



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÉUTICAS**

**CONTROLE BOTÂNICO, FÍSICO-QUÍMICO E  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
*Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Vilmar Cláudio Banderó Filho**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

---

**CONTROLE BOTÂNICO, FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADE  
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Glechon spathulata* BENTH.  
(LAMIACEAE)**

**por**

**Vilmar Cláudio Banderó Filho**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melânia Palermo Manfron**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CONTROLE BOTÂNICO, FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADE  
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE)**

elaborada por  
**Vilmar Cláudio Banderó Filho**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Melânia Palermo Manfron (UFSM)**  
(Presidente/ Orientador)

---

**Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil (UNICENTRO)**

---

**Prof. Dr. Ademir Farias Morel (UFSM)**

Santa Maria, 13 de julho de 2010

---

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo  
valioso em todas as suas folhas.”

***Johan Wolfgang Von Goethe***

---

*Dedicatória*

À minha família

---

## *Agradecimentos*

Agradeço a Deus, por estar sempre presente, em todos os momentos, fazendo-me persistir a cada desafio.

Aos meus pais, Vilmar Cláudio (*in memoriam*) e Maria Nilva, pelo apoio incondicional, por me ensinar a persistir, pelos valores e princípios, e por acreditarem na educação.

À minha esposa Cristina, pela compreensão, pelo incentivo, o companheirismo e a alegria de cada dia juntos.

Aos meus irmãos, Neiva, Jefferson, Lígia, Zuleika e Rachel, por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos sobrinhos e afilhados, por todos os ensinamentos e alegrias.

À Lia, Urbano, Rafael e Bruna, por me acolherem em sua família.

A todos os amigos.

Sem vocês não chegaria até aqui. Amo muito todos vocês!

Agradeço a minha orientadora, professora Melânia Manfron, por acolher-me em seu grupo de pesquisa, pelo incentivo e pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório e amigos Camila Zanotto, Alexandre, Tiago, Rosana, Raquel, Júnior, Cauriane, Marina, Camila Bugnotto, Vera e Gilberto, agradeço pela parceria e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários Rosemary, João, Renato, Paulo Ricardo, Carmem, Isabel, Verinha, Rosecler, Luis Fernando, pelas colaborações.

Aos professores Margareth Athaide, Carlos Mello, Clarice Rolim, Sérgio Dalmora, pela amizade e os valiosos ensinamentos.

À Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar a qualificação através da sua pós-graduação.

À Capes pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram e contribuíram para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado!

---

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **CONTROLE BOTÂNICO, FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE)**

Autor: Vilmar Cláudio Banderó Filho  
Orientador: Melânia Palermo Manfron  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 13 de julho de 2010.

A qualidade dos derivados de drogas vegetais deve ser assegurada através de testes de autenticidade (caracterização organoléptica, identificação macro e microscópica), pureza e integridade (matéria estranha, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, perda por dessecação, contaminantes microbiológicos e metais pesados), e ainda por determinações qualitativa e quantitativa do (s) princípio (s) ativo (s) e/ou marcador (es) químico (s) característico (s) da espécie. Muitas espécies vegetais são utilizadas na medicina tradicional sem comprovação científica das suas propriedades farmacológicas. O objetivo deste trabalho reside na caracterização botânica, físico-química e atividade anti-inflamatória de *Glechon spathulata*. Entre as características macroscópicas das folhas de *G. spathulata* destacam-se a forma espatulada e a margem subrevoluta, crenada no meio-superior. Microscopicamente, destacam-se a epiderme uniestratificada com células retas a pouco sinuosas, estômatos diaclíticos, tricomas tectores e glandulares, mesofilo dorsiventral, feixes vasculares do tipo colateral fechado com bainha parenquimática, que na nervura central é incompleta e constituída por esclerênquima, bem como a ausência de cristais. Estas características contribuem no controle botânico de qualidade de *G. spathulata*, quando analisadas em conjunto com suas propriedades organolépticas, permitem a autenticidade da amostra. Por outro lado, os teores extrativos, a granulometria, conteúdo de óleos voláteis, índices de intumescência, amargor e espuma, bem como o perfil cromatográfico do extrato bruto (EB), suas frações e do óleo essencial através da cromatografia em camada delgada (CCD), além de permitir a autenticidade revelam informações sobre a pureza e integridade desta espécie. O perfil cromatográfico do EB de *G. spathulata* estabelecido através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu determinar a natureza dos principais compostos presentes, bem como a identificação presuntiva dos compostos flavonóides rutina e luteolina, evidenciando como composto majoritário a rutina. Além da autenticidade do extrato obtido a partir das partes aéreas, o perfil cromatográfico de *G. spathulata* permite monitorar a sua qualidade e caracterizar os compostos fenólicos presentes, cujas ações farmacológicas são bem descritas na literatura. Desta forma, a significativa atividade anti-inflamatória verificada pelo tratamento via oral com o EB de *G. spathulata* na inflamação crônica em ratos, é provavelmente exercida pelos compostos polifenólicos presentes. As análises realizadas basearam-se em técnicas descritas na literatura, em compêndios oficiais e na legislação brasileira, e permitiram estabelecer parâmetros úteis para o controle de qualidade das partes aéreas de *G. spathulata* como matéria-prima para a indústria farmacêutica e/ou de alimentos.

Palavras-chave: atividade anti-inflamatória; controle de qualidade; *Glechon spathulata* Benth.; Lamiaceae; plantas medicinais; condimentos

---

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **BOTHANIC, PHYSICO-CHEMICAL CONTROL AND ANTI- INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE)**

Author: Vilmar Cláudio Banderó Filho  
Advisor: Melânia Palermo Manfron  
Date and place of defense: Santa Maria, July 13<sup>th</sup>, 2010.

The quality of plant-derived drugs must be ensured through tests of authenticity (organoleptic features, macro and microscopic identification), purity and integrity (foreign matter, total ash, acid insoluble ash, loss on drying, microbiological contaminants and heavy metals) and also by qualitative and quantitative determinations of active (s) principle (s) and / or chemical (s) marker (s) characteristic (s) of the species. Many plant species are used in traditional medicine without scientific evidence of its pharmacological properties. The purpose of this work lies in the botanical characterization, physico-chemical and anti-inflammatory activity of *Glechon spathulata*. Among the macroscopic features of *G. spathulata* leaves stand out the spatulate form and subrevolute margin, finely crenulate in the middle-upper. Microscopically, the uniseriate epidermis shows straight to slightly sinuous cells, diacytic stomata, and non-glandular and glandular trichomes, dorsiventral mesophyll. Vascular bundles are collateral closed, and no crystals were identified. These features help to the botanical quality control of *G. spathulata*, and when analyzed in conjunction with its organoleptic properties, allow to ensure the authenticity of the sample. Furthermore, the procedures which measure the extractives content, particle size, volatile oil content, swelling index, bitterness and foaming index, and the chromatographic profile of crude ethanolic extract (CEE), its fractions and essential oil by thin layer chromatography (TLC), allow to verify the authenticity besides to reveal information about purity and integrity of this species. The chromatographic fingerprinting of CEE of *G. spathulata* by high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out in order to determine the nature of the main compounds, and the presumptive identification of the flavonoids rutin and luteolin, also it allowed the verification of the major compound rutin. Besides the authenticity of the extract obtained from aerial parts, the chromatographic fingerprinting of *G. spathulata* enabled to monitor its quality and to characterize its phenolic compounds. Therefore, the significant anti-inflammatory activity observed by the oral treatment with CEE of *G. spathulata* in chronic inflammation in rats is probably exerted by polyphenolic compounds. The performed analyses were based on techniques described in literature, official textbooks and Brazilian legislation and were useful in establishing some parameters for the quality control of aerial parts of *G. spathulata* as raw material for the pharmaceutical and / or food industries.

Keywords: anti-inflammatory activity; *Glechon spathulata* Benth.; Lamiaceae; medicinal plants; quality control; spices



---

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 *Glechon spathulata* Benth

FIGURA 1 - Morfologia das partes aéreas de *Glechon spathulata* Benth. .... 22

FIGURA 2 (A-B) – Detalhes das partes aéreas de *Glechon spathulata* Benth. 23

#### 2.5 O processo inflamatório e a bioatividade de compostos naturais

FIGURA 3 - Vias do metabolismo do ácido araquidônico (AA). .... 32

FIGURA 4 - Sítios de ligação dos íons metálicos..... 35

FIGURA 5 - Sequestro de EROs pelos flavonóides (Fl) ..... 36

### 4 RESULTADOS

#### 4.1 Manuscrito I

FIGURE 1 (A-C) - General view of *Glechon spathulata* Benth. A - aerial parts;  
B – flowery branch; C - leaves on a branch . .... 45

FIGURE 2 (A-B) - Paradermic sections of leaves of *Glechon spathulata* Benth.  
A - adaxial face; B - abaxial face . .... 47

FIGURE 3 - Cross section of median region of leaf blade of *Glechon spathulata* Benth. .... 47

FIGURE 4 (A-B) - Cross section of leaf blade of *Glechon spathulata* Benth.  
A - lateral region; B - abaxial face of lateral region. .... 48

FIGURE 5 - Cross section of distal region leaf blade of *Glechon spathulata* Benth. .... 48

---

## 4.2 Manuscrito II

FIGURE 1 – (A) Frequency of distribution according to mean diameter of powdered aerial parts of <i>G. spathulata</i> ; (B) Cumulative percentage of retention and passing, considering the average particle size of powdered aerial parts of <i>G. spathulata</i> . .....	62
TABLE 1 - Content of crude ethanolic extract (CEE), extractable matter, ash, foreign matter, loss on drying and swelling index in 100 g of powdered aerial parts of <i>Glechon spathulata</i> . .....	66
FIGURE 2 - Chromatographic profile by TLC of <i>Glechon spathulata</i> extracts. 1 – CEE, 2 – H, 3 – CF, 4 – AF, 5 – BF, 6 – Quercetin, 7 – Rutin, 8 – Chlorogenic acid, 9 – Caffeic acid. Mobile phase - ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27); Oxalic-boric reagent; $\lambda$ 365 nm. ....	68
TABLE 2 - Rfs of phenolic compounds of <i>G. spathulata</i> extracts after sprayed with oxalo-boric solution. Mobile phase - ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27), $\lambda$ 365 nm. ....	68
FIGURE 3 - Co-chromatography of <i>G. spathulata</i> extracts. 1 – FA, 2 – FA+Q+R, 3 – FB, 4 – FB+R, 5 – Quercetin, 6 – Rutin, 7 – Q+R. Mobile phase: ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27); A - $\lambda$ 365 nm; B – Spray reagent: FeCl <sub>2</sub> . ....	69
TABLE 3 - Total extractable compounds (TEC), total phenolic compounds, total flavonoids content, condensed tannins from aerial parts of <i>Glechon spathulata</i> . .....	71

## 4.3 Manuscrito III

FIGURE 1 - (A) Chromatogram of CEE of <i>Glechon spathulata</i> (5 mg/mL), $\lambda$ 365 nm; (B) UV spectrum of major compound – 2. ....	89
FIGURE 2 - Chromatogram of standards pool, 12 – Rutin, 13 – Luteolin, 14 – Kaempferol; $\lambda$ 365 nm. ....	90
TABLE 1 - Retention time (minutes) and maximum wavelengths absorption of standards and for the main peaks of <i>Glechon spathulata</i> CEE. ....	90

---

TABLE 2 - Effect of crude ethanolic extract (CEE) of <i>G. spathulata</i> (300 mg/Kg/day) and nimesulide (5 mg/Kg/day) p.o. treatment on cotton pellet granuloma in rats. ....	92
FIGURE 3 - Effect of oral administration of crude ethanolic extract of <i>Glechon spathulata</i> on weight of granuloma in rats. Vehicle - propyleneglycol 20% (v/v). The bar represents the mean $\pm$ SD. *** $p < 0,0001$ . ....	93

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA – ácido araquidônico  
AAS – ácido acetil salicílico  
ACN – acetonitrila  
AINEs – anti-inflamatórios não-esteroidais  
AMPc – adenosina monofosfato cíclico  
ANOVA – análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APG – Angiosperm Phylogeny Group  
CAF – ácido caféico  
CCD – cromatografia em camada delgada  
CDB – Convenção sobre Diversidade Biológica  
CG – cromatografia gasosa  
CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
CLA – ácido clorogênico  
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência  
CLAE/EM – cromatografia líquida de alta eficiência/ espectrometria de massas  
CNUMAD – Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento  
COX – ciclooxigenase  
COX-1 – ciclooxigenase 1  
COX-2 – ciclooxigenase 2  
EMEA – Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
ETA – ácido eicosatetraenóico  
FA e AF – fração acetato de etila  
FB e BF – fração butanólica  
FBRAS – Farmacopéia Brasileira  
FC e CF – fração clorofórmica  
FDA – Food and Drug Administration  
FH e HF – fração hexânica  
g – grama  
GMPc – guanina monofosfato cíclica  
GOD – glicose oxidase  
GSH-Px – glutatona-peroxidase  
H<sub>2</sub>O – água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HO<sub>2</sub><sup>·</sup> – radical hidroperoxila  
HETEs – hidroieicosatetraenóicos

---

HpETEs – hidroperoxieicosatetraenóicos  
i.p. – intraperitoneal  
kg – kilograma  
LOX – lipooxigenase  
LTs – leucotrienos  
MDA – malonaldeído  
mg – miligrama  
MS – Ministério da Saúde  
MTC – medicina tradicional chinesa  
NF- $\kappa$ B – fator de transcrição nuclear kappa B  
NO $\cdot$  – óxido nítrico  
NOS – enzima óxido nítrico sintase  
O $_2$  – oxigênio  
O $_2^{\cdot-}$  – radical superóxido  
OH $\cdot$  – radical hidroxila  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
p/v – peso/volume  
PGs – prostaglandinas  
PLA $_2$  – fosfolipase A $_2$   
PPARs – receptores ativados por proliferador de peroxissoma  
Q – quercetina  
R – rutina  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RMN – ressonância magnética nuclear  
SFDA – Chinese Food and Drug Administration  
SOD – superóxido-dismutase  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TGI – trato gastrointestinal  
TXs – tromboxanos  
u – unidade  
u/g – unidade/grama  
v.o. – via oral  
v/v – volume/volume  
w/v – peso/volume  
 $\mu$ g – micrograma  
 $\mu$ L – microlitro  
 $\mu$ m – micrômetro

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 <i>Glechon spathulata</i> Benth</b> .....	19
<b>2.2 Aspectos regulatórios do controle de qualidade de drogas vegetais</b> .....	23
<b>2.3 O desenvolvimento fitofarmacêutico</b> .....	25
<b>2.4 O comércio de derivados de plantas medicinais no Brasil</b> .....	26
<b>2.5 O processo inflamatório e a bioatividade de compostos naturais</b> ...	29
2.5.1 Indução da inflamação <i>in vivo</i> .....	36
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	40
<b>4.1 Manuscrito I - MORPHO-ANATOMY OF <i>Glechon spathulata</i> BENTH. (LAMIACEAE) LEAVES</b> .....	42
<b>4.2 Manuscrito II - PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION FOR QUALITY CONTROL OF <i>Glechon spathulata</i> BENTH. (LAMIACEAE) AERIAL PARTS</b> .....	54
<b>4.3 Manuscrito III - HPLC FINGERPRINTING AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF <i>Glechon spathulata</i> BENTH. (LAMIACEAE)</b> .....	83
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	101
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	114
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	117

---

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, no item RESULTADOS, subitens 4.1, 4.2 e 4.3. Cada um dos manuscritos encontra-se dividido em Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas.

Os itens, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO.

---

## **1 INTRODUÇÃO**

---



## 1 INTRODUÇÃO

Espécies vegetais são utilizadas pela humanidade desde a antiguidade, no tratamento e profilaxia das mais distintas doenças. Esta ampla utilização de plantas na medicina tradicional levou os pesquisadores a investigarem os efeitos terapêuticos atribuídos a cada espécie, visando comprová-los cientificamente através de estudos químicos e farmacológicos, surgindo assim a etnofarmacologia (Elisabetsky & Setzer, 1985; Korolkovas, 1996).

O aumento do uso terapêutico de produtos naturais é notável ao longo das últimas décadas, em especial os derivados de plantas medicinais. Este fato deve-se a falta de acesso aos tratamentos farmacológicos convencionais por grande parte da população mundial; aos efeitos colaterais ou à ineficácia dos medicamentos convencionais; à crença de que os produtos naturais produzam menos efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos, ou ainda, por serem considerados mais eficazes nos casos em que a medicina convencional não tenha alcançado resultados seguros (Calixto, 2000; Rates, 2001a).

Compostos derivados de plantas medicinais estão presentes em 25 % das prescrições mundiais (Rates, 2001a). O Brasil é o país com maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (Guerra & Nodari, 2007). No entanto, apesar da flora medicinal brasileira ter sido objeto de numerosos estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos no século passado (Mentz et. al., 1997), apenas 8 % das suas espécies foi estudado em relação aos compostos bioativos presentes, e tão somente 1.100 espécies avaliadas em suas propriedades farmacológicas (Guerra & Nodari, 2007).

As taxas de crescimento do mercado mundial de fitoterápicos verificadas a partir de 1985 (de 5 a 18 % ao ano), proporcionaram um aumento no número de medicamentos fitoterápicos disponíveis à população (Grünwald, 1995), que, segundo Chimin et al. (2008), não foi acompanhado por melhorias no setor produtivo e na qualidade dos produtos. A qualidade questionável destes produtos pode ser relacionada a vários fatores, desde a forma de cultivo, identificação botânica, colheita, secagem, armazenamento, análises quali e quantitativas, contaminações, adulterações, incluindo as técnicas de desenvolvimento dos produtos farmacêuticos

e a obtenção do produto acabado (Bauer, 1998; Calixto, 2000; Carvalho et al., 2006; Niharika et al., 2010; Sahoo et al., 2010).

No Brasil, grande parte da comercialização de plantas medicinais é realizada em farmácias, mas também é uma prática comum em mercados, lojas de produtos naturais e feiras livres. As drogas vegetais obtidas a partir destes mercados, geralmente não possuem certificação de qualidade e, em muitos casos, suas supostas propriedades farmacológicas não foram validadas cientificamente por ensaios pré-clínicos ou clínicos (Veiga-Júnior et al., 2005). O uso de derivados vegetais provenientes de plantas medicinais de baixa qualidade tem gerado sérios problemas relacionados à sua eficácia e segurança (Sahoo et al., 2010). Por isso deve ser um compromisso da cadeia produtiva de medicamentos, a segurança e eficácia dos seus produtos, garantindo a proteção da saúde e o bem-estar da população (Farias et al., 1985).

Considerando a riqueza da biodiversidade brasileira, o seu potencial inexplorado e a ascensão do mercado mundial de fitomedicamentos, vislumbra-se uma boa oportunidade ao país, que através de planejamento governamental pode coordenar e instituir a execução de ações concretas, no sentido de valorizar e proteger o conhecimento tradicional da sua população, inserí-la na cadeia produtiva, orientar o cultivo e/ou exploração sustentável dos recursos naturais, com um foco direcionado na obtenção de matérias-primas de qualidade (Brasil, 1998; Barbosa-Filho et al., 2005; Albuquerque et al., 2007; Carvalho et al., 2008).

---

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Glechon spathulata* Bentham

A família Lamiaceae (Labiatae) compreende 7 subfamílias, e 236 gêneros com 7.173 espécies, distribuídas mundialmente. No Brasil ocorrem 26 gêneros e aproximadamente 350 espécies (Barroso, 1991; APG, 2003; Souza & Lorenzi, 2005). A família é caracterizada pela presença de folhas aromáticas, simples, inteiras, com disposição oposta-cruzada e flores hermafroditas, bilabiadas, com o gineceu assentado sob um disco glandular e estilete do tipo ginobásico (Joly, 1985; Schultz, 1985; Barroso, 1991). Espécies de Lamiaceae são muito valorizadas e conhecidas pelo óleo essencial, constituído por terpenóides de cadeia curta que lhe conferem odor e sabor (Naghibi et al., 2005). Utilizadas mundialmente para diferentes finalidades, destacam-se como medicinais, ornamentais, e suas propriedades aromáticas conferem aplicações na indústria de cosméticos, e como condimentos na culinária e na indústria de alimentos (Naghibi et al., 2005; Corrêa et al., 2010). Escavações arqueológicas revelaram que algumas espécies da família, hoje conhecidas apenas como plantas selvagens, já foram cultivadas no passado (Naghibi et al., 2005).

Uma grande variedade de compostos terpenóides, iridóides, fenólicos e flavonóides têm sido relatada em Lamiaceae. Espécies de *Lavandula* contem vários compostos terpenóides de aroma agradável, que são utilizados na fabricação de perfumes e pastilhas antitruças. Diterpenóides são encontrados em 20 gêneros da família, incluindo *Ballota*, *Coleus*, *Leonotis*, *Marrubium* e *Sideritis*. Os diterpenos tricíclicos estão presentes nas folhas e inflorescências de *Plectranthus*, sendo responsáveis por suas propriedades antioxidantes. Iridóides também são encontrados na família e têm importância taxonômica. Diversas espécies de Lamiaceae apresentam grandes quantidades de ácidos fenólicos, entre os quais o ácido rosmarínico, encontrado na subfamília Nepetoideae, porém ausente na subfamília Lamioideae. Este composto exibe propriedades antibacterianas, antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias (Naghibi et al., 2005).

Um estudo de Albuquerque et al. (2007), baseado em espécies de plantas utilizadas para fins medicinais por comunidades indígenas e rurais do nordeste do Brasil, revelou que 8% das 389 espécies citadas pertencem à família Lamiaceae. A medicina popular brasileira atribui às espécies desta família propriedades antisséptica, antimicrobiana, antiúlcera, anti-inflamatória, calmante, hipotensora, estomáquico, digestiva, expectorante, no tratamento de diferentes condições patológicas e da dor (Ritter et al., 2002; Costa, 2006; Fenner et al., 2006; Barros et al., 2007). Das espécies comumente utilizadas citam-se *Melissa officinalis*, *Origanum majorana*, *Origanum onites*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Mentha* spp. (Ritter et al., 2002; Oiyé & Muroki, 2002; Albuquerque et al., 2007; Barros et al., 2007; Dundar et al., 2008; Barros et al., 2010).

O gênero *Glechon* pertence à subfamília Nepetoideae, tribo Mentheae, subtribo Menthinae, juntamente com outros gêneros, entre os quais: *Mentha*, *Micromeria*, *Origanum*, *Satureja* e *Thymus*. Entre os gêneros da subfamília Nepetoideae, largamente utilizados na culinária e na medicina popular, encontram-se *Hyptis*, *Ocimum* e *Plectranthus* (APG, 2003; Moon et al., 2008). A tribo Mentheae é composta pelos gêneros *Glechoma*, *Nepeta*, *Melissa*, *Rosmarinus* e *Salvia*, entre outros. Além de ser considerada a maior e economicamente mais importante tribo de Lamiaceae, com aproximadamente 65 gêneros e 2.000 espécies, a tribo Mentheae é formada em grande parte por ervas aromáticas, e representa em torno de 25 % dos gêneros atualmente conhecidos em Lamiaceae (Moon et al., 2008). *Glechon* Spreng. foi estabelecido em 1827, é exclusivamente sul-americano e, compreende aproximadamente 9 espécies distribuídas entre Brasil (Minas Gerais ao Rio Grande do Sul), Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina, basicamente na Província de Corrientes (Barroso, 1991; Xifreda & Mallo, 2004).

*Glechon spathulata* é um subarbusto perene, que atinge no máximo 70 cm de altura, caule prostrado desde a base e ramos ascendentes em geral do meio para o ápice. Ocorre no Brasil, Uruguai e Argentina em terrenos abertos, por entre a pastagem e parcialmente protegida do sol pleno e, é popularmente conhecida como “mangerona-do-campo”. Na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira (1926) consta uma monografia sobre esta espécie, onde é recomendado o seu emprego na forma de extrato fluido. De acordo com Xifreda & Mallo (2004) suas flores solitárias são axilares, possuem um par de estames e exibem corola rosada a branco-amarelada que atinge até 7 mm de comprimento (Figuras 1 e 2).

---

Esta espécie é empregada como diaforética, na Argentina, e no Brasil, é ainda utilizada como condimento, como estomáquico em dispepsias, antisséptico e expectorante em afecções catarrais das vias respiratórias, resfriados, defluxos, bronquites e laringites (Coimbra, 1942; Mentz et al., 1997; Morgan, 1997; Xifreda & Mallo, 2004; Brandão et al., 2006). O extrato de *G. spathulata* está presente na fórmula do fitoterápico Teratokhuma<sup>®</sup>, comercializado no Brasil, juntamente com *Luffa operculata* e *Foeniculum foeniculum*, indicado para o tratamento de sinusite e rinite por suas ações antisséptica e descongestionante (Cibecol Ltda).

No estudo de Kunz (2007) foram detectados flavonóides, triterpenos, antocianinas e taninos condensados. Do óleo volátil foram separados nove constituintes, dos quais 7 foram identificados como: 1,8-cineol, beta-cariofileno, alfa-humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno. O constituinte majoritário, que representa 84,39% do óleo essencial, não foi identificado neste trabalho. O mesmo autor avaliou a atividade antimicrobiana deste óleo essencial, mostrando inibição do crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas, e de *Candida albicans*. Os derivados da droga vegetal possuem ainda atividade antioxidante e toxicidade frente à *Artemia salina*.

Montanha et al. (2004) observaram que o extrato hidroetanólico a 50% de *G. spathulata* inibiu 100 % do efeito citopático viral do Herpes Simples tipo 1 (HSV-1), cepas KOS, ATCC-VR 733 e 29R-aciclovir-resistente, em células renais de macaco, tipo Vero ATCC CCL-81.

Apesar da presença em uma formulação fitoterápica e na Farmacopéia Brasileira, os parâmetros atualmente disponíveis para o controle de qualidade de *G. spathulata* como insumo farmacêutico, na literatura consultada, restringem-se à algumas características morfológicas da espécie, como mostrado nas Figuras 1 e 2.



Figura 1 – Morfologia das partes aéreas de *Glechon spathulata* Benth. (Fonte: Flora brasiliensis).

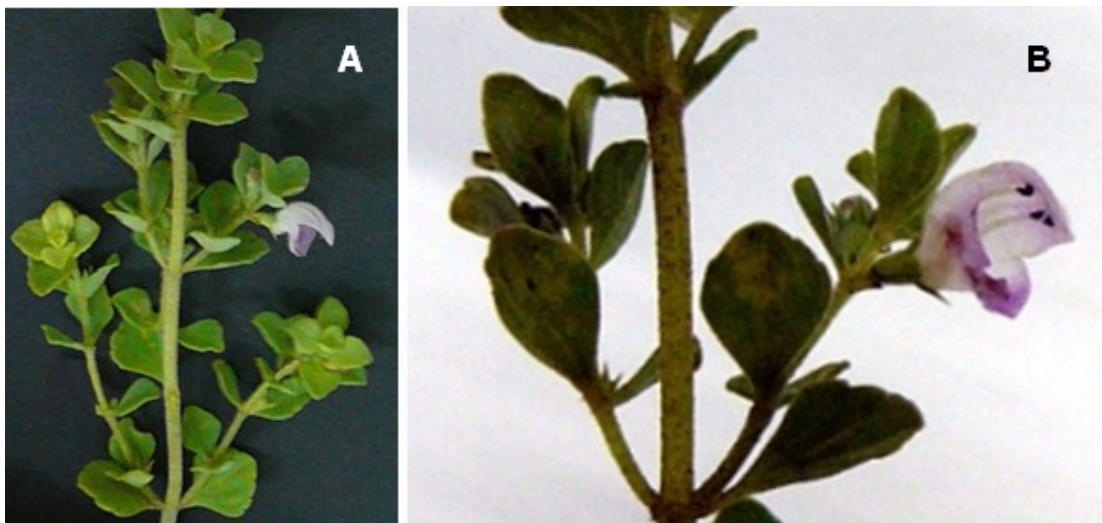


Figura 2 (A-B) – Detalhes das partes aéreas de *Glechon spathulata* Benth.

