas vermelhas fechadas e sobrepostas onde se desenvolve os botões florais e frutos. Suas flores vermelhas atraem os polinizadores principalmente os beija-flores os quais são importantes vetores de pólen, garantindo para esta espécie uma elevada taxa de produção de sementes e maior variabilidade genética (ARAÚJO e OLIVEIRA, 2007).

**Figura 2- *Costus spiralis* (Jack.) Roscoe**



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Na medicina tradicional, folhas, hastes e rizomas de *C. spiralis* são utilizados como depurativo, adstringente e diurético. Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas da planta como diurético, tônico, emenagogo e diaforético, e o suco da haste fresca diluído em água tem o uso contra gonorreia, sífilis, nefrite, picadas de insetos, problemas da bexiga e complicações decorrentes do diabetes (LORENZI e MATOS, 2008).

De acordo com a literatura, pesquisas visando à busca de novos agentes terapêuticos com ação hipoglicemiante vêm sendo conduzidas com plantas medicinais utilizadas na medicina popular para o controle do diabetes. Dentre os diversos trabalhos realizados, pode-se citar a avaliação do potencial de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, pela ação de substâncias provenientes de plantas medicinais (ZHAO et al., 2009; THAO et al., 2014; YIN et al., 2014).

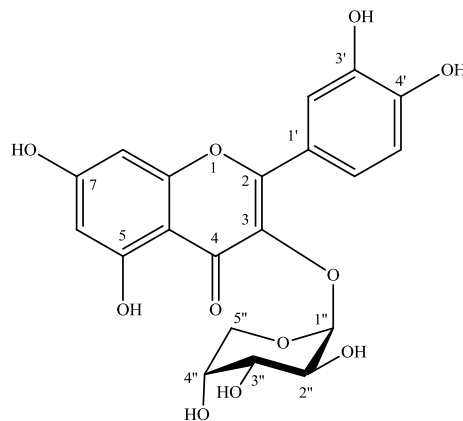
Recentemente, Tchamgoue et al. (2015) mostrou que os extratos acetato de etila e metanólico da espécie *C. afer*, utilizada na medicina popular como hipoglicemiante, apresentou potente inibição frente às enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Tal atividade foi correlacionada com a capacidade antioxidante destes extratos, assim como com a presença de substâncias bioativas da classe dos flavonoides, alcaloides, fenóis e taninos.

Até o momento, poucos estudos foram conduzidos visando à investigação dos constituintes químicos e das propriedades hipoglicemiantes da espécie *C. spiralis*.

Recentemente, Duarte et al. (2014) relatou o efeito hipoglicemiante, *in vivo*, da droga vegetal, do extrato metanólico das folhas e do flavonoide isolado quercetina 3-O- $\alpha$ -arabinosideo (Figura 3), o qual apresentou ação hipoglicemiante superior a da glibenclamida, fármaco utilizado no tratamento do diabetes. Segundo a autora, após os animais serem tratados com droga vegetal, extrato e substância isolada, não houve o aumento dos níveis glicêmicos no plasma, sugerindo que o mecanismo de ação está relacionado com o aumento da liberação de insulina ou a regulação da captação da glicose a partir do intestino.

Ainda neste trabalho, verificou-se através da histologia de tecidos pancreáticos e hepáticos que a planta *C. spiralis* traz benefícios a nível bioquímico e enzimático.

**Figura 3- Quercetina 3-O- $\alpha$ -arabinosideo**



Sabendo que os flavonoides estão entre as classes de produtos naturais com potente inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase (YIN et al., 2014), e que tais substâncias estão presentes nos extratos das folhas de *C. spiralis* (ANTUNES, et al., 2000, GARCIA, 2011), pode-se supor que extratos e substâncias isoladas de folhas de *C. spiralis* são uma estratégia terapêutica viável para o tratamento de *Diabetes mellitus* tipo 2, através da inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

#### 1.4 MACRO E MICRONUTRIENTES

Os elementos minerais essenciais são classificados de acordo com os minerais exigidos pelas plantas e da fertilidade do solo e são classificados em: macronutrientes, que corresponde a 99,5% da massa seca e micronutrientes, cerca de 0,5% da planta (EPSTEIN e BLOOM, 2006). Os macronutrientes são: carbono (C), Hidrogênio (H), Oxigênio (O), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S). E os

micronutrientes são: Boro (B), Cloro (Cl) Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mo (Molibdênio), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) (FERNANDES, 2006).

Espécies vegetais da medicina tradicional indígena, utilizadas como hipoglicemiantes, contêm níveis elevados de substâncias inorgânicas, tais como potássio, zinco, cálcio e cromo (MERTZ, 1981).

O potássio é essencial à vida humana, pois associado ao sódio, atua na condução dos impulsos nervosos, contração e relaxamento muscular, secreção de insulina pelo pâncreas e manutenção do equilíbrio ácido-base. A deficiência de potássio pode causar problemas no batimento cardíaco e fraqueza muscular (FRANCISCONI, 2014).

O zinco é um componente importante de enzimas, agindo no crescimento celular, diferenciação e reparação de tecidos, cicatrização de feridas, além de participar na síntese e degradação de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FRANCISCONI, 2014). Segundo Mooradian e Morley (1987), a deficiência de zinco pode levar a um aumento da resistência à insulina.

O cálcio é importante para o fortalecimento e rigidez de ossos e dentes, bem como para a coagulação sanguínea e contração muscular (FRANCISCONI, 2014). O enxofre é um dos elementos fundamentais na síntese de proteínas, do colágeno e auxilia o fígado na secreção da bÍlis. Seu excesso é eliminado pela urina e seu déficit retarda o crescimento.

O magnésio está envolvido na homeostase da glicose. Ele participa como um cofator no sistema de transporte da membrana plasmática e está envolvido com a atividade de várias enzimas que atuam na oxidação da glicose. Pode desempenhar função de liberação da insulina e em paciente com hiperglicemia sem controle ocorre a perda de magnésio pela urina provocando uma baixa concentração deste íon no plasma (MOORADIAN e MORLEY, 1987). Estudos sugerem que a deficiência de cobre pode estar relacionada ao diabetes tipo 2 (MOORADIAN e MORLEY, 1987).

O boro, um oligoelemento presente em vegetais, atua no metabolismo mineral e hormonal, na membrana celular e em reações enzimáticas. Possui ação antiosteoporese, antiinflamatória, hipolipodêmica, anticoagulante e anticâncer (BAKIRDERE, 2010).

Essencial para a ação da insulina, atuando como um cofator, o cromo é um elemento importante para o metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras (CEFALU; HU, 2004; CHOWDHURY et al., 2003). Este mineral tornou-se um dos nutrientes indispensáveis da alimentação humana, desde que um paciente diabético, em 1977, teve seus níveis de glicose reduzidos, após receber nutrição parenteral suplementada com cromo (ANDERSON, 1998). Além disto, o cromo atua na homeostase da glicose no organismo (MERTZ, 1993).

A quantificação de níveis de cromo em espécies vegetais, visando correlacionar o acúmulo deste mineral com os efeitos hipoglicemiantes em plantas medicinais, tem sido o alvo de muitos trabalhos científicos (FRANCO et al., 2011; IBARRA et al., 2009; BRUDZINSKA-KOSIOR et al., 2012; NEGI et al., 2012; GJORGIEVA et al., 2011; ZHANG et al., 2012; EBRAHIM et al., 2012; JABEEN et al., 2010; KHUDA et al., 2012; LIBERATO et al., 2013; GARCIA et al., 2000).

Com base nestas informações, a quantificação de macro e micronutrientes em *C. spiralis* contribuirá com os estudos que correlacionam o acúmulo destes minerais em plantas hipoglicemiantes.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos extratos e flavonoides presentes em *C. spiralis* (Jacq.) Roscoe na inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar, purificar e identificar os flavonoides presentes em *C. spiralis*.
- Obter extratos hexânico, acetato de etila, metanólico e aquoso da droga vegetal (pó das folhas) de *C. spiralis*.
- Analisar o teor de macro e micronutrientes da droga vegetal (inicial e final) e dos extratos de *C. spiralis*.
- Avaliar a concentração necessária dos extratos e substâncias isoladas que inibe 50% (IC<sub>50</sub>) da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1 MATERIAL VEGETAL**

Para o isolamento e purificação dos constituintes presentes na fração clorofórmica de *C. spiralis*, partes aéreas das plantas (folhas) foram coletadas no município de Jardinópolis, estado de São Paulo, Brasil, no sítio denominado Terra de Ismael em fevereiro de 2011.

Exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, com Voucher (HPMV 1883), identificada pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo.

O material vegetal (folhas) foi seco em estufa de ar circulante a 50°C durante 72 h e, em seguida, moído em moinho de faca (MARCONI Ma032), até a pulverização total.

Para a extração e análise de macro e micronutrientes, folhas de *C. spiralis* (1,575 Kg) foram coletadas na coleção de plantas medicinais da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP, e secas em estufa de ar circulante, sob temperatura, de aproximadamente 45°C por 72 horas. As folhas secas (200g) foram moídas em moinho de 25 mesh, obtendo-se 190g de pó.

### 3.2 EXTRATO BRUTO

O material vegetal foi macerado (3x) em metanol na proporção de 1000 (g) por 5000 ml de solvente, sob agitação contínua, por 24 h à temperatura ambiente.

O extrato foi filtrado e o solvente evaporado por rota evaporador (Sovereign IKA® RV 10) até a obtenção de extrato de consistência pastosa.

O extrato metanólico “EM” (54 g) foi ressuspenso com solução metanol (MeOH) e água (H<sub>2</sub>O) na proporção de 1:1, sendo em seguida realizada uma partição com hexano e clorofórmio resultando nas frações hexânica “FH”, clorofórmica “FC” e aquosa “FA”.

### 3.3 PURIFICAÇÃO

A fração FC (14,72g) foi submetida à purificação em cromatografia em coluna (CC), utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, em uma coluna com diâmetro de 3 cm e altura de 74,5 cm.

Foram recolhidas 52 subfrações, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se placa de sílica gel como fase estacionária e BAW (butanol, ácido acético e água na proporção de 9:1:5) como eluente. Em seguida, as placas foram reveladas com NP/PEG (solução metanólica a 1% / solução etanólica (PA) 5% polietilenoglicol) e visualizadas em luz UV.

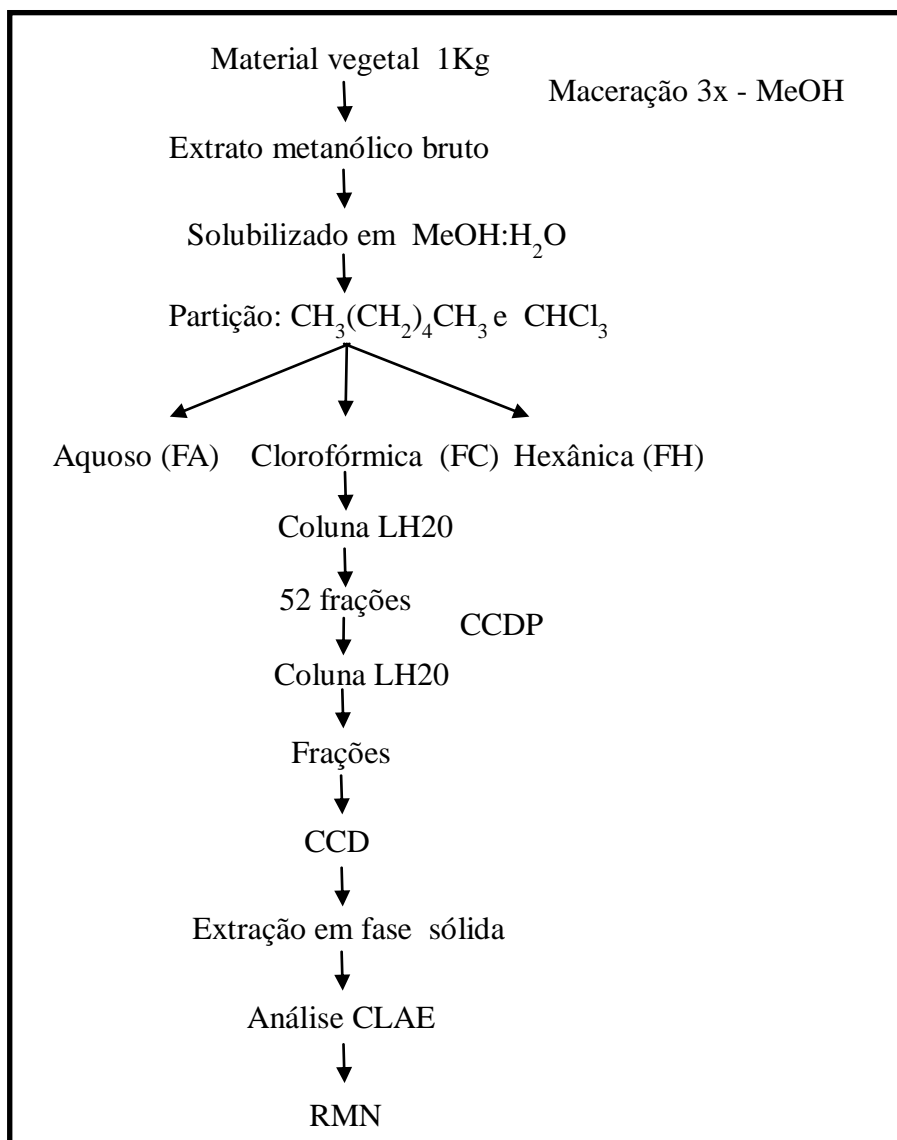
Após análise em CCDC, as frações que apresentaram similaridade no perfil cromatográfico foram reunidas, e as frações resultantes foram recromatografadas em CC, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel. As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por CCDC.

Algumas das subfrações obtidas foram purificadas por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando as mesmas condições citadas para o desenvolvimento da CCDC. Após este procedimento, estas frações foram purificadas por extração em fase

sólida (EFS), utilizando-se cartucho Supelclean LC-18 (6mL). Inicialmente, o cartucho contendo a fase estacionária sílica C-18 foi condicionado com água deionizada, e após adição da amostra, solubilizada em água, iniciou-se o procedimento de eluição das substâncias químicas presentes, utilizando água, água : metanol (9:1) e metanol como eluente.

As subfrações (C9-4 e C11), contendo as substâncias isoladas, foram solubilizadas em metanol, filtradas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, seguido de análise por RMN. Os procedimentos utilizados no processo de isolamento e purificação das substâncias presentes na fração clorofórmica de *C. spiralis* estão representados na Figura 4.

**Figura 4- Fluxograma do fracionamento do extrato e purificação**



### 3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As frações, assim como as substâncias isoladas e purificadas de *C. spiralis* foram analisadas por CLAE, de acordo com o procedimento descrito por Sales et al. (2014). Utilizou-se equipamento Shimadzu -SPD 20A, acoplado a um detector de arranjo de diodo. As amostras analisadas foram preparadas na concentração de 1mg/mL em metanol/H<sub>2</sub>O (7:3). A análise cromatográfica foi desenvolvida em coluna Luna C18 (250x4.6x5µm- tamanho da partícula); Phenomenex, Macclesfield, UK. A fase móvel foi constituída de água/ácido acético (0,1%) (A) e metanol (B), começando com 20% B em gradiente chegando a 50% B até 30min. e 100% B até 40min. O volume de injeção das amostras foi de 20µL e o fluxo 1mL/min. Os espectros de ultravioleta foram obtidos em λ 250nm e 350nm.