## 2.2 Aspectos regulatórios do controle de qualidade de drogas vegetais

A qualidade dos fitoterápicos no Brasil vem sendo discutida há muito tempo [(Vidal, 1935; Costa, 1936; Cruz, 1936; Portugal, 1943; Liberalli, 1944; Oliveira & Akisue, 1973; Jorge, 1985) – apud Farias et al., 1985], e envolve um conjunto de fatores que vão desde a matéria-prima até a propaganda (FBRAS, 1988; Brasil, 2004; Carvalho et al., 2008).

De acordo com a RDC N<sup>o</sup> 17/2000, a comprovação da qualidade, eficácia e segurança de uso, são requisitos para o registro de fitomedicamentos (Brasil, 2000). A Resolução RDC n<sup>o</sup> 48 (Brasil, 2004), que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, dispensa as drogas vegetais de registro ou cadastro. No entanto, a qualidade da matéria-prima utilizada na fabricação está diretamente relacionada à qualidade do produto final (OMS, 2003). Desta forma, a isenção do registro não exime do controle de qualidade as drogas vegetais utilizadas na produção de medicamentos fitoterápicos.

A qualidade dos derivados da droga vegetal deve ser assegurada através de testes de autenticidade (caracterização organoléptica, identificação macro e microscópica), pureza e integridade (matéria estranha, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, perda por dessecação, contaminantes microbiológicos e metais



---

pesados), e ainda por determinações qualitativa e quantitativa do (s) princípio (s) ativo (s) e/ou marcador (es) químico (s) característico (s) da espécie (FBRAS, 1988; OMS, 1998; Brasil, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere o perfil cromatográfico como uma técnica útil na identificação e avaliação da qualidade de plantas medicinais (OMS, 1991). O Food and Drug Administration (FDA) propõe o uso do perfil cromatográfico como uma alternativa aceitável para a identificação de drogas vegetais (FDA, 2004). O Chinese State Food and Drug Administration (SFDA) preconiza o uso de marcadores químicos cromatográficos no controle de qualidade dos fitomedicamentos da medicina tradicional chinesa (MTC). A Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) afirma em seu manual “Quality of Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products” que a estabilidade dos produtos deve ser determinada através de marcadores químicos cromatográficos, quando não for possível determinar a estabilidade de cada princípio ativo separadamente (Alaerts et al., 2007).

A regulamentação dos medicamentos industrializados é realizada pela ANVISA, órgão responsável pelo registro, controle do processo produtivo, distribuição, comercialização, publicidade, consumo e descarte, de medicamentos e outros produtos destinados à saúde. Por outro lado, os requisitos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde, desde a fabricação até a embalagem final, são preconizados pela Farmacopéia Brasileira, que representa o Código Oficial Farmacêutico do país (Brasil, 2008).

Muitas drogas vegetais comercializadas em nosso meio constam apenas na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira (1926), que é anterior ao desenvolvimento das técnicas atualmente indispensáveis para o controle de qualidade de fitomedicamentos. Em virtude disso, os critérios de identificação e qualidade preconizados pela Farmacopéia para muitas drogas vegetais, atêm-se à identificação botânica, o que isoladamente, não garante a qualidade do produto. Desta forma, a busca do estabelecimento de propriedades físicas, químicas e farmacológicas é um recurso valioso na elaboração de técnicas apropriadas para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais.

### 2.3 O desenvolvimento fitofarmacêutico

No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao marcante desenvolvimento de fármacos sintéticos pela indústria farmacêutica no pós-Guerra, contribuíram para o declínio do uso de plantas medicinais e, conseqüentemente, o investimento em fármacos de origem vegetal. Por outro lado, recentes mudanças nos paradigmas das sociedades ocidentais fizeram com que os produtos de origem vegetal passassem novamente a ocupar papel de destaque, devido à utilização por grandes contingentes das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar dos grandes avanços da medicina, no início da década de 90 as práticas tradicionais ainda eram utilizadas por 80 % da população mundial na atenção primária à saúde, e deste total 85 % envolvia o uso de plantas medicinais (Akerele, 1993). É estimado que a população indígena brasileira domine a aplicação medicinal de aproximadamente 1.300 espécies vegetais (Silveira, 2003). Estes dados demonstram a ampla utilização e a importância das propriedades farmacológicas das drogas vegetais, e atualmente, as informações etnobotânicas e/ou etnofarmacológicas obtidas junto a estas populações direcionam as pesquisas na busca de novos agentes terapêuticos (Rates, 2001a).

O desenvolvimento tecnológico na área de fitoterápicos tornou possível o aprimoramento do controle de qualidade e a produção de fitoterápicos seguros, eficazes e de efeitos totalmente reprodutíveis. Os avanços farmacológicos, toxicológicos e moleculares permitiram elucidar total ou parcialmente os mecanismos de ação, proporcionando avaliações toxicológicas seguras e estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos segundo as normas que regem os processos de validação de fármacos puros. Estes fatores, aliados ao efeito sinérgico entre os compostos presentes nos extratos, a associação de mecanismos de ação em alvos moleculares diferentes, os menores riscos de efeitos colaterais e menores custos de pesquisa, foram fundamentais para o aumento do mercado mundial de fitoterápicos.

Grandes empresas sediadas em países industrializados, como Alemanha, França, Estados Unidos e Japão, vêm investindo no aperfeiçoamento científico e tecnológico para o desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais, muitas vezes oriundas de países em desenvolvimento e com usos tradicionais

estabelecidos (Yunes et al., 2001). Cabe destacar que, na maioria das vezes, não há uma partilha de benefícios com o país de origem da matéria-prima ou com as comunidades tradicionais que lhes indicaram as aplicações terapêuticas das plantas convertidas em produto final (Funari & Ferro, 2005). Na tentativa de melhorar as questões relacionadas à exploração destes valiosos recursos foi criada a Medida Provisória nº 2.186-16 (Brasil, 2001) que estabelece uma série de normas regulamentares para a coleta e bioprospecção das plantas medicinais no país, bem como a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da exploração do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado.

Além disso, a visão econômica dos serviços de saúde no contexto social moderno e resultados promissores em pesquisas com plantas medicinais têm representado uma oportunidade na busca de novos fármacos, levando instituições privadas e governamentais a se tornarem apoiadores financeiros de programas de pesquisa, no intuito de suprir necessidades do mercado farmacêutico brasileiro e mundial (Elisabetsky, 1987; Calixto, 1996).

Novas perspectivas na área de plantas medicinais surgem no Brasil com a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde (Brasil, 2006). O país se insere em um novo contexto, pois além de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, através da inclusão de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, promove o uso sustentável da sua ampla biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Todavia, o aproveitamento total do potencial brasileiro no desenvolvimento de fitoterápicos / fitofármacos passa necessariamente pela instituição do controle da qualidade em toda cadeia produtiva (Rates, 2001b).

## **2.4 O comércio de derivados de plantas medicinais no Brasil**

As irregularidades referentes à qualidade dos fitoterápicos além de comprometer a eficácia dos produtos, oferecem risco à saúde dos consumidores. Os produtos derivados de plantas medicinais não são isentos de efeitos colaterais, sendo associados à ocorrência de problemas cardiovasculares, renais, hepáticos e

atividade anticolinérgica (Sahoo et al., 2010). Estes efeitos podem ser causados por adulterações, presença de metais pesados, pesticidas ou contaminantes microbianos, na droga vegetal ou no produto acabado (Farias et al., 1985; Sahoo et al., 2010).

A análise de drogas vegetais comercializadas em farmácias, supermercados ou por ervateiros, em todo o Brasil, demonstra a necessidade de uma maior fiscalização destes produtos disponibilizados para o consumo da população.

Analisando diferentes amostras de *Peumus boldus*, *Chamomilla recutita*, *Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum* e *Mentha* spp., foi verificado que embora todas fossem autênticas, apresentavam-se excessivamente dessecadas e sem seus aromas característicos, que os produtos à base de *Chamomilla recutita*, *Mentha* spp. e *Melissa officinalis*, apresentavam elevados índices de matéria estranha, e que nas amostras a base de *Peumus boldus*, *Chamomilla recutita* e *Melissa officinalis*, os componentes voláteis estavam ausentes (Brandão et al., 2002).

Em amostras de *Rheum officinalis*, *R. palmatum*, *R. rhaponticum* e *Ferraria cathartica*, obtidas em farmácias de Juiz de Fora, foi constatado teor de cinzas totais acima do máximo permitido (13 %), e o fato de *R. rhaponticum* estar sendo comercializado como *R. palmatum*, adulteração verificada através de CCD (Sousa et al., 2003).

A avaliação de amostras de *Statice brasiliense*, *Peumus boldus*, *Centella asiatica*, *Mikania glomerata*, *Pilocarpus jaborandi* e *Valeriana officinalis*, demonstrou que 71,4 % não atendiam aos quesitos mínimos de qualidade, sendo os problemas mais freqüentes as substituições, contaminações e ausência do constituinte químico principal (Zuccolotto et al., 1999).

A reprovação das 10 amostras de *Peumus boldus* analisadas ocorreu por apresentarem elevado teor de umidade, conteúdo de boldina abaixo do recomendado, e por ser constatado em 90 % das amostras altos índices de impurezas (Barbosa et al., 2001).

A análise de amostras de *Chamomilla recutita* demonstrou percentual de matéria estranha acima do máximo permitido e um teor de óleo essencial abaixo do recomendado (Duarte & Lima, 2003).

Analisando qualitativamente amostras de *Myracrodruon urundeuva*, *Peumus boldus*, *Luffa operculata*, *Cymbopogon citratus*, *Baccharis trimera*, *Alternanthera*

*tenella*, *Caesalpinia ferrea*, *Momordica charantia*, *Tabebuia avellanedae*, *Punica granatum*, *Senna alexandrina* e *Bowdichia virgilioides*, adquiridas em bancas de ervateiros, foi demonstrado que 62 % apresentavam valores de umidade acima do recomendado, 86 % continham impurezas acima do permitido e 81,5 % estavam microbiologicamente contaminadas (Amaral et al., 2003).

Nas amostras de *Peumus boldus*, *Bauhinia* spp. e *Ginkgo biloba*, adquiridas em farmácias de Recife, foi verificado nas três espécies um conteúdo de impurezas acima do máximo preconizado, e um teor de cinzas totais de todas as amostras de *Peumus boldus* acima do limite de 10 % preconizado pela FBRAS (2000) (Melo et al., 2004).

Já as amostras de *Aesculus hippocastanum*, *Cymbopogon citratus* e *Centella asiatica*, comercializadas em farmácias de Recife (PE), foram todas autênticas. Entretanto, amostras de *Aesculus hippocastanum*, de *Cymbopogon citratus* e de *Centella asiatica* foram reprovadas no teor de umidade devido ao percentual acima do recomendado pelas monografias farmacopéicas. Todas as amostras a base de *Centella asiatica* ultrapassaram o máximo (11 %) teor de cinzas totais e amostras de *Cymbopogon citratus* apresentaram elementos estranhos acima do permitido. Estes produtos vegetais podem oferecer riscos ao consumidor pela ineficácia, ou pelo elevado teor de impurezas (Melo et al., 2007).

A análise do perfil cromatográfico por CCD dos extratos de amostras de *Baccharis trimera* adquiridas no comércio de Riberião Preto (SP) permitiu confirmar a autenticidade, não apresentando diferenças qualitativas em relação à composição química, no entanto, uma diferença substancial foi percebida no teor de flavonóides (Borella & Fontoura, 2002).

Em um estudo de Rodrigues et al. (2005) foram analisadas 182 amostras de condimentos, entre os quais *Origanum majorana*, *Origanum vulgare* e *Petroselinum sativum*, obtidas em supermercados e mercearias de 6 cidades de São Paulo, e verificaram que apesar de todas as amostras serem autênticas, 98,9 % destas apresentaram larvas, ovos, insetos ou pêlos, estando em desacordo com a legislação vigente.

A análise de amostras comercializadas de *Bauhinia forficata* revelou a presença de insetos em 66 %, e apenas 33 % apresentaram descrição microscópica idêntica à amostra padrão. No entanto, o diagnóstico preciso sobre a autenticidade e

composição química das amostras foi obtido através da CCD e CLAE (Engel et al., 2008).

Apesar da semelhança na constituição fitoquímica visualizada na CCD de tinturas de *Stryphnodendron barbatiman* obtidas em farmácias de manipulação, o resíduo seco e o teor de taninos evidenciou diferenças significativas no conteúdo das amostras (Fonseca & Librandi, 2008).

Por outro lado, amostras de *Maytenus ilicifolia* adquiridas em farmácias de várias cidades do Paraná, apresentaram uma quantidade de materiais estranhos, constituídos de terra, areia, insetos e partes de outros vegetais, superior ao preconizado pela FBRAS (2002), e um elevado teor de umidade. Outras não-conformidades foram o teor de cinzas totais acima do recomendado, ausência de características anatômicas esperadas, e a ausência do marcador químico no perfil da CCD. Segundo os autores nenhuma das amostras cumpriu totalmente os requisitos exigidos pela legislação (Chimin et al., 2008).

Desta forma, considerando que os dados da literatura retratam, pelo menos em parte, a realidade do comércio de plantas medicinais no Brasil, entende-se como necessidade fundamental o estabelecimento de parâmetros que permitam a avaliação da qualidade das espécies vegetais, contribuindo para a garantia da eficácia e segurança do produto final.

## **2.5 O processo inflamatório e a bioatividade de compostos naturais**

A inflamação é o mecanismo de defesa imunológica do organismo no combate à infecção ou lesão causada por bactérias, vírus e outros patógenos. As características clínicas que definem a inflamação são rubor (vermelhidão), calor, tumor (inchaço) e dor. A vermelhidão e o inchaço ocorrem devido ao aumento da permeabilidade vascular, o que causa excessiva exsudação de plasma rico em proteínas ao tecido-alvo, para permitir o acesso dos glóbulos brancos ao local da lesão (Chaudhuri et al., 2005; Yoon & Baek, 2005).

De maneira geral, o processo inflamatório é dividido em duas fases, aguda e crônica. A resposta inflamatória aguda inicia imediatamente após a agressão tecidual e pode ser observada pela presença de edema, causado pela migração de

fluidos para o interstício. Por outro lado, a inflamação crônica é caracterizada pela migração de leucócitos da circulação sanguínea para a área lesionada, com a formação de um tecido granulomatoso devido à agregação de macrófagos (Adams, 1976).

Yoon & Baek (2005) resumem a atividade inflamatória em duas vias principais: uma via independente do ácido araquidônico (AA) e outra dependente. Entre os mecanismos moleculares da atividade inflamatória independentes da via do AA podem ser citados, a enzima óxido nítrico sintase (NOS), a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o estresse oxidativo (Barros et al., 2010) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Já, a via dependente de AA está diretamente relacionada à produção de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs) (Fig. 3) (Pelzer et al., 1998; Zheng et al., 2003; Rosa & Rapoport, 2009).

A principal fonte de AA são os fosfolipídios de membranas, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol. O AA é liberado para a célula via hidrólise destes fosfolipídios, como consequência do aumento da concentração intracelular de cálcio, que determina a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Schünke et al., 2007). Na circulação sanguínea o AA pode ser liberado a partir de uma lesão ou processo inflamatório, sendo metabolizado pela ciclooxigenase (COX) em PGs e TXs da série-2, ou pela lipooxigenase (LOX), via ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HpETEs), em ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETES) e LTs da série 4. As enzimas COX e LOX além de estarem associadas à geração de mediadores lipídicos pró-inflamatórios possuem funções no controle da intensidade e duração da dor, na ocorrência de febre, no inchaço e calor da área afetada.

Estudos com diferentes agentes anti-inflamatórios tem indicado que a superexpressão das enzimas COX e LOX, o aumento dos níveis de mediadores lipídicos e a geração de radicais livres, estão intrinsecamente envolvidos durante o processo inflamatório (Yoon & Baek, 2005).

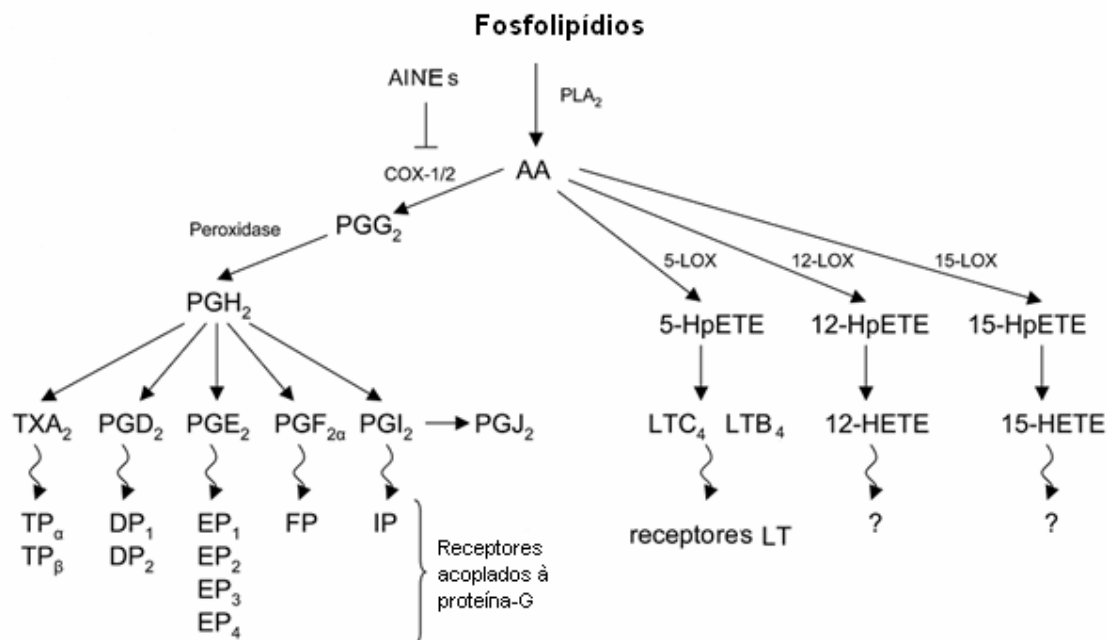
Radical livre não é o termo ideal para designar todos os agentes reativos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Os compostos derivados do metabolismo oxigênio (O<sub>2</sub>) são atualmente denominados espécies reativas de oxigênio (EROs). De acordo com Rasineni et al. (2008) a produção de EROs é uma característica intrínseca do metabolismo celular aeróbico,

onde o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água ( $H_2O$ ). No entanto, durante este processo são formados produtos intermediários altamente reativos como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), indutores de danos celulares (Ferreira & Matsubara, 1997). Muitas doenças autoimunes, cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias, câncer e o processo de envelhecimento, tem sido associadas à superprodução de EROs e ao estresse oxidativo (Chaudhuri et al., 2005; Khanavi et al., 2009).

O tratamento da inflamação tem sido realizado por meio de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) desde a introdução do ácido acetil salicílico (AAS) em 1899 (Chakraborti et al., 2010). Estes compostos são eficazes como analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios (Fries, 1991; Roth, 1996), figurando entre as categorias de medicamentos mais consumidos pela população mundial (Rainsford, 1999). Os AINEs são inibidores da COX, enzima responsável pela produção de PGs, e embora eficazes no tratamento da inflamação aguda não têm sido bem sucedidos na cura de doenças inflamatórias crônicas (Yoon & Baek, 2005). O uso prolongado destes medicamentos resulta em efeitos adversos gastrointestinais em quase um quarto dos pacientes (Singh & Triadafilopoulos, 1999). Os efeitos vão desde dispepsia a complicações graves, como hemorragia ou perfuração de úlcera gástrica ou duodenal (Tseng & Wolfe, 2000), estando entre os maiores causadores de hepatotoxicidade idiossincrática medicamentosa (Aithal & Day, 2007). Numerosos autores referem ainda depressão da medula óssea e inibição da função renal, através da redução da eficácia dos diuréticos e retardamento do efeito de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) (Silverstein et al., 2000; Falcão et al., 2005; Xiao et al., 2005; Babu et al., 2009; Traversa et al., 2009).

Diante disso, a descoberta de agentes terapêuticos mais eficazes é necessária, em especial de compostos que impliquem menores danos à saúde, considerando os efeitos colaterais ocasionados pelos anti-inflamatórios sintéticos disponíveis no mercado.





**Figura 3 - Vias do metabolismo do ácido araquidônico (AA); pode ser convertido em prostaglandinas, tromboxanos ou leucotrienos, dependendo das enzimas presentes (Adaptado de Yoon & Baek, 2005).**

O grande número de pesquisas a partir de fontes vegetais tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química e da farmacologia de produtos naturais (Yunes et al., 2001). A exemplo disso, o extrato metanólico de *Larrea divaricata* inibiu a formação de tecido granulomatoso em ratos, e ainda protegeu a mucosa gástrica da ulceração induzida por agentes necrotizantes em níveis semelhantes aos do controle omeprazol, sendo as propriedades atribuídas aos compostos antioxidantes do extrato (Pedernera et al., 2006). Além da atividade anti-inflamatória, a gastroproteção de compostos polifenólicos (principalmente flavonóides e taninos) é descrita por vários autores (Gonzales et al., 2000).

Dos 40 medicamentos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994 pelo FDA, 12 foram desenvolvidos a partir de compostos polifenólicos (Cragg et al., 1997). Devido à diversidade molecular encontrada nos derivados vegetais e o seu grande potencial no desenvolvimento de novos medicamentos, pesquisadores do mundo inteiro têm se dedicado à busca de protótipos com atividades farmacológicas definidas, como o tratamento ou controle de estados inflamatórios crônicos, como o

reumatismo, asma, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, etc (Barreiro, 1990; Calixto, 2003; Ramassamy, 2006; Talhouc et al., 2007).

A atividade anti-inflamatória de derivados de plantas medicinais é amplamente descrita (Tunón et al., 1995; Surh et al., 2001; Falcão et al., 2005; Moura et al., 2005; Corrêa et al., 2008; Pupo et al., 2008), e evidenciada em considerável número de espécies de Lamiceae, cujas ações são exercidas tanto na inflamação aguda quanto crônica (Baricevic et al., 2001; Maleki et al., 2001; Sosa et al., 2005; Akkol et al., 2008a, 2008b; Arumugan et al., 2008; Adams et al., 2009; Loizzo et al., 2009; Menichini et al., 2009; Güvenç et al., 2010).

A superprodução de óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ) é reponsável por uma importante função em diferentes modelos de inflamação, na mutagênese e na carcinogênese. A reação do  $\text{NO}^\cdot$  com o ânion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  leva à formação de peroxinitrito, um potente oxidante citotóxico indutor da peroxidação lipídica e dano celular (Surh et al., 2001; Wu et al., 2006). Uslu et al. (2003) verificaram que administração tópica do extrato aquoso de *Satureja hortensis* proporcionou uma redução significativa da concentração de  $\text{NO}^\cdot$  e da atividade da enzima NOS. Esta redução ocorreu juntamente com o desaparecimento dos sintomas da rinosinusite, e o efeito foi atribuído à atividade anti-inflamatória dos compostos polifenólicos presentes no extrato.

A peroxidação lipídica induzida pelo peroxinitrito pode ser também monitorada através dos níveis séricos de malonaldeído (MDA). Já, as enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) e glutathione-peroxidase (GSH-Px) são utilizadas para avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres (Wu et al., 2006; Ferreira & Matsubara, 1997). Desta forma, a redução da produção de  $\text{NO}^\cdot$  e dos níveis séricos de MDA, e o aumento concomitante dos níveis séricos de SOD e GSH-Px, verificados através do tratamento com o extrato de *Laggera alata* via oral em ratos, demonstraram não apenas a inibição da peroxidação lipídica, mas também o aumento da capacidade seqüestrante de radicais livres pelas enzimas antioxidantes. Com isso, os efeitos sobre a inibição da inflamação aguda e crônica são atribuídos às propriedades antioxidantes dos fenólicos totais de *Laggera alata* (Wu et al., 2006).

A enzima glicose oxidase (GOD) é utilizada experimentalmente como um agente pró-inflamatório devido à capacidade de induzir a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos. Chaudhuri et al. (2005) relataram uma significativa inibição do edema induzido pela GOD em camundongos tratados com extrato aquoso de *Camellia*

*sinensis*, atribuindo parte deste efeito aos compostos antioxidantes presentes no extrato.

Os metabólitos secundários podem interferir em diversos mediadores e diferentes mecanismos envolvidos no processo inflamatório, como: produtos do metabolismo do AA, peptídeos, citocinas, enzimas (NOS, COX-2, PLA<sub>2</sub>), produção de segundos mensageiros (proteína-quinase, guanosina monofosfato cíclico - GMPc, adenosina monofosfato cíclico - AMPc), fatores de transcrição (NF-κB, AP-1), etc (Calixto, 2003). Entre os compostos capazes de inibir a resposta inflamatória encontram-se os terpenos, flavonóides, taninos, glicosídeos, saponinas, esteróides, lignanas e alcalóides (Sharma et al., 1994; Calixto, 2003; Polya, 2003; Iwalewa et al., 2007; Talhouc et al., 2007). Entretanto, os flavonóides são destacados por alguns autores como principais compostos vegetais inibidores da inflamação aguda e crônica (Pelzer et al., 1998; Guardia et al., 2001; Shen et al., 2003; Talhouc et al., 2007), cuja ação, é dependente da sua estrutura, da dose e do método utilizados no ensaio (Miceli et al., 2005).

Apenas uma pequena fração dos flavonóides da dieta é absorvida na forma de aglicona ou glicosídeo, pois a maior parte destes compostos é degradada pela flora intestinal, produzindo diferentes ácidos fenólicos, cuja estrutura está diretamente relacionada aos compostos de origem. Este aspecto é relevante por duas razões: primeiro, porque os ácidos fenólicos podem representar de 30 a 60% dos flavonóides ingeridos; e segundo, porque alguns dos ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante comparável aos seus precursores intactos. Os mecanismos pelos quais os flavonóides exercem sua atividade antioxidante incluem: (i) supressão da produção de EROs pela inibição de enzimas ou por quelar oligoelementos (Fig. 4) envolvidos na sua formação, (ii) eliminação de EROs (Fig. 5), e (iii) preservação dos antioxidantes enzimáticos e/ou não-enzimáticos do organismo (Pietta, 2000).

As espécies de Lamiaceae são uma importante fonte de compostos polifenólicos, aos quais são atribuídas suas propriedades farmacológicas (Zgórka & Glowniak, 2001; Lu & Foo, 2002; Naghibi et al., 2005; Fecka & Turek, 2007; Habibvash et al., 2007; Wojdylo et al., 2007; Sluzarczyk et al., 2009; Barros et al., 2010), como a atividade antioxidante (Zheng & Wang, 2001; Mariutti & Bragagnollo, 2007; Erkan et al., 2008; Matkowski et al., 2008), e a atividade anti-inflamatória (Yang et al., 2001; Shen et al., 2003; Kris-Etherton et al., 2004; Chi & Kim, 2005; Santos et al., 2006; Wu et al., 2006; De Melo et al., 2009). De acordo com Naghibi et

al. (2005) os flavonóides ocorrem em Lamiaceae com uma variedade de formas estruturais, incluindo flavonas, flavonóis, flavanonas, dihidroflavonóis e chalconas.