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

As substâncias isoladas foram submetidas à análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC e Espectrometria de Massas (EM), no departamento de Química da FFCLRP/USP.

### 3.6 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO TEOR DE MACRO E MICRONUTRIENTES DE *C. spiralis*

Sessenta gramas do pó das folhas de *C. spiralis* foram submetidos à extração por Soxhlet, sequencialmente, com os seguintes solventes: hexano, acetato de etila, metanol e água deionizada. Para tanto, foram utilizados 300 mL de cada um dos solventes (marca Synth<sup>®</sup>). O processo de extração foi de 8 horas para cada solvente.

Os extratos orgânicos hexânico, acetato de etila e metanólico foram evaporados e o extrato aquoso foi liofilizado.

A quantificação dos constituintes inorgânicos foi realizada com 1mg das amostras: extrato hexânico (E Hexânico), extrato acetato de etila (E Acetato de etila), extrato metanólico (E Metanólico), fração aquosa (FAq), e com a droga vegetal, antes (DV Inicial) e após (DV final) extração por soxhlet. As amostras foram analisadas em triplicada de acordo com o procedimento de Nardi et al; 2009, no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP/USP.



### 3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

#### 3.7.1 Preparo das Amostras para a Realização do Ensaio Enzimático

As soluções das amostras utilizadas no ensaio com a enzima  $\alpha$ -glicosidase foram preparadas na concentração de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

As amostras dos extratos acetato de etila, hexânico e metanólico, foram solubilizadas em  $\text{H}_2\text{O}$ : DMSO, na proporção de 9:1. O extrato aquoso e os flavonoides isolados foram solubilizados em 100% de água deionizada, bem como o controle positivo, a acarbose (Sigma<sup>®</sup>). Como controle negativo foram utilizados os veículos de solubilização apropriada à cada amostra.

#### 3.7.2 Preparo das Soluções:

- **Preparo da solução tampão fosfato 67 mM pH 6,8:** 4,18g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Vetec<sup>®</sup>) e 3,54g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth<sup>®</sup>) foram pesados e solubilizados em 100 mL de água deionizada, separadamente, obtendo uma solução 0,24 e 0,26M, respectivamente. Para obter a solução tampão a 67 mM foram transferidos 13,4 mL de cada uma das soluções estoque para balões volumétricos distintos e completados os volumes para 100 mL com água deionizada. O ajuste do pH a 6,8 foi feito adicionando aos poucos a solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- **Preparo da enzima  $\alpha$ -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20) (Sigma<sup>®</sup>):** foram utilizados  $0.2\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima solubilizada em solução tampão fosfato.
- **Preparo do pNPG ( $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo) (Sigma<sup>®</sup>):** 0,06989g solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato.
- **Preparo do  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Carbonato de Sódio):** 1,0599g de Carbonato de Sódio solubilizado em 10 mL de água deionizada.
- **Preparo da Acarbose (Sigma<sup>®</sup>):** 0,1032 g de acarbose solubilizada em 1mL de água deionizada.

#### 3.7.3 Ensaio Enzimático

A enzima  $\alpha$ -glicosidase proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada nos ensaios *in vitro* devido à semelhança estrutural e funcional entre as enzimas de levedura e de mamíferos (TABUSSUM et al., 2013). O ensaio consiste em avaliar a capacidade de inibição desta enzima pelos extratos e substâncias isoladas frente ao substrato pNPG, que ao ser hidrolisado libera um agente cromóforo ( $p$ -nitrofenil) (VIEIRA, 2013). Quanto maior a

ação da enzima  $\alpha$ -glicosidase sobre o substrato, maior será a concentração de p-nitrofenil liberado.

A acarbose é uma substância capaz de ligar-se à enzima  $\alpha$ -glicosidase, competindo com o substrato pNPG, interferindo diretamente no produto da reação propiciada pelo ensaio enzimático. Sendo assim esta foi utilizada como controle positivo nos experimentos conduzidos.

O experimento foi realizado seguindo a metodologia descrita por Wang et al. (2012), sendo modificado o preparo da solução tampão fosfato, onde foi utilizado o protocolo de Choo et al. (2012).

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços adicionando 25  $\mu$ L de cada amostra em diferentes concentrações. Em seguida foram adicionados 175  $\mu$ L da solução tampão fosfato em todos os poços e 25  $\mu$ L da enzima 0.2U.mL<sup>-1</sup> a três poços. Os outros três poços que não receberam a enzima foram acrescidos de 25  $\mu$ L da solução tampão fosfato. Após a realização do procedimento descrito, a placa foi mantida em temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 10 minutos, seguida da adição de 25  $\mu$ L de pNPG. A placa foi incubada por 15 minutos em banho-maria à  $37^\circ\text{C}$ . Após isto, foram adicionados 50  $\mu$ L de Carbonato de Sódio e realizada a leitura da absorbância à 405nm, utilizando-se leitor de microplaca Universal Microplate Reader EL<sub>x</sub> 800 uv (BIO TEK Instruments, INC). A acarbose foi utilizada como controle positivo do experimento e passou por todo o tratamento descrito para as amostras. Como controle da atividade enzimática foram utilizados os veículos de solubilização apropriado à cada amostra, distribuídos em seis poços, sendo três acrescidos da enzima  $\alpha$ -glicosidase e três não.

As concentrações das amostras que inibiram 50% da atividade da enzima (IC<sub>50</sub>) foram determinadas a partir da equação geral da reta obtida por gráfico correlacionando o valor da inibição, expressa pela absorbância, e a concentração do ativo. Os ensaios foram conduzidos em três triplicatas para cada amostra ensaiada (n=9).

#### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

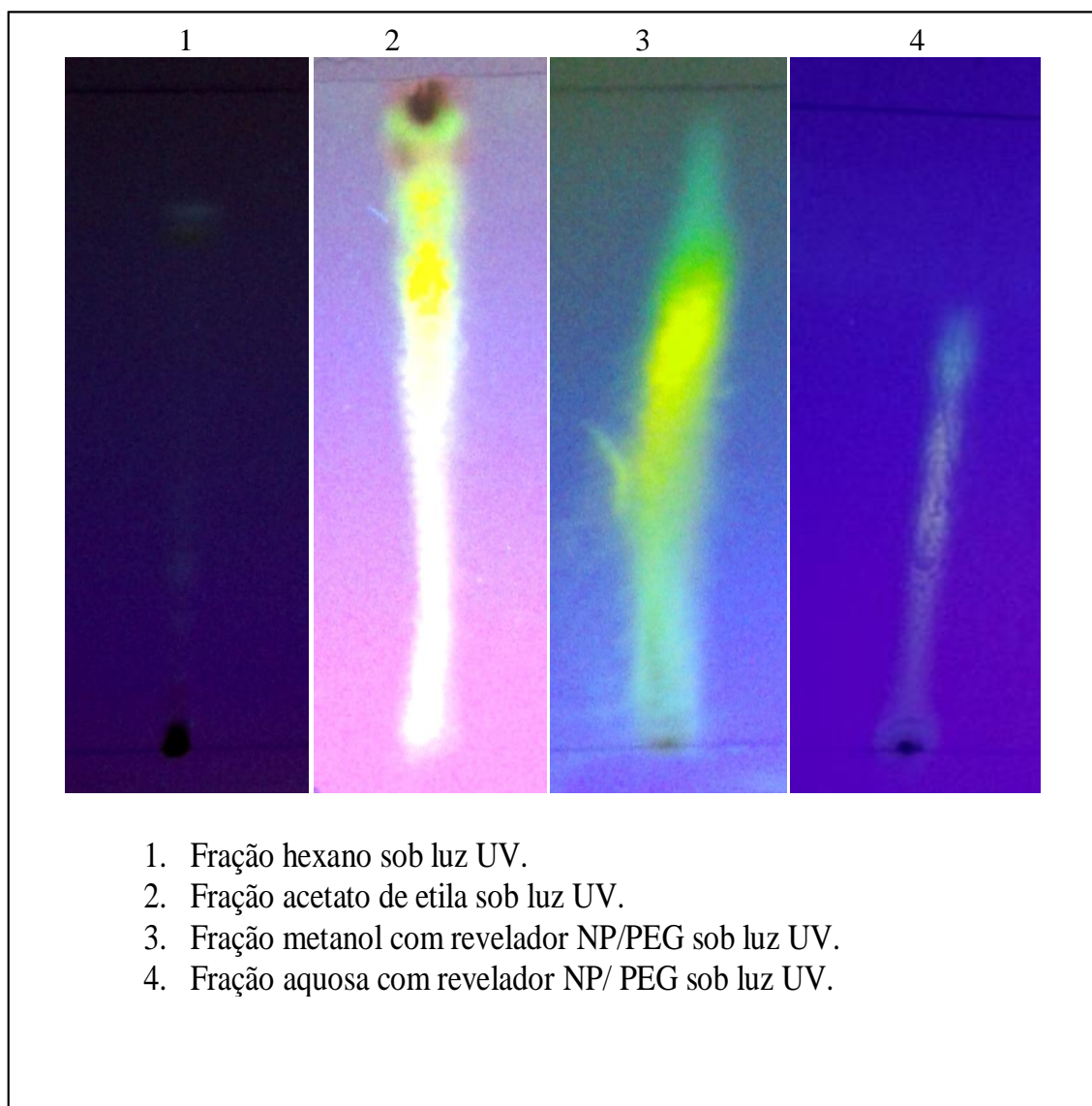
Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. Foi realizada análise de variância Teste Scott-knott (1974), seguida de teste de média.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

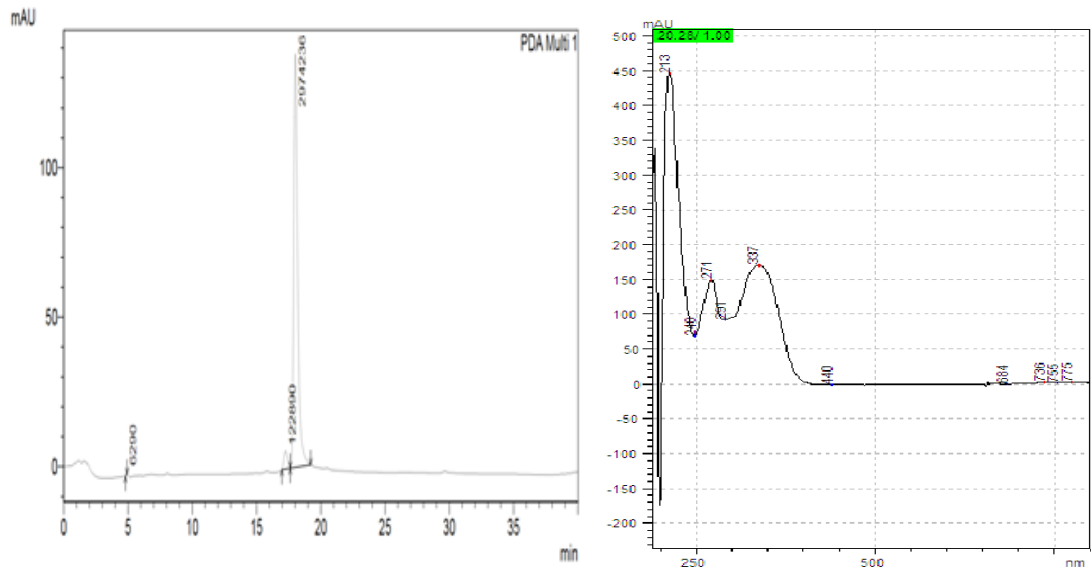
Após análise por CCDC dos extratos hexânico, acetato de etila, metanólico e aquoso, obtidos por Soxhlet, verificou-se o aparecimento de manchas na coloração amarela, caracterizando a presença de substâncias da classe dos flavonoides (Figura 5).

**Figura 5- Análise em CCDC dos extratos de *C. spiralis***

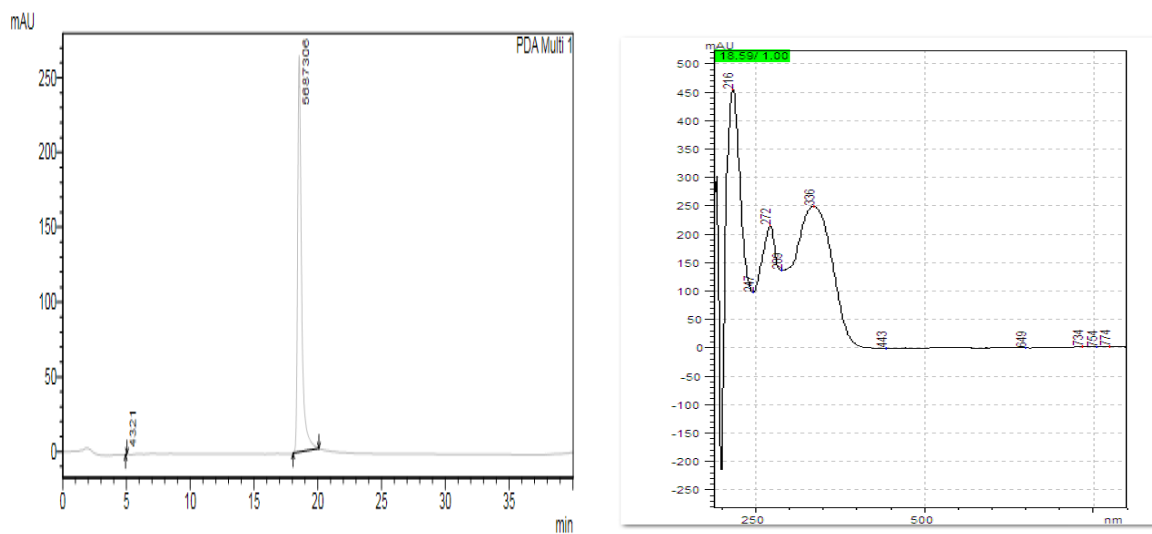


Após análise dos perfis cromatográficos das subfrações C9-4 e C11(Figuras 6 e 7), obtidos por CLAE, foi detectada a presença de bandas características da classe das flavonas (MABRY, MARKHAM , THOMAS, 1970).

**Figura 6- Cromatograma e espectro de UV obtido por CLAE da subfração C9-4 de *C. spiralis***



**Figura 7- Cromatograma e espectro de UV obtido por CLAE da subfração C11 de *C. spiralis***



## 5.2 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS AMOSTRAS C9-4 E C-11

O espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra C-11 (Figuras 8a-8c) apresentou 3 sinais na região dos hidrogênios aromáticos, sendo um sinal em  $\delta$  6,47, integrando para 1H, além dos sinais em  $\delta$  6,88 ( $J=9,0\text{Hz}$ ) e  $\delta$  8,07 ( $J=9,0\text{Hz}$ ), integrando para 2H cada, característicos de sistema AA'XX' de anel aromático.

Observaram-se também dois dubletos, na região de hidrogênios anoméricos  $\delta$  4,64 e  $\delta$  4,72, evidenciando a presença de duas unidades de açúcares, cujos valores de constante de acoplamento ( $J=10,0\text{ Hz}$ ) permitem definir a estereoquímica  $\beta$  para a glicose e  $\alpha$  ou  $\beta$  para a arabinose.

As correlações observadas no mapa de contorno de HMQC (Figuras 9a-9b) (Tabela 2) são indicativas de que a estrutura da molécula investigada pertence à classe das flavonas (HARBORNE, 1986; AGRAWAL, 1989).

Os sinais observados no espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra C9-4 (Figuras 10a-10c) foram semelhantes aos observados no espectro da amostra C-11. O mapa de contorno HSQC da amostra C9-4 (Figuras 11a-11b) também apresentou correlações semelhantes à amostra C-11, sendo um forte indicativo de que os flavonoides investigados poderiam ser isômeros.

Os espectros de massas (EM) de alta resolução, obtidos no modo negativo das amostras C9-4 e C-11 (Figuras 12 e 13, respectivamente), apresentaram os íons  $m/z$  563.1599  $[\text{M} - \text{H}]^-$  para a amostra C9-4 e  $m/z$  563.1384  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , para a amostra C-11; correspondentes à fórmula molecular  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$ .

O espectro de MS/MS de alta resolução (Figura 14) da amostra C9-4 (íon  $m/z$  563.1599) apresentou os íons fragmentos  $m/z$  503.1371,  $m/z$  473.1248,  $m/z$  443.1148,  $m/z$  383.0924 e  $m/z$  353.0790, característicos da quebra de ligações C-glicosídicas (C-hexosil e C-pentosil).

O espectro de MS/MS de alta resolução (Figura 15) da amostra C-11 (íon  $m/z$  563.1384) também apresentou os mesmos íons fragmentos da amostra C9-4. Porém, pôde-se observar que houve diferença de intensidade entre os íons de valores  $m/z$  443 e  $m/z$  473, onde, na amostra C9-4, a intensidade do íon  $m/z$  443 é superior à intensidade do íon  $m/z$  473; e na amostra C-11, a intensidade do íon  $m/z$  473 é superior à intensidade do íon  $m/z$  443. A observação da diferença na intensidade dos picos foi essencial para concluir que as substâncias, presentes nas amostras C9-4 e C-11, realmente são isômeros.

Com base nas informações obtidas dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, HMQC, EM, e comparação com os dados da literatura (KITE et al., 2006; XI et al., 2003) foi possível concluir que a amostra C9-4 trata-se da flavona escafosídeo e que a amostra C-11 corresponde à seu isômero isoescafosídeo (Figura 16). Este é o primeiro relato de identificação estrutural dos flavonoides C- glicosilados escafosídeo e isoescafosídeo em *C. spiralis*.

Garcia (2011) relatou a presença de um flavonoide C-glicosilado em *C. spiralis*. Porém, não houve determinação estrutural exata desta molécula. Foram sugeridos os possíveis isômeros: 6-C- $\beta$ -D-glicosil-8-C- $\alpha$ -L-arabinosilapigenina (escafosídeo); 6-C- $\alpha$ -L-arabiosil-8-C- $\beta$ -D-glicosilapigenina (isoescafosídeo); 6-C- $\beta$ -D-glicosil-8-C- $\beta$ -L-arabinosilapigenina (neoescafosídeo) e 6-C- $\beta$ -L-arabiosil-8-C- $\beta$ -D-glicosilapigenina (neoisoescafosídeo).

**Tabela 2: Dados obtidos a partir dos espectros de RMN 1H e HMQC da amostra C-11**

C	$\delta^1\text{H}$ (DMSO; 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}^*$ (DMSO; 100 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (Xi et al., 2003) (DMSO)	$\delta^{13}\text{C}$ (Xi et al., 2003) (DMSO)
3	6,47 s	101,9	6,73 s	101,9
5	13,77 s		13,75 s	-
2'	8,07 (d, J 8,0 Hz)	129,0	8,07 (d, J 8,2 Hz)	128,6
3'	6,88 (d, J 9,0 Hz)	116,0	6,92 (d, J 8,2 Hz)	115,6
5'	6,88 (d, J 9,0 Hz)	116,0	6,92 (d, J 8,2 Hz)	115,6
6'	8,07 (d, J 8,0 Hz)	129,0	8,07 (d, J 8,2 Hz)	128,6
Glic 1''	4,64 (d, J 10,0 Hz)	75,0	4,74 (d, J 9,8Hz)	73,1
Glic 2''	4,05	71,0	3,89	70,7
Glic 3''	3,10	79,0	3,28	78,2
Glic 4''	3,10	70,5	3,28	69,7
Glic 5''	3,10	81,0	3,28	80,8
Glic 6''	3,40 de 3,60	61,9	3,70 e 3,54	60,5
Ara 1'''	4,72 (d, J 10,0 Hz)	76,0	4,80 (d, J 9,5 Hz)	74,6
Ara 2'''	4,10	69,5	4,09	68,7
Ara 3'''	3,35	75,5	3,53	74,0
Ara 4'''	3,70	69,5	3,88	68,3
Ara 5'''	3,45 e 3,75	71,0	3,93 e 3,69	70,2

\*Valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) obtidos do mapa de correlação heteronuclear HMQC.