Estudos recentes têm sugerido possíveis mecanismos de ação para uma grande variedade de compostos. Para o resveratrol (Subbaramaiah et al., 1998; Jang & Pezzuto, 1999), 6-hidróxi-canferol, quercetina, 6-hidróxi-luteolina e escutelareína (Williams et al., 1999), foi verificada a inibição da atividade da COX, sugerindo o efeito anti-inflamatório pela redução da síntese de PGs. Os flavonóis, canferol, quercetina, morina e miricetina (Laughton et al., 1991); baicaleína (Sekiya & Okuda, 1982) e curcumina (Hong et al., 2004), são capazes de inibir a 5-LOX. Fiorucci et al. (2001) verificaram que o bloqueio seletivo da COX-2 proporcionou um aumento da produção de LTs via LOX, sugerindo assim, que a inibição concomitante da LOX e COX seria uma característica desejável para novas drogas anti-inflamatórias. Através da análise de diversos polifenóis inibidores da COX e LOX foi percebida uma relação entre o número de grupamentos hidroxila presentes e a atividade do composto sobre estas enzimas. Quanto menor o número de grupamentos hidroxila na molécula, maior é a inibição da COX e menor a inibição da LOX (Moroney et al., 1988). Outro mecanismo de grande potencial terapêutico está na inibição da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), tanto pela diminuição da produção de AA, quanto por se tratar de um importante mediador inflamatório intra e extracelular (Yoon & Baek, 2005). Esta inibição da PLA<sub>2</sub> é descrita para a quercetina, tanto em leucócitos humanos quanto de ratos (Lee et al., 1982; Lanni & Becker, 1985).

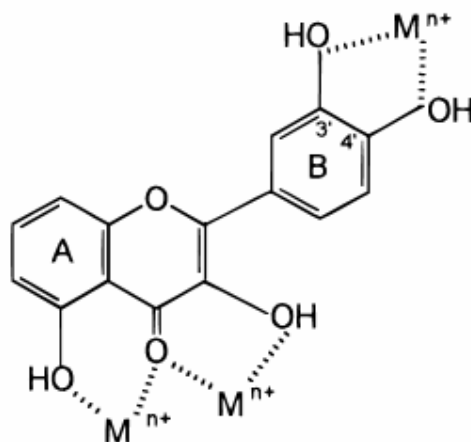


Figura 4 – Sítios de ligação dos íons metálicos (Reproduzido de Pietta, 2000).

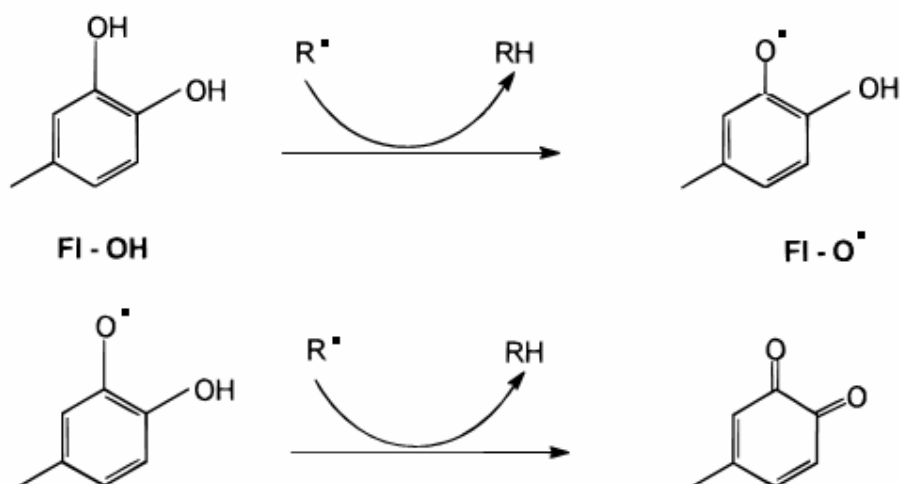


Figura 5 – Sequestro de EROs (R<sup>•</sup>) pelos flavonóides (FI) (Reproduzido de Pietta, 2000).

Diversas publicações têm descrito a atividade de compostos fenólicos isolados frente a diferentes modelos de inflamação. Entretanto, o efeito sinérgico entre os compostos bioativos e seus subprodutos, exclusivo dos fitoterápicos, contribui na eficácia e segurança de muitos extratos vegetais (Williamson, 2001; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009) por exercer suas ações farmacológicas em diferentes etapas do processo inflamatório (Miceli et al., 2005).

### 2.5.1 Indução da inflamação *in vivo*

De acordo com Antônio & Brito (1998), a resposta inflamatória aguda consiste de três principais efeitos vasculares: (i) a vasodilatação e aumento do fluxo vascular, (ii) aumento da permeabilidade vascular, e (iii) a migração dos leucócitos para os tecidos lesados. A vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar resultam na exsudação de plasma para o espaço intersticial (Pedernera et al., 2006), e a infiltração de leucócitos nos tecidos inflamados permite a formação do granuloma, experimentalmente desenvolvido através do implante subcutâneo de algodão peletizado em ratos (Meier et al., 1950; Pedernera et al., 2006).

A atividade anti-inflamatória de diferentes compostos químicos tem sido revelada ao longo de décadas através de modelos de indução da inflamação *in vivo*. Na inflamação aguda são utilizados geralmente como agentes pró-inflamatórios carragenina, dextran, formaldeído, serotonina, histamina e bradicinina (Campos et al., 1995), sendo provavelmente o mais empregado e bem estudado, a carragenina (Shikov et al., 2008).

A inflamação crônica *in vivo* revela o efeito do tratamento sobre a fase proliferativa, e pode ser também verificada por meio da indução de artrite por carragenina, *Mycobacterium tuberculosis* ou formaldeído (Bersani-Amado et al., 1995; Moura et al., 2005; Pedernera et al., 2006). De acordo com Süleyman et al. (2003) a formação de granulomas é inicializada por um antígeno, que estimula o sistema imunológico a produzir anticorpos e interleucinas, resultando na proliferação de leucócitos e formação de tecido de granulação em torno deste corpo estranho. O método do granuloma induzido por algodão peletizado tem sido amplamente utilizado na triagem de novos compostos anti-inflamatórios (Billingham & Davies, 1979), pois permite induzir a inflamação crônica, e avaliação das fases transudativa, exsudativa e proliferativa (Niemegeers et al., 1975; Olajide et al., 1999). O peso seco do granuloma é utilizado devido à boa correlação com o tecido granulomatoso formado (Swingle & Shideman, 1972).

---

**3 OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar parâmetros úteis no controle de qualidade das partes aéreas de *Glechon spathulata* Benth. e avaliar sua atividade farmacológica *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Determinar características morfoanatômicas de folhas de *G. spathulata*;
2. Determinar o teor extrativo da droga vegetal;
3. Fracionar o extrato bruto hidroetanólico através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, e determinar o rendimento de cada fração;
4. Determinar parâmetros físico-químicos das partes aéreas de *G. spathulata* e dos derivados da droga vegetal;
5. Identificar marcadores químicos de *G. spathulata* e estabelecer o perfil cromatográfico dos extratos por CCD e CLAE;
6. Quantificar por espectrofotometria os metabólitos secundários presentes na droga vegetal;
7. Determinar a atividade anti-inflamatória do extrato bruto hidroetanólico de *G. spathulata* na inflamação crônica através do modelo do granuloma em ratos Wistar.



---

**4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação encontram-se na forma de manuscrito, apresentados nos subitens **4.1**, **4.2** e **4.3**.

### 4.1 Manuscrito I

**“MORPHO-ANATOMY OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE) LEAVES”**. Aceito para publicação na revista Latin American Journal of Pharmacy.

### 4.2 Manuscrito II

**“PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION FOR QUALITY CONTROL OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE) AERIAL PARTS”**. Artigo a ser submetido.

### 4.3 Manuscrito III

**“HPLC FINGERPRINTING AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE)”**. Artigo a ser submetido.

## 4.1 Manuscrito I

### MORPHO-ANATOMY OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE) LEAVES

Vilmar C. BANDERÓ-F<sup>o</sup> <sup>1\*</sup>, Gilberto D. ZANETTI <sup>2</sup>, Gizele S. CANTO<sup>2</sup>, Sérgio L. DALMORA <sup>2</sup>, Marina C. NEMITZ <sup>1</sup>, Melânia P. MANFRON <sup>2</sup>

*1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
2 Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário,  
Prédio 26, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.*

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* [v.bandero@yahoo.com.br](mailto:v.bandero@yahoo.com.br)

**ABSTRACT:** *Glechon spathulata* Benth. (Lamiaceae) is a native plant in Brazil popularly known as “mangerona-do-campo”. This plant is a perennial sub-shrub with aromatic leaves used in South America as a condiment and in traditional medicine for different purposes, such as: inflammations, dyspepsia, diaphoretic, expectorant and antiseptic in catarrhal affections of the respiratory tract, colds, bronchitis and laryngitis. In this study, morpho-anatomical parameters of leaves of this plant were determined, by macro and microscopic analysis, aiming to help its diagnosis as a pharmaceutical ingredient. The leaves are sub-sessile with spatulate shape and subrevolute margin, finely crenulate in the middle-upper. The uniseriate epidermis shows straight to slightly sinuous cells, diacytic stomata and non-glandular and glandular trichomes. The mesophyll is dorsiventral, displaying an uniseriate palisade parenchyma and a little compact spongy parenchyma, with an average of 4 cell layers. The vascular bundles are collateral closed. There was no presence of crystals. These morphological and anatomical features, when taken together, contribute to quality control of plant leaves of *G. spathulata* as a pharmaceutical ingredient.

**KEY WORDS:** *Glechon spathulata*, Lamiaceae, medicinal plants, morpho-anatomy, pharmacobotany.

## INTRODUCTION

The Lamiaceae family (Labiatae) is composed by 7 subfamilies, which comprise 300 genera with about 7500 species, distributed throughout the world. In Brazil, there are 26 genera and 350 species<sup>1,2,3</sup>. The plants of this family are characterized by aromatic, entire, opposite and simple leaves and hermaphrodite bilabial flowers, with the gynoecium set under a glandular disc and gynobasic stylet<sup>3,4,5</sup>.

The genus *Glechon* was established in 1827 and belongs to the Nepetoideae subfamily, together the genera *Salvia*, *Rosmarinus*, *Thymus*, *Mentha*, *Origanum*, *Plectranthus* and *Hyptis* among others. Plants from this genus are widely used as condiments and in traditional medicine in Brazil. *Glechon* occurs exclusively in South America and comprises about 9 species found in Brazil (from Minas Gerais to Rio Grande do Sul), Paraguay, Uruguay and northeastern Argentina<sup>2,3,6</sup>.

*Glechon spathulata* Benth. (Fig. 1) grows up in Brazil, Uruguay and Argentina, in open terrain through the pasture, where it is partially protected from full sun. It is a perennial sub-shrub that reaches up to 70 cm tall and has a stem prostrate from the base, usually presenting branches from the middle to the apex with aromatic leaves, with similar aroma to *Origanum majorana*. The flowers are solitary axillaries, reaching up to 7 mm long, showing a pair of stamens and a pink to yellowish-white corolla<sup>6</sup>.

In the phytochemical screening of *G. spathulata*, flavonoids, triterpenes, anthocyanins and condensed tannins were detected and, in the volatile oil were separated by gas chromatography (GC): 1,8-cineole, beta-caryophyllene, alpha-humulene, germacrene D, bicyclogermacrene, spathulenol and caryophyllene oxide<sup>7</sup>.

In Argentina, *G. spathulata* is used as a diaphoretic. In Brazil, this species is known as “mangerona-do-campo”, used as a condiment and its fluid extract as stomachic in dyspepsia, flatulence, diaphoretic, expectorant and antiseptic in catarrhal affections of the respiratory tract, colds, catarrh, bronchitis and laryngitis<sup>6,8,9,10,11</sup>. Its use in the form of fluid extract is recommended in Brazilian Pharmacopoeia<sup>12</sup>. *G. spathulata* is marketed in Brazil together with *Luffa operculata* and *Foeniculum foeniculum* in the herbal Teratokhuma<sup>®</sup>, which is indicated for treatment of sinusitis and rhinitis<sup>13</sup>.

Although *G. spathulata* is presented in an herbal formulation and has a monograph in the Brazilian Pharmacopoeia (1926), the records found in the literature describe only certain morphological characteristics of this plant<sup>12,13</sup>. Thus, this work aims to provide support for the identification of *G. spathulata* through anatomical parameters of its leaves, in order to provide quality control of this organ as a raw material for pharmaceutical industry.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

The leaves of *G. spathulata* Benth. were collected in Dilermando de Aguiar city, Rio Grande do Sul state, Brazil. A sample of plant material was identified and recorded in the Herbarium of the Department of Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM) as voucher SMDB 10 297.

### Morpho-anatomy analysis

Morphological analysis was carried out through estereomicroscope and the macroscopic description was based on Gonçalves & Lorenzi (2007), Gattuso & Gattuso (1999), Oliveira & Akisue (1989), Hickey (1974) e Felipe & Alencastro (1966)<sup>15,16,17,18,19</sup>.

For anatomical analysis, paradermic sections and cross sections of median-apical region of adult leaf blades were used.

The paradermic sections were composed by freehand fresh material in semi-permanent slides, using glycerol as a means of inclusion and methylene blue dye 0.05%<sup>16</sup>. For the cross sections analysis, the 2 x 2 mm material was fixed directly in 2% glutaraldehyde in phosphate buffered saline with 0.013 M, pH 7.2 and kept under refrigeration at 4 ° C for 48 h. Next, the material was dehydrated in ascending ethanol series, from 30 to 96 GL, and included in hydroxiethylmetacrilate paraffin blocks<sup>20,21</sup>. Sections of 4 µm were made through rotary histological microtome, transferred to blades stained with toluidine blue 0.1%<sup>22</sup> and mounted in synthetic balsam.

The analysis of the sections was based on Appezzato-Da-Gloria & Carmello-Guerreiro (2003), Dickison (2000), Fahn (1990) and Cutter (1987) and photomicrographs were made through microscope with digital camera<sup>23,24,25,26</sup>. The permanent slides were deposited in the Pharmacognosy Laboratory collection at Industrial Pharmacy Department of Federal University of Santa Maria.

## RESULTS

### Determination of macroscopic characteristics

The leaves of *G. spathulata* (Fig. 1 A-C) are simple, entire, imbricate and arranged very close, with opposite-alternated phyllotaxy. The form of the leaf blades varies from spatulated to sub-rounded (Fig. 1 C), and they are concolor and opaque. The venation is

penninerved, characterizing the craspedodromous type, with concave main vein on the adaxial surface and protruding on the abaxial surface. On average, they reach 6 to 12 mm long and 4 to 10 mm in width. Their base is wedge-shaped, their apex is obtuse and their margin is subrevolute throughout the length and finely crenulate in the middle-upper. The trichomes are whitish and are encountered in more quantity on abaxial face, mainly along the main veins. These leaves are sessile and have a short petiole that reaches about 1 mm in length. In cross section, the petiole shows a circular or slightly tubular form.



**Figure 1 (A-C).** General view of *Glechon spathulata* Benth. A - aerial parts (Bar: 5 cm); B – flowery branch (Bar: 0.5 cm); C - leaves on a branch (Bar: 0.5 cm).

### **Determination of microscopic characteristics**

In paradermic section, multicellular trichomes are observed in large quantities, occurring throughout the epidermis. The epidermal cells have a straight to little sinuous outline and the stomata are of the diacytic type (Fig. 2 A-B).

In cross section, the central region of the leaf blade displays slightly concave contour on adaxial face and convex on the abaxial (Fig. 3).

The epidermis is uniseriate and has a thick, smooth and plicated cuticle. Epicuticular formations were not observed. (Fig. 3 and 4 A-B). The epidermal cells are usually oval or pavement, but also there was occurrence of square and rounded cells (Fig. 3 and 4 AB). In the adaxial face, the pavement cells reach 25 to 55  $\mu\text{m}$  width by 20 to 35  $\mu\text{m}$  height, while the lower surface is about 25 to 50  $\mu\text{m}$  width by 10 to 12  $\mu\text{m}$  height. The oval cells in the adaxial face reach 25 to 55  $\mu\text{m}$  width by 22 to 35  $\mu\text{m}$  height, while in the abaxial face they can reach 30 to 37  $\mu\text{m}$  width by 25 to 32  $\mu\text{m}$  height. The round cells occur mainly in the central region of abaxial face and reach 22 to 30  $\mu\text{m}$  in diameter. The square cells reach 18 x 18  $\mu\text{m}$  to 25 x 25  $\mu\text{m}$ .

On both epidermal sides, there are simple non-glandular trichomes with 50  $\mu\text{m}$  in length by 8  $\mu\text{m}$  in width at the base (Fig. 4 A and 5) and also of multicellular uniseriate trichomes with tapered apex, 2 to 5 cells, which reach 50  $\mu\text{m}$  to 380  $\mu\text{m}$  in length by 10  $\mu\text{m}$  in width at the base (Fig. 5). On both sides of epidermis there are capitate glandular trichomes, consisting of only one basal cell and an apical globular cell with 12  $\mu\text{m}$  in diameter (Fig. 4 B). These glandular trichomes are covered by non-glandular trichomes and reach an average 25  $\mu\text{m}$  in length.

The stomata are distributed throughout the epidermis, but in greater number in the abaxial face. These stomata are small and protrude out of the axis of epidermal cells. On average the guard cells reach 6  $\mu\text{m}$  in diameter, the subsidiary cells reach 5 to 10  $\mu\text{m}$  in diameter and the substomatal chamber reaches up to 100  $\mu\text{m}$  in depth (Fig. 3 to 5).

The mesophyll is heterogeneous, dorsiventral type (Fig. 4 A). The palisade parenchyma is composed of juxtaposed epidermal cells that reach 25 to 75  $\mu\text{m}$  in length by 30 to 35  $\mu\text{m}$  in width (Fig. 4 A and 5). The spongy parenchyma has, in average, 4 layers of cells, which are juxtaposed in transverse direction (Fig. 4 A and 5). However, between all the cell layers of the whole spongy parenchyma, there are large intercellular spaces of camera type, giving this a little compact aspect. The mesophyll is shown as a compact structure only on the distal region of the leaf, presenting little intercellular spaces. The spongy parenchyma cells are

rounded to oval, ranging between 17 and 31  $\mu\text{m}$  in diameter. In the analyzed material of *G. spathulata*, there was no presence of inter or intracellular crystals.

The vascular bundles are collateral closed and the low order ones are surrounded by a complete parenchymatic sheath cells (Fig. 3 and 5). In the midrib (Fig. 3), a formation of an annular collenchyma occurs, which is restricted to one or two layers cells underlying the two epidermal faces. The central vascular bundle is protected by two or three layers of sclerenchyma, however, these layers are absent in bundles in the lateral region of the leaf.

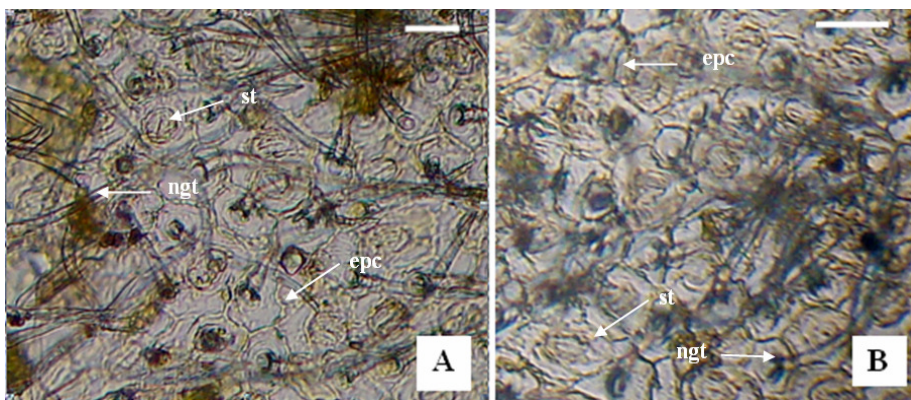


Figure 2 (A-B). Paradermic sections of leaves of *Glechon spathulata* Benth. A - adaxial face (Bar: 25  $\mu\text{m}$ ); B - abaxial face (Bar: 25  $\mu\text{m}$ ). Legend: st - stomata, ngt - non-glandular trichome, epc - epidermal cell.

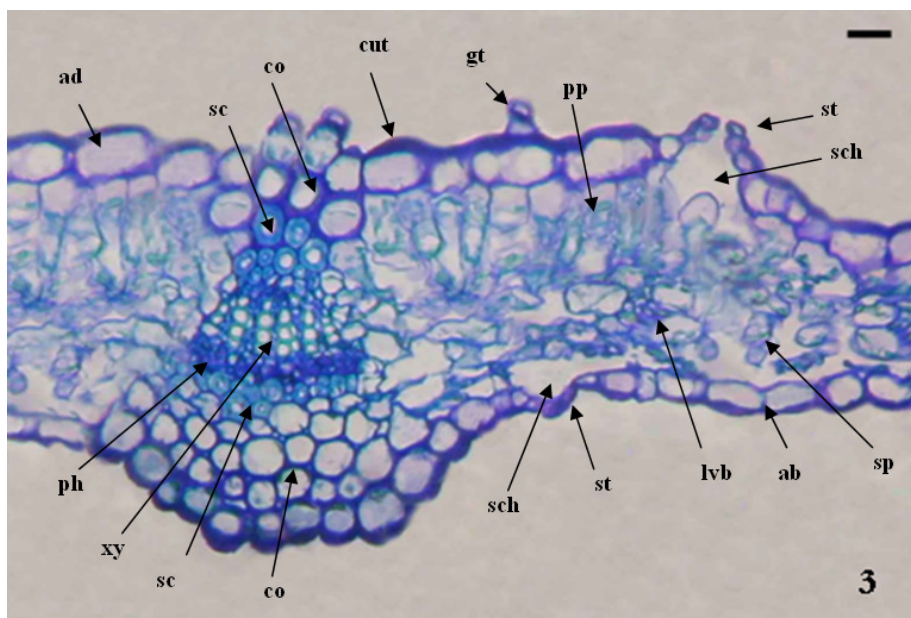


Figure 3. Cross section of median region of leaf blade of *Glechon spathulata* Benth. (Bar: 25  $\mu\text{m}$ ). Legend: co - collenchyma, sc - sclerenchyma, ph - phloem, xy - xylem, pp - palisade parenchyma, sp - spongy parenchyma, lvb - lateral vascular bundle, st - stomata, sch - substomatal chambers, cut - cuticle, ad - adaxial face epidermis, ab - abaxial face epidermis, gt - glandular trichomes.



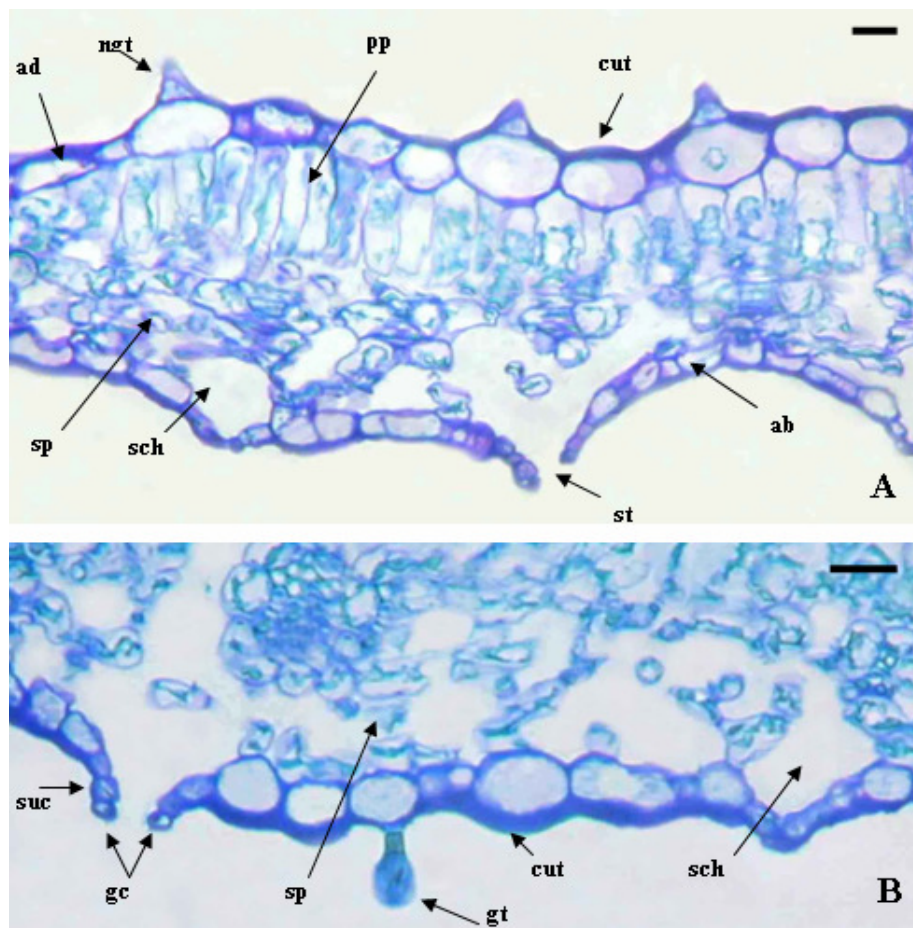


Figure 4 (A-B). Cross section of leaf blade of *Glechon spathulata* Benth. A - lateral region (Bar: 25 µm); B - abaxial face of lateral region (Bar: 25 µm). Legend: pp - palisade parenchyma, sp - spongy parenchyma, st - stomata, sch - substomatal chambers, gc - guard cells, suc - subsidiary cell, cut - cuticle, ngi - non-glandular trichome, gt - glandular trichome, ad - adaxial face epidermis, ab - abaxial face epidermis.

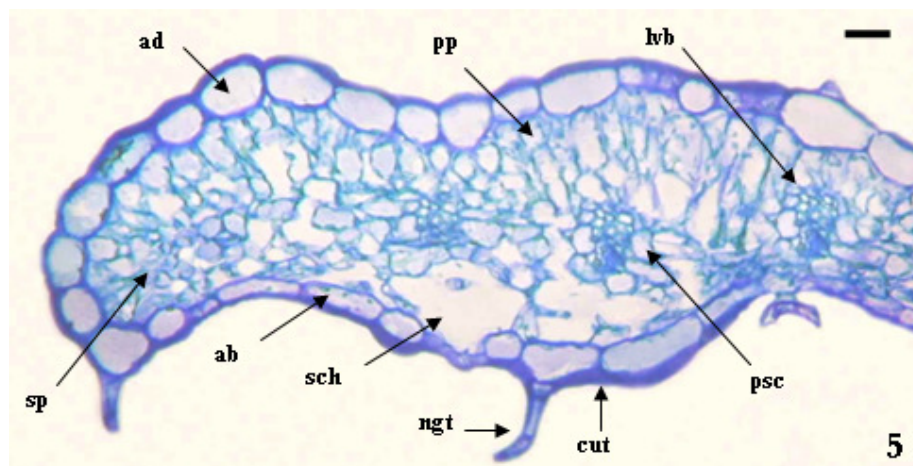


Figure 5. Cross section of distal region leaf blade of *Glechon spathulata* Benth. (Bar: 25 µm). Legend: pp - palisade parenchyma, sp - spongy parenchyma, sch - substomatal chambers, cut - cuticle, ad - adaxial face epidermis, ab - abaxial face epidermis, ngi - non-glandular trichome, lvb - lateral vascular bundle, psc - parenchymatic sheath cells.