Figura 8a- Espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-11

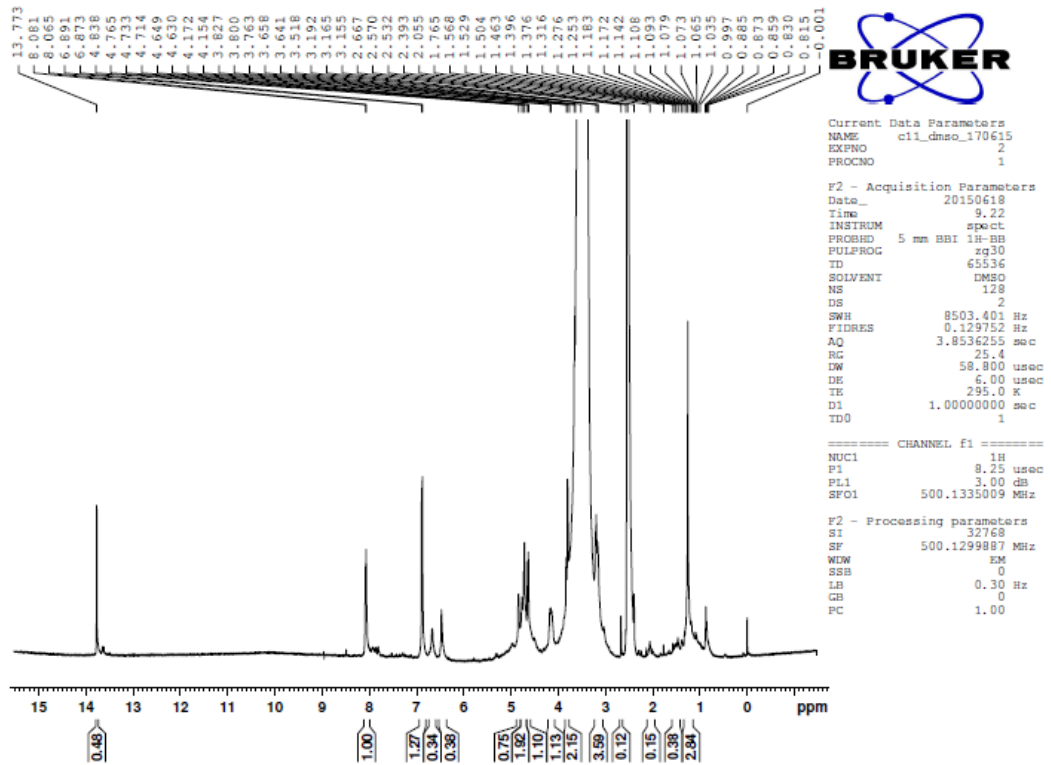


Figura 8b - Ampliação do espectro de RMN 1H da mostra C-11

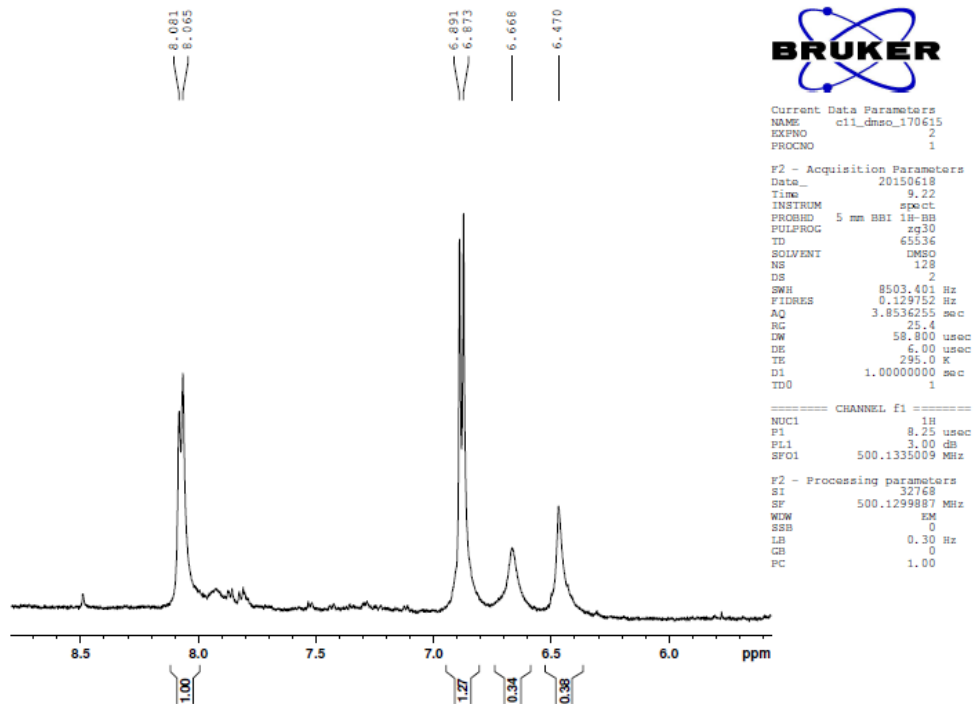


Figura 8c- Ampliação do espectro de RMN 1H da amostra C-11

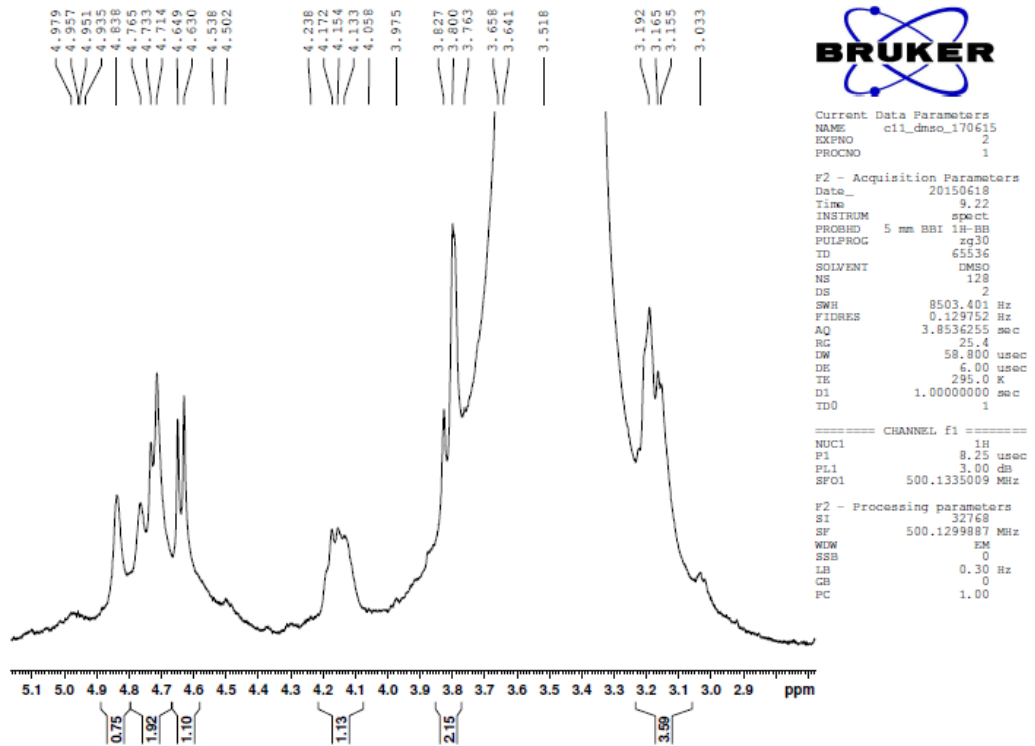


Figura 9a- Mapa de correlações (HMQC) da amostra C-11

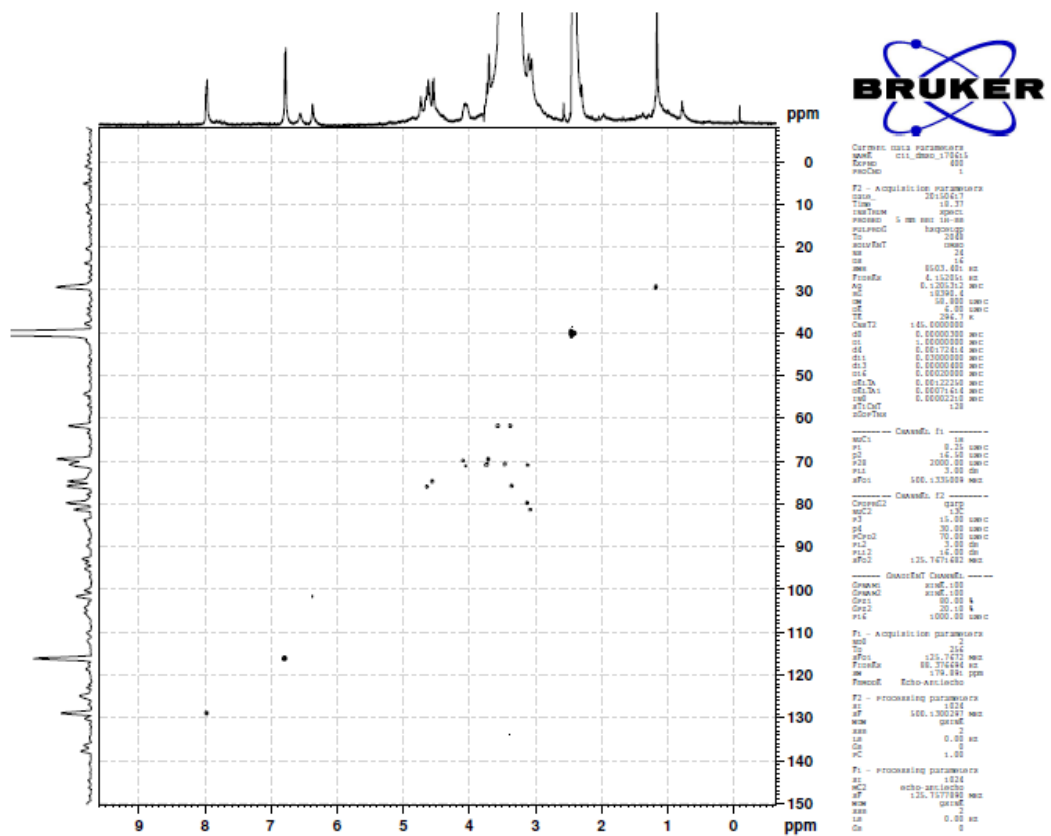




Figura 9b- Ampliação do mapa de correlações (HMQC) da amostra C-11

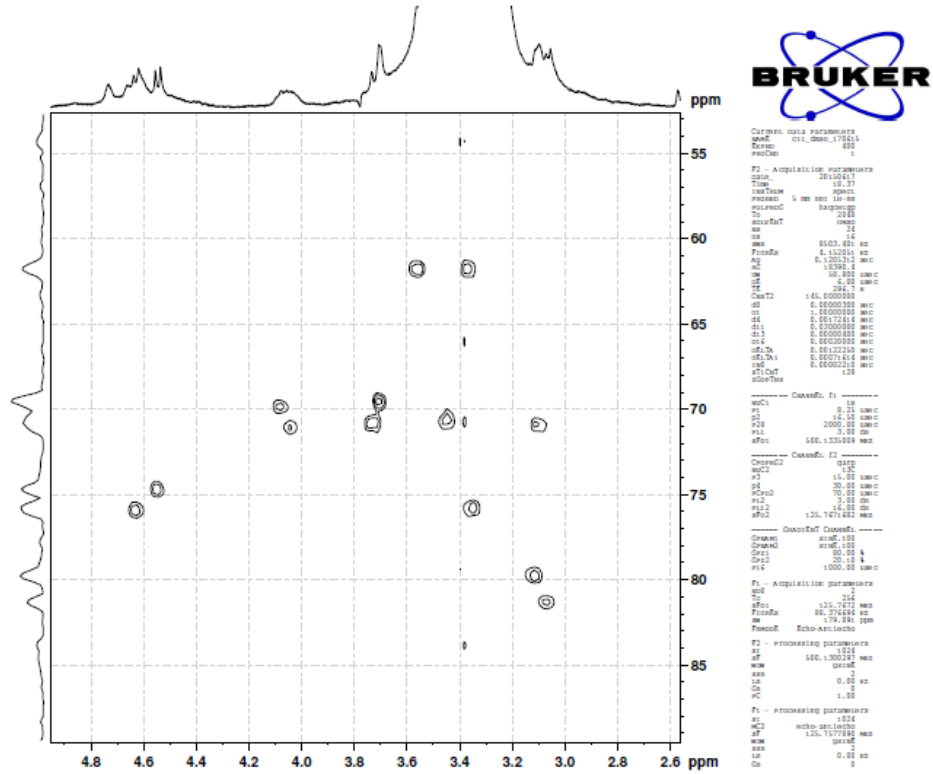


Figura 10a- Espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-9-4

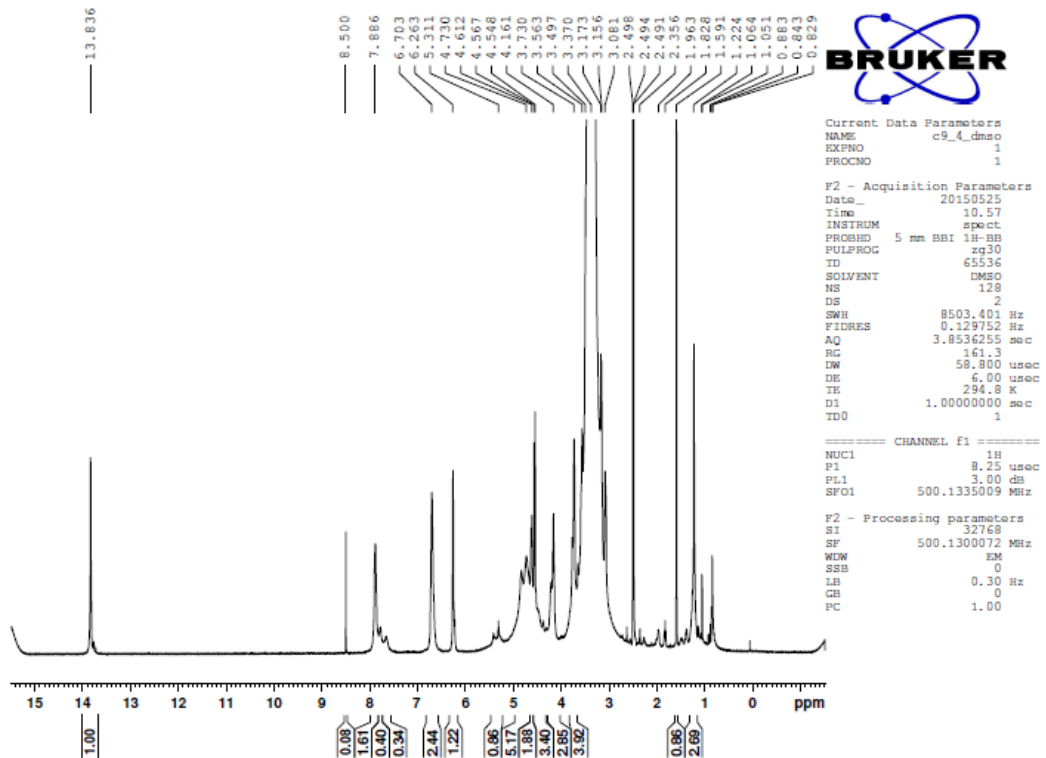


Figura 10b- Ampliação do espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-9-4

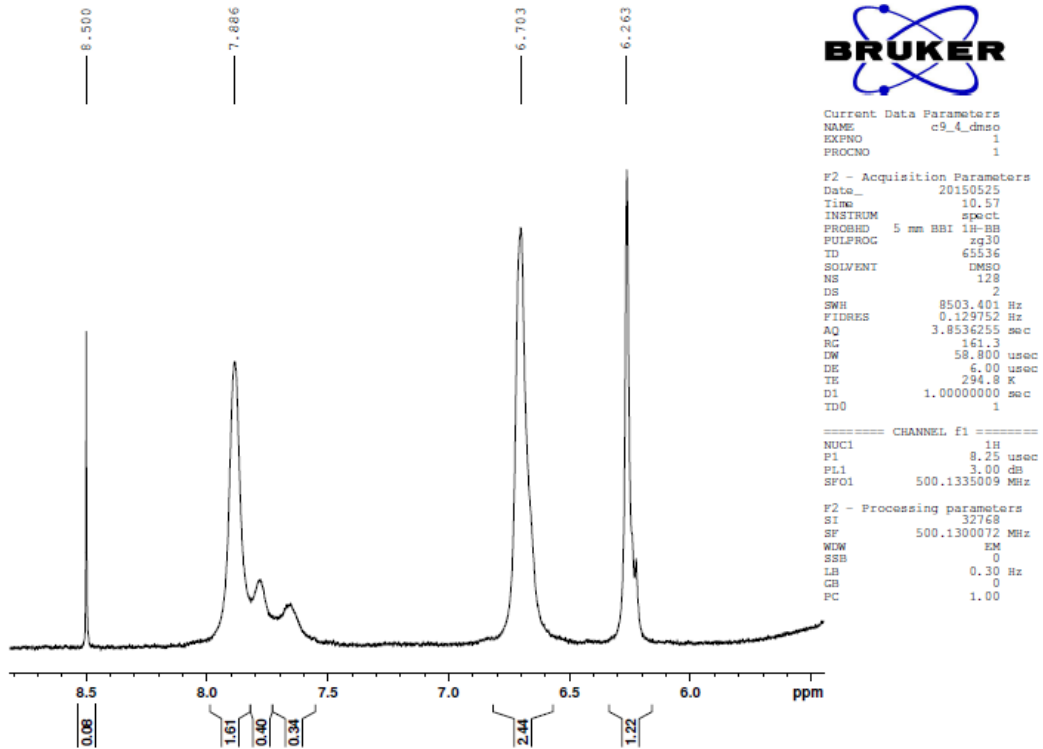


Figura 10c- Ampliação do espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) da mostra C-9-4

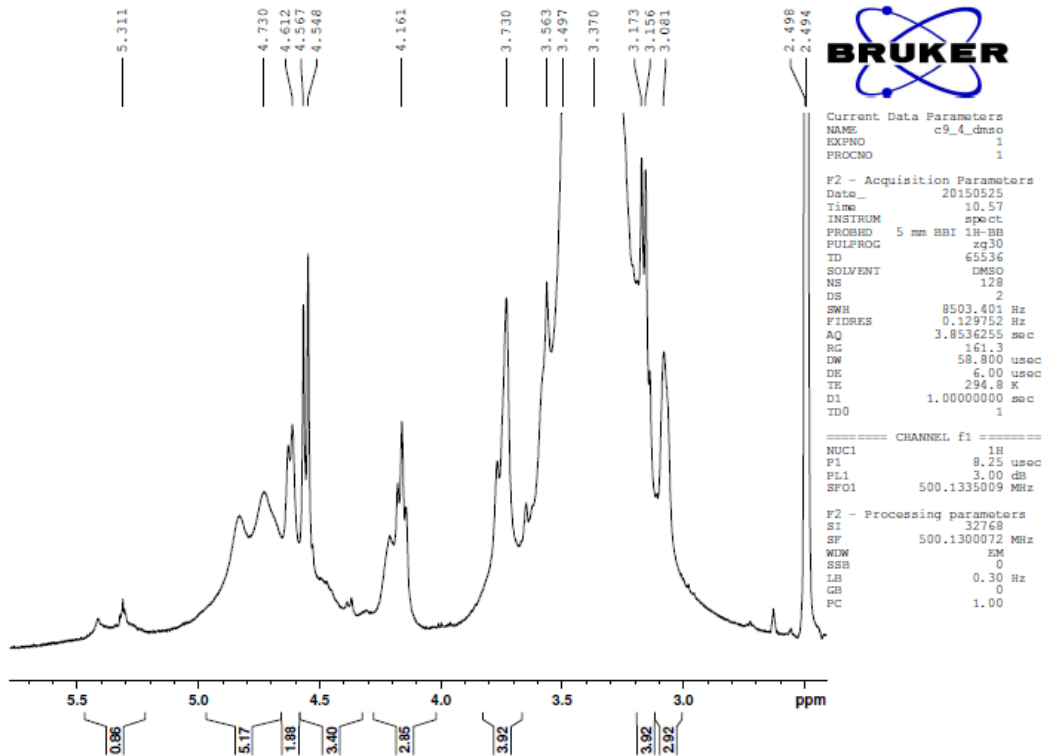


Figura 11a- Mapa de correlações (HMQC) da amostra C-9-4

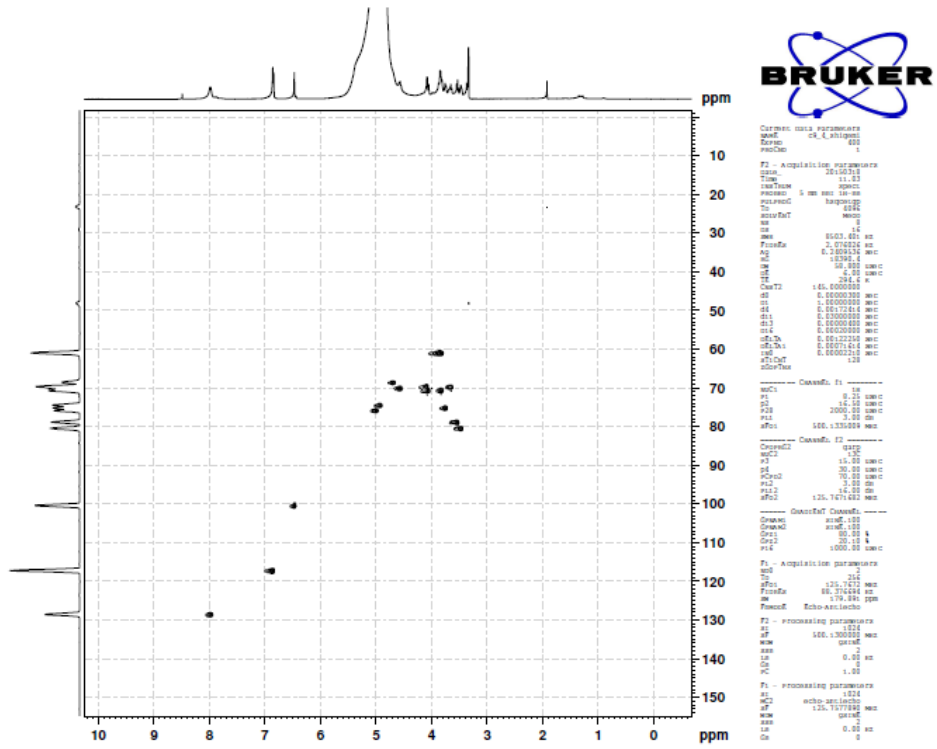


Figura 11b- Ampliação do mapa de correlações (HMQC) da amostra C-9-4

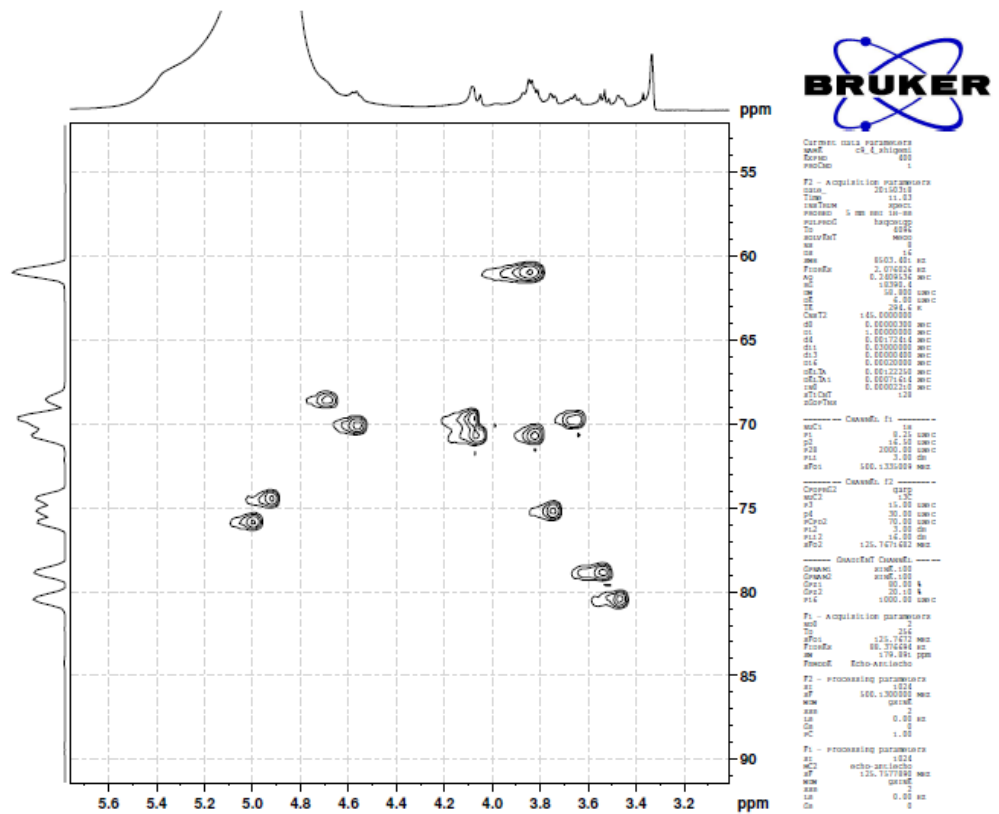


Figura 12- Espectro de massas em alta resolução (modo negativo) da amostra C9-4

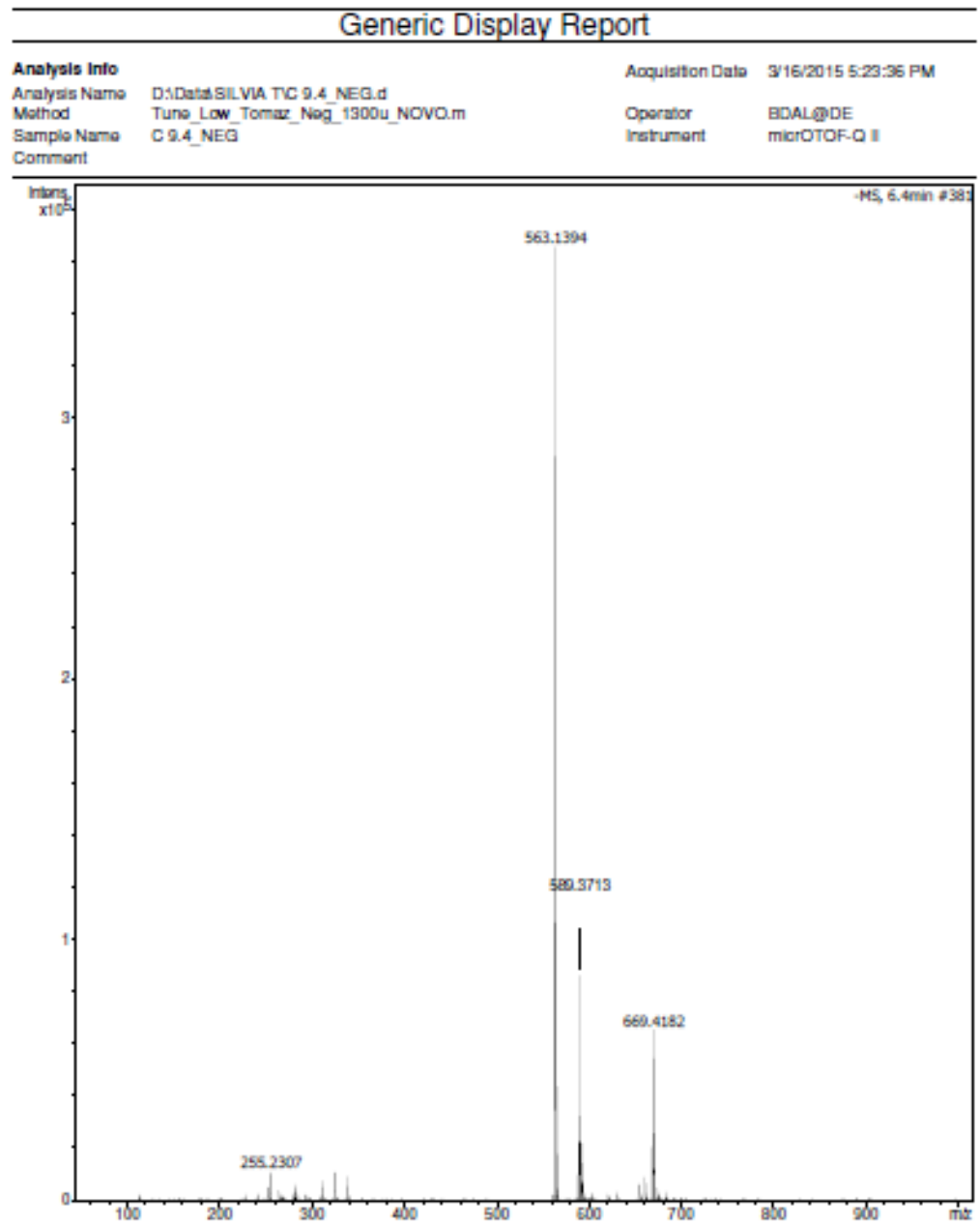


Figura 13- Espectro de massas em alta resolução (modo negativo) da amostra C-11

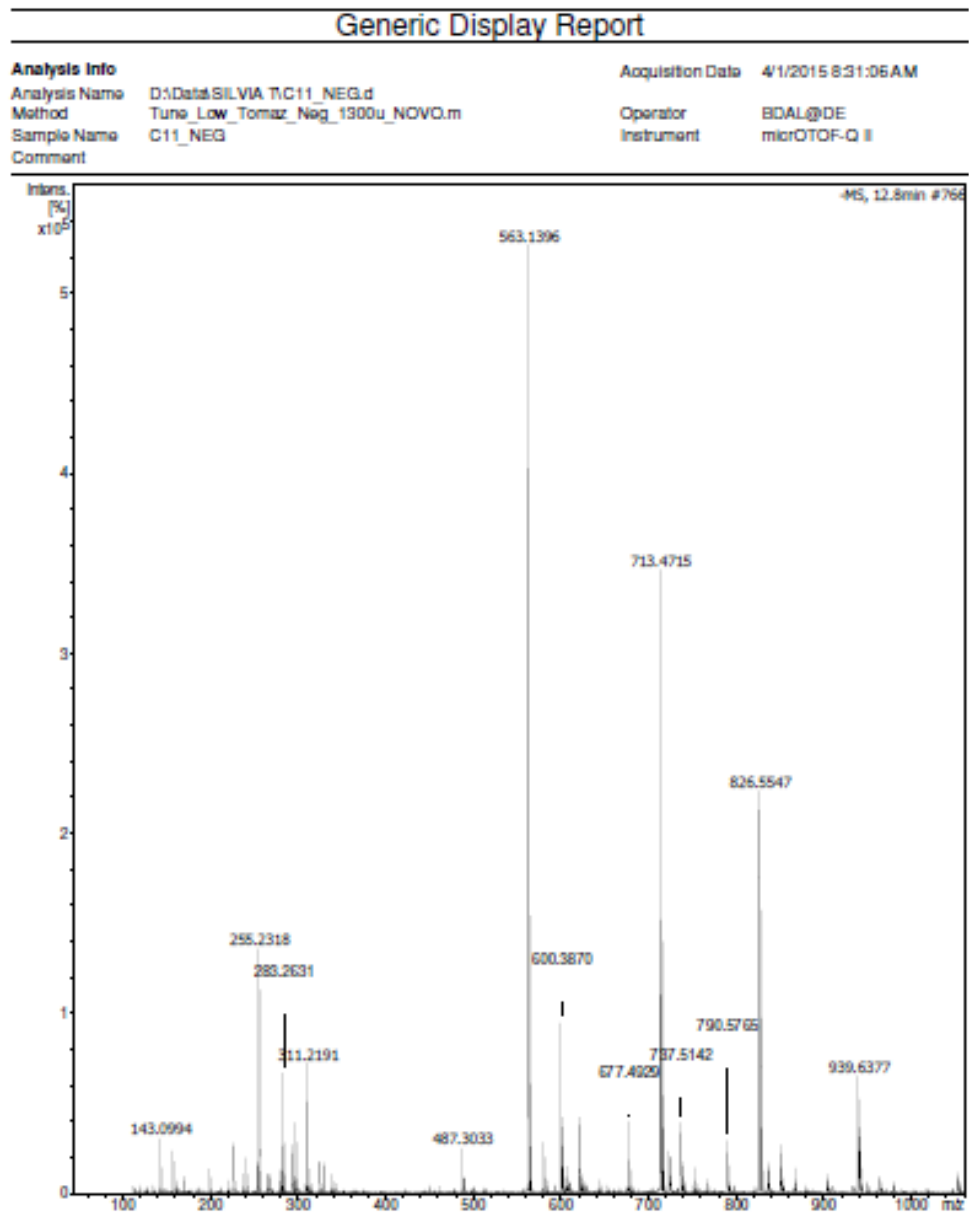


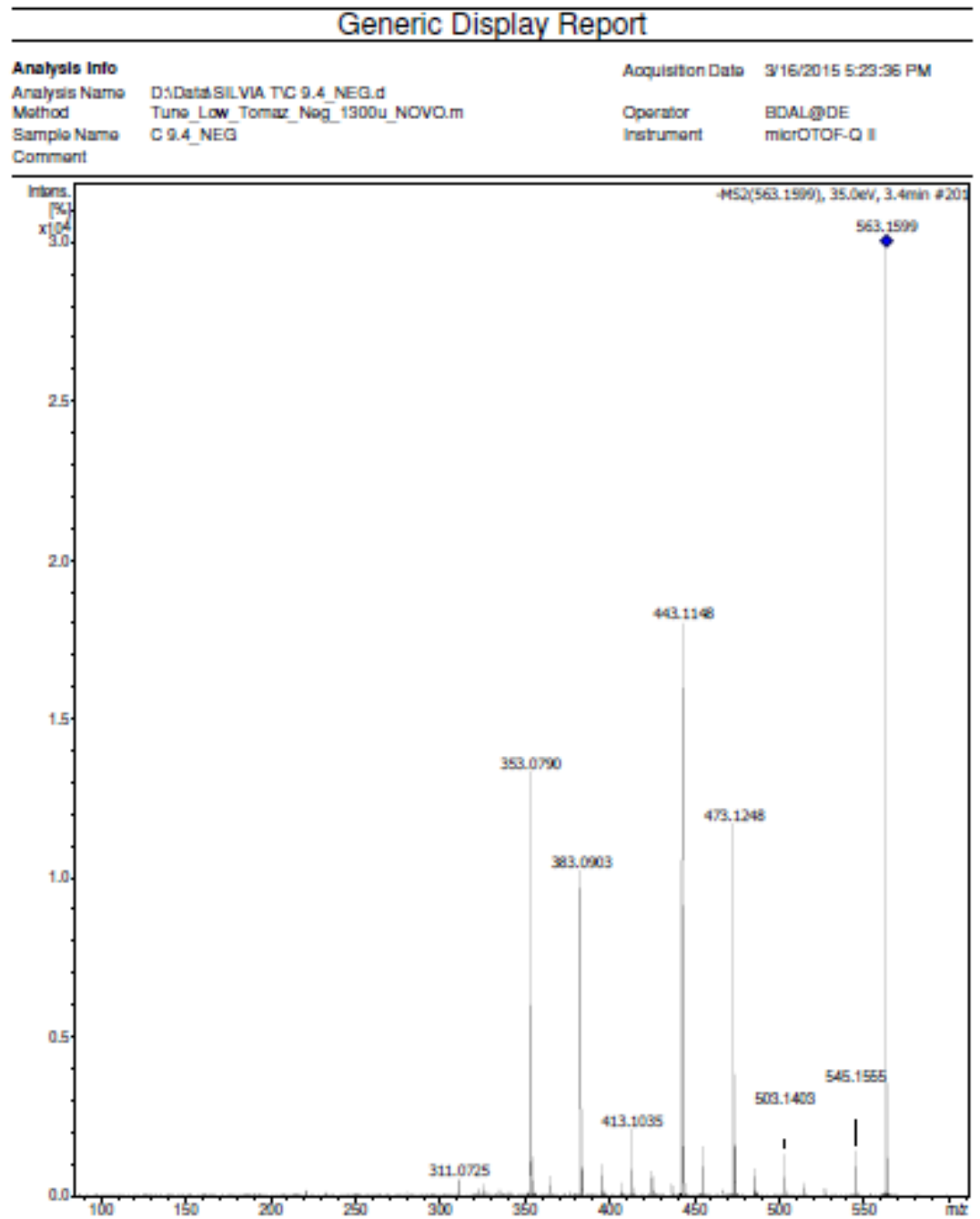
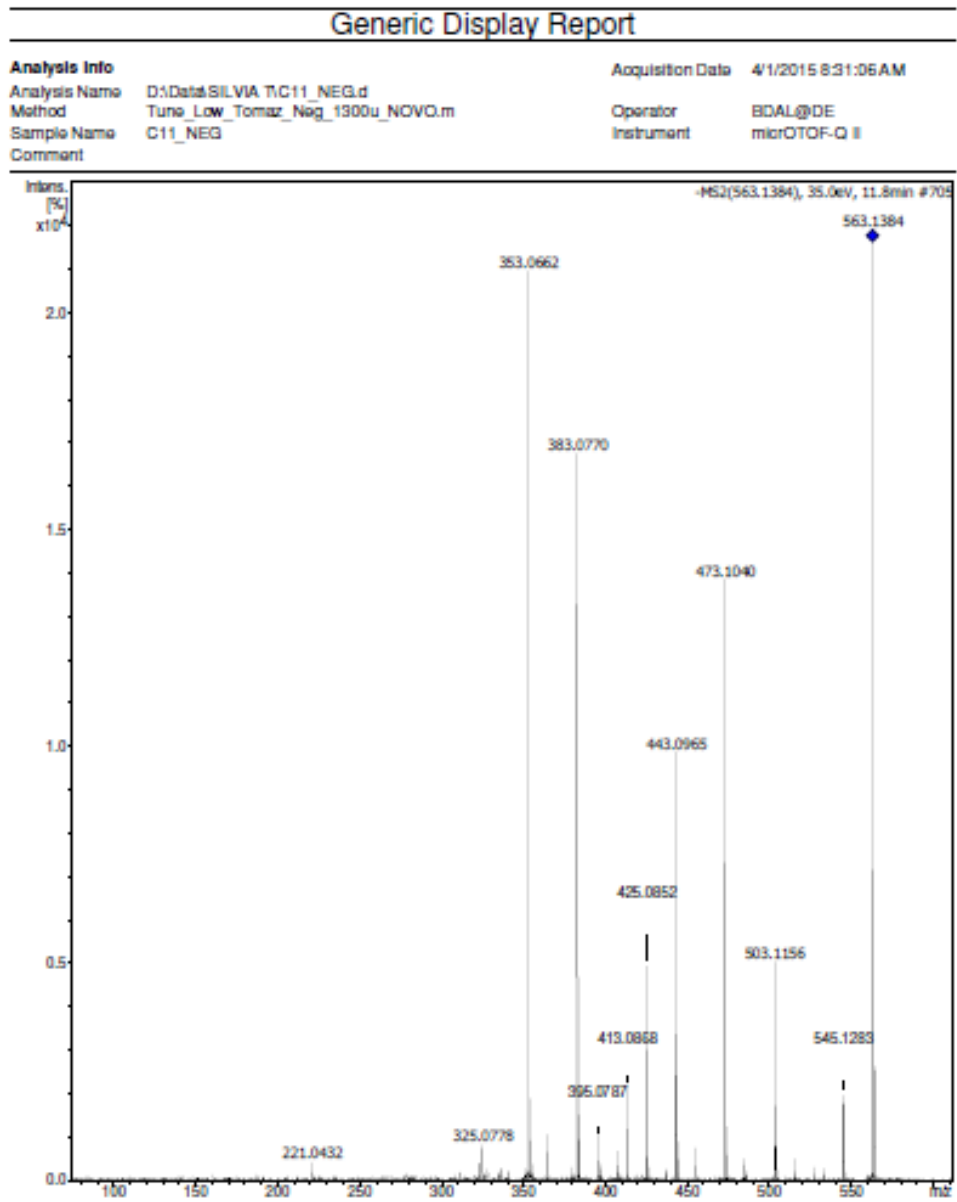
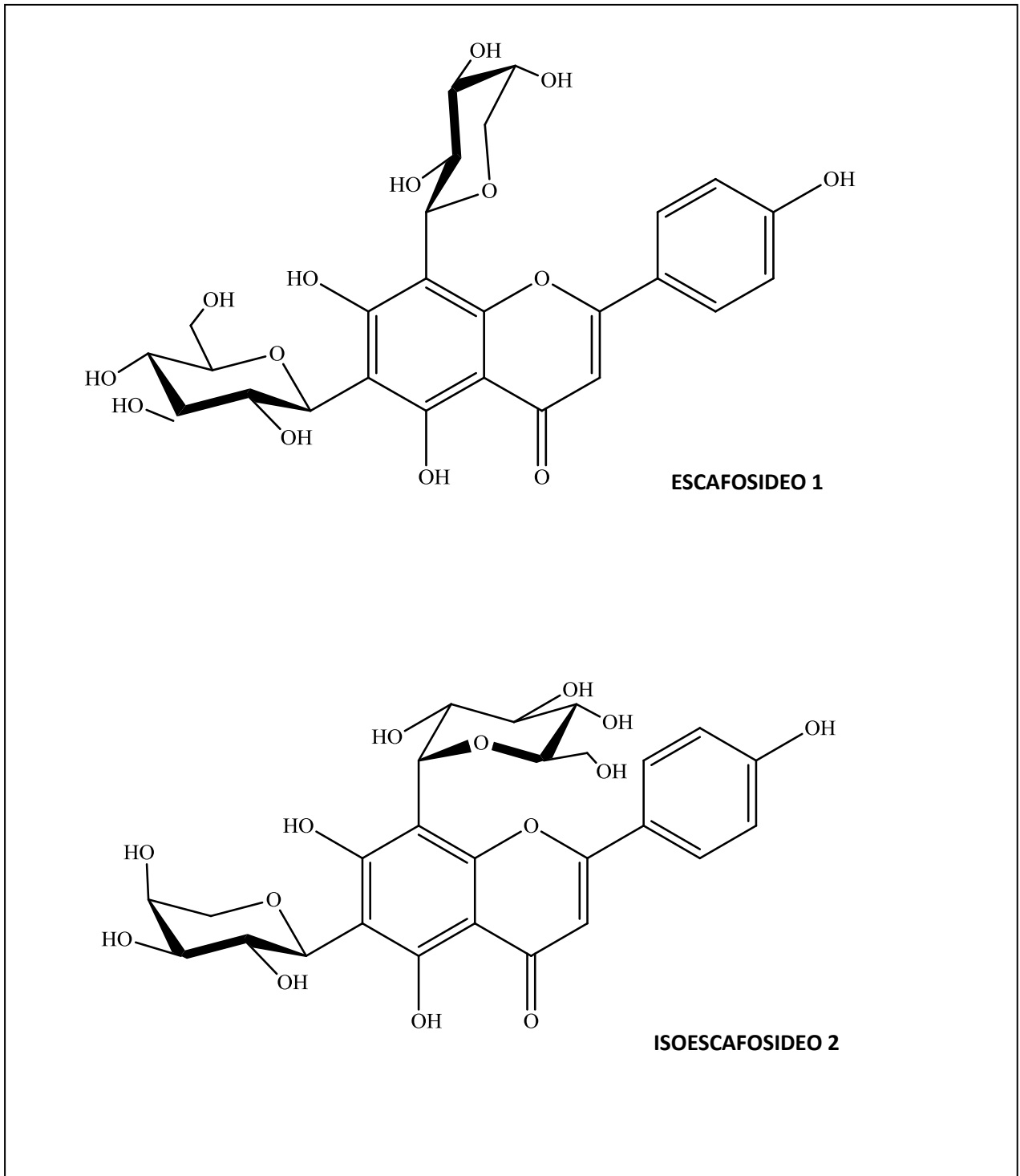
Figura 14- Espectro de MS/MS em alta resolução (modo negativo) do íon  $m/z$  563.1599