## DISCUSSION

The analysis of leaf architecture and other plant tissues contributes to the identification of various species, as well as for quality control of plant drugs and pharmaceutical raw material.

The morphological analysis of *G. spathulata* shows that its macroscopic features are similar to those found for the Lamiaceae family, which has simple, whole and opposed leaves<sup>1,3,4,5</sup>.

The leaf characteristics of *G. spathulata* observed in this study are in accordance to those described by Xifreda and Mallo (2004)<sup>6</sup>. Shape, size and color of its leaf blade and size of petiole are macroscopic features that differentiate *G. spathulata* from other species of *Glechon* genus. The spatulate shape of the leaf blade of *G. spathulata* is different from that found in *G. ciliata* and *G. marifolia*, which have ovate to elliptic leaf blades, and also *G. thymoides*, whose leaf is obovate to oblong. The dimensions of the *G. spathulata* leaf are smaller than those of *G. marifolia*, which has 4 to 20 mm in length by 3 to 10 mm in width. *G. thymoides* has discolored leaf blade and petiole with 2 to 9 mm in length, while *G. spathulata* has a concolored leaf and subsessile petiole. The dense pubescence throughout the leaf epidermis of *G. spathulata* contrasts with *G. ciliata*, which has trichomes only on the abaxial leaf epidermis.

Petiole shape in *G. spathulata* is concave-convex in the cross section and this helps to differentiate it from species such as *Plectranthus neochilus* and *Plectranthus barbatus*, which exhibit plane-convex and bi-convex petioles, respectively<sup>27,28,29</sup>.

The epidermal cells on the adaxial face of leaves from *G. spathulata* present larger dimensions than those in the abaxial face. This fact allows distinguishing it from species such as *Hymenocrater bituminosus*, in which epidermal cells have similar size. On the other hand, the fact that the cells have a straight to slightly sinuous outline distinguishes it from *Leonurus*, *Hyptis*, *Hymenocrater* and *Mentha* species, whose epidermal cells are wavy<sup>30,31,32,33</sup>.

The smooth, thick and plicate cuticle of *G. spathulata*, , differentiates it from *Cyclotrichium organifolium*, *Plectranthus amboinicus* and *Plectranthus ornatus*, which exhibit a straight cuticle, and *Cunila microcephala*, *Plectranthus neochilus* and *Leonurus sibiricus*, where the cuticle is striated<sup>28,32, 34,35,36</sup>.

The diacytic stomata of *G. spathulata* are common in Lamiaceae family, however, it is different from species such as *Plectranthus amboinicus* and *Leonurus sibiricus*, in which the stomata are anomocytic<sup>27,32,34</sup>. The prominence of stomata in relation to the epidermal cells may help in the process of authentication of plant species, allowing us to differentiate *G.*

*spathulata*, which has protrude stomata above the epidermal cells, of *Cyclotrichium origanifolium*, *Ocimum selloi* and *Hymenocrater bituminosus*, which exhibit stomata arranged on the same level of epidermal cells<sup>30,35,37</sup>.

The simultaneous occurrence of different trichome types, their distribution and cuticle characteristics provide valuable information for the identification of gender and species from the Lamiaceae family<sup>27</sup>. The capitate glandular trichomes of *G. spathulata* are different from other species such as *P. ornatus*, which has glandular sessile trichomes<sup>34</sup>. Unlike *G. spathulata*, in which the cuticle is smooth, *Leonurus sibiricus* and *Plectranthus neochilus* have a granular cuticle in trichomes<sup>28,32</sup>. Also, in *G. spathulata*, the non-glandular and glandular trichomes are distributed throughout the leaf epidermis, differently from *Ocimum selloi*, in which they are restricted to the adaxial face of the leaf<sup>37</sup>.

The mesophyll has a variable constitution in Lamiaceae<sup>27</sup>. The dorsiventral type in *G. spathulata* distinguishes it from *Hymenocrater bituminosus*, which has isobilateral mesophyll, and *Plectranthus neochilus* and *Plectranthus ornatus*, with homogeneous mesophyll<sup>28,30,34</sup>. The palisade parenchyma in *G. spathulata* is stratified, while in *Tetradenia riparia* and *Hymenocrater bituminosus* is biserial and, in *Salvia argentea*, it is composed of 1 to 3 layers. Thus, parenchyma characteristics are useful for differentiation between these species<sup>30,38,39</sup>. Despite both species exhibit spongy parenchyma with 3 to 4 layers of cells, *G. spathulata* can be differentiated from *Salvia napifolia* by their palisade parenchyma which presents 2 to 4 cell layers<sup>40</sup>. Characteristics of the spongy parenchyma also allow differentiating *G. spathulata* from other species of Lamiaceae, such as *Hyptis suaveolens*, in which parenchyma is composed by 6 to 7 layers of cells<sup>31</sup>.

The structure of vascular bundles is also an important taxonomic feature and in Lamiaceae the collateral closed type is very common. This feature differentiates *G. spathulata* from other Lamiaceae, such as *Leonurus sibiricus*, where the vascular bundles are collateral and open<sup>32</sup>. The presence of an incomplete sheath of sclerenchyma around the vascular bundle of midrib characterizes a tendency to xeromorphy<sup>27</sup>. In this region there is also a formation of annular collenchyma, an useful feature to differentiate it from *Cunila microcephala* and *Leonurus sibiricus*, which have a lamellar collenchyma, *Salvia napifolia* and *Plectranthus* species, which exhibit an angular collenchyma, or *Salvia argentea*, with a lacunar collenchyma<sup>28,32,34,36,38</sup>.

In the analyzed material from *G. spathulata* there was no presence of inter or intracellular crystals, a feature which is useful to differentiate it from other species of the

family, such as *Cunila microcephala*, *Leonurus sibiricus*, *Mentha spicata*, *Mentha spicata x suaveolens* and *Tetradenia riparia*<sup>27,32,33,36,39</sup>.

The stomata prominence in relation to the epidermal cells observed in *G. spathulata* is a common feature in plants from moist environments. However, the small size of the stomatal cells and the presence of straight to little sinuous epidermal cells, trichomes and dorsiventral mesophyll, may characterize an adaptation to loss of water, useful for species that occur in open environments, with high exposure to solar radiation, as in the case of *G. spathulata*<sup>25,26,27,41</sup>.

## CONCLUSION

Among the macroscopic characteristics of *G. spathulata* leaves, stand out the spatule form, subrevolute margin and finely crenulate in the middle-upper. Microscopically, we highlight the epidermis cells with straight to little sinuous outline, diacytic stomata, non-glandular and glandular trichomes, dorsiventral mesophyll, vascular bundles of collateral closed type with parenchymatic sheath cells, which in the midrib is incomplete and consists of sclerenchyma, as well as the absence of crystals. These characteristics, when analyzed together, contribute to the botany quality control of *G. spathulata* as raw material for the pharmaceutical and / or food industry.

## REFERENCES

1. Souza, V.C. & H. Lorenzi (2005) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum.
2. The Angiosperm Phylogeny Group – APG in “Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acessado em 20/12/2009.
3. Barroso, G.M. (1991) *Sistemática de angiospermas do Brasil*, 1ª ed., v. 3, Viçosa, UFV: Impr. Univ. p. 98-105.
4. Joly, A.B. (1985) *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*, 7ª ed., São Paulo: Editora Nacional, p. 582-586.
5. Schultz, A.R.H. (1985) *Introdução à botânica sistemática*, 5ª ed., v. 2, Porto Alegre: Editora UFRGS.
6. Xifreda, C.C. & A.C. Mallo (2004) *Darwiniana* **42** (1 - 4): 333 – 346.

7. Kunz, V.T. (2007) "*Glechon spathulata Benth.: Estudo químico e farmacológico*". Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
8. Brandão, M.G.L., G.P. Cosenza, R.A. Moreira & R.L.M. Monte-Mor (Jul/Set 2006) *Braz. J. Pharmacogn.* **16** (3): 408-420.
9. Mentz, L.A., L.C. Lutzemberger & E.P. Schenkel (1997) *Caderno de Farmácia*, **13** (1): 25-48.
10. Morgan, R. (1997) *Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição, propriedades*. São Paulo: Editora Hemus, 555 p.
11. Coimbra, R. (1942) *Notas de Fitoterapia*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo. p. 166.
12. Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1926) 1ª ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, p. 572.
13. Cibecol Industria Farmacêutica Ltda. Porto Alegre, RS, Brasil. Disponível em: <http://www.cibecol.com.br/produtos.php?in=problemas&problema=30>. Acesso em 04/10/2009.
14. Montanha, J.A., P. Moellerke, S.A.L. Bordignon, E.P. Schenkel, P.M. Roehe (2004) *Lat. Am. J. Pharm.* **23** (2): 183-6
15. Gonçalves, E. & H. Lorenzi (2007) *Morfologia vegetal - Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 416 p.
16. Gattuso, M.A. & S.J. Gattuso (1999) *Manual de procedimentos para analisis de drogas en polvo*. Ed. Universidade Nacional de Rosario, Argentina.
17. Oliveira, F. & G. Akisue (1989) *Fundamentos de Farmacobotânica*. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 216p.
18. Hickey, L.J. (1974) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **16**: 1-26.
19. Felipe, G.M. & F.M.M.R. Alencastro (1966) *Am. Acad. Brasil.* **38** (supl): 125-157.
20. Ruetze, M. & U. Schmitt (1986) *Eur. J. Path.* **16**: 321-324.
21. Gerrits, P.O. & L.A. Smid (1983) *J. Microsc.* **132** (1): 81-85.
22. Gerlach, D. (1977) *Botanische mikrotechnik*, 2 ed., Stuttgart, Georg-Thieme Verlag, 211 p.
23. Appezzato-da-Glória, B. & S.M. Carmello-guerreiro (2003) *Anatomia vegetal*. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil.
24. Dickson, W.C. (2000) *Integrative Plant Anatomy*. Harcourt Academic Press, San Diego.

- 
25. Fahn, A. (1990) *Plant anatomy*. 4<sup>a</sup> ed. Pergamon Press, Oxford, 587 p.
  26. Cutter, E.G. (1987) *Anatomia vegetal. Parte II – Órgãos. Experimentos e interpretações*. Ed. Rocca, São Paulo.
  27. Metcalfe, C. R. & L. Chalk (1965) *Anatomy of the dicotyledons*. v. 2, Clarendon Press, Oxford, p. 1041-1053.
  28. Duarte, M.R. & J.F. Lopes (Out./Dez. 2007) *Braz J. Pharmacogn*. **17** (4): 549-556.
  29. Scavone O. (1965) *Rev. Fac. Farm. Bioquím.* São Paulo **3**: 249-270.
  30. Satil, F., M. Ünal, & E. Hopa (2007) *Turk J. Bot.* **31**: 269-275.
  31. Basílio, I.J.L.D., M.F. Agra, E.A. Rocha, C.K.A. Leal & H.F. Abrantes (2006) *Lat. Am. J. Pharm.* **25** (4): 518-525.
  32. Duarte, M.R. & J.F. Lopes (2005) *Lat. Am. J. Pharm.* **24** (1): 68-74.
  33. Martins, M.B.G. (2002) *Bragantia* **61** (3): 205-218.
  34. Mauro, C., C.P. Silva, J. Missima, T. Ohnuki, R.B. Rinaldi & M. Frota (Out./Dez. 2008) *Braz. J. Pharmacogn*. **18** (4): 608-613.
  35. Kaya, A., K.H.C. Baser, F. Satil & G. Tumen (2000) *Turk J. Bot.* **24**: 273-278.
  36. Toledo, M.G.T., Y. Alquini & T. Nakashima (Out./Dez. 2004) *Braz. J. Pharm. Sci.* **40** (4): 487-493.
  37. Costa, L.C.B., E.M. Castro, J.E.B.P. Pinto, E. Alves, S.K.V. Bertolucci, L.F. Rosal & C.M. Moreira (Jul. 2007) *Rev. Bras. Biociências*. **5** (supl. 1): 6-8.
  38. Baran, P., C. Ozdemir & K. Aktas (2008) *Res. J. of Agric. and Biol. Sci.*, **4** (6): 725-733.
  39. Sossae, F.C. (1995) “Anatomia e fitoquímica foliar de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd.” Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu.
  40. Baran, P. & C. Ozdemir (Jun. 2006) *Bangladesh J. Bot.* **35** (1): 77-84.
  41. Medri, M.E. & E. Lleras (1980) *Acta Amazônica* **10**: 463-493.

## 4.2 Manuscrito II

### PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION FOR QUALITY CONTROL OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE) AERIAL PARTS

Vilmar C. BANDERÓ-FILHO <sup>1\*</sup>, Camila Z. ZANOTTO <sup>2</sup>, Marina C. NEMITZ <sup>2</sup>,  
Tiago M. DIOLJI <sup>2</sup>, Gilberto D. ZANETTI <sup>3</sup>, Melânia P. MANFRON <sup>3</sup>

*1 Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences,*  
*2 Student of Pharmacy*  
*3 Department of Industrial Pharmacy, Health Sciences Center,*  
*Federal University of Santa Maria,*  
*Prédio 26, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.*

\* Author to whom correspondence should be addressed: *E-mail:* v.bandero@yahoo.com.br

**ABSTRACT:** *Glechon spathulata* is commonly used in Brazil as a condiment and in folk medicine for the treatment of inflammations and dyspepsia, and also as diaphoretic, expectorant and antiseptic in affections of the respiratory tract such as colds, bronchitis and laryngitis. Considering that the widespread use of medicinal plants requires the establishment of quality parameters, the physico-chemical characterization of *G. spathulata* aerial parts was lead by currently established methodologies, which allowed its diagnosis as a raw material for pharmaceutical and/or food industry. The selected elution system can be useful for the authenticity and integrity of plant material by thin layer chromatography. In the physico-chemical characterization of *G. spathulata* were identified: the content of total ash (5,81 %), acid-insoluble ash (0,2 %), foreign matter (0,16 %), loss on drying (6,82 %), volatile oils (2,93 %), swelling indvex (2,5), bitterness index (1,25 u/g) and foaming index (<100). In crude ethanolic extract, it was found 18,6% of polyphenols, 5,94 % of flavonoids and 0,25 % of condensed tannins. These findings allow us to establish parameters of authenticity, purity and integrity of *G. spathulata*, contributing, thus, to the diagnosis of the species as a raw material for food and cosmetic industry.

**KEY WORDS:** *Glechon spathulata*, Lamiaceae, medicinal plants, physico-chemical, spices, quality control

## 1 INTRODUCTION

Traditional medicine can be defined as the sum of knowledge, skills and practices used to maintain health, as well as to prevent, diagnose or treat physical and mental illnesses based on theories, beliefs and experiences of different cultures. In some developing countries, around 80 % of population depends on traditional medicine for primary health care, and besides that, the use of herbal therapy has been increasing worldwide as an alternative in official medicine (WHO, 2008). Brazil has the greatest genetic diversity of plants in the world, with more than 55.000 described species from an estimated total between 350.000 and 550.000 species. In contrast, 4.400 species were studied for the identification of bioactive compounds and only 1.100 plant species have been assessed in terms of its pharmacological properties (Simões et al., 2007).

A compromise with ethical principles should guide the whole productive chain of medicines to ensure safety and efficacy of products. The use of low quality herbal products in international markets has generated serious questions towards the effectiveness and safety of these products (WHO, 2008). The quality of pharmaceutical products derived from medicinal plants may be related to several factors, ranging from cultivation, botanical identification, harvesting, drying and storage conditions of the plant material to qualitative analysis and techniques of pharmaceutical development to obtain the finished product (Bauer, 1998; Calixto, 2000; Carvalho et al., 2006; Sahoo et al., 2010). The use of chromatographic fingerprinting, besides to be preconized by several pharmacopoeias, was proposed by WHO (1991) and FDA (2006) as an acceptable alternative technique for the identification and quality evaluation of a plant drug.

The raw materials plays a pivotal role for guaranteeing the quality and stability of herbal preparations, although this is not the only aspect responsible for the efficacy and safety of the final product (Farias et al., 1985; Calixto, 2000; WHO, 2002; Farias, 2007). Moreover, the lack of quality parameters for medicinal plants prevents the development of prototypes for new medicines (Budel et al., 2004). Therefore, to ensure the quality of the vegetal drug, various research steps are preconized: authenticity (organoleptic characterization, macro and microscopic identification), purity and integrity tests (determination of foreign materials, total ash, acid-insoluble ash, loss on drying) and qualitative or quantitative determination of active compounds or chemical markers. (WHO, 1998; Brasil, 2000).

Considering the potential of Brazilian biodiversity, we investigate a native plant, which has reports of use in traditional medicine and that already has been included in the



Brazilian Pharmacopoeia (Braz. Pharm., 1926). *Glechon spathulata* is traditionally known in Brazil as “mangerona-do-campo”, where it is used as condiment and, in traditional medicine, stomachic, diaphoretic, anti-inflammatory, anti-herpetic, expectorant and antiseptic properties are attributed for its extract (Coimbra, 1942; Mentz et al., 1997; Morgan, 1997; Xifreda & Mallo, 2004; Brandão et al., 2006). In the phytochemical screening of *G. spathulata* were detected flavonoids, triterpenes, anthocyanins and condensed tannins. In volatile oil, nine compounds were detected and separated by gas chromatography (GC): 1,8-cineole, beta-caryophyllene, alpha-humulene, germacrene D, bicyclogermacrene, spathulenol and caryophyllene oxide (Kunz, 2007). Moreover, Montanha et al. (2004) described a remarkable activity against HSV-1 of ethanol 50 % extract, and Banderó-Filho et al. (2010) revealed morphological and anatomical features of *G. spathulata* leaves, suggesting its use in the authenticity of the sample.

Worldwide, there have been many efforts to monitor the quality and regulate the growing business of herbal drugs (Patwardhan et al., 2004). In Brazil, the medicinal plants of native flora are usually consumed with little or no scientific evidences of its pharmacological properties (Veiga-Junior et al., 2005). Given the few published data and the lack of quality parameters of *G. spathulata*, our purpose in this paper is to characterize the physico-chemical properties of this medicinal plant in order to contribute for the establishment of more appropriate, effective and safer uses of this species.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Plant material**

Flowery aerial parts of a wild sample of *G. spathulata* were collected in Dilermando de Aguiar city, Rio Grande do Sul state, Brazil, in April 2009. A sample of plant material was identified by Dr. Gilberto D. Zanetti and voucher specimens were deposited in the Herbarium of Biology Department of the Federal University of Santa Maria (SMDB 10297). The plant material was dried at 40° C with air circulation and grounded in a knife mill.

### **2.2 Preparation of extractive solutions**

The crude ethanolic extract (CEE) was obtained by maceration of powdered plant drug (354 g) with solid solvent ratio 20% (w/v) in ethanol 70% during 30 days, and residue was dried through rotary evaporator at 40 °C (Büchi, Flawil, Switzerland). After this, the CEE was

partitioned in four fractions by solvents of increasing polarity (Falkenberg, Santos & Simões, 2007). Following, 30 g of CEE in 400 ml of water was dissolved and partitioned. Through this process, four fractions were obtained: hexane (HF), chloroform (CF), ethyl acetate (EAF) and butanol (BF). For last, each fraction was dried in the same way and the yield was measured as total extractable compounds (TEC) for CEE and its fractions.

### 2.3 Physico-chemical analysis

The physico-chemical characterization was realized with aerial parts and extracts of *G. spathulata* (Braz. Pharm., 1988, 2000; WHO, 1998).

#### 2.3.1 Organoleptic properties and pH

The organoleptic features analyzed were odour, flavor and color. The odour was checked by pressing a small portion of leaves on the palm of the hand, inhaling slowly and repeatedly. The color of the leaves was analyzed with fresh plant under diffuse daylight. The flavor was tasted through the instillation of few drops on the tongue of an aqueous solution 1 % (w/v) of the powdered plant drug heated on an electric-plate and brought to the boil for 5 min (WHO, 1998). The pH was verified by potentiometry with the above solution (Braz. Pharm., 1988).

#### 2.3.2 Granulometry

In order to standardize the sample size, 50 g of powdered aerial parts of *G. spathulata* were subjected to forced vibration passing through the sieves with aperture corresponding to 1.70, 0.850, 0.600, 0.425, 0.300, 0.212, 0.150, and 0.05 mm, using vibratory screening, ten of the scale unit, for 20 minutes. After this process, the fractions were collected from the sieves and the collector, and then quantified according to their proportions. For the analysis of the passage and retention of the amount of powdered plant drug collected from each sieve, worksheets were prepared in Excel® software, where the percentage frequencies and also the cumulative percentage frequencies were calculated. (Braz. Pharm., 1988)

#### 2.3.3 Extractable matter

The extractable matter was assessed through the manual "Quality control methods for medicinal plant materials" (WHO, 1998). The results were achieved using 4 g of powdered plant drug and 100 ml of each solvent (ethanol 70 % and water), through hot extraction under reflux (1 h) and cold maceration (24 h).

#### 2.3.4 Foreign matter

Macro and microscopy examination was conveniently employed to determine the presence of foreign matter in powdered plant drug. In the macroscopy examination, 50 g of vegetal drug was spread on a thin layer from which the foreign matter was selected by inspection through the magnifying lens. The content of foreign matter was calculated considering the air-dried sample.

#### 2.3.5 Loss on drying

For the determination of water and volatile matter, 3 g of powdered plant drug were placed in a previously dried and tared weighing bottle, and then, deposited in an oven at 105 °C during 5 hours. The loss of drying weight was calculated considering the air-dried sample.

#### 2.3.6 Determination of ash

The remaining ash of plant material ignition was determined by two methods, for obtaining the total ash and the acid-insoluble ash.

##### 2.3.6.1 Total ash

The powdered plant drug (3 g) was placed in a previously ignited and tared crucible, and then it was ignited by gradual heating to 450 °C, cooled in a desiccator and weighed. For obtaining carbon-free ash, the residue was moistened with 2 ml of water after cooling the crucible. The remaining material was dried on a water-bath and then placed on a hot-plate, being ignited again until constant weight. The residue was cooled in a desiccator for 30 minutes and weighed. Total ash content was calculated considering the dry material.

##### 2.3.6.2 Acid-insoluble ash

In the crucible containing the total ash, it was added 25 mL of hydrochloric acid (70g/L), covered with a watch-glass and boiled gently for 5 minutes. The watch-glass was rinsed with 5 mL of hot water and then this liquid was added to the crucible. The insoluble matter was collected on an ashless filter-paper and washed with hot water until the filtrate was neutral. Thereafter, the filter-paper containing the insoluble matter was transferred to the original crucible, which was dried on a hot-plate and ignited to constant weight. After cooling the residue in a desiccator, the crucible was weighted and the content of acid-insoluble ash calculated considering the dry material (Braz. Pharm., 2000).

### 2.3.7 Volatile oils

In order to determine the content of volatile oil in aerial parts of *G. spathulata*, there were used 25 g of fresh aerial parts, which were hydro-distilled for 30 minutes in a Clevenger apparatus. The total oil content was calculated considering the weight of fresh plant material.

### 2.3.8 Bitterness value

The bitter properties of plant material were determined by comparing the threshold bitter concentration of the extract from the material with the concentration from a dilute solution of quinine hydrochloride. Drinking-water was the vehicle to the extraction of plant materials and for the mouth-wash after each tasting. The stock solution (St) was made through boiling the plant drug 1 % (w/v) in water for 30 minutes under reflux. After filtered, the St was transferred to 10 tubes with volumes from 1 to 10 mL. The standard solution of quinine hydrochloride R was distributed in nine tubes from 0.042 to 0.058 mg/10mL. The bitterness value was expressed in units equivalent to the bitterness of a solution containing 1g of quinine hydrochloride in 2000 mL (Braz. Pharm., 1988).

### 2.3.9 Swelling index

One gram of powdered plant drug was introduced into a 25 mL glass-stoppered measuring cylinder for the verification of the volume occupied by the sample. Next, 25 mL of water was added and the mixture was shaken thoroughly every 10 minutes for about 1 hour. After that, the mixture was stood for 3 hours at room temperature, and finally the volume in ml occupied by the plant material was remeasured.

### 2.3.10 Foaming index

One hundred mL of water was added to 1 g of powdered plant drug and maintained in moderate boiling for 30 minutes. After, it was cooled, filtered and the volume was completed with water up to 100 mL. This solution was added in 10 stoppered-tubes successively from 1 to 10 mL, completing the volume in each tube with water up to 10 mL. The tubes were shaken for 15 seconds and stood for 15 minutes and then the height of the foam was measured. The results were assessed according to the following criterion: if the height of the foam in every tube was lower than 1 cm, the foaming index is less than 100. For calculating the foaming index of samples with height greater than 1 cm, the following formula was used:  $FI = 1000/a$ , in which  $a$  is the volume in ml of the decoction used for preparing the dilution in the tube where the foaming (up to 1 cm height) was observed (Braz. Pharm., 2000).

## 2.4 Thin-layer chromatography (TLC)

In order to identify and characterize the constituents of CEE of *G. spathulata* and its fractions, plates with 0.1 mm layer of silica gel 60 F<sub>254</sub> were used in TLC (Merck, Darmstadt, Germany). The standards of flavonoids (quercetin, rutin) and phenolic acids (chlorogenic acid and caffeic acid) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

The extracts (CEE and fractions) were dissolved in methanol at 1 % (w/v), and the standards at 0.1 % (w/v) in the same solvent, and then applied 10 µL in TLC plates. Also, some elution systems were used (Wagner et al., 1984) in order to define the best profile for enabling the sample authentication. Before the elution, both chambers were equilibrated for 1 hour. In order to perform successful separation of standards and samples, the following mobile phases were tested: ethyl acetate: formic acid: water (67:13:20), chloroform: acetone: formic acid (60:16.5:8.5) and ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27) (Wagner et al., 1984). Next, the plates were air-dried, sprayed with oxalic and boric acid solution, heated under 100 °C for 10 minutes, and viewed under UV light (long and short). After, the rate of flow (Rf) was calculated and TLC plates were recorded by photographs.

## 2.5 Determination of phenolics, flavonoids and condensed tannins

### 2.5.1 Total phenolics

The determination of total phenolic content was performed by the Folin–Ciocalteu reagent (Chandra & Mejia, 2004). Briefly, 1 mL of 2 N Folin–Ciocalteu reagent was added to 1 mL of each sample (80 µg/mL water) and this mixture stood for 5 min before the addition of 2 mL of 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After 10 min at 25 °C, the absorbance was read at 730 nm in spectrophotometer (Shimadzu UV-Vis 1201, Kyoto, Japan). The blank was prepared with water instead of plant extracts. The total phenolic content was expressed in gallic acid equivalents (GAE), in mg/g dry sample. The regression curve of gallic acid in the range 0.006–0.030 mg/mL was  $Y = 0.0285x + 0.0167$  ( $r^2 = 0.9993$ ).

### 2.5.2 Flavonoids

The total flavonoids determination was performed according to a modified methodology from Rio (1996). Briefly, 75 µL of 5 % methanol (MeOH) solution of AlCl<sub>3</sub> was added to 1.0 mL of each sample (400 µg/mL MeOH 70 %) and 4.0 mL of MeOH 70 %. This mixture stood in the dark at 25 °C for 30 min, before reading at 425 nm. The blank was prepared with MeOH 70 % instead of plant extracts. The total flavonoids content was

expressed in quercetin equivalents (QE), in mg/g dry sample. The regression curve of quercetin in the range 0.002–0.070 mg/mL was  $Y = 0.0128x + 0.0041$  ( $r^2 = 0.9977$ ).

### 2.5.3 Condensed tannins (proanthocyanidins)

The sulfuric vanillin assay for condensed tannins was made according to Sun et al. (1998), where 2.5 mL of 1 % vanillin in MeOH (w/v) was added to 1 mL of each extract (4 mg/mL MeOH 70 %), followed by 2.5 mL of 25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in methanol (v/v). After 15 min at 25 °C, the absorbance was read at 500 nm. The blank was prepared with methanol 70 % instead of plant extracts. The condensed tannins content was expressed in catechin equivalents (CAE), in mg/g dry sample. The regression curve of catechin in the range 0.010–0.150 mg/mL was  $Y = 0.0058x - 0.0153$  ( $r^2 = 0.9974$ ). All determinations were performed in triplicate.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Organoleptic properties

Fresh leaves of *G. spathulata* presented a strong aromatic odour, similar to the *Origanum majorana*. Other organoleptic features of aqueous extract presented were an adstringent flavor, slightly bitter, with dark green color. The slightly acidic pH (pH 4.0) suggests the presence of acidic substances in aerial parts of *G. spathulata*.

### 3.2 Granulometry

The powdered plant drug presented coarse particle size, because all of its particles passed through the 2000 µm sieve, and not more than 40 % through the 355 µm sieve (Braz. Pharm., 1988; WHO, 1998), as shown in Figure 1A. Through the linear regression of achieved granulometry results, it was possible to determine the particles mean diameter of 606.3 µm (Fig. 1 B). The size of ground plant drugs is an important parameter to be established because it influences directly on the efficiency of the extraction process.

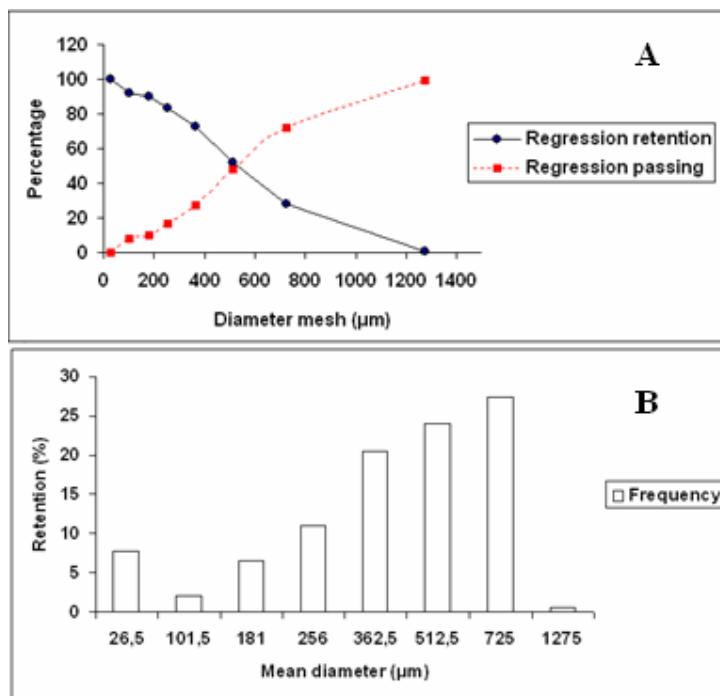


Figure 1. A - Frequency of distribution according to mean diameter of powdered aerial parts of *G. spathulata*; B - Cumulative percentage of retention and passing, considering the average particle size of powdered aerial parts of *G. spathulata*.

### 3.3 Yield of extractive solutions

Extractive solution was prepared by maceration of 354 g of *G. spathulata* powdered aerial parts (606.3  $\mu\text{m}$ ) at 20 % (w/v) in ethanol 70 % for 30 days produced an yield of 50.1 g (14.15 %) of CEE. In liquid-liquid partition from 30 g of dry CEE dissolved in water were obtained the yields as follows: HF – 0.8 g (2.67 %); CF – 4.372 g (14.57 %); AF – 3.14 g (10.47 %) and BF – 4.423 g (14.74 %). The extractive content of CF and BF were very close and approximately 40 % higher than AF. The AF showed an extractive yield almost four times higher than HF, which exhibited only 2.67 % of extractives.

The extractive content obtained through the standardized methodologies (maceration and heating under reflux), with ethanol 70 % and water, showed very close results. The power extraction verified for hot and cold water was 16.9 % (0.169  $\pm$  0.006 g) and 17.1 % (0.171  $\pm$  0.0006 g), respectively. Tepe et al. (2005) obtained a greater yield of extractives (21.09 %) by hydrodistillation of aerial parts of *Salvia tomentosa*. With the use of hot and cold ethanol, we found a greater difference on power extraction, obtaining 18.6 % (0.186  $\pm$  0.0006 g) and 14.2 % (0.142  $\pm$  0.0047 g) of extractable matter, respectively. Both extractions with water showed a higher yield than the cold ethanol, and this result was very close to that obtained with hot

ethanol. Considering these results, in the process of choosing the most suitable extraction system, the integrity of the sample should be preserved in order to avoid the degradation of thermo-labile compounds.

The extractable matter is the result of a combination of several factors such as the compounds content in the plant drug, its solubility in the solvent used according to polarity and the ability of the solvent to penetrate plant cells (Costa, 1994). The water permits extraction of high amounts of phenolic compounds, but its use has some restrictions due to a significantly increased risk of microbial contamination of the extract, but this risk can be minimized by reduction of extraction time (Migliato et al., 2007; Mariod et al., 2010). Our results demonstrated that the maceration of plant drug in water for 24 h produced higher extractable matter content (17.1 %) than ethanol 70 % (14.2 %). The maceration used in preparation of extractive solutions, besides preserving the thermo-labile compounds, also showed a good extractive content, which was almost three times higher than the content obtained from other Lamiaceae species, as *Mentha spicata* (5.25 %) (Arumugan et al., 2008).

Changes in the extract composition may occur either by microbial grown or by oxidation caused by the long extraction time, but this effect can be prevented by the addition of reducing agents to the solvent system (Khanna et al., 1968; Migliato et al., 2007). Comparing of results achieved in the preparation of extractive solutions with the methods recommended by WHO (1998), differences were observed only in the drug solvent and extraction time ratios. Ethanol 70 % caused a drastic change in the maceration time, although it did not influence in the extraction power. The same yield was observed in maceration of plant drug at 20 % (w/v) in ethanol 70% for 30 days and 4 % (w/v) for 24 hours, which besides optimizing the extraction time, it also had a great contribution to the preservation of the sample. In addition, the extractable content obtained by different tested methods is related to the coarse size of used powder and can be improved by reducing the size of its particle (Costa, 1982, 1994).

### 3.4 Foreign matter

In 50 g of powdered plant drug, it was encountered  $0.020 \pm 0.001$  g (0.04 %) of foreign matter, mainly sand. This small amount found can be assigned to the environment where the plant grows naturally, besides being smaller than permitted for fruits of *Foeniculum vulgare* and leaves of *Peumus boldus*, 2 % and 3 % respectively (Braz. Pharm., 1996). The percentage of steams on powdered plant drug sample was 46.7 %.



### 3.5 Loss on drying

The loss on drying of 3,0 g of air-dried powdered plant drug was  $204,7 \pm 2,5$  mg (6,82 %), and represents the water and volatile matter content in the analyzed sample of *G. spathulata*, providing information about the storage of plant drug. The residual water content of dry plant drug is directly related to its storage, and may result in hydrolysis of chemical constituents or microbial growth (Cirio et al., 2003). The loss on drying of *G. spathulata* was close to that found in powdered fruit of *Syzygium cumini* (6.01 %). Considering the limits established to other plants in the 4<sup>a</sup> ed. of Brazilian Pharmacopoeia (<5 % to <16 %), we concluded that this value can protect the plant drug from degradation (Braz. Pharm., 1988-2005; Farias, 2007; Migliato et al., 2007). The inexistence of a monograph of *G. spathulata* prevents its comparison with established parameters in literature. Limits for water content should therefore be set for every plant material, which is especially important for materials that absorb moisture easily or deteriorate quickly in the presence of water (WHO, 1998).

### 3.6 Ash

The combined analysis of ashes and foreign material revealed information about the purity of the sample. From the ignition of 3.0 g of plant drug,  $174.2 \pm 2.3$  mg (5.81 %) of total ash was obtained. From this analysis, the acid insoluble ashes were determined, which showed a content of  $5.9 \pm 1.8$  mg (0.20 %). The main goal of this test was to verify the content of physiological and non-physiological ash in plant drug. Acid-insoluble ash is generally composed by sand and siliceous earth. *G. spathulata* aerial parts presented 0.20 % (2.0 g/Kg) of acid-insoluble ash, similar to the amount verified for stems of *Caesalpinia ferrea* (0,153 %) (Frasson et al, 2003). Both values are lower than the maximum value recommended for *Hamamelis virginiana* (2 %), *Atropa belladonna* (3 %) and contrasting even more with *Peumus boldus*, where is allowed 6 % of acid-insoluble ash (Braz. Pharm., 1996). These low levels of non-physiological ash can be considered a particular plant feature, since that high contents of silica in epidermal cells of leaves can be useful for the differentiation of Dilleniaceae species (Barroso., 1991; Almeida et al., 1998). The subtraction of acid-insoluble ash from the total ash provided us the content of physiological ashes (5.61 %), representing 96.56 % of total ashes. The total ash content of *G. spathulata* is similar to that found in *C. ferrea* (5.31 %) (Frasson et al., 2004), but smaller than that recommended for aerial parts of other species, such as *Centella asiatica* (11 %), *Malva sylvestris* (16 %) (Braz. Pharm., 2000), *Salvia officinalis* L. (8 %) and *Passiflora incarnata* (11 %) (Brit. Pharm., 1996), and that

found in *Hamamelis virginiana* (9.14 %) and *Syzygium cumini* (9.56 %) (Migliato et al., 2007).

### 3.7 Volatile oils

The hydrodistillation of 25 g of fresh and whole aerial parts of the plant resulted in  $0.732 \pm 0.015$  g (2.93 %, w/w) of volatile oils. These compounds are complex mixes of volatile substances, lipophylic, oil-like appearance and liquid at room temperature, and they are generally intense and have a pleasant aroma, being called essential oils (Simões & Spitzer, 2007). The content found in *G. spathulata* was considerably higher than observed for other Lamiaceae, such as *Thymus vulgaris* (1.80 %), *Thymus revolutus* (1.67 %), *Ocimum vulgare* (1.45 %), *B. dracunculifolia* (0.8 %), *B. articulata* (0.5 %), and *Ocimum basiliscum* (0.06 % – 0.66 %) (Werker et al., 1993; Karaman et al., 2001; Budel et al., 2004; Bozin et al., 2006). This result can be explained by the fact that the plant was collecting at flowering, when the content of volatile oils is maximum (Budel et al., 2004).

For a long time, a notable antimicrobial activity has been reported in these essential oils from aromatic plants and spices, in some cases, this characteristic is attributed to the high content of phenolic compounds, which could be useful in food production (Huhtanen, 1980; Karaman et al., 2001; Baydar et al., 2004; Bozin et al., 2006). The anti-bacterial activities of essential oils of Lamiaceae species is described in previous studies to the genera *Salvia*, *Mentha*, *Origanum*, *Thymbra*, *Satureja*, among others (Karaman et al., 2001; Marino et al. 2001; Baydar et al., 2004; Tepe et al., 2005; Bozin et al., 2006). Dundar et al. (2008), observed that the treatment with *Origanum onites* essential oil, applied at 0.1 or 1.0 mg/kg/day dosage, had a significant protective effect on the colonic injury in rats.

### 3.8 Bitterness value

The bitter taste of standard was felt from the tube containing 5 µg/ml of quinine hydrochloride, and, in the sample, it was felt from the tube with 8 mg/ml of water extract. The bitterness value calculated was 1.25 units/g. Medicinal plants with a strong bitter taste are employed therapeutically, mostly as appetizing agents, once their bitterness stimulates secretions in the gastrointestinal tract, especially the secretion of gastric juice (Mors et al., 2000). The bitterness value found for *G. spathulata* confirms the presence of bitter substances, although these are present in very small amounts. *Baccharis articulata* showed bitterness value of 230 u/g and was compared to *Gentiana lutea*, a known bitter plant. *Baccharis cylindrica*

presented moderately bitterness value (153.3 u/g), and *Baccharis gaudichaudiana* (28.8 u/g) was considered faintly bitter (Budel et al., 2004)

### 3.9 Swelling index

After 3 hours of water addition to 1 g of powdered plant drug, it was verified a swelling index of  $2.03 \pm 0.21$  mL. This result represented an increasing of 50.75 % in the volume initially occupied by plant drug, and suggests the presence of mucilage and/or gum in the plant drug (Braz. Pharm., 1988; WHO, 1992). Natural gums and mucilage have been widely explored as pharmaceutical excipients. Patel et al. (2007) tested the separated mucilage from seeds of *Ocimum americanum* as a tablet disintegrant, perceiving that they did not interfere in the release of drug from this formulation.

### 3.10 Foaming index

After 15 minutes stand, neither tube presented a persistent ring of foam higher than 1 cm. Only a small ring from the 8<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> tube was observed, but this did not reach 1 cm. Therefore, the foaming index found was less than 100, which reveals the presence of a small amount of saponins.

**Table 1. Content of crude ethanolic extract (CEE), extractable matter, ash, foreign matter, loss on drying and swelling index in 100 g of powdered aerial parts of *Glechon spathulata*.**

<i>Glechon spathulata</i>		Results (%)	
CEE (20 % w/v, Ethanol 70 %)		14.15	
Extractable matter (4 % w/v)	Ethanol 70 %	Hot	18.60
		Cold	14.20
	Water	Hot	16.90
		Cold	17.10
Ash	Total	5.81	
	Acid-insoluble	0.20	
Foreign matter		0.04	
Loss on drying – water and volatile matter		6.82	
Swelling index		50.75	

### 3.11 TLC

TLC besides to be simple, fast and an inexpensive technique, is a recognized method which is useful for authenticity of raw materials (Vogel et al., 2005; Farias, 2007). After testing the elution systems, the mobile phase ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27) was chosen due to its better separation of samples constituents. The analysis of chromatogram developed with the selected mobile phase and sprayed with oxalic-boric solution revealed the presence of some distinct fluorescent bands under UV short, but more intense under UV long wavelength radiation (365 nm) (Fig. 2). According to Costa (1982), the appearance of yellow green fluorescence (particularly in flavonols) is related to the reaction of oxalic and boric acid to the fundamental core of flavonoids. In the table 2, the Rfs and color of the observed bands in developed chromatogram are presented. Through the analysis of the results, it was verified two yellow brown bands, the first viewed in CEE, AF and BF (Rf 0.44), and the second viewed only on CEE and BF (Rf 0.65). Due to the high intensity presented in the yellow brown band of Rf 0.44, especially in the CEE and BF, we suggest its use as a chemical marker of *G. spathulata* extracts. Comparing the color developed at  $\lambda$  365 nm by standards (chlorogenic acid and caffeic acid), it was verified in samples the presence of substances with the same staining pattern although different Rfs, leading us to speculate the presence of the phenolic acids in extracts of *G. spathulata*, especially in CEE, AF and BF, which are commonly found in Lamiaceae, and could be responsible for the acidification verified in aqueous extract (Fig. 2). A band of AF, although not recorded due to its low intensity, showed Rf and staining similar to quercetin. The co-chromatography by the addition of standards in samples with the same mobile phase was performed in order to confirm the presence of rutin and quercetin in the extracts (Fig. 3). Thus, it was observed an increasing of the intensity of a zone in BF caused by rutin, but in the AF was not confirmed the presence of quercetin.

The chosen mobile phase allowed the separation of CEE, AF and BF flavonoids in bands, which were best visualized under UV light. Thus, we assume that the methodology used in this experiment is suitable for authenticity of the studied species. Moreover, the co-chromatography by the addition of rutin to BF increased the concentration of the dark blue color zone under UV longwave, before being sprayed with 5 % (w/v) aqueous FeCl<sub>2</sub>.

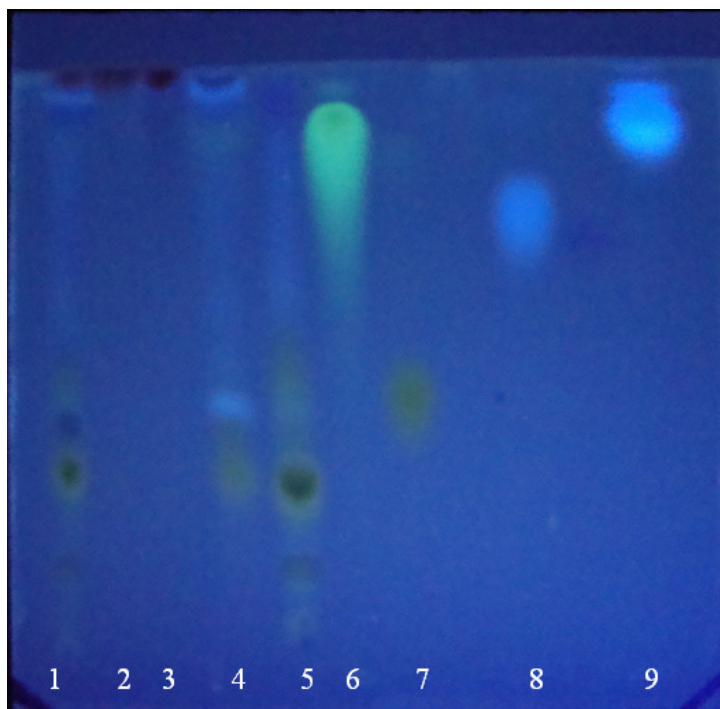
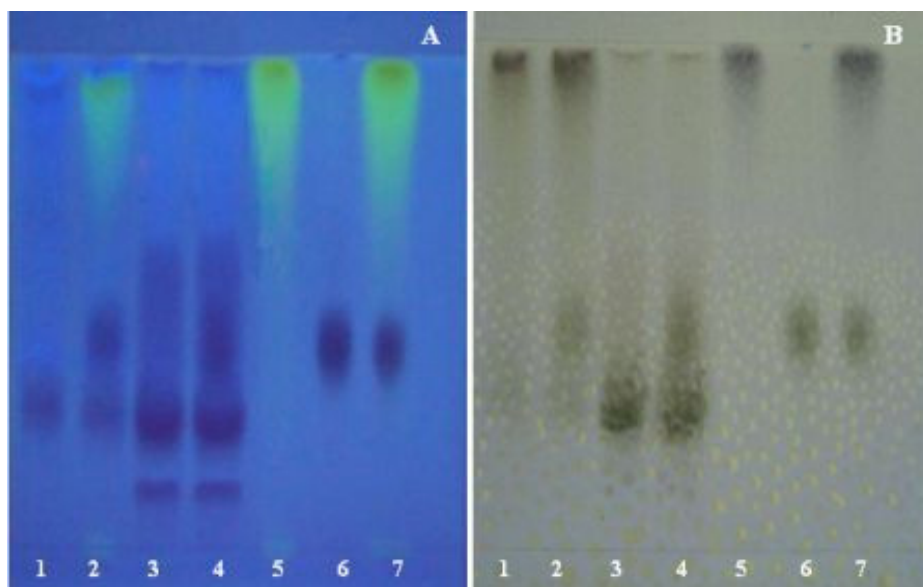


Figure 2. Chromatographic profile by TLC of *Glechhon spathulata* extracts. 1 – CEE, 2 – HF, 3 – CF, 4 – AF, 5 – BF, 6 – Quercetin, 7 – Rutin, 8 – Chlorogenic acid, 9 – Caffeic acid. Mobile phase - ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27); Oxalic-boric reagent;  $\lambda$  365 nm.

Table 2. Rfs of phenolic compounds of *G. spathulata* extracts after sprayed with oxalo-boric solution. Mobile phase - ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27),  $\lambda$  365 nm.

Sample	Revelator oxalo-boric solution
CEE	0.23 (brown); 0.45 (yellow brown); 0.55 (blue); 0.65 (brown); 0.95 (light blue); 0.98 (dark red)
HF	0.98 (dark red)
CF	0.98 (dark red, dark blue outline)
AF	0.44 (yellow brown); 0.55 (yellow brown); 0.60 (light blue); 0.95 (light blue); 0.98 (dark blue)
BF	0.25 (brown); 0.43 (yellow brown); 0.66 (yellow brown)
Q	0.94 (light yellow)
R	0.64 (yellow brown)
CLA	0.89 (light blue)
CAF	0.96 (light blue)

Crude ethanolic extract (CEE), hexane fraction (HF), chloroformic fraction (CF), acetate fraction (AF), butanol fraction (BF), quercetin (Q), rutin (R), Chlorogenic acid (CLA), Caffeic acid (CAF).



**Figure 3.** Co-chromatography of *G. spathulata* extracts. 1 – AF, 2 – AF+Q+R, 3 – BF, 4 – BF+R, 5 – Quercetin, 6 – Rutin, 7 – Q+R. Mobile phase: ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27); A -  $\lambda$  365 nm; B – Spray reagent:  $\text{FeCl}_2$ .

### 3.12 Bioactive compounds

The development of herbal medicines requires comprehensive understanding of plant systems including biological, chemical, genetic, and agronomic aspects (Farias et al., 1985; Zou et al., 2005; Yang et al., 2005; Sahoo et al., 2010). The production of different metabolites (alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, etc.) in medicinal plants can be affected by environmental (photoperiod, climate, soil conditions, nutrient availability and moisture), physiological and genetic variables, among others. Secondary metabolite content is also dependent on the time of harvesting, storage, drying, extraction and processing for final packaging of plants. Some of these chemical constituents characterize of a particular plant, and thus may serve as a parameter for its identification. Considering these aspects and the fact that no studies were found about these features of *G. spathulata*, its phenolic constituents were quantified by regression curves, in CEE and in its fractions as shown in Table 3.

Total phenolic compounds represented 18.6 % of CEE, and among its fractions the AF showed the highest phenolics amount (35.2 %). On the other hand, HF and BF showed also a significant content, ranging from 16.2 % to 18.9 %. These results can be useful both for quality control of raw material, and for justifying, at least in part, its use in traditional

medicine. Phenolic compounds are synthesized by plants in response to stress conditions. Their solubility depends on the polarity of used solvent in extraction, degree of polymerization, as well as its interaction with other plant constituents and formation of insoluble complexes (Naczki & Shahidi, 2004). Ethyl acetate is often used due to its significant selectivity in the extraction of phenolics, which was also verified in our study (Scholz & Rimpler, 1989; Sluzarczyk, 2009; Mariod et al., 2010). In food industry, these compounds may contribute to the bitterness, astringency, color, flavor, odor and stability of products, preventing them from oxidation (Marino et al., 2001; Naczki & Shahidi, 2004; Baydar et al., 2004; Angelo & Jorge, 2007; Mariutti & Bragagnolo, 2007; Sluzarczyk et al., 2009). Currently it can be observed a tendency to replace synthetic antioxidants by natural antioxidants in food, and, at the same time, to add the other beneficial properties attributed to these compounds (Moure et al., 2000; Marino et al., 2001; Tepe et al., 2005; Li et al., 2008). *G. spathulata* besides medicinal uses is already consumed as a condiment.

Many herbal infusions, frequently used as home medicines, have antioxidative and pharmacological properties associated to the presence of phenolic compounds, especially phenolic acids and flavonoids (Sluzarczyk et al., 2009).

Among the phenolic compounds, flavonoids are one of the large and heterogeneous groups of biologically active non-nutrients, together with phenolic acids (Shahidi & Naczki, 1995). Overall, flavonoids have so far been found to exhibit a wide spectrum of pharmacological properties, including antioxidative, antiallergic, anti-inflammatory, antidiabetic, hepato and gastro-protective, antiviral, and antineoplastic activities (Nijveldt et al., 2001; Zand et al., 2002; Ren et al., 2003). Their presence is cited in other species of Lamiaceae, such as *Sideritis raeseri*, *Sideritis scardica*, *Teucrium montbretii* and *Ballota undulata*, besides being one of the main compounds present in *Haplopappus taeda* (Asteraceae) (Siciliano et al., 2005; Vogel et al., 2005; Janeska et al., 2007; Özkan et al., 2007). The content of flavonoids in *G. spathulata* aerial parts (0.84 %) is higher than the minimum recommended to the flowers of *Calendula officinalis* (0.4 %) and *Baccharis trimera* (0.5 %), but smaller than the established for *Achyrocline satureoides* (1.7 %) and *Eugenia uniflora* (2.0 %) (Braz. Pharm., 2002, 2003, 2004). In fractions, flavonoids concentration was directly related to solvent polarity, which was also observed by Mariod et al. (2010). Therefore, the highest quantity of flavonoids was found in the BF, accounting for 13.03 % of this fraction, corresponded for 68.9 % of phenolics present in this fraction.

The determination of the condensed tannins amount in plant materials is important due to its reactivity with molecules of biological significance such as proteins, metal ions and

polysaccharides, hence they have important nutritional and physiological consequences (Schofield et al., 2001). Previous studies focused on the tannins of the Lamiaceae species (*Salvia officinalis*, *Origanum vulgare*, *Thymus serpyllum*, *Ocimum vulgare*, *Mentha x piperita*), and others, as important antiviral constituents (Kucera & Herrmann, 1967; Herrmann & Kucera, 1967; Yarnell & Abascal, 2005). Among the condensed tannins, the polymers are responsible for adstringency and the monomers for bitterness (Ojeda et al., 2002). Thus, the small bitterness index found corroborates the content of metabolites in plant extracts. Özkan et al. (2007) describes a content of 43.8 mg CTE/g extract of condensed tannins in the hot methanol extract of *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum*, almost 18 times higher than that found in CEE of *G. spathulata* (Tab. 3). Nevertheless, it was found that the BF has the highest content of condensed tannins (0.48 %), approximately three times the content found in the FA (0.17 %). Therefore, our findings show that the content of condensed tannins in the samples of *G. spathulata* is higher than those found in *Melissa officinalis*, *Mentha longifolia*, *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* (Ho et al., 2010).

**Table 3.** Total extractable compounds (TEC), total phenolic compounds (expressed in milligrams equivalent of gallic acid per gram of each fraction), total flavonoids content (milligrams equivalent of quercetin per gram of each fraction), and condensed tannins (milligrams equivalent of catechin per gram of each fraction) from aerial parts of *Glechon spathulata*.

Sample	TEC	Total phenolics		Flavonoids		Condensed tannins	
	mg/g	mg GAE / g	%	mg QEE / g	%	mg CTE / g	%
<i>G. spathulata</i> aerial parts	-	26.32	2.63	8.4	0.84	0.36	0.04
<b>CEE</b>	141.5	186 ± 4.00	18.60	59.4 ± 0.58	5.94	2.51 ± 0.13	0.25
<b>HF</b>	26.7	162 ± 3.48	16.20	17.01 ± 0.2	1.70	1.95 ± 0.09	0.20
<b>CF</b>	145.7	57 ± 1.03	5.70	30.29 ± 0.59	3.03	4.84 ± 0.09	0.48
<b>AF</b>	104.7	352 ± 10.85	35.20	95.92 ± 0.39	9.59	1.74 ± 0.09	0.17
<b>BF</b>	147.4	189 ± 9.82	18.90	130.29 ± 0.39	13.03	2.43 ± 0.13	0.24

Besides its importance for medicine, the Lamiaceae family is also a source of high valued species used as condiments in food, and in the industry of perfumes and cosmetics. *G.*



*spathulata* was part of the 1st edition of the Brazilian Pharmacopoeia (1929), but was not included in its most recent three editions, and the inexistence of established quality parameters, prevents us from taking advantages of its beneficial properties. Therefore, this work indicates important parameters for quality control of *G. spathulata*, by standardized methodologies, besides the identification and quantification of chemical markers of its extracts. The research of pharmacological activities of *G. spathulata* extracts must be encouraged due to its content of phenolic compounds and the properties attributed to them (Häkkinen et al., 1999; Paganga et al., 1999; Eberhardt et al., 2000 Galati & O'Brien, 2004; Hernández-Perez et al., 2004; Mariutti & Bragagnolo, 2007; Arumugan et al., 2008).