Figura 15- Espectro de MS/MS em alta resolução (modo negativo) do íon  $m/z$  563.1384

**Figura 16- Flavonoides C-glicosilados: escafosideo (1) e isoescafosideo (2) isolados de *C.spiralis***





### 5.3 ANÁLISE DO TEOR DE MACRO E MICRONUTRIENTES

Os resultados das análises do teor de macro e micronutrientes da droga vegetal (pó inicial e pó final) e dos extratos estão apresentados nas Tabelas 3a e 3b.

Podemos observar que os elementos cálcio, magnésio, cobre, manganês, zinco e cromo, os quais têm apresentado importante papel no controle da glicemia (MERTZ, 1981; MOORADIAN E MORLEY, 1987; FRANCISCONI, 2014) estão presentes na espécie vegetal estudada, a qual pode ser considerada uma rica fonte desses elementos.

Akpabio et al. (2012) analisaram a composição de elementos inorgânicos no caule de *C. afer*. Os autores verificaram que a espécie, também relatada como hipoglicemiante (Tchamgoue et al., 2015), acumula minerais essenciais para o metabolismo humano.

Pacientes com diabetes tipo 2 possuem baixa concentração de cromo no sangue em comparação com indivíduos sem a doença. Desta forma, é viável o uso da droga vegetal ou dos extratos de *C. spiralis* visto que o mesmo foi encontrado em concentrações significativas nestas amostras e que este elemento favorece a homeostase da glicose (SIDDIQUI et al., 2014).

Além da presença destes importantes minerais, observa-se também uma alta concentração do elemento alumínio tanto na droga vegetal como também nos extratos. Este elemento é considerado tóxico ao organismo e está relacionado a casos de insuficiência renal bem como a complicações sérias do diabetes tipo 2 (FLORES et al., 2011).

Tabela 3a: Média do teor de macro e micro nutrientes de folhas de *C. spiralis* em µg/g.

ELEMENTOS	D.V INICIAL	D.V FINAL	E. HEXANO	E.ACETATO ETILA	E.METANÓLICO	E. AQUOSO
Cálcio	6186,461 <sup>b</sup>	8646,339 <sup>a</sup>	707,579 <sup>c</sup>	297,739 <sup>c</sup>	388,490 <sup>c</sup>	340,687 <sup>c</sup>
Magnésio	3401,847 <sup>a</sup>	4472,238 <sup>a</sup>	206,340 <sup>c</sup>	42,514 <sup>d</sup>	76,922 <sup>d</sup>	1894,700 <sup>b</sup>
Ferro	727,341 <sup>b</sup>	747,605 <sup>b</sup>	30,237 <sup>c</sup>	3,534 <sup>d</sup>	19,230 <sup>c</sup>	2051,580 <sup>a</sup>
Cobre	1,323 <sup>b</sup>	5,599 <sup>b</sup>	1,620 <sup>b</sup>	1,648 <sup>b</sup>	2,760 <sup>b</sup>	22,238 <sup>a</sup>
Zinco	24,159 <sup>b</sup>	37,45 <sup>b</sup>	25,297 <sup>b</sup>	12,857 <sup>b</sup>	22,176 <sup>b</sup>	144,658 <sup>a</sup>
Manganês	296,504 <sup>a</sup>	382,811 <sup>a</sup>	8,316 <sup>b</sup>	0,267 <sup>e</sup>	1,150 <sup>b</sup>	242,959 <sup>a</sup>
Níquel	2,929 <sup>a</sup>	n.d	1,086 <sup>a</sup>	0,505 <sup>a</sup>	1,009 <sup>a</sup>	2,159 <sup>a</sup>
Molibdênio	0,350 <sup>a</sup>	0,102 <sup>b</sup>	0,007 <sup>d</sup>	0,0006 <sup>e</sup>	0,039 <sup>c</sup>	0,136 <sup>b</sup>
Samário	0,078 <sup>b</sup>	0,091 <sup>a</sup>	0,045 <sup>c</sup>	0,007 <sup>e</sup>	0,006 <sup>e</sup>	0,014 <sup>d</sup>
Térbio	0,008 <sup>b</sup>	0,012 <sup>a</sup>	0,005 <sup>c</sup>	0,0007 <sup>e</sup>	0,0007 <sup>e</sup>	0,002 <sup>d</sup>
Túlio	0,004 <sup>a</sup>	0,001 <sup>b</sup>	0,001 <sup>b</sup>	n.d	n.d	0,001 <sup>b</sup>
Itérbio	0,012 <sup>b</sup>	0,020 <sup>a</sup>	0,010 <sup>c</sup>	0,003 <sup>d</sup>	0,002 <sup>d</sup>	0,011 <sup>b</sup>
Lantânio	0,583 <sup>a</sup>	0,632 <sup>a</sup>	0,173 <sup>b</sup>	0,033 <sup>c</sup>	0,029 <sup>c</sup>	0,041 <sup>c</sup>
Cério	1,377 <sup>a</sup>	1,615 <sup>a</sup>	0,416 <sup>b</sup>	0,074 <sup>d</sup>	0,071 <sup>d</sup>	0,121 <sup>c</sup>
Disprósio	0,049 <sup>a</sup>	0,066 <sup>a</sup>	0,024 <sup>b</sup>	0,006 <sup>c</sup>	0,003 <sup>c</sup>	0,016 <sup>b</sup>
Érbio	0,021 <sup>a</sup>	0,021 <sup>a</sup>	0,012 <sup>b</sup>	0,003 <sup>c</sup>	0,002 <sup>c</sup>	0,024 <sup>a</sup>
Európio	0,023 <sup>a</sup>	0,032 <sup>a</sup>	0,011 <sup>b</sup>	0,002 <sup>d</sup>	0,002 <sup>d</sup>	0,005 <sup>c</sup>
Gadólínio	0,089 <sup>a</sup>	0,107 <sup>a</sup>	0,047 <sup>b</sup>	0,008 <sup>d</sup>	0,008 <sup>d</sup>	0,014 <sup>c</sup>
Hólmio	0,009 <sup>a</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,005 <sup>b</sup>	0,001 <sup>d</sup>	0,001 <sup>d</sup>	0,004 <sup>c</sup>
Lutécio	0,003 <sup>a</sup>	0,003 <sup>a</sup>	0,001 <sup>c</sup>	0,0003 <sup>d</sup>	0,0007 <sup>d</sup>	0,002 <sup>b</sup>
Neodímio	0,493 <sup>a</sup>	0,582 <sup>a</sup>	0,206 <sup>b</sup>	0,036 <sup>c</sup>	0,029 <sup>c</sup>	0,041 <sup>c</sup>
Praseodímio	0,122 <sup>a</sup>	0,146 <sup>a</sup>	0,046 <sup>b</sup>	0,008 <sup>c</sup>	0,008 <sup>c</sup>	0,011 <sup>c</sup>
Escândio	0,467 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Tório	0,069 <sup>b</sup>	0,057 <sup>b</sup>	0,026 <sup>c</sup>	0,018 <sup>d</sup>	0,015 <sup>d</sup>	0,209 <sup>a</sup>
Antimônio	0,144 <sup>a</sup>	n.d	0,014 <sup>b</sup>	0,022 <sup>b</sup>	0,107 <sup>a</sup>	0,121 <sup>a</sup>
Estanho	1,197 <sup>a</sup>	0,128 <sup>c</sup>	0,229 <sup>b</sup>	0,028 <sup>d</sup>	0,155 <sup>c</sup>	0,286 <sup>b</sup>
Cádmio	0,058 <sup>b</sup>	n.d	0,049 <sup>c</sup>	0,022 <sup>d</sup>	0,042 <sup>c</sup>	0,099 <sup>a</sup>
Bário	21,113 <sup>a</sup>	22,404 <sup>a</sup>	4,221 <sup>b</sup>	1,177 <sup>b</sup>	2,211 <sup>b</sup>	6,114 <sup>b</sup>

Médias com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott 5%.

D.V: droga vegetal.

n.d: não detectado na amostra.

Tabela 3b: (continuação) Média do teor de macro e micro nutrientes de folhas de *C.spiralis* em µ/g.

ELEMENTOS	D.V INICIAL	D.V FINAL	E. HEXANO	E.ACETATO ETILA	E.METANÓLICO	E. AQUOSO
Chumbo	1,533 <sup>a</sup>	0,906 <sup>b</sup>	0,731 <sup>b</sup>	0,370 <sup>b</sup>	0,580 <sup>b</sup>	1,118 <sup>a</sup>
Berílio	n.d	n.d	0,004 <sup>c</sup>	0,006 <sup>c</sup>	0,018 <sup>b</sup>	0,100 <sup>a</sup>
Bismuto	n.d	0,786 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d	0,019 <sup>b</sup>
Rubídio	30,777 <sup>c</sup>	20,933 <sup>c</sup>	5,397 <sup>d</sup>	0,520 <sup>e</sup>	78,979 <sup>b</sup>	229,665 <sup>a</sup>
Cromo	3,946 <sup>c</sup>	0,239 <sup>d</sup>	3,835 <sup>c</sup>	6,762 <sup>b</sup>	7,218 <sup>a</sup>	6,580 <sup>b</sup>
Selênio	n.d	0,499 <sup>b</sup>	0,179 <sup>c</sup>	0,192 <sup>c</sup>	1,114 <sup>a</sup>	0,698 <sup>b</sup>
Alumínio	3078,530 <sup>a</sup>	576,621 <sup>b</sup>	267,098 <sup>c</sup>	196,158 <sup>d</sup>	205,701 <sup>c</sup>	660,387 <sup>b</sup>
Prata	0,338 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cobalto	0,559 <sup>a</sup>	n.d	0,018 <sup>c</sup>	0,002 <sup>d</sup>	0,008 <sup>c</sup>	0,116 <sup>b</sup>
Tálio	0,003 <sup>b</sup>	0,002 <sup>c</sup>	0,001 <sup>d</sup>	0,001 <sup>d</sup>	0,007 <sup>b</sup>	0,023 <sup>a</sup>
Estrôncio	22,257 <sup>b</sup>	30,372 <sup>a</sup>	2,161 <sup>c</sup>	0,936 <sup>e</sup>	1,329 <sup>d</sup>	1,510 <sup>d</sup>
Lítio	0,131 <sup>c</sup>	0,032 <sup>d</sup>	0,437 <sup>b</sup>	0,346 <sup>b</sup>	0,529 <sup>a</sup>	0,551 <sup>a</sup>
Arsênio	0,982 <sup>b</sup>	0,520 <sup>b</sup>	20,542 <sup>a</sup>	18,071 <sup>a</sup>	16,793 <sup>a</sup>	17,539 <sup>a</sup>

Médias com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott 5%.

D.V: droga vegetal.

n.d: não detectado na amostra.

#### 5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados da avaliação da atividade dos extratos (hexânico, acetato de etila, metanólico, aquoso) e das substâncias isoladas (escafósídeo e isoescafósídeo) frente à inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase estão apresentados na Tabela 4.

Analisando os dados da Tabela 4, observamos que os flavonoides escafósídeo e isoescafósídeo apresentaram significativa atividade inibitória frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase. Estudos envolvendo a busca de substâncias com ação hipoglicemiante sugerem que constituintes fenólicos da classe dos flavonoides apresentam potencial efeito no tratamento do *diabetes mellitus* (BRAHMACHARI, 2011; MALHEIROS et al., 2010; LINO et al., 2004).

A obtenção de agentes inibidores de  $\alpha$ -glicosidase, a partir de fontes naturais, tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores que buscam um tratamento para o diabetes com baixo efeito colateral (TUNDIS e MENICHINI, 2010; XIAO et al., 2013; YIN et al., 2014).

Flavonoides estão entre às classes de produtos naturais com ação inibitória sobre esta enzima, e um grande número de publicações estão voltadas ao estudo da relação estrutura atividade destas substâncias frente à  $\alpha$ -glicosidase (XIAO et al., 2013; YIN et al., 2014).

De acordo com Gao et al. (2004), a presença de hidroxilas nas posições 5,6 e 7 de flavonas é crucial para que se tenha atividade inibitória da enzima.