#### 4 CONCLUSION

These findings demonstrate that the methodologies described in this work are appropriate for quality control of plant drug and its derived products because they allow us to establish parameters of authenticity, purity and content of bioactive compounds from aerial parts of *G. spathulata*, contributing, thus, to the diagnosis of the species as a raw material for food and pharmaceutical industry.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Capes / CNPq for the financial support.

#### REFERENCES

- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. (1998) Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina/DF: EMBRAPA-CAPC.
- Angelo, P.M. & Jorge, N. (2007) Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **66** (1): 232-240.
- Angiosperm Phylogeny Group – APG in “Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since]”. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/>, Accessed: April 09, 2010.
- Appenzato-da-Glória, B. & Carmello-guerreiro, S.M. (2003) *Anatomia vegetal*. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil.

- Arumugam, P.; Gayatri Priya, N.; Subathra, M.; Ramesh, A. (2008) Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environ. Toxicol. Phar.*, **26**: 92–95.
- Banderó-Filho, V.C.; Zanetti, G.D.; Canto, G.S.; Dalmora, S.L.; Nemitz, M.C., Manfron, M.P. (2010) Morpho-anatomy of *Glechon spathulata* Benth. (Lamiaceae) leaves. *Lat. Am. J. Pharm.*, (IN PRESS).
- Baran, P. & Özdemir, C. (Jun. 2006) The morphological and anatomical characters of *Salvia napifolia* Jacq. in Turkey. *Bangladesh J. Bot.*, **35** (1): 77-84.
- Baran, P.; Özdemir, C.; Aktas, K. (2008) The morphological and anatomical properties of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, **4** (6): 725-733.
- Barbosa-Filho, J.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Alencar, A.A.; Batista, L.M.; Oliveira, R.A.G.; Guedes, D.N.; Falcão, H.S.; Moura, M.D.; Diniz, M.F.F.M.; Modesto-Filho, J. (2005) Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**: 392-413.
- Barroso, G.M. (1991) *Sistemática de angiospermas do Brasil*, 1ª ed., v. 3, Viçosa, UFV: Impr. Univ. p. 98-105.
- Basílio, I.J.L.D.; Agra, M.F.; Rocha, E.A.; Leal, C.K.A.; Abrantes, H.F. (2006) *Lat. Am. J. Pharm.*, **25** (4): 518-525.
- Bauer, R. (1998) Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable **drug** standards be achieved? *Drug Inf. J.*, **32**: 101-110.
- Baydar, H.; Sagdiç, O.; Özkan, G.; Karadogan, T. (2004) Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, **15**: 169–172
- Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackov, G. (2006) Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 1822–1828.
- Brandão, M.G.L.; Cosenza, G.P.; Moreira, R.A.; Monte-Mor, R.L.M. (2006) Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**: 408-420.
- Brandão, M.G.L.; Zanetti, N.N.S.; Oliveira, G.R.R.; Goulart, L.O.; Monte-Mor, R.L.M. (2008) Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18**: 127-134.
- BRASIL (1998) Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Primeiro Relatório nacional para a conservação sobre diversidade biológica.
- BRASIL (2000) Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.

BRASIL (2003) Ministério da Saúde. RE 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL (2006) Ministério da Saúde. Portaria nº 971. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN- PIC) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 04 mai. 2006.

Brazilian Pharmacopoeia (1926) - Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1ª ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, p. 572.

Broadhurst, R.B. & Jones, W.T. (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, **29**: 788-794.

Budel, J.M.; Duarte, M.R.; Santos, C.A.M. (2004) Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **14** (1): 41-48.

Calixto, J.B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 179-89.

Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel, A.; Perfeito, J.P.S. (2008) Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18**: 314-319.

Carvalho, C.M.G.; Prudente, L.R.; Pereira, A.C.; De Paula, J.R.; Bara, M.T.F. (2006) *Rev. Eletrônica Farmácia*, **3** (2): 53-62.

Chandra, S. & Mejia, E.G. (2004) Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 3583-3589.

Chimin, A.; Lima, E.L.; Beltrame, F.L.; Pereira, A.V.; Esmerino, L.A. (2008) Avaliação da qualidade de amostras comerciais de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) comercializadas no estado do Paraná. *Lat. Am. J. Pharm.*, **27** (4): 591-7.

Cibecol Industrial Farmacêutica Ltda. Porto Alegre, RS, Brasil. Available in: <http://www.cibecol.com.br/produtos.php?in=problemas&problema=30>. Accessed: October 04, 2009.

Cirio, G.M.; Doni Filho, L.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; Zanin, S.M.W. (Jul.- Dez./2003) Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart. ex. Reiss (espinheira-santa) como insumo para a indústria farmacêutica. *Visão Acadêmica*, **4** (2): 67-76.

Coimbra, R. (1942) *Notas de Fitoterapia*. 1. ed., Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo. p. 166.

Costa, A.F. (1982) Farmacognosia experimental. III vol., 2. ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1032 p.

- Costa, A.F. (1994) Farmacognosia. II vol. 4. ed., Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 1117 p.
- Costa, L.C.B.; Castro, E.M.; Pinto, J.E.B.P.; Alves, E.; Bertolucci, S.K.V.; Rosal, L.F.; Moreira, C.M. (Jul. 2007) *Rev. Bras. Biociências.*, **5** (supl. 1): 6-8.
- Cutter, E.G. (1987) *Anatomia vegetal. Parte II – Órgãos. Experimentos e interpretações.* 2. ed., São Paulo: Ed. Rocca, 336 p.
- Di Stasi L.C. & Hiruma-Lima, C.A. (2002) Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Ed. Unesp, 604 p.
- Dickson, W.C. (2000) Integrative Plant Anatomy. San Diego: Harcourt Academic Press, 533 p.
- Duarte, M.R. & Lopes, J.F. (2005) Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Leonurus sibiricus* L., Lamiaceae. *Lat. Am. J. Pharm.*, **24** (1): 68-74.
- Duarte, M.R. & Lopes, J.F. (Out./Dez. 2007) Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **17** (4): 549-556.
- Dundar, E.; Olgun, E.G.; Isiksoya, S.; Kurkcuoglu, M.; Baser, K.H.C.; Bal, C. (2008) The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **59**: 399–408.
- Eberhardt, M.; Lee, C.; Liu, R. (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, **405** (6789): 903–4.
- Fahn, A. (1990) Plant anatomy. 4. ed. Oxford: Pergamon Press, 587 p.
- Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. (2005) Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**: 381-391.
- Falkenberg, M.B.; Santos, R.I.; Simões, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. p. 229-246. In: Simões C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1104 p.
- Farias, M.R.; Shenkel, E.P.; Bergold, A.M.; Petrovick, P.R. (1985) O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, **1** (2): 73-82.
- Farias, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. p. 263-288. In: Simões C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1104 p.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1926). 1. ed., São Paulo: Cia Editora Nacional, p. 572.

Farmacopéia Brasileira (1988) 4. ed., Fascículo 1 (1996), Fasc. 2 (2000), Fasc. 3 (2002), Fasc. 4 (2003), Fasc. 5 (2004), Fasc. 6 (2005). São Paulo: Atheneu Editora. Available in: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/publicacoes.htm>

FDA - Food and Drug Administration, **Guidance for Industry: Botanical Drug Products**, June 2004, p. 11. Available in: <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CenterforDrugEvaluationandResearch/ucm106136.pdf>, Accessed: June 01, 2010.

Felipe, G.M. & Alencastro, F.M.M.R. (1966) Contribuição ao estudo da nervação foliar das compositae dos cerrados: I – Tribus Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae, e Senecionae. *Am. Acad. Brasil.*, **38** (supl): 125-157.

Frasson, A.P.Z.; Bittencourt, C.F.; Heinzmann, B.M. (jan./jun. 2003) Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia férrea* Mart. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **13** (1): 35-39.

Galati, G. & O'Brien, P.J. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Bio. Med.*, **37** (3): 287–303.

Gattuso, M.A. & Gattuso, S.J. (1999) Manual de procedimentos para analisis de drogas en polvo. Ed. Universidade Nacional de Rosário, Argentina, 48 p.

Gerlach, D. (1977) Botanische mikrotechnik, 2. ed., Stuttgart, Georg-Thieme Verlag, 211 p.

Gerrits, P.O. & Smid, L.A. (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microsc.*, **132** (1): 81-85.

Goldstein, J.L. & Swain, T. (1963) Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, **2** (4): 371-383.

Gonçalves, E. & Lorenzi, H. (2007) Morfologia vegetal - Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 416 p.

Häkkinen, S.; Heinonen, M.; Kärenlampi, S.; Mykkänen, H.; Ruuskanen, J.; Törrönen, R. (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res. Int.*, **32**: 345-353.

Hänsel, R.; Sticher, O.; Steinegger, E. (1999) Pharmakognosie – Phytopharmazie. 6. Aufl. Berlin: Springer, p.125-48.

Harbone, J.B. Introduction to Ecological Biochemistry and Pridham, J.B. Phenolics in Plants in Health and Disease. In: Naczki, M.; Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **1054**: 95–111.

Herrmann, E.C.Jr. & Kucera, L.S. (1967) Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae): 3. Peppermint (*Mentha piperita*) and other mint plants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**: 874–878.

- Hernández-Pérez, M.; Sánchez-Mateo, C.C.; Montalbetti-Moreno, Y.; Rabanal, R.M. (2004) Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. *J. Ethnopharmacol.*, **93**: 279–284.
- Hickey, L.J. (1974) Clasificación de la arquitectura de las hojas de Dicotiledoneas. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, **16**: 1-26.
- Ho, S.-C.; Wu, S.-P.; Lin, S.-M.; Tang, Y.-L. (2010) Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. *Food Chem.*, (IN PRESS).
- Huhtanen, C.N. (1980) Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *J. Food Prot.*, **43**: 195–196.
- Janeska, B.; Stenofa, M.; Alipieva, K. (2007) Assay of flavonoids aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. *Acta Pharm.*, **57**: 371–377.
- Joly, A.B. (1985) Botânica: introdução à taxonomia vegetal, 7. ed., São Paulo: Editora Nacional, p. 582-586.
- Kaya, A.; Baser, K.H.C.; Satil, F.; Tumen, G. (2000) Morphological and anatomical studies on *Cyclotrichium origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. (Labiatae). *Turk. J. Bot.*, **24**: 273-278.
- Karaman, S.; Digrak, M.; Ravid, U.; Ilcim, A. (2001) Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, **76**: 183–186.
- Khanna, S.K.; Viswanatham, P.N.; Krishnan, P.S.; Sanwai, G.G. (1968) *Phytochemistry*, **7**: 1513, In: Naczki, M. & Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in foods. *J. Chromatogr. A*, **1054**: 95-111.
- Kucera, L.S. & Herrmann, E.C.Jr. (1967) Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae): 1. Tannin of *Melissa officinalis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**: 865–869.
- Kunz, V.T. (2007) “*Glechon spathulata* Benth.: Estudo químico e farmacológico”. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 89 f.
- Li, H.B.; Wong, C.C.; Cheng, K.W.; Chen, F. (2008) Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT– Food Sci. Technol.*, **41**: 385–390.
- Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**: 187–195.
- Mariod, A.A.; Ibrahima, R.M.; Ismail, M.; Ismail, N. (2010) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seed cakes. *Food Chem.*, **118**: 120–127.

- Mariutti, L.R.B. & Bragagnolo, N. (abr./jun. 2007) Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. *Braz. J. Food Technol.*, **10** (2): 96-103.
- Mariz, S.R.; Cerqueira, G.S.; Araújo, W.C.; Duarte, J.C.; Melo, A.F.M.; Santos, H.B.; Oliveira, K.; Diniz, M.F.F.M.; Medeiros, I.A. (2006) Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**: 372-378.
- Martins, M.B.G. (2002) Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* X *suaveolens* (Lamiaceae). *Bragantia*, **61** (3): 205-218.
- Mauro, C.; Silva, C.P.; Missima, J.; Ohnuki, T.; Rinaldi, R.B.; Frota, M. (Out./Dez. 2008) Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18** (4): 608-613.
- Medri, M.E. & Lleras, E. (1980) Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* Muell. *Acta Amazônica*, **10**: 463-493.
- Mentz, L.A.; Lutzemberger, L.C.; Schenkel, E.P. (1997) Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). *Caderno de Farmácia*, **13** (1): 25-48.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. (1965) *Anatomy of the dicotyledons*. v. 2, Oxford: Clarendon Press, p. 1041-1053.
- Migliato, K.F.; Moreira, R.R.D.; Mello, J.C.P.; Sacramento, L.V.S.; Corrêa, M.A.; Salgado, H.R.N. (Jan./Mar. 2007) Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **17**(1): 94-101.
- Montanha, J.A., Moellerke, P.; Bordignon, S.A.L.; Schenkel, E.P.; Roehle, P.M. (2004) Antiviral activity of Brazilian plant extracts. *Lat. Am. J. Pharm.*, **23** (2): 183-6
- Morgan, R. (1997) *Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição, propriedades*. São Paulo: Editora Hemus, 555 p.
- Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. (2000) *Medicinal plants of Brazil*. Michigan: Reference Publications, 501 p.
- Moure, A.; Franco, D.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nunez, M.J.; Lema, J.M. (2000) Evaluation of extracts from *Gevuina hulls* as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 3890–3897.
- Netto, H.J.C.B.; Souza, H.P.D.; Araújo, L.G. (2002) Estudo morfoanatômico e prospecção fitoquímica de *Curatella americana* L. In: Soares, M.L. et al. (Out./Dez. 2005) Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15** (4): 352-360.
- Niharika, S.; Padmavati, M.; Satyahari D. (2010) Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*, (IN PRESS).

- Nijveldt, R.J.; Nood, E.; Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; Norren, K.; Leeuwen P.A.M. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**: 418–425.
- Ojeda, H.; Andary, C.; Kraeva, E.; Carbonneou, A.; Deloire, A. (2002) Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv Shiraz. *Am. J. Enol. Viticul.*, **53**: 261–267.
- Oliveira, F. & Akisue, G. (1989) Fundamentos de Farmacobotânica. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 216p.
- Özkan, G.; Kuleasan, H.; Çelik, S.; Göktürk, R.S.; Ünal, O. (2007) Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control*, **18**: 509–512.
- Paganga, G.; Miller, N.; Rice Evans, C. (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Res.*, **2** (30):153–62.
- Patel, D.M.; Prajapati, D.G.; Patel, N.M. (2007) Seed mucilage from *Ocimum americanum* linn. as disintegrant in tablets: Separation and evaluation. *Indian J. Pharm. Sci.*, **69** (3): 431-435.
- Patwardhan, B.; Vaidya, A.D.B.; Chorghade, M. (mar. 2004) Ayurveda and natural products drug discovery. *Curr. Sci. India*, **86** (6): 789-799.
- Ren, W.; Qian, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. (2003) Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Res. Rev.*, **23** (4): 519–534.
- Rio, R.G.W. (1996) Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ruetze, M. & Schmitt, U. (1986) Glykol-methacrylat (GMA) als Einbettungssystem in histologische Untersuchungen von Koniferen-Nadeln. *Eur. J. Path.*, **16**: 321-324.
- Sahoo, N.; Manchikanti, P.; Dey, S. (2010) Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* (IN PRESS).
- Satil, F.; Ünal, M.; Hopa, E. (2007) Comparative morphological and anatomical studies of *Hymenocrater bituminosus* Fisch. & C.A.Mey. (Lamiaceae) in Turkey. *Turk. J. Bot.*, **31**: 269-275.
- Scavone, O. (1965) Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Coleus barbatus* Benth., Labiatae. *Rev. Fac. Farm. Bioquím.*, **3**: 249-270.
- Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Food Sci. Technol.*, **91**: 21–40.
- Scholz, E. & Rimpler, H. (1989) Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. In: Mariod et al. (2010) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black



mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seed cakes. *Food Chem.*, **118**: 120–127.

Schultz, A.R.H. (1985) Introdução à botânica sistemática, 5. ed., v. 2, Porto Alegre: Ed. UFRGS, 414 p.

Shahidi, F. & Naczki, M. (1995) Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc, 331 p.

Siciliano, T.; Bader, A.; Vassallo, A.; Braca, A.; Morelli, I.; Pizza, C.; De Tommasi, N. (2005) Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**: 341–351.

Silano, M.; De Vicenzi, A.; Silano, V. (2004) The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. *Fitoterapia* **75** (2): 107-116.

Silva, M.I.G.; Gondim, A.P.S.; Nunes, I.F.S.; Sousa, F.C.F. (2006) Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**: 455-462.

Simões, C.M.O. & Spitzer, V. Óleos voláteis. p. 467-496. In: Simões C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1104 p.

Simões C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1104 p.

Slusarczyk, S.; Hajnos, M.; Skalicka-Wozniak, K.; Matkowski, A. (2009) Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chem.*, **113**: 134–138.

Soares, M.L.; Rezende, M.H.; Ferreira, H.D.; Figueiredo, A.D.L.; Bustamante, K.G.L.; Bara, M.T.F.; Paula, J.R. (Out./Dez. 2005) Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15** (4): 352-360.

Sossae, F.C. (1995) Anatomia e fitoquímica foliar de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu.

Souza, V.C. & Lorenzi, H. (2005) Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum.

Sun, B.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, I. (1998) Critical Factors of Vanilin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 4267-4274.

Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.*, **90**: 333–340.

- Toledo, M.G.T.; Alquini, Y.; Nakashima, T. (Out./Dez. 2004) Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). *Braz. J. Pharm. Sci.*, **40** (4): 487-493.
- Veiga-Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. (2005) Plantas medicinais: cura segura? *Quím. Nova*, **28** (3): 519-528.
- Veiga-Junior, V.F. (2008) Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18**: 308-313.
- Vogel, H.; Gonzalez, M. ; Faini, F.; Razmilic, I.; Rodriguez, J.; San Martin, J.; Urbina, F. (2005) Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-species known as bailahuén. *J. Ethnopharmacol.*, **97**: 97-100.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. (1984) Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer, 320 p.
- Werker, E.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Dudai, N.; Katzir, I. (1993) Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Ann. Bot. London*, **71**: 43-50.
- WHO (1991) Guidelines for the Assessment of Herbal Medicine. Munich, Germany, p. 2. Available: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/WHO\\_TRM\\_91.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/WHO_TRM_91.4.pdf), Accessed: June 01, 2010.
- WHO (1998) Quality control methods for plant materials. Geneva, 122 p.
- WHO (2002-2005) Traditional medicine strategy. Munich, Germany, 2002, p. 3.
- WHO (2007) Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. Good manufacturing practices and inspection. v. 2, 2. ed.
- WHO (2008) Traditional medicine. <http://www.801who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>, Accessed: September 03, 2009.
- Williams, G.M.; Iatropoulos, M.J.; Whysner, J. (1999) Safety assessment to butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem. Toxicol.*, **37**: 1027-1038.
- Woisky, R.G. & Salatino, A. (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.*, **37** (2): 99-105.
- Xifreda, C.C. & Mallo, A.C. (2004) Las especies argentinas de *Glechona* (Lamiaceae, Mentheae). *Darwiniana*, **42** (1 - 4): 333 - 346.
- Yang, L.-W.; Wu, D.-H.; Tang, X.; Peng, W. ; Wang, X.-R.; Ma, Y.; Su, W.-W. (2005) The Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate blocks Nuclear Factor- $\kappa$ B activation by inhibiting I $\kappa$ BKinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *J. Chromatogr. A*, **1070**: 35.

Yarnell, E. & Abascal, K. (abr. 2005) Herbs for treating herpes simplex infections. *Alternative & Complementary Therapies*, p. 83-88.

Zand, R.S.R.; Jenkins, D.J.A.; Diamandis, E.P. (2002) Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J. Chromatogr. B*, **777**: 219–232.

Zou, P.; Hong, Y.; Koh, H.L. (2005) Chemical fingerprinting of *Isatis indigotica* root by RP-HPLC and hierarchical clustering analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**: 514-520.

## 4.3 Manuscrito III

### HPLC FINGERPRINTING AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Glechon spathulata* BENTH. (LAMIACEAE)

Vilmar C. BANDERÓ-FILHO <sup>1\*</sup>, Sergio L. DALMORA <sup>3</sup>, Gizele S. do CANTO <sup>3</sup>,  
Gilberto D. ZANETTI <sup>3</sup>, Camila Z. ZANOTTO <sup>2</sup>; Melânia P. MANFRON <sup>3</sup>

*1 Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences,*

*2 Student of Pharmacy*

*3 Department of Industrial Pharmacy, Health Sciences Center,*

*Federal University of Santa Maria,*

*Prédio 26, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.*

\* Author to whom correspondence should be addressed: *E-mail:* v.bandero@yahoo.com.br

**ABSTRACT:** *Glechon spathulata* is a perennial sub-shrub that has aromatic leaves and South American distribution. This plant is usually used as a condiment and, in folk medicine, as anti-inflammatory, antiseptic, stomachic, diaphoretic, and expectorant. In the experiment, it was used the crude ethanolic extract in order to: a) investigate the in vivo anti-inflammatory activity of *G. spathulata* attributed by folk medicine, b) determine its chromatographic profile by reverse phase liquid chromatography with diode array detection. The major compound of the extract identified by UV spectra was the flavonol rutin. Also, other flavone and flavonol compounds are present, among them, the luteolin. Crude ethanolic extract of *G. spathulata* revealed a significative anti-inflammatory effect in chronic inflammation by cotton pellet induced granuloma, which may be related to its content of polyphenols, especially flavonoids. Therefore, besides allowing the authenticity of extracts, HPLC fingerprinting permitted to determine the nature of the main active compounds present in CEE of *G. spathulata*, being useful for its quality control. The significative anti-inflammatory activity of CEE in chronic inflammation strengthens the importance of this species as an anti-inflammatory agent.

**KEY WORDS:** Anti-inflammatory, *Glechon spathulata*, HPLC, Lamiaceae, medicinal plants, spices.

## 1 INTRODUCTION

Medicinal plants are widely used in traditional medicine of several countries for treatment of inflammatory conditions, but the real effectiveness and relevance of many is still unknown. The chemical characterization of medicinal plants is needed and can be assessed through the chromatographic fingerprinting, as an acceptable alternative for its authenticity and quality evaluation (WHO, 1991; FDA, 2006).

Inflammation is a reaction of the blood vessels tissue against an aggressor agent, characterized by access of liquids and cells to interstice, causing blush, heat, tumor, pain and lost function (Lope et al., 1987; Dassoler et al., 2004). It presents three phases: the first phase (acute) is characterized by local vasodilatation and increased capillary permeability resulting in an exudation of fluid and proteins from the blood into the interstitial space; the second one by infiltration of leukocytes into the inflamed tissues and the third one by granuloma formation (White, 1999). The granulomatous tissue consists of giant cells, undifferentiated connective tissue and the fluid infiltrate. The method by granulomatous-induced tissue is frequently used to investigate the chronic phase of inflammation and it is experimentally developed by subcutaneous implantation of a compressed cotton pellet in rats (Olajide et al., 1999). Several agents are known for treatment of inflammations, such as the steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), but their prolonged use has been associated to severe side effects, and frequently related to morbidity or death of patients (Rainsford, 1999; Scheiman, 2001; Traversa et al., 2003; Davies & Jamali, 2004; Gaddi et al., 2004; Xiao et al., 2005). The investigation of pharmacological activities of chemicals from plant can contribute to the search for more effective and safer new bioactive compounds.

*Glechon spathulata* (Lamiaceae) is a perennial sub-shrub with aromatic leaves and it has distribution in South America, in Argentine, Paraguay, Brazil and Uruguay. In Brazil, it is popularly known as “mangerona-do-campo” and its aerial parts are used in cooking as condiment. Also, in folk medicine, it is used as anti-inflammatory in bronchitis, sinusitis and laryngitis; besides as diaphoretic, stomachic, expectorant and antiseptic (Braz. Pharm., 1926; Coimbra, 1942; Mentz et al., 1997; Morgan, 1997; Xifreda & Mallo, 2004; Brandão et al., 2006).

Montanha et al. (2004), using 50% hydroethanolic extract of *G. spathulata*, observed the inhibition of viral cytopathic effect in monkey kidney cells (Vero cells ATCC CCL-81) against Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1), strains KOS, ATCC-VR 733 e 29R-aciclovir-resistant. Kunz (2007) demonstrated the antimicrobial activity of essential oil against Gram

positive e Gram negative bacteria, besides the antioxidant activity and toxicity against *Artemia salina*.

Among the secondary metabolites described for treatment of inflammatory disorders are phenolics and flavonoids (Falcão et al., 2005; Cordeiro et al., 2006; Wu et al., 2006; Arumugan et al., 2008; Corrêa, 2008; Adams et al., 2009). These compounds are present in numerous species of Lamiaceae (Zgórka & Glowniak, 2001; Zheng & Wang, 2001; McKay & Blumberg, 2006; Fecka & Turek, 2007). The phytochemical screening of *G. spathulata* detected flavonoids, triterpenes, anthocyanins and condensed tannins (Banderó-Filho et al., 2010).

The ethyl acetate fraction (AF) of *G. spathulata* showed higher antioxidant activity with LC<sub>50</sub> of 7.99 µg/ml, followed by butanol fraction (BF) with LC<sub>50</sub> of 11.75 µg/ml and crude ethanolic extract (CEE) with LC<sub>50</sub> of 48.29 µg/ml. The higher activity can be related to the presence of polar constituents such as phenols, flavonoids and tannins in *G. spathulata* extracts (Kunz, 2007). Banderó-Filho et al. (2010) observed that the content of polyphenols represents around 18 % of CEE, reaching 35 % in the AF, and flavonoids match approximately to 6 % of CEE. In addition, it was observed that the content of flavonoids increased according to the solvent polarity, with 9.6 % in the AF and 13.0 % in the BF.

This work aims to investigate the in vivo anti-inflammatory activity of *G. spathulata* attributed by folk medicine through its CEE, as well as to determine its chromatographic profile by reverse phase liquid chromatography with diode array detection.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Standards, Reagents and apparatus

Phenolic standards, such as flavonols (kaempferol and rutin) and flavone (luteolin) were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). The nimesulid used was Nisulid<sup>®</sup> (Aché) oral suspension 10 mg/ml. Folin-Ciocalteu reagent was purchased from Sigma Chemicals Co. Deionized water was prepared by Milli-Q water purification system. Acetonitrile of HPLC grade was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents were degassed in an ultrasonic bath before their use in the analyses. High performance liquid chromatography (HPLC) of samples was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Prominence auto sampler (SIL- 20A), Shimadzu LC-20 AT and

reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, photodiode array detector (DAD) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1.

## 2.2 Preparation of plant extract

The leaves and stems of the wild sample of *G. spathulata* were collected in Dilermando de Aguiar, Rio Grande do Sul state, Brazil, in April 2009. The plant was identified by Dr. Gilberto D. Zanetti and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of Biology Department of Federal University of Santa Maria (UFSM), under the reference SMDB 10297. The plant material was dried at 40 °C with air circulation, grounded in a knife mill, and the extraction of powdered plant drug was performed by maceration in ethanol 70 % until exhaustion.

## 2.3 Chromatography procedure

### 2.3.1 Sample preparation

The sample and standards were dissolved at 1 % (w/v) in methanol and after diluted with acetonitrile at concentrations of 5 and 1 mg/ml, respectively. All solutions were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Sartolon Polyamid). Standard solutions were mixed and the chromatographic profile of this pool determined.