Gao e Kawabata (2004) também mostraram que a presença de grupamentos hidroxilas nas posições 2',4', 3' e 4', e 3',4',5' aumentaram a atividade inibitória frente à  $\alpha$ -glicosidase em relação às flavonas que não tinham hidroxilas no anel B.

Tais observações são importantes para justificar a atividade apresentada pelas substâncias escafósídeo e isoescafósídeo frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase. Conforme observado na Figura 15, as flavonas isoladas apresentam grupamentos hidroxila livres, nas posições 5,7 e 4'.

A glicosilação de flavonoides também é outro ponto chave para a atividade inibitória da enzima. Segundo Xiao et al. (2013), a glicosilação de flavonoides leva à uma diminuição da atividade destas substâncias frente à  $\alpha$ -glicosidase, sendo que os flavonoides monoglicosilados apresentam maior atividade em relação aos poliglicosilados.

Estudo realizado por Li et al. (2009) mostrou que a glicosilação de flavonas nas posições C6 ou C8 levou à diminuição da atividade inibitória destas substâncias frente à  $\alpha$ -glicosidase. Neste mesmo estudo, o autor demonstrou que a glicosilação em C-6 tem um impacto relativamente menor que em C-8.

De acordo com estes dados, o efeito inibitório das flavonas, escafosídeo e isoescafosídeo sobre a  $\alpha$ -glicosidase menor em relação à acarbose pode ser justificado pelo fato destas moléculas serem glicosiladas em C6 e C8.

A relação entre a diminuição do efeito inibitório sobre enzima  $\alpha$ -glicosidase e a presença de açúcares na molécula dos flavonoides pode ser justificada devido aumento do tamanho e da polaridade da molécula, após a adição de grupamentos de açúcares, resultando em uma estrutura não planar, com conseqüente impedimento estérico e enfraquecimento da interação entre as moléculas dos flavonoides e a enzima (XIAO et al., 2013).

Ainda na Tabela 4, verifica-se também que o extrato acetato de etila é 1,95 vezes mais potente que a acarbose ( $IC_{50}$  de  $408,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 2,34 vezes mais potente que o escafosídeo e 2,22 vezes mais potente que o isoescafosídeo.

A expressiva atividade deste extrato pode estar relacionada à presença das flavonas C-glicosiladas somada à significativa presença do elemento inorgânico cromo, o qual tem demonstrado ser um elemento essencial para a ação da insulina no controle do diabetes (CEFALU; HU, 2004; CHOWDHURY et al, 2003).

Quando um paciente de diabetes busca um tratamento alternativo, à base de plantas medicinais, frequentemente, é utilizado preparações farmacêuticas na forma de chás ou tinturas (LI et al., 2004).

A presença das flavonas escafosídeo e isoescafosídeo, com ação inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase, e a constatação de que o extrato acetato de etila, rico em cromo, apresentou ação inibitória superior à acarbose, justifica o uso popular da espécie *C. spiralis* como hipoglicemiante.

**Tabela 4:  $IC_{50}$  dos extratos e flavonoides isolados de *C. spiralis*.**

Amostras	$IC_{50}$		
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\mu\text{M}$	mM
Acarbose (Sigma <sup>®</sup> )	798,70 <sup>b</sup>	1237,14 <sup>a</sup>	$1.2 \pm 0.4^a$
Isoescafosídeo (C11)	910,50 <sup>c</sup>	1613,93 <sup>b</sup>	$1.6 \pm 0.2^b$
Escafosídeo (C9.4)	954,12 <sup>c</sup>	1691,25 <sup>b</sup>	$1.6 \pm 0.4^b$
Extrato Acetato de Etila	408,40 <sup>a</sup>	-	-
Extrato Aquoso	n.d	n.d	n.d
Extrato Hexânico	n.d	n.d	n.d
Extrato Metanólico	n.d	n.d	n.d

n.d.: não determinada em concentrações  $\leq$  à  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Acarbose : controle positivo

## 6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato clorofórmio de *C. spiralis* resultou no isolamento e identificação estrutural de duas flavonas C-glicosiladas, escafósídeo e isoescafósídeo, as quais estão sendo relatadas pela primeira vez na espécie.

Escafósídeo e isoescafósídeo apresentaram atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase.

A espécie *C. spiralis* acumula quantidades significativas de minerais como cálcio, magnésio, cobre, manganês, zinco e cromo, os quais são importantes no controle da glicemia. Além destes elementos há uma concentração elevada de alumínio nas amostras o qual é considerado tóxico ao organismo levando a complicações do diabetes.

A presença das flavonas escafósídeo e isoescafósídeo, com ação inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase, e a constatação de que o extrato acetato de etila apresentou ação inibitória superior à acarbose, justifica o uso popular da espécie *C. spiralis* como hipoglicemiante.

## REFERÊNCIAS

- AKPABIO, U. et al. Evaluation of phytochemical, proximate and mineral element composition of stem of *Costus afer* (Bush cane). **Asian Journal of Plant Science and Research**, v.2 , n.5, p. 607-612. 2012.
- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Ed.Elsevier, 1989, 564p.
- ANAGA, A.O et al.. Investigations of the methanolic leaf extract of *Costus afer*. Ker for pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v.11, n.2-3, p. 242-248. 2004.
- ANDERSON, R. A. Chromium, glucose intolerance and diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 17, n. 6, p. 548-555. 1998.
- ANTUNES, A.S. et al. Flavonol glycosides from leaves of *Costus spiralis*. **Fitoterapia**, v.71, n.5, p. 507-510. Sep. 2000.
- ANYASOR, G.N. et al Hexane fraction of *Costus afer* ker Gawl leaves inhibited mitochondrial membrane permeability transition, F<sub>1</sub> F<sub>0</sub> adenosine triphosphatase and scavenged nitric oxide and hydrogen peroxide. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v.3, n.2. Set 2014.
- ANYASOR, G.N. et al. Chemical constituents in n-butanol fractions of *Costus afer* ker Gawl leaf and stem. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v.3, n. 2, p.78-84. Apr-jun, 2014.
- ARAUJO, F.P.; OLIVEIRA, P.E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae.).
- ARULSELVAN, P. et. al. Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v.4, n. 4, p. 607-617. Oct.-Dec. 2014.
- AZEVEDO, L.F.P. et al. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n.2, p.209-215. 2014.
- BAKIRDERE, S. et al. Effect boron on human health. **The Open Mineral Processing Journal**, v.3, p-54-59. Jan. 2010.
- BHUVANESWARI, et al. GC-MS Analysis of bioactive components from the ethanolic leaf extract of *Costus spicatus*. **International Journal of Natural Products Research**, v. 4, n.1, p.12-14, 2014.
- BÖME,F. et al. 24-methylpollinastanone, related triterpenoids and sterols from *Costus tonkinensis*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1041-1044. July 1997.
- BRAHMACHARI, G. Bio-flavonoids with promising antidiabetic potentials: A critical survey. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, p. 187-212. 2011.
- BRUDZINSKA-KOSIOR, A. et al. Metal contents in *Centaureum erythraea* and biometry at various levels of environmental pollution. **Exotoxicology and Environmental safety**, v. 80, p. 349-354. 2012.

CHENG, A.Y.Y.; FANTUS, I.G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v.172(2), p. 213-226. 18 jan. 2005.

CEFALU, W.T.; HU, F.B. Role of chromium in human health and in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 11. 2004.

CHOO, C.Y. et al. Vitexin and isovitexin from the leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo  $\alpha$ -glucosidase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p.-776-781. 2012.

CHOWDHURY, S. et al. Role of chromium in human metabolism, with special reference to type 2 diabetes. **Japi**. v. 51. 2003.

CORREA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional, 1984.

DA SILVA, B.P.; PARENTE, J.P. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus spiralis*. Zeitschrift für Naturforschung C, **Journal of Biosciences**, v. 59, n.1-2, p.81-85.

DU, Z-y. et al.  $\alpha$ -glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, issue. 2, p. 213-218. Feb. 2006.

DUARTE, R.C. Efeito antidiabético da droga vegetal, extrato e flavonoides de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe em modelo experimental *in vivo*. Tese apresentada à Universidade de Ribeirão Preto UNAERP, para obtenção do título de Doutora. Ribeirão Preto, 2014.

DURAI PANDIYAN, D. et al. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12:13, mar. 2012.

EBRAHIM, A. M. et al. Study on selected trace elements and heavy metals in some popular medicinal plants from Sudan. **J Nat. Med.** v. 66, p. 671-679. 2012.

ELIZA, J. et al. Antioxidant activity of costunolide and eramanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p.467-472. 5 dec. 2010.

EZEJIOFOR, A.N. et al. Cytological and biochemical studies during the progression of alloxan-induced diabetes and possible protection of an aqueous leaf extract of *Costus afer*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n.10, p.745-752. Out. 2014.

FRANCISCONI, L.S. Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências na área de tecnologia nuclear- aplicações- IPEN, Autarquia associada a Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FRANCO, M. J. et al. Determinação de metais em plantas medicinais comercializadas na região de Umuarama-PR. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n.2, p. 121-127. 2011.



GAO,H.; KAWABATA,J. Importance of the B ring and its substitution on the alpha-glucosidase inhibitory activity of baicalein, 5,6,7- trihydroxyflavone. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p.1858-1864. 2004.

GAO,H. et al. Structure activity relationship for alpha-glucosidase inhibition of baicalein, 5,6,7- trihydroxyflavone: the effect of A-ring substitution. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p.369-375. 2004.

GARCIA, T.A. Fitoquímica e atividade anti-inflamatória de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe. Dissertação submetida ao programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Belo Horizonte, 2011.

GASPARRI, S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/ antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil, para obtenção do grau de Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular. Canoas, 2005.

GHANI, U. Re-exploring promising  $\alpha$ -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: finding needle in the haystack. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n.103, p.133-162, 2015.

GJORGIEVA, D. et al. Metallic trace elements in medicinal plants from Macedonia. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 1, p. 109-114. 2011.

GOODMAN, Louis Sanford; GILMAN, Alfred. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Editor: Laurence I Bruton, John S. Lazo, Keith L. Parker; tradução: Carlos Henrique de Araújo Cosendey et. al. 11ªed- Porto Alegre : AMGH editora Ltda, 2010. 1844p.

HARBORNE, J.B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Ed. Chapman & Hall, 1994. 661p.

GARCIA, E. et al. Chromium levels in spices and aromatic herbs. **The Science of the total environment**, v. 247, p. 51-56. 2000.

GULATI, V.; et al. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of tradicional medicinal plants: potential application in the management of hyperglycemia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.77, p. 1-9. Jun. 2012.

GUPTA, M.M., et al. Aliphatic hydroxyketones and diosgenin from *Costus speciosus* roots. **Phytochemistry**, v. 20, n.11, p. 2553-2555. 1981.

GUPTA, M.M., et al. Aliphatic compounds from *Costus speciosus* roots. **Phytochemistry**, v.21, n.1, p-230-231.1982.

GUPTA,M.M., et al. Oxo acids and branched fatty acid ester from rhizomes of *Costus speciosus*. **Phytochemistry**, v. 25, n.8, p.1899-1986. 1986.

HABSAH, M. et al. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n. 3, p. 403-410. Out.2000.

- HOLLMAN, P.C. et al. The sugat moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. **Free Radical Research**, v. 31,n.6, p. 569-573. Dec. 1999.
- HUO, Y.; WINTERA, W.D.; YAO, DA-LIN. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytother Res.**, v.17, p.48-55, 2003.
- IBARRA, M. J. et al. Caracterización fitoquímica y efecto hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su relación con la presencia del cromo como factor de tolerancia a la glucosa. **Información Tecnológica**, v.20, n. 5, p. 55-65. 2009.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION- IDF. Diabetes Atlas . Sixth Edition.2013. Disponível em : [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas). Acesso em : 14 setembro 2014.
- JABEEN, S. et al. Determination of major and trace elements in ten important folk therapeutic plants of Haripur basin, Pakistan. **Journal of medicinal plants research**, v. 4, n. 7, p. 559-566. 2010.
- JOSE,B.; REDDY,L.J. Analysis of the essential oil of the stems, leaves and rhizomes of the medicinal plant *Costus pictus* from Southern India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2 , suppl. 2, p.100-101. Fev. 2010.
- KALAILINGAM, P. et al. Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)- induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 21, n.10, p. 1154-1161. 16 set. 2014.
- KALAILINGAM, P. et al. Isolation and quantification of flavonoids from ethanol extract of *Costus Igneus* rhizome (CiREE) and impact of CiREE on hypoglycaemic, electron microscopic studies of pancreas in streptozotocin (STZ)- induced diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n.3, p. 285-297. Jul- Set. 2013.
- SIDDIQUI, K. et al. Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-9. 2014.
- KHUDA, F. et al. Metal analysis, phytotoxic, insecticidal and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhawa. **Pak. J. Pharm. Sci**, v. 25, n. 1, p. 51-58. 2012.
- KITE, G.C. et al; Data directed scan sequence for the general assignment of C-glycosylflavone in plant extracts by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p.123-131. 2006.
- LI, W. L. et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 1-21. 2004.
- LI, F. et al. Screening and structural characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS and SORI-CID FTICRMS. **J.Am. Soc. Mass Spectrom**, v.20, p.1496-1503.

- LIBERATO, M. C. T. C. et al. Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará State, Northeastern Brazil. **Food Sci. Technol**, v. 33, n. 1, p. 38-46. 2013.
- LIN, Rui-Chao et al.. Aferoside A, a steroidal saponin from *Costus afer*. **Phytochemistry** , v. 43, n.2, p. 665-668. Oct. 1996.
- LINO, C. S. et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.1, n. 27, p. 125-127. 2004.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Mediciniais no Brasil. Nativas e Exóticas. Nova Odessa, SP.: Instituto Plantarium, 512p. 2002.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Ed. Springer-Verlag, 1970. 345p.
- MAHMOOD, U. et al. Benzoquinones from *Costus speciosus* seeds. **Phytochemistry**, v.23, n.8, p.1725-1727. 1984.
- MALHEIROS, S.V.P. et al. Effect of *Myrcia guianensis* (Pedra-ume-caa) infusion on Wistar rat glycemia and lipidemia. **Perspectivas Médicas**, v.21, n.2, p.17-23. 2010
- MARLES, R.J.; FARNSWORTH, N.R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v.2, n. 2, p. 137- 189. Out. 1995.
- MELO, E.B.  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidasas como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.24, n.9, p.840-843, 2006.
- MERTZ, W. The essential trace elements. **Science**, v. 213, n.4512, p. 1332-1338, 18 Sep. 1981.
- MERTZ, W. Chromium in human nutrition: a review. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.4, p.626-633.
- MOORADIAN, A.D.; MORLEY, J.E. Micronutrient status in diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, n.5, p. 877-895. May 1987.
- NAIR, S.V.G. et al. Apoptotic and inhibitory effect on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG<sub>2</sub> cells by methanol leaf extract of *Costus speciosus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-10. 10 Apr. 2014.
- NARDI, E.P. et al. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, v.112, p.727-732. 2009.
- NEGI, J. S. et al. Determination of mineral contents of *Digitalis purpurea* L. and *Digitalis lanata* Ehrh. **Journal of soil Science and Plant Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 463-469. 2012
- PATEL, D.K. et al. Diabetes mellitus: an overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2(5), p.411-420. May 2012.