### 2.3.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC-DAD was used to obtain a chromatographic profile of CEE of *G. spathulata*. The analytical column was a Shim-pack C18 (4.6mm x 150 mm, 5 µm) with C18 pre-column. The separation of the sample compounds was carried out at room temperature with a gradient elution at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup> and an injection volume of 20 µL. The mobile phase was 0.3 % acetic acid (v/v) (eluent A) and acetonitrile (eluent B), filtered through a 0.45 µm membrane filter and degassed by ultrasonic bath prior to use. The optimized gradient system consisted of 4 % B (0-2 min), 4-21 % B (2-3 min), 21 % B (3-20 min), 21-32 % B (20-21 min), 32 % B (21-38 min), 32-70 % B (38-39 min), 70-100 % B (30-50 min), 100-4 % B (50-51 min) and 4 % B (51-60 min). The UV-vis scanning was performed from 200 to 600 nm.

The UV spectra of chromatographic peaks of *G. spathulata* CEE were compared with phenolic compounds spectra described in the literature. It was analyzed the retention time of sample peaks and its Diode-Array-UV spectra, as well as those obtained for reference standards, and finally compared with the data from literature.

## 2.4 *In vivo* anti-inflammatory effect

### 2.4.1 Animals and treatment

Male Wistar rats, weighing 180–200 g, were used in the experiment. The animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24±1 °C, 55±10 % relative humidity) with free access to a standard commercial diet and water. The animals were divided into four groups: **Group 1:** vehicle (water); **Group 2:** vehicle (propyleneglycol 20 % v/v); **Group 3:** treatment (CEE 4 % w/v in propyleneglycol 20 % v/v) and, **Group 4:** control (nimesulide oral solution: 5 mg/Kg/day in water). The group treated with *G. spathulata* was composed by nine rats, while the other groups were composed by only six animals. Body weight was determined in the beginning and in the end of experiment. The dosage administered to the rats was 300 mg/Kg/day of CEE of *G. spathulata* and 5 mg/Kg/day of nimesulide.

### 2.4.2 Cotton pellet granuloma

All procedures were performed according to recommendations from the Animal Ethical Committee of Federal University of Santa Maria, protocol number 23081.003191/2010-52.

The granuloma test was induced by subcutaneous implantation of a sterile cotton pellet (40 mg) in the dorsal region of the rats, according to Niemegeers et al. (1975) modified. Two hours after the implant, and for six consecutive days, the animals received 0.5 mL of the treatment three times a day by oral gavage. On the eighth day, the pellets surrounded by granuloma tissue were surgically removed and weights were determined before and after drying in incubator at 60°C for 24 h. The anti-proliferative effects of crude extract of *G. spathulata* and nimesulide were determined by comparison with the dry weight granuloma of the respective vehicle. The percentage of granuloma inhibition (I %) was calculated according to the formula as follows:

$$I \% = 100 - (B \times 100 / A)$$

where: A – mean granuloma weight of vehicle (propyleneglycol or water)

B – mean granuloma weight of treatment (CEE of *G. spathulata* or nimesulide)



## 2.5 Statistical analysis

Experimental data were analyzed using GraphPad Prisma 5.0. All results are expressed as the mean  $\pm$  SD. The results were analyzed for statistical significance by Student's *t*-test and  $p < 0.05$  were accepted as statistically significant.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 HPLC

The CEE of *G. spathulata* aerial parts was analyzed by liquid chromatography and the chromatogram registered at 365 nm. The main peaks of *G. spathulata* CEE are identified by the numbers (1-11) considering the elution order, as shown in Figure 1A. In order to determine the HPLC fingerprint of CEE of *G. spathulata* aerial parts, a binary elution system from acetic acid 0.3 % and acetonitrile was optimized, by combination of an isocratic and a gradient technique, with acetonitrile concentration ranging from 4 to 100 %. In this way, all compounds present in the extract were eluted, from water-soluble to nonpolar compounds. The chromatogram of standards Rutin, Luteolin and Kaempferol are identified by the numbers (12-14) considering the elution order (Fig. 2). In addition, Table 1 presents the retention time and the maximum UV wavelengths for all peaks of the *G. spathulata* CEE and standards analyzed.

The reverse phase HPLC (RP-HPLC) currently represents the most popular and reliable technique for phenolic analysis. In recent reports on the RP-HPLC of phenolic compounds, systems developed from different proportions of acetic acid in water and acetonitrile were used to separate members of several classes of phenols (Chirinos et al., 2009; Han et al., 2008). The obtained chromatogram showed us preliminary information on classes of the present substances, through the UV spectra of the main chromatographic peaks (Tab. 1). It is known that all phenolic compounds show intense absorption in the UV region of the spectrum. Flavonoids exhibit two characteristic absorption bands. In most of them, the Band II has a maximum at the 240-285 nm range (A-ring), and Band I, with a maximum at the 300-380 nm range (B-ring) (Merken & Beecher, 2000). However, phenolic compounds identification in plant extract can be a complex task, mainly due to a wide variety of structures which can also get bonded to different sugar moieties or get in dimers and trimers. The bands for polyphenols and their absorption spectra in UV-visible region were compared to standards and previous data from the literature.

The compound number 2 presented the same retention time of standard rutin (number 12), and a purity index of 0.97. In addition, the UV spectrum of both had great similarity, leading us to believe that the majority peak of CEE of *G. spathulata* is probably rutin (quercetin-3-rutinoside). To confirm this suspicion, it was carried out co-injection of the CEE and the standard rutin (data not shown). There was an increase in the peak number 2 corresponding to the major compound, suggesting to be a flavonol glycoside rutin. On the other hand, the number 7 compound of the sample and the standard luteolin (number 13) presented a great proximity of Rt and UV spectra, making us believe that it is the flavone luteolin. The co-injection of the standard and sample (data not shown) allowed us effectively identifying the luteolin. On the other hand, the analysis of the spectra of compounds 1, 3, 4, 5, 6, 8 and 9 (Fig. 1) suggests that they are probably derived from flavones or flavonols (Merken & Beecher, 2000; Chirinos et al., 2009; Li et al., 2009).

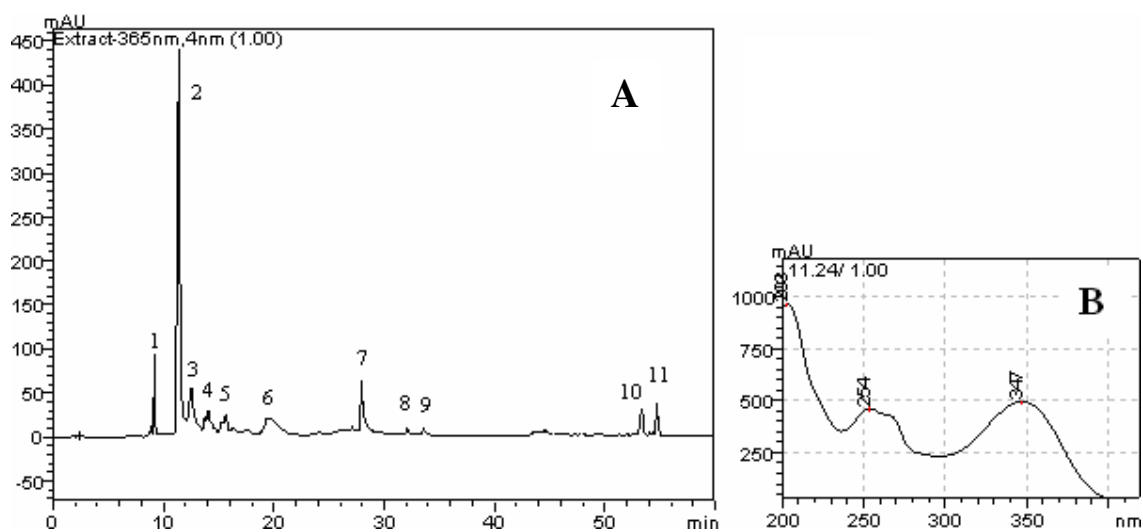


Figure 1. (A) Chromatogram of CEE of *Glechon spathulata* (5 mg/mL),  $\lambda$  365 nm; (B) UV spectrum of major compound – 2.

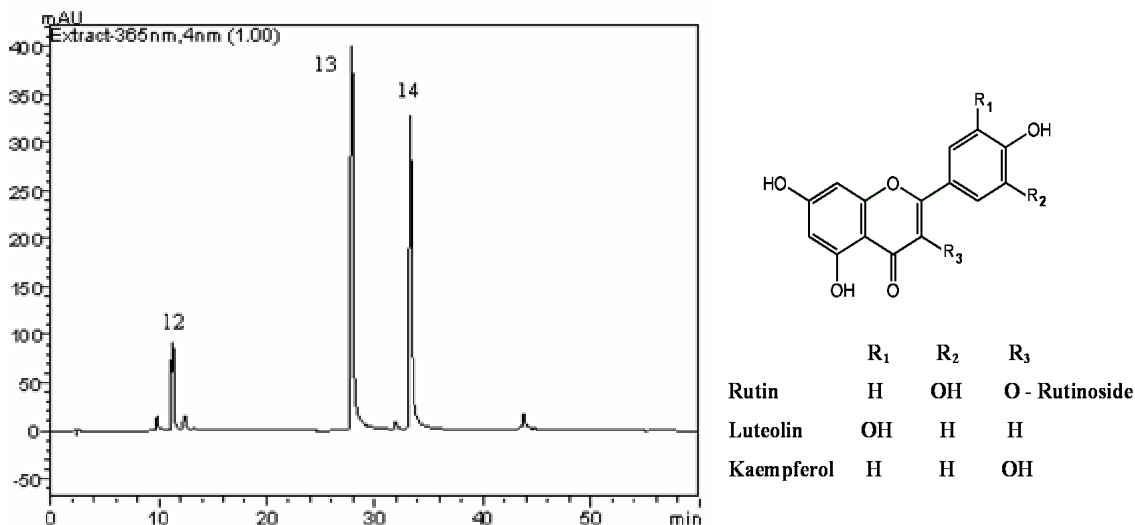


Figure 2. Chromatogram of standards. 12 – Rutin, 13 – Luteolin, 14 – Kaempferol;  $\lambda$  365 nm.

Table 1. Retention time and maximum wavelengths absorption of standards and for the main peaks of *Glechon spathulata* CEE.

Peak	Rt (min)	$\lambda_{\text{Max}}$ (nm)	Peak	Rt (min)	$\lambda_{\text{Max}}$ (nm)
1	9.20	271, <u>332</u>	8	32.09	267, <u>333</u>
2	11.24	254, <u>347</u>	9	33.58	249, <u>342</u>
3	12.55	248, <u>331</u>	10	53.35	325, <u>409</u>
4	14.05	267, <u>336</u>	11	54.72	324, <u>409</u>
5	15.26	250, <u>338</u>	12	11.35	<u>255</u> , 354
6	19.46	268, <u>336</u>	13	27.90	253, <u>346</u>
7	27.94	252, <u>344</u>	14	33.75	265, <u>366</u>

(1-11) CEE of *G. spathulata*; 12 – Rutin, 13 – Luteolin, 14 – Kaempferol; Underlined data were the max UV absorption wavelength.

### 3.2 *In vivo* anti-inflammatory activity

The cotton pellet granuloma test has been widely employed in the screening of new anti-inflammatory compounds (Billingham & Davies, 1979). This method allows the induction of the chronic inflammation, by evaluating both the transudative phase, exudative phase, and after 3 days, the proliferative phase (Niemegeers et al., 1975; Bailey, 1982; Olajide

et al., 1999). The fluid absorbed by the cotton pellet greatly influences the wet weight of the granuloma, but the dry weight has been used due to its good correlation with the granulomatous tissue formed (Swingle & Shideman, 1972).

The mean weight of cotton pellets of the vehicles, CEE of *G. spathulata* and nimesulide, are shown in Table 2. The result of inhibition of inflammation verified for CEE of *G. spathulata* is presented in Figure 3. According to these results, the treatment with the CEE of *G. spathulata* p.o. during 7 days showed a significant anti-inflammatory activity, when compared to the vehicle ( $P < 0.0001$ ). The extract reduced the granuloma weight, demonstrating an inhibition of inflammation of 51.31 %, very close to that presented by nimesulide (I % = 60.38 %). This inhibition of granuloma tissue formation by the oral treatment of *G. spathulata* extract in rats presented no effects regarding the growth of the rats, toxic manifestations and mortality.

The inflammatory process has been associated to the production of reactive oxygen species (ROS) and the oxidative stress (Barros et al., 2010), as well as to the prostaglandins and leukotrienes, through the arachidonic acid metabolism by cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) enzymes (Pelzer et al., 1998; Zheng et al., 2003; Rosa & Rapoport, 2009). Anti-inflammatory properties have been described for extracts and essential oils from Lamiaceae species (Maleki et al., 2001; Hernández-Perez et al., 2004; Akkol et al., 2008a; Kamatou et al., 2008; Adams et al., 2009), and attributed to their phenolic compounds (Akkol et al., 2008b; Adams et al., 2009), which are secondary metabolites widely distributed in this family (Zgórka & Glowniak, 2001; Zheng & Wang, 2001; Patora & Klimek, 2002; Shen et al., 2003; Naghibi et al., 2005; McKay & Blumberg, 2006; Fecka & Turek, 2007; Arumugan et al., 2008; Barros et al., 2010). Although the flavonoids reveal antiallergenic, antiviral and vasodilating actions, they are also responsible for important anti-inflammatory activity (Pietta, 2000; Guardia et al., 2001). Most of the ingested flavonoids are extensively degraded to various phenolic acids, and both may display an *in vivo* antioxidant activity (Pietta, 2000). According Arumugan et al. (2008) the great free radical scavenging activity and larger amounts of flavonoids and other phenolics in the AF and aqueous fraction from the leaves of *Mentha spicata* are responsible for the potent anti-inflammatory activity on the granulomatous tissue formation.

**Table 2. Effect of crude ethanolic extract (CEE) of *G. spathulata* (300 mg/Kg/day) and nimesulide (5 mg/Kg/day) p.o. treatment on cotton pellet granuloma in rats.**

<b>Treatment</b>	<b>Initial weight rats</b>	<b>Final weight rats</b>	<b>Wet weight granuloma</b>	<b>Dry weight granuloma</b>	<b>Inhibition %</b>
<b>Propyleneglycol</b>	197.42 ±	226.53 ±	1.355 ±	0.244 ±	--
	7.83	37.79	0.244	0.029	
<b>CEE</b>	190.88 ±	225.11 ±	0.564 ±	0.118 ±	51.31 ***
	4.21	16.97	0.067	0.010	
<b>Water</b>	192.75 ±	210.72 ±	1.206 ±	0.233 ±	--
	7.09	8.04	0.188	0.025	
<b>Nimesulide</b>	191.15 ±	218.27 ±	0.408 ±	0.092 ±	60.38 ***
	8.03	28.70	0.039	0.006	

Values are in grams (g), mean ± SD, \*\*\*p< 0.0001. Percentage inhibition was computed with respect to the vehicle. Cotton pellet: 40 mg.

Although the increased interest on the investigation of flavonoids structure and their relationship with antioxidant activity, they have been also extensively studied and well characterized for their anti-inflammatory activity (Pietta, 2000; Guardia et al., 2001; Kris-Etherton et al., 2004; Clavin et al., 2007). In a study by Pelzer et al. (1998), almost 30 flavonoids from plants demonstrated the ability to prevent the cotton pellet-induced rat granuloma and also the acute inflammation. Guardia et al. (2001) observed that the intraperitoneal administration of rutin, quercetin (flavonols) and hesperidin (flavanone), administrated in daily doses of 80 mg/kg, inhibited both acute and chronic phases of inflammation. Rutin was the most active in the chronic phase, and considering the fact that it differs from quercetin only in the presence of the sugar rutinose in position 3, some authors, assume that it could be responsible for contributing to a pharmacokinetic improved activity. Clavin et al. (2007) besides attributing the anti-inflammatory activity of the crude extract of *Eupatorium arnottianum* to the presence of flavonoids as major compounds, also found that the activity exerted by the isolated compounds was lower than that exhibited by the total extract.

The mechanisms of action of flavonoids include inhibition of eicosanoid producing enzymes and inhibition of activation of inflammatory cells. Wogonin, a flavone from *Scutellaria radix*, decreased the expression of COX-2 and PGE<sub>2</sub> production in fibroblasts,

suggesting to be the mechanism involved in anti-inflammatory activity of this compound on the skin (Chi & Kim, 2005). Rutin showed significant antiarthritic activity, attributed to the ability to inhibit NO<sup>•</sup> production by macrophages, and proliferation of T lymphocytes, inducing secretion of proinflammatory cytokines (Han, 2009). Rutin has been shown to reduce the expression of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8), infiltration of leukocytes, granuloma formation and tissue fibrosis, without affecting the transcription NF- $\kappa$ B. On the other hand, quercetin and fisetin act through the suppression of NF- $\kappa$ B and MAPKs. Quercetin is also responsible for the inhibition of PLA<sub>2</sub> (Lee et al., 1982), COX-2 (Williams et al., 1999), and 5-LOX (Laughton et al., 1991), the release of histamine mediated by Ig E, and the production of TNF- $\alpha$  (Park et al., 2008).

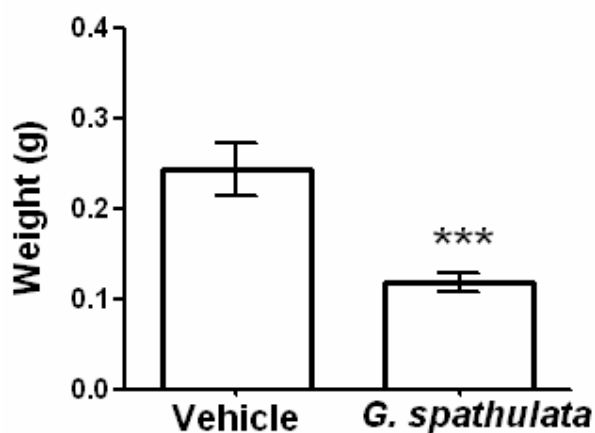


Figure 3. Effect of oral administration of crude ethanolic extract of *Glechon spathulata* on weight of granuloma in rats. Vehicle - propylenglycol 20 % (v/v). The bar represents the mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p$  < 0.0001.

NSAIDs are effective analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory. As such, they are among the most frequently consumed drugs worldwide (Fries, 1991; Roth, 1996). However, their prolonged use results in adverse gastrointestinal effects in nearly one fourth of patients (Singh & Triadafilopoulos, 1999). These effects range from dyspepsia to serious complications, such as bleeding or perforation to gastric or duodenal ulcers (Tseng & Wolfe, 2000). Also, NSAIDs are among one the most common drugs which cause idiosyncratic hepatotoxicity (Aithal & Day, 2007). Although steroidal anti-inflammatory drugs and NSAIDs are currently used to treat inflammation, these drugs have not been successful in curing

chronic inflammatory diseases (Yoon & Baek, 2005). Thus, there is a need to investigate therapeutic agents which present greater efficacy and cause, minor damage to health, considering the serious side effects of synthetic anti-inflammatory compounds on the market.

Several references describe gastroprotective effects to the polyphenolic compounds (mainly flavonoids and tannins) (Gonzales et al., 2000; Koo & Cho, 2004; Vasconcelos et al., 2010). Gonzales et al. (2000) specially emphasize that the aqueous extract from *Satureja boliviana* shows both anti-inflammatory and cytoprotective activity, against EtOH-induced ulcerogenesis. Therefore, we suggest that the compounds present in the CEE of *G. spathulata* may also provide a reduction in ulcerogenic activity.

#### 4 CONCLUSION

Besides allowing the authenticity of extracts, HPLC fingerprinting permitted to determine the nature of the main active compounds present in CEE of *G. spathulata*, being useful for its quality control. Therefore, it was possible to identify the major compound rutin, but also verified the presence of another flavones and flavonols, among them the luteolin.

The significative anti-inflammatory activity of CEE of *G. spathulata* in chronic inflammation strengthens the importance of this species as an anti-inflammatory agent. Finally, besides the significant activity of the phenolics in inflammation, we speculate that the *in vivo* treatment could additionally provide an anti-ulcerogenic effect.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Capes / CNPq for the financial support.

#### REFERENCES

- Abramson, S.B. & Weissmann, G. (1989) The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum.*, **32** (1): 1-9.
- Adams, M.; Berset, C.; Kessler, M.; Hamburger, M. (2009) Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacol.*, **121**: 343-359.

- Aithal, G.P. & Day, C.P. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Clin. Liver Dis.*, **11**: 563–575.
- Akkol, E.K.; Yalçın, F.N.; Kaya, D.; et al. (2008) In vivo anti-inflammatory and antinociceptive actions of some *Lamium* species. *J. Ethnopharmacol.*, **118**: 166–172.
- Arumugam, P.; Gayatri Priya, N.; Subathra, M.; Ramesh, A. (2008) Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environ. Toxicol. Phar.*, **26**: 92–95.
- Bailey, P.J. (1982) *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 213-8.
- Banderó-Filho, V.C.; Zanotto, C.Z.; Nemitz, M.C.; et al. (It will be submitted) Physico-chemical characterization for quality control of *Glechon spathulata* Benth. (Lamiaceae) aerial parts.
- Barros, L.; Heleno, S.A.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R. (2010) Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT-Food Sci. Technol.*, **43**: 544–550.
- Billingham, M.E.J. & Davis, G.E. (1979) Experimental models of arthritis in animals as screening tests for drugs to treat arthritis in man. In: Vane, J.R.; Ferriera, S.H. (Eds.) *Anti-inflammatory Drugs. HandBook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, New York, pp. 108–144.
- Bispo, M.D.; Mourão, R.H.V.; Franzotti, E.M.; et al. (2001) Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.*, **76**: 81-86.
- Bolkent, S.; Yanardag, R.; Karabulut-Bulan, O.; Yesilyaprak, B. (2005) Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study. *J. Ethnopharmacol.*, **99**: 391-398.
- Brandão, M.G.L.; Cosenza, G.P.; Moreira, R.A.; Monte-Mor, R.L.M. (jul./set. 2006) Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16** (3): 408-420.
- Brouillard, R.; Cheminat, A. (1998) Flavonoids and plant color. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **280**: 93-106.
- Chandra, S. & Mejia, E.G. (2004) Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Food Chem.*, **52**: 3583-3589.
- Chi, Y.S.; Kim, H.P. (2005) Suppression of cyclooxygenase-2 expression of skin fibroblasts by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Prostag. Leukotr. Ess.*, **72**: 59–66.
- Chirinos, R.; Betalleluz-Pallardel, I.; Huamán, A.; et al. (2009) HPLC-DAD characterization of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem.*, **113**: 1243–1251.



- Clavin, M.; Gorzalczany, S.; Macho, A.; et al. (2007) Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J. Ethnopharmacol.*, **112**: 585–589.
- Coimbra, R. (1942) *Notas de Fitoterapia*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo. p. 166.
- Cordeiro, C.H.G.; Sacramento, L.V.S.; Corrêa, M.A.; et al. (2006) Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **8** (4): 173-182.
- Corrêa, M.F.P.; Melo, G.O.; Costa, S.S. (dez. 2008) Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18** (Supl.): 785-797.
- Cullen, L.; Kelly, L.; Connor, S.O.; Fitzgerald, D.J. (1998) Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**: 578–582.
- Dassoler, M.; Schwanz, M.; Busseto, F.; et al. (2004) Perfil fitoquímico e ensaio farmacológico de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). *J. Bras. Fitomedicina*, **2**: 4-8.
- Davies, N.M. & Jamali, F. (2004) COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. *J. Pharmacy & Pharmaceutical Sci.*, **7**: 332–336.
- Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; et al. (Out./Dez. 2005) Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15** (4): 381-391.
- Fawole, O.A.; Ndhlala, A.R.; Amoo, S.O.; et al. (2009) Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, **123**: 237–243.
- FDA - Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Botanical Drug Products, June 2004, p. 11, <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CenterforDrugEvaluationandResearch/ucm106136.pdf>, accessed June 01, 2010.
- Fecka, I. & Turek, S. (2007) Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 10908–10917.
- Fries, J. F. (1991) NSAID gastropathy: The second most deadly rheumatic disease? *J. Rheumatol.*, **18**, 6-10.
- Gaddi, A.; Cícero, A.F.G.; Pedro, E.J. (2004) Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **38**: 201-212.
- Gonzales, E.; Iglesias, I.; Carretero, E.; Villar, A. (2000) Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **70**: 329–333.
- Guardia, T.; Rotelli, A.E.; Juarez, A.O.; Pelzer, L.E. (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Farmaco*, **56**: 683–687.

- Gürbüz, I.; Üstün, O.; Yesilada, E.; et al. (2003) Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, **88**: 93–97.
- Han, J.; Ye, M.; Qiao, X.; et al. (2008) Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **47**: 516–525.
- Han, Y. (2009) Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.*, **9**: 207–211.
- Hernández-Pérez, M.; Sánchez-Mateo, C.C.; Montalbetti-Moreno, Y.; Rabanal, R.M. (2004) Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. *J. Ethnopharmacol.*, **93**: 279–284.
- Higgs, G.A.; Eakins, K.E.; Mugridge, K.G.; et al. (1980) The effects of nonsteroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenan-induced inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, **66**: 81–86.
- Insel PA (1996) Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: *The pharmacological basis of therapeutics* (eds Goodman & Gilman). New York, MacGraw Hill Press, p. 617-658.
- Jacobs, J.W.; Bijlsma, J.W.J. (1997) NSAIDs: a critical appraisal. *Neth. J. Med.*, **51**: 198–204.
- Kamatou, G.P.P.; Makunga, N.P.; Ramogola, W.P.N.; Viljoen, A.M. (2008) South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *J. Ethnopharmacol.*, **119**: 664–672.
- Koo, M.W.L. & Cho, C.H. (2004) Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur. J. Pharmacol.*, **500**: 177–185.
- Kris-Etherton, P.M.; Lefevre, M.; Beecher, G.R.; et al. (2004) Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.*, **24**: 511–538.
- Kumar, S.; Müller, K. (1999) Lichen metabolites 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acids on human keratinocyte growth. *J. Nat. Prod.*, **62**: 821–823.
- Laughton, M.J.; Evans, P.J.; Moroney, M.A.; et al. (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.*, **42** (9): 1673–1681.
- Li, C.; Du, H.; Wang, L.; et al. (2009) Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia section Moutan*) yellow flowers. *J. Agric. Food Chem.*, **57** (18): 8496-8503.
- Lope, E.R.; Chapadeiro, E.; Raso, P.; Tafuri, W.L. (1987) *Bogliolo – Patologia*. 4. ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, p.67-112.

- Lopes Martins, R.A.B.; Pegoraro, D.H.; Woisky, R.; et al. (2002) The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine*, **9**: 245-248.
- Maleki, N.; Garjani, A.; Nazemiyeh, H.; Nilfouroushan, N.; Eftekhari-Sadat, A.T.; Allameh, Z.; Hasannia, N. (2001) Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J. Ethnopharmacol.*, **75**: 213–218.
- Martelli, A.E. (1977) Inflammation and Anti-inflammatories. Spectrum Publications, New York, p. 177.
- McKay, D.L. & Blumberg, J.B. (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res.*, **20**: 619–633.
- Mentz, L.A., L.C. Lutzemberger & E.P. Schenkel (1997) Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). *Caderno de Farmácia*, **13** (1): 25-48.
- Merken, H.M. & Beecher, G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.*, **48** (3): 577-599.
- Miceli, N. ; Tavianoa, M.F. ; Giuffrida, D.; Trovatoa, A. ; Tzakou, O. ; Galati, E.M. (2005) Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *J. Ethnopharmacol.*, **97**: 261–266.
- Montanha, J.A.; Moellerke, P.; Bordignon, S.A.L.; Schenkel, E.P.; Roehle, P.M. (2004) Antiviral activity of Brazilian plant extracts. *Lat. Am. J. Pharm.*, **23** (2): 183-186.
- Morgan, R. (1997) Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição, propriedades. São Paulo: Editora Hemus, 555 p.
- Naghbi, F. ; Mosaddegh, M. ; Motamed, S.M. ; Ghorbani, A. (2005) Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iran. J. Pharm. Res.*, **2**: 63-79,.
- Niemegeers, C.J.E.; Bruggen, W.V.; Awouters, F. (1975) The effects of suprofen in rats with implanted cotton pellets. *Arzneim. Forsch.*, **25**: 1524–1526.
- Ogmundsdottir, H.M.; Zoega, G.M.; Gissurarson, S.R.; Ingolfsson, K. (1998) Antiproliferative effects of lichen derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell lines mitogen stimulated lymphocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50** (1): 107–115.
- Olajide, O.A.; Makinde, J.M.; Awe, S.O. (1999) Effects of the aqueous extract *Bridella ferruginea* stem bark on carrageenan induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.*, **66** (1): 113–117.
- Park, H.H.; Lee, S.; Son, H.-Y.; et al. (2008) Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.*, **31** (10): 1303-1311.

- Patora, J. & Klimek, B. (2002) Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta Pol. Pharm.*, **59**(2): 139-143.
- Pelzer, L.E.; Guardia, T.; Juarez, A.O.; Guerreiro, E. (1998) Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco*, **53**: 421-424.
- Phan, T.T., Wang, L.; See, P.; et al. (2001) Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 1373-1379.
- Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **63**: 1035-1042.
- Rainsford, K.D. (1999) Relationship of nimesulid safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. *Rheumatology*, **38** (suppl. 1): 4-10.
- Regnault-Roger, C.; Ribodeau, M.; Hamraoui, A.; et al. (2004) Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *J. Stored Prod. Res.*, **40**: 395-408.
- Roth, S. H. (1996) NSAID gastropathy: A new understanding. *Arch. Intern. Med.*, **156**: 1623-1628.
- Scheinman, J.M. (2001) The impact of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *Am. J. Manag. Care*, **7**: 10-14.
- Shen, Y.C.; Chiou, W.F.; Chou, Y.C.; Chen, C.F. (2003) Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *Eur. J. Pharm.*, **465**: 171-181.
- Siciliano, T.; Bader, A.; Vassallo, A.; et al. (2005) Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**: 341-351.
- Singh, G. & Triadafilopoulos, G. (1999) Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J. Rheumatol.*, **56** (suppl):18-24.
- Spector, W.G. (1969) *Intern. R. Exp. Phatol.*, **8**: 1-55.
- Swingle, K.F. & Shideman, F.E. (1972) Phases of inflammatory response to subcutaneous implantation of Cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **183**: 226-234.
- Talhouk, R.S.; Karam, C.; Fostok, S.; et al. (2007) Anti-Inflammatory Bioactivities in Plant Extracts. *J. Med. Food*, **10** (1): 1-10.
- Traversa, G.; Bianchi, C.; Da Cas, R.; et al. (2003) Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ*, **327**:18-22.
- Tseng, C. & Wolfe, M. (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Med. Clin. N. Am.*, **84**(5): 1329-1344.

- 
- Vasconcelos, P.C.P.; Andreo, M.A.; Vilegas, W.; et al. (2010) Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *J. Ethnopharmacol.*, (IN PRESS).
- Williams, C.A.; Harborne, J.B.; Geiger, H.; Hoult, J.R. (1999) The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*, **51** (3): 417–423.
- White, M.J. (1999) Mediators of inflammation and inflammatory process. *J. Allergy Clin. Immun.*, **103**: 378–S381.
- WHO (1991) Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines, World Health Organization, Munich, Germany, p.2, Available: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/WHO\\_TRM\\_91.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/WHO_TRM_91.4.pdf), Accessed: June 01, 2010.
- Wu, Y.; Zhou, C.; Song, L.; et al. (2006) Effect of total phenolics from *Lagera alata* on acute and chronic inflammation models. *J. Ethnopharmacol.*, **108**: 243–250.
- Xiao, J.; Jiang, X.; Chen, X. (2005) Antibacterial, anti-inflammatory and diuretic effect of flavonoids from *Marchantia convoluta*. *Afr. J. Tradit. Complem.*, **2**: 244-252.
- Xifreda, C.C. & A.C. Mallo (2004) Las especies argentinas de Glechon (Lamiaceae, Mentheae). *Darwiniana*, **42** (1 - 4): 333 – 346.
- Zgórká, G & Glowniak, K. (2001) Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **26**: 79–87.
- Zheng, J.; Wu, L.-J.; Zheng, L.; et al. (2003) Two new monoterpenoid glycosides from *Mentha spicata*. *L. J. Asian Nat. Prod. Res.*, **5**: 69–73.
- Zheng, W.; Wang, S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 5165–5170.



## 5 DISCUSSÃO

A padronização das condições de cultivo como o tipo de solo, clima, irrigação, área geográfica, e de procedimentos para a coleta, como a época do ano, período do dia, órgão vegetal, além do monitoramento da presença de contaminantes são fatores que asseguram a qualidade de drogas vegetais (OMS, 2003). A altitude e variações sazonais foram responsáveis pela modificação de características estruturais das folhas de *Origanum vulgare*, sendo observadas diferenças na altura da planta, na área da superfície e espessura da lâmina foliar, na densidade de estômatos e tricomas glandulares, e no percentual de compostos fenólicos presentes nas folhas (Kofidis et al., 2003).

A lâmina foliar é o principal sítio de produção de fotoassimilados, cuja estrutura é a que mais se modifica em resposta às alterações ambientais, sendo sua anatomia objeto de vários estudos (Elias et al., 2003). Desta forma, a análise da arquitetura foliar e de outros órgãos contribui para a autenticidade de espécies vegetais empregadas como insumo farmacêutico.

Entre as características macroscópicas das folhas de *G. spathulata* destacam-se a forma espatulada e a margem sub-revoluta, crenada no meio-superior. A forma, o tamanho e a coloração da lâmina foliar, bem como o tamanho do pecíolo, permitem diferenciá-la de, pelo menos, outras 3 espécies do gênero, como *G. ciliata*, *G. marifolia*, e *G. thymoides*. A forma espatulada diferencia *G. spathulata* de *G. ciliata* e *G. marifolia*, que apresentam lâmina foliar de forma ovada a elíptica, mas também de *G. thymoides*, cuja lâmina foliar é obovada a oblonga. As dimensões da lâmina foliar de *G. spathulata* são inferiores às de *G. marifolia*, que apresenta 4 a 20 mm de comprimento por 3 a 10 mm de largura. *G. thymoides* possui lâmina foliar discolor, com pecíolo de 2 a 9 mm de comprimento enquanto *G. spathulata* apresenta lâmina foliar concolor e pecíolo subséssil. Além disso, a densa pubescência observada ao longo de toda a epiderme foliar de *G. spathulata* contrasta com *G. ciliata*, que exibe tricomas apenas na face abaxial (Xifreda & Mallo, 2004).

As estruturas anatômicas especializadas no armazenamento de óleos essenciais evoluíram de células oleíferas, cavidades e canais secretores, para tricomas glandulares (Toledo et al., 2004). A família Lamiaceae é muito conhecida

pelos óleos essenciais produzidos por suas espécies (Naghibi et al., 2005). Os tricomas glandulares são estruturas típicas destas espécies, e responsáveis pela biossíntese, secreção e armazenamento dos óleos essenciais (Toledo et al., 2004; Gairola et al., 2009).

Apesar de comumente encontrados em Lamiaceae, a ocorrência simultânea de diferentes tipos de tricomas, sua distribuição e características da cutícula, fornecem importantes informações taxonômicas na identificação de gêneros e espécies da família (Metcalf & Chalk, 1965; Özkan, 2008; Gairola et al., 2009). A análise microscópica da lâmina foliar de *G. spathulata* evidenciou a presença de tricomas glandulares capitados e tricomas tectores pluricelulares unisseriados, em ambas as faces da epiderme, o que permite diferenciá-la de *Ocimum selloi*, na qual os tricomas encontram-se restritos à face adaxial da folha (Costa et al., 2007). A cutícula lisa, espessa e plicada de *G. spathulata*, a diferencia de espécies como *Cunila microcephala*, *Leonurus sibiricus* e *Plectranthus neochilus*, onde esta é estriada, e de *Cyclotrichium origanifolium*, *Plectranthus amboinicus* e *Plectranthus ornatus*, que exibem cutícula reta (Kaya et al., 2000; Toledo et al., 2004; Duarte & Lopes, 2005, 2007; Mauro et al., 2008).

Foi observado que a densidade dos tricomas de *Tetradenia riparia* diminui progressivamente com a maturidade das folhas (Gairola et al., 2009). Outros autores verificaram o maior conteúdo de óleo essencial em folhas jovens de *Ocimum basilicum* (Werker et al., 2003). Por outro lado, avaliando a dinâmica do desenvolvimento dos tricomas glandulares de *Mentha arvensis*, foi proposta a divisão do processo de secreção do óleo essencial em 3 fases, (i) pré-secretória, (ii) secretória e (iii) pós-secretória (Sharma et al., 2003). Desta forma, a obtenção do máximo teor extrativo do óleo essencial depende do estabelecimento da época ideal para colheita de cada espécie vegetal.

Quando considerada a secção transversal da lâmina foliar de *G. spathulata*, a forma côncavo-convexa do pecíolo é útil na sua diferenciação de *Plectranthus neochilus*, que exhibe pecíolo plano-convexo e, *Plectranthus barbatus* e *Hyptis pectinata*, cujo pecíolo é biconvexo (Metcalf & Chalk, 1965; Scavone, 1965; Basílio et al., 2006; Duarte & Lopes, 2007). Já, as dimensões das células epidérmicas, que na face adaxial de *G. spathulata* são superiores às da face abaxial, permitem diferenciá-la de *Hymenocrater bituminosus*, cujo tamanho é homogêneo ao longo de toda epiderme foliar. O contorno reto a sinuoso destas células permite diferenciar *G. spathulata* de



espécies de *Leonurus*, *Hyptis*, *Hymenocrater* e *Mentha*, cujas células epidérmicas são onduladas (Martins, 2002; Duarte & Lopes, 2005; Basílio et al., 2006; Satil et al., 2007;).

A cutícula de *G. spathulata*, lisa, espessa e plicada, a diferencia de *Cyclotrichium organifolium*, *Plectranthus amboinicus* e *Plectranthus ornatus*, que exibem cutícula reta, e de *Cunila microcephala*, *Plectranthus neochilus* e *Leonurus sibiricus*, cuja cutícula é estriada (Kaya et al., 2000; Toledo et al., 2004; Duarte & Lopes, 2005, 2007; Mauro et al., 2008).

O mesofilo apresenta constituição variável em Lamiaceae (Metcalf & Chalk, 1965) e, o tipo dorsiventral de *G. spathulata* permite diferenciá-la de *Hymenocrater bituminosus* e *Thymbra sintenisii*, cujo mesofilo é isobilateral, e *Plectranthus neochilus* e *Plectranthus ornatus*, que apresentam mesofilo homogêneo (Erken, 2005; Duarte & Lopes, 2007; Satil et al., 2007; Mauro et al., 2008). Em *G. spathulata* o parênquima paliçádico é uniestratificado, enquanto em *Tetradenia riparia* e *Hymenocrater bituminosus* é bisseriado, e em *Salvia argentea*, este parênquima é constituído de 1 a 3 camadas, característica importante na diferenciação destas espécies (Sossae, 1995; Basílio et al., 2006; Satil et al., 2007; Baran et al., 2008). Apesar de ambas exibirem parênquima esponjoso com 3 a 4 camadas de células, *G. spathulata* pode ser diferenciada de *Salvia napifolia*, cujo parênquima paliçádico apresenta 2 a 4 camadas celulares (Baran & Ozdemir, 2006). Características do parênquima esponjoso permitem ainda, diferenciar *G. spathulata* de outras espécies de Lamiaceae, como *Hyptis suaveolens*, onde este parênquima é constituído por 6 a 7 camadas de células (Basílio et al., 2006).

A estrutura dos feixes vasculares é um importante carácter taxonômico, sendo comum em Lamiaceae o tipo colateral. O feixe vascular do tipo colateral fechado diferencia *G. spathulata* de outras lamiáceas, como *Leonurus sibiricus*, em que os feixes vasculares são do tipo colateral aberto (Duarte & Lopes, 2005). A presença de uma bainha incompleta de esclerênquima em torno do feixe vascular da nervura central caracteriza uma tendência a xeromorfia (Metcalf & Chalk, 1965). Nesta região ocorre ainda uma formação colenquimática com padrão anular, característica útil na diferenciação de *Cunila microcephala* e *Leonurus sibiricus*, que apresentam colênquima lamelar, *Salvia napifolia* e espécies de *Plectranthus*, que exibem colênquima angular, ou ainda *Salvia argentea*, em que o colênquima é lacunar (Toledo et al., 2004; Duarte & Lopes, 2005, 2007; Baran et al., 2008; Mauro et al., 2008;).

No material analisado de *G. spathulata*, não foi observada a presença de cristais inter ou intracelulares, sendo útil na diferenciação de espécies desta família, como *Cunila microcephala*, *Leonurus sibiricus*, *Mentha spicata*, *Mentha spicata x suaveolens*, *Peltodon radicans* e *Tetradenia riparia*, onde estes elementos são descritos nas células foliares (Metcalf & Chalk, 1965; Sossae, 1995; Martins, 2002; Toledo et al., 2004; Duarte & Lopes, 2005; Paiva & Machado, 2005).

Embora a proeminência dos estômatos em relação às células epidérmicas, verificada em *G. spathulata*, seja comum em plantas de ambiente úmido, o pequeno tamanho das células estomáticas, a presença de tricomas tectores, de células epidérmicas retas a sinuosas e de mesofilo dorsiventral, podem caracterizar uma adaptação à perda de água, características úteis para espécies que ocorrem em locais abertos e de grande exposição à radiação solar, como é o caso de *G. spathulata* (Metcalf & Chalk, 1965; Medri & Lleras, 1980; Cutter, 1987; Fahn, 1990).

Atualmente, está bem estabelecida a influência das características físico-químicas da droga vegetal sobre a qualidade dos fitoterápicos. Além disso, a falta de parâmetros para o controle da qualidade de plantas medicinais impede o desenvolvimento de protótipos de novos medicamentos (Budel et al., 2004). Desta forma, os resultados obtidos através de metodologias preconizadas pela Farmacopéia Brasileira (1988) e pela OMS (1998), por estarem de acordo com exigências da legislação brasileira (Brasil RDC n° 48, 2004), asseguram sua aplicabilidade no diagnóstico das partes aéreas de *G. spathulata*.

As características organolépticas, como o intenso odor aromático das folhas frescas de *G. spathulata*, semelhante ao de *Origanum majorana*, além de auxiliar na identificação, justificam sua utilização como condimento e o nome popular atribuído a esta espécie. Por outro lado, o pH levemente ácido (pH 4,0) do extrato aquoso sugere a presença de substâncias ácidas. O sabor adstringente, ligeiramente amargo, verificado no extrato aquoso pode contribuir no processo digestivo, uma vez que plantas com forte sabor amargo são utilizadas como agentes, pois o amargor estimula as secreções do trato gastrointestinal (TGI), especialmente do suco gástrico (Mors et al., 2000 apud Budel et al., 2004). No entanto, o índice de amargor de *G. spathulata* (1,25 u/g) é baixo comparando-se aos resultados encontrados para *Baccharis articulata* (230 u/g), *Baccharis cylindrica* (153,3 u/g) e *Baccharis gaudichaudiana* (28,8 u/g) classificadas como fortemente, moderadamente e levemente amargas (Budel et al., 2004).

A análise granulométrica tem grande utilidade no controle de qualidade da droga vegetal, pois o diâmetro médio das partículas (606,3  $\mu\text{m}$ ) exerce influência sobre a eficiência da extração. De acordo com a classificação granulométrica proposta pela Farmacopéia Brasileira (1988) e OMS (1998), a amostra de *G. spathulata* analisada apresentou tamanho grosseiro. Nunes et al. (2009) salientam ainda a necessidade da confirmação de laudos técnicos de insumos farmacêuticos e matérias-primas vegetais, devido à divergências de resultados encontrados na análise das flores de *Calendula officinalis* pulverizadas.

O teor extrativo é resultado da combinação entre o conteúdo dos compostos na droga vegetal, a sua solubilidade no solvente utilizado, e a capacidade de solvente em penetrar as células vegetais (Costa, 1994). O resultado verificado através de metodologias padronizadas (OMS, 1998), utilizando a droga vegetal na proporção de 4,0 % (p/v) em etanol 70 % e água, revelou maior poder extrativo da maceração durante 24 horas em água (17,1 %) do que em etanol 70 % (14,2 %). A comparação dos resultados obtidos. Tepe et al. (2005) obtiveram maior rendimento através da hidrodestilação das partes aéreas de *Salvia tomentosa* (21,09 %). Por outro lado, na extração de *G. spathulata* à quente, o etanol 70 % (18,6 %) proporcionou maior teor extrativo que a água (16,9 %). Contudo, deve-se considerar os maiores riscos de contaminação microbiana dos extratos aquosos durante o armazenamento (Migliato et al., 2007), já que a adição de conservantes pode interferir nas análises do controle de qualidade. As extrações à quente, por outro lado, são responsáveis pela degradação de compostos termo-lábeis. Desta forma, na escolha do sistema de extração adequado deve ser considerada a preservação dos constituintes da amostra, e a eficiência na obtenção dos compostos químicos de interesse.

Através da comparação do resultado da maceração em etanol 70 % de 354 g de *G. spathulata* a 20 % (p/v) e o resultado obtido pelo método preconizado pela OMS a 4 % (p/v), as diferenças mais relevantes foram observadas na relação droga: solvente e no tempo de extração. A mudança na relação droga vegetal: etanol 70% de 20 % para 4 % proporcionou uma redução do tempo de maceração, de 30 dias para 24 horas, não influenciando no poder extrativo, 14,15 % e 14,20 % de EB. A maceração de *G. spathulata* em etanol 70 % (14,15 %) proporcionou um teor extrativo quase três vezes superior ao obtido com *Mentha spicata* (5,25%) em etanol 95% sob agitação por 24 horas, preservando os compostos termo-lábeis. O teor

extrativo está diretamente relacionado à granulometria do pó de *G. spathulata* e, pode ser aumentado pela redução do tamanho destas partículas (Costa, 1982 e 1994).

Outros parâmetros utilizados no controle de qualidade de drogas vegetais referem-se à pureza das amostras, determinada através do conteúdo de materiais estranhos, do teor de umidade e cinzas. O excesso de elementos estranhos se deve a um processo inadequado de separação das diferentes partes vegetais e à limpeza inadequada destes materiais (Melo et al., 2007). No pó de *G. spathulata* foi encontrado 0,04 % de matéria estranha, a maior parte areia, valor inferior ao permitido para os frutos de *Foeniculum vulgare* (2 %) e folhas de *Peumus boldus* (3 %) (FBRAS, 1996). Além dos cuidados observados na coleta e limpeza da matéria-prima, esta pequena quantidade pode estar relacionada ao ambiente onde a planta se desenvolve, no qual o solo é completamente coberto por uma vegetação rasteira.

As monografias farmacopéicas geralmente consideram caules e folhas separadamente, no entanto, no presente estudo os extratos foram preparados a partir das partes aéreas de *G. spathulata*. De acordo com Barni et al. (2008), pela comparação do teor de flavonóides no extrato de folhas e de caules de *Ipamoea pes-caprae* (Convolvulaceae), verificaram nas folhas um conteúdo aproximadamente 5 vezes superior ao encontrado nos caules. Desta forma, se este fato for reproduzível em *G. spathulata*, cujo percentual de caules na amostra analisada foi de 46,7 % (p/p), a preparação dos extratos a partir de suas folhas poderia proporcionar um conteúdo de metabólitos secundários ainda mais significativo.

Através da dessecação as drogas vegetais perdem água e matéria volátil (FBRAS, 1988), que na amostra analisada de *G. spathulata* representou 6,82 % (p/p). O monitoramento deste resultado é importante no armazenamento da droga vegetal, para prevenir a hidrólise de constituintes químicos e/ou o crescimento microbiano, causados pela excessiva quantidade de água (FBRAS, 1998; Círio et al., 2003). Palazzo de Mello & Petrovick (2000) verificaram que o teor de umidade das partes aéreas pulverizadas de *Baccharis trimera* após nove meses de estocagem à temperatura ambiente aumentou de 5,75 % para 10,44 %. Devido à inespecificidade desta técnica para a perda de água residual da droga, estes autores orientam a análise em conjunto com o teor de substâncias voláteis. Considerando os valores preconizados para outras espécies na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira (<5 % a <16 %), conclui-se que o resultado encontrado no presente estudo é

importante na proteção da integridade das partes aéreas de *G. spathulata*. A inexistência de uma monografia atualizada de *G. spathulata* impede a comparação com parâmetros estabelecidos para a espécie, que devem ser definidos para cada material das espécies vegetais (OMS, 1998).

O resíduo não-volátil no processo de incineração da droga vegetal é representado pelas cinzas totais, constituídas por cinzas fisiológicas e não-fisiológicas. O acréscimo de ácido clorídrico às cinzas totais proporciona a solubilização das cinzas fisiológicas (orgânicas), restando após a filtração apenas os constituintes silicosos do material analisado, impurezas inorgânicas contaminantes ambientais (Delaporte et al., 2005). A incineração de *G. spathulata* resultou em 5,81 % de cinzas totais e apenas 0,20 % de cinzas insolúveis em ácido (não-fisiológicas). Este teor de cinzas não-fisiológicas é significativamente menor do que o máximo recomendado para *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae) (2 %) e *Atropa belladonna* (Solanaceae) (3 %), contrastando ainda mais com *Peumus boldus* (Monimiaceae), onde é permitido até 6 % (FBRAS, 1996). Além disso, este pequeno conteúdo de cinzas não-fisiológicas pode ser uma característica particular da espécie (Barroso et al., 1991), uma vez que o alto teor de sílica nas folhas é considerado um parâmetro útil na diferenciação de espécies da família Dilleniaceae (Almeida et al., 1998). A análise conjunta das determinações das cinzas insolúveis em ácido e do material estranho revela o alto grau de pureza da amostra de *G. spathulata* analisada. O teor de cinzas totais obtido é menor que o recomendado para as partes aéreas de outras espécies, como *Centella asiatica* (Apiaceae) (11 %), *Malva sylvestris* (Malvaceae) (16 %) (FBRAS, 2000), *Salvia officinalis* L. (8 %), *Passiflora incarnata* (Passifloraceae) (11 %) (Brit. Pharm, 1996), e que o encontrado para *Hamamelis virginiana* (9,14 %) e *Syzygium cumini* (Myrtaceae) (9,56 %) (Migliato et al., 2007).

O teor de óleo essencial de *G. spathulata* coletada no mês de abril, época da floração, foi significativamente diferente de espécies do mesmo gênero e de outros gêneros de Lamiaceae. Em *G. spathulata* foi encontrado um conteúdo de 2,93 % (v/p), enquanto em *G. marifolia* (0,30 %), *G. discolor* (0,50 %), *Cunila incisa* (1,94 %), *Cunila microcephala* (0,26 %), *Leonurus sibiricus* (0,10 %), *Mentha aquatica* (0,93 %), *Mentha piperita* (0,38 %), *Ocimum basiliscum* (0,06 % - 0,66 %), *Ocimum selloi* (0,34 %), *Ocimum vulgare* (1,45 %), *Thymus revolutus* (1,67 %) e *Thymus vulgaris*

(1,80 %) (Werker et al., 1993; Karaman et al., 2001; Budel et al., 2004; Bozin et al., 2006; McKay & Blumberg, 2006; Agostini et al., 2009).

Geralmente o conteúdo máximo de óleos essenciais ocorre durante o período de floração (Budel et al., 2004), podendo ser um indicador de qualidade, por viabilizar o monitoramento da estabilidade da droga vegetal durante o armazenamento (Palazzo de Mello & Petrovick, 2000). Estes autores observaram que o teor de óleo essencial nas partes aéreas frescas de *Baccharis trimera* (Asteraceae) de 3,13 % não foi alterado significativamente pela secagem a 35 °C em estufa de circulação de ar. No entanto, o armazenamento sob condições ambiente causou uma diminuição significativa na quantidade destes óleos, atingindo após o quinto mês de armazenamento o teor de 0,68 %.

Além disso, o conteúdo de óleo essencial encontrado em *G. spathulata* demonstra o potencial econômico desta espécie, uma vez que os óleos essenciais têm sido historicamente valorizados por suas propriedades estéticas, culinárias, flavorizantes, aromáticas e medicinais (Sharma et al., 2003). Espécies de Lamiaceae encontram-se entre as mais utilizadas pela indústria cosmética, de alimentos ou de medicamentos, em todo o mundo (Naghbi et al., 2005). Atividade antibacteriana é descrita para o óleo essencial dos gêneros *Salvia*, *Mentha*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* (Karaman et al., 2001; Marino et al., 2001; Baydar et al., 2004; Sacchetti et al., 2005; Tepe et al., 2005; Bozin et al., 2006), e também para *G. spathulata* (Kunz, 2007). A combinação das propriedades antibacterianas e antioxidantes de derivados vegetais tem grande utilidade na conservação de produtos farmacêuticos, nutracêuticos ou cosméticos (Sacchetti et al., 2005).

A análise cromatográfica é fundamental para a identificação de derivados de drogas vegetais, como extratos, tinturas, óleos fixos, óleos voláteis, e outros (Farias, 2007). A CCD além de ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, é reconhecidamente útil na autenticidade de matérias-primas (FBRAS 1988; Deutsches, 1991; British, 1996; Vogel et al., 2005; Farias et al., 2007). A fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27) mostrou-se eficaz na separação dos flavonóides através da CCD, permitindo identificar no EB e FB uma banda majoritária de alta intensidade. A co-cromatografia da FB com rutina revelou um aumento da intensidade da zona de Rf 0,66, sugerindo a presença deste glicosídeo na fração.

Por CLAE foi determinado o perfil cromatográfico do EB de *G. spathulata* utilizando um sistema binário de ácido acético 0,3 % e acetonitrila (ACN), que tem sido empregado na separação de várias classes de compostos fenólicos (Han et al., 2008; Chirinos et al., 2009). A identificação dos fenólicos de origem vegetal é uma tarefa complexa, devido à grande variedade de estruturas, à ligação a diferentes moléculas de açúcares ou por estarem conjugados em dímeros e trímeros. Através da co-injeção de amostra e padrão é possível identificar os compostos presentes em extratos de drogas vegetais.

A co-injeção do EB de *G. spathulata* e do padrão rutina proporcionou o aumento do pico correspondente ao composto majoritário (número 2) da amostra, sendo assim identificado como glicosídeo rutina (flavonol). Já a co-injeção do EB e do padrão luteolina proporcionou o aumento do pico de número 7 da amostra, sendo identificando como luteolina (flavonol). Os espectros de absorção dos compostos 1, 3, 4, 5, 6 e 8, quando comparados aos espectros obtidos por Chirinos et al. (2009), Li et al. (2009) e Merken & Beecher (2000), sugerem se tratar de derivados de flavonas e flavonóis.

O doseamento espectrofotométrico do EB e frações de *G. spathulata* revelou