QUINTANS JÚNIOR, L.J. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n.10, p. 1097-1102. Oct. 2010.

RAJASEKARAN, S.et.al. Mineral contents of Aloe vera leaf gel and their role on streptozotocin-induced diabetic rats. **Biological Trace Element Research**, v.108, p.185-195. Feb. 2005.

REGE, A. et.al. Effect of *Costus pictus* D. Don. on pepsin enzyme. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n. 5, p.178-180. 24 Mar. 2014.

REGE, A. et.al. Effect of *Costus pictus* D.Don on carbohydrate hydrolyzing enzymes. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n. 7, p.278-280. 18 May 2014.

REMYA,R.; DANIEL,M.. Phytochemical and pharmacognostic investigation of antidiabetic *Costus pictus* D.Don. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research**, n.3, n. 1, p. 30-39. 6 Mar. 2012.

RIBEIRO, J.C.L. Análise química e biológica de metabólitos voláteis isolados de plantas das famílias Myrtaceae e Zingiberaceae. Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

SALES, D.S. et. al. *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. as an adjuvant treatment for type-2 diabetes mellitus: a non-controlled, pilot study. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 12, p. 1816-1821. Dec. 2014.

SHINDE, J. et. al.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels seed kernel in vitro and in *Goto-kakizaki* (GK) rats. **Carbohydrate Research**, v. 343, n.4, p. 1278-1281. 19 may. 2008.

SHINY, C.T. et al. Phytochemical investigation of insulin plant “*Costus pictus*” D.Don. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research** , v.4, n. 2, p.97-104. 26 Apr 2013.

SIDHU, A.K. et al. In vitro evaluation of anti-diabetic activity of leaf and callus extracts of *Costus pictus*. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 6, p. 1622-1625. Jun. 2014.

SILVA, B.P. et al. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Pytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 87-92. Jan. 2000.

SILVA, B.P.; PARENTE, J.P. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 3, p. 239-242. 15 Fev. 2003.

SINGH, R., et al. Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 51-70. 28 Oct. 2013.

- SINGH, S.B.; THAKUR, R.S. Costusoside-I and Costusoside-J, two new furostanol saponins from the seeds of *Costus speciosus*. **Phytochemistry**, v.21, n.4, p.911-915. 1982.
- SPECHT, C.D; STEVENSON, D.Wm. A new phylogeny-based generic classification of Costaceae (Zingiberales), v.55, n.1, p. 153-163. Feb. 2006.
- SURYA, S. et.al. Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 5, p. 337-347. Oct. 2014.
- TABUSSUM, A. et al.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Chrozophora plicata*. **Phytochemistry Letters**, v.6, n.4, p.614-619. Nov.2013.
- TADERA, K. et al. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. **Journal Nutr Sci Vitaminol**, v.52, p.149-153. 2006.
- TALHI. O.; SILVA, M.S. Advances in C-glycosylflavonoid Research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 7, p.859-896.2012.
- THAO, N.P. et al. Rat intestinal sucrase inhibition of constituents from the roots of *Rosa rugosa* Thunb. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, p.1192-1196, 2014.
- TINTINO, S.R., et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e moduladora dos extratos etanólico e hexânico de bulbo de *Costus arabicus* . **Bioscience Journal**, v. 29, n.3, p.732-738. May / June 2013.
- TCHAMGOUE, A.D., et al. *Costus afer* possesses carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory activity and antioxidant capacity in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015 (2015), p.1-10. June 2015.
- TSCHESCHE, R.; PANDEY, V.B. Steroidal saponins of *Costus speciosus*. **Phytochemistry**, v. 17, p.1781-1782. 1978.
- TUNDIS, R.; et al. Natural products as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10(4), p. 315-331. Apr. 2010.
- VIEIRA, G.P. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras spp.* Dissertação para obtenção do grau de mestre, do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental, Área de Bromatologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2013.
- VIEL, T.A., et al. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n. 2, p. 193-198. Aug. 1999.
- VISHNU, B. et al. Antidiabetic activity on insulin plant (*Costus igneus*) leaf extract in diabetic rats. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n.3, p. 608-611. Feb. 2010.
- XIE, C. et al. Flavone C-glicosides from *Viola yedoensis* Makino. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 1204 – 1207. 2003.

YIN, Z. et.al.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v.3, n.3-4, p.136-174. Set-Dez. 2014.

ZENG, P. et.al. Advances in studying of the pharmacological activities and structure–activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3(3), p.154-162. Mar.2013.

ZHANG, J. et al. Determination of mineral elements in *Gentiana rigescens* from different zones of Yunnan, China. . **Biological Trace Element Research**, v. 147, p. 329-333. 2012.

ZHAO, J. et al.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.45, n.2. 2009.

WANG, Z-B. et al.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Acanthopanax senticosus* Harm leaves. **Molecules**, v.17, p.6269-6276. 2012.

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus afer</i>	Aferosideo A (3-O-[[ $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1-2)]- [ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-4)]- $\beta$ -D- glucopyranosyl]-25(R)-spirost-5-em-3 $\beta$ -ol	Raiz	Ciclohexano	-	LIN et al., 1996
	-	Folha	Metanol	Anti-hiperglicêmico Abortivo no terceiro trimestre de gravidez	ANAGA et al., 2004
	-	Folha	Aquoso	Antidiabético Hepatoprotetor	EZEJIOFOR et al., 2014
	Indolizina 2-metoxi-4vinilfenol 3-buten-2-one,4-(4-hidroxi-2,2,6 trimetil-7- oxabicyclo [4.1.0] hepta-1yl) Ácido hexadecanóico, metilo éster (éster metílico de ácido palmítico) ácido n-hexadecanóico (palmítico) 10 Metil-metil-hexadecanoato Ácido 9,12-octadecanóico, metilo éster (éster metílico do ácido linoleico) Ácido 11-octadecenoico, éster metílico Pitol Ácido octadecanóico, éster metílico Ácido oleico 9-octadecenal Eicosano (ácido araquídico) Ácido Cis-vacénico	Folha	Fração n-butanol (metanol)	-	ANYASOR et al., 2014

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus afer</i>	Benzofurano, 2,3-di-hidro (coumaran) 2-metoxi-4vinilfenol (fenol) Ácido hexadecanóico, éster metílico de(éster metílico de ácido palmítico) ácido n-hexadecanóico ( ácido palmítico) ácido cis-vacénico (ômega 7 de ácido graxo) Ácido trans-13-octadecenóico Ácido oléico (ômega 9 de ácidos graxos) Ácido tiociânico, éster 2,4-dinitrofenil 2-Metil-Z, Z-3, 13-octadecadienol Ácido 9-octadecenóico (Z) -, 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil éster 17-Pentatriacontene Tricosane Campesterol (ergost-5-en-3-Ol) Estigmasterol (24- Etilcolesta-5,22-dien-3-ol)	Caule	Fração n-butanol (metanol)	-	ANYASOR et al., 2014
	-		Metanol (fração hexano)	Antioxidante Antiinflamatória	ANYASOR et, 2014
<i>Costus arabicus</i>	-	Bulbo	Etanol Hexano	Antimicrobiana Antifúngica	TINTINO, 2013
<i>Costus igneus</i>	-	Folha	Etanol	Antidiabética	VISHNU, 2010
<i>Costus igneus</i>	Quercetina Kaempferol	Rizoma	Etanol	Antidiabética	KALAILINGAM, 2013
	Diosgenina		Éter de petróleo	Antidiabética Reduz risco doença cardiovascular Reduz colesterol ruim	KALAILINGAM, 2014



Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus pictus</i>	-	Folhas e calos	Aquoso, acetato de etila, acetona, etanol	Antidiabética	SIDHU et al., 2014
	glicosídeo metil-L-β – Arabinopyranose	Folha	Metanol	-	SHINY et al., 2013
	Kaempferol 3',4'-di O-Me-quercetina 4'-O Me-Kaempferol Gentísico Ácido 2,5-dihidroxi benzóico o-cumárico Melilotic α-resorcylic Ácido 3-5-dihidroxi benzoico Ácido p-hidroxi benzoico Ácido cis e trans-p- curmárico	Folha	Água Metanol Éter	Antidiabética	REMYA,R.; DANIEL,M., 2012
	Óxido cis-linalol Linalol Propanoato de linalilo Ácido decanóico Benzoato de etil-etoxi Ácido dodecanóico γ-Eudesmol α-Eudesmol Ácido tetradecanóico 2,4-di-terc-butyl fenol Ácido pentadecanóico Ácido hexadecanóico Pitol Ácido 9,12-octadecadienóico	Caule Folha Rizoma	Óleo essencial	-	JOSE; REDDY, 2010

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus pictus</i>	Ácido octadecanóico 4-etoxi fenol 4-vinil-2-metoxi fenol Isopitol Etano 1,1-dietoxi cis-3-hexenol 2-etoxi butano 2-pentanol Tetradecano $\beta$ -Ionone $\alpha$ -Ionone n-nonadecano Farnesil acetona A-terpinol 9,12-octadecadien-1-ol	Caule Folha Rizoma	Óleo essencial	-	JOSE; REDDY, 2010
	-	Aquoso Hidroalcoólico	Folhas	Inibidor de proteases do HIV  Antidiabética Antioxidante	REGE et al., 2014

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus speciosus</i> ou <i>Cheilocostus speciosus</i>	Tetradecil 13-metilpentadecanoato Tetradecil 11-metiltridecanoato Triacontanol 5 $\alpha$ -stigmast-9(11)-en-3 $\beta$ -ol Ácido triacontanóico Ácido 14-oxotricosanóico Ácido 14-oxoheptacosanóico Ácido 14-oxo-octacosanóico Sitosterol Diosgenina	Rizomas	Fração Hexano	-	GUPTA et al., 1986
	24-hidroxitriacontan-26-one 24-hidroxihentriacontan-27-one Metil triacontanoato Diosgenina Sitosterol	Raízes	Hexano	-	GUPTA et al., 1981
	8-hidroxitriacontan-25-one Me tritriacontanoato	Raízes	Hexano	-	GUPTA et al., 1982
	6-metil dihidrofitilplastoquinona Dihidrofitilplastoquinona A-tocoferolquinona 5 $\alpha$ -stigmast-9(11)-en-3 $\beta$ -ol	Sementes	Hexano	-	MAHAMOOD et al., 1984

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus speciosus</i> ou <i>Cheilocostus speciosus</i>	3- <i>O</i> -{ $\beta$ -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) [ $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glicopiranosil}-26- <i>O</i> -( $\beta$ -D-glicopiranosil-22 $\alpha$ -metoxi-25 <i>R</i> )-furost-5-em-3 $\beta$ , 26 diol e 22-hidroxi.	Sementes	Metanol/ fração n-butanol	-	SINGH; THAKUR, 1982
	2,3,4-tri- <i>O</i> -metil-1-raminose 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-glicose 3,4,6-tri- <i>O</i> -metil-D-glicose 4,6-di- <i>O</i> -metil-D-glicose 2,3,4- <i>O</i> -metil-L-raminose 3,6-di- <i>O</i> -metil-D-glicose	Rizomas	Metanol	-	TSCHESCHE; PANDEY, 1978
	-	Folhas	Metanol	Anticancer	NAIR, et al., 2014
	Costunolide Eremanthin	Rizomas	Hexano	Antifúngico Antioxidante Antidiabética	DURAIKANDIYAN, et al., 2012 ELIZA, et al., 2010
<i>Costus spicatus</i>	Tamarixetin- 3- <i>O</i> -neohesperidoside Kaempferide 3- <i>O</i> -neohesperidoside Quercetin 3- <i>O</i> -neohesperidoside Tamarixetin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside Kaempferide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside Quercetin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside Tamarixetin, Kaempferide, Quercetina	Folhas	Metanol	Anti-inflamatória	SILVA, et al., 2000
	-	Haste	Aquosa	Anti-inflamatória Imunomodulatória	SILVA; PARENTE, 2003
	-	Folha Partes aéreas	Metanol Metanol Hidroalcoólico	Analgésica Anti-inflamatória Antioxidante	QUINTANS JÚNIOR, et al., 2010 GASPARRI, 2005

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus spicatus</i>	-	Caules folhas flores	Hexano, acetato de etila, butanol	Antioxidante	AZEVEDO, 2014
	1,2-Ethanediol, monoacetate 1-tetradecanol (-)- Elema-1,3,11(13)-trine-12-ol (+)-beta-costol Ácido 4,7,10,13,16,19-Docosahexacnoic Metil éster Naphtho[1,2-6]furan-3-one 2,3,3a,4,5,5a,6,7,9a,9b-decahydro-3,5a-9-trimethyl-7,9a-peroxy Eremanthin 5-(ethynyl) nona-1,8-dien-5-ol Benzeneacetic acid Alpha-bergamotene 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester Isolongifolene, 4,5-dehydro-	Folhas	Etanol	-	BHUVANESWARI, et al., 2014
<i>Costus spiralis</i>	3,5-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone Kaempferol 3-O-neohesperidoside Kaempferide 3-O-neohesperidoside Quercetin 3-O-neohesperidoside Tamarixetin 3-O-neohesperidoside	Folhas	Metanol	-	ANTUNES, et al., 2000

Tabela 1- Estudos químicos e biológicos do gênero *Costus*

Espécie	Substância	Parte da Planta	Extração	Atividade Biológica	Referência
<i>Costus spiralis</i>	Tujeno $\alpha$ Pino $\alpha$ Canfeno Pino Pino- $\beta$ Limoneno Perileno Nonladienol Netalactona Lavandulil isobutanoato Eudesma Amorfeno Selineno	Brácteas	Óleo essencial	-	RIBEIRO, 2013
	(3 $\beta$ ,25R)-26-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-22-hydroxyfurost-5-en-3-yl O-D-apio- $\beta$ -D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopyranoside	Rizomas	Metanol	Anti-inflamatória	DA SILVA; PARENTE, 2003
	(3 $\beta$ ,25R)-26( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-22-hydroxyfurost-5-em-3-yl O-D-apio- $\beta$ -D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside	Rizomas e raízes	Diclorometano Metanol	Antioxidante Antimicrobiana	HABSAH, et al., 2000
	-	Folhas	Etanol	Anti-inflamatória	GARCIA, 2011
	Flavonoides C-glicosilados	Planta inteira	Aquosa	Antiurólítica	VIEL, et al., 1999
	-	Folhas	Metanol	Antidiabética	DUARTE, 2014

	<b>Substância</b>	<b>Parte da Planta</b>	<b>Extração</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
	29-norcycloartanone (1) $\beta$ -amyrone (1) Cycloartanone (1) A-amyrone (1) 24-methylenecycloartanone (1) 24-methylpollinastanone (1) 29-norcycloartanol (1) $\beta$ -amyrin (1 e 2) Cycloartanol (1 e 2) Cycloeucaleanol (1 e 2) Cycloeucalanol (1 e 2) $\alpha$ -amyrin (1 e 2) 24-methylenecycloartanol (1 e 2) Pollinastanol (1) 24-methylenepollinastanol (1) 24-methylpollinastanol (1) Cholesterol (1 e 2) Brassicasterol (1 e 2) Campesterol (1 e 2) Stigmasterol (1 e 2) Sitosterol (1 e 2) Sitostanol (1 e 2) 7-oxocholesterol (2) 7-oxocampesterol (2) 7-oxostigmasterol (2) 7-oxositosterol (2)	Raízes (1) e partes aéreas (2)	Metanol	-	BÖME, et al., 1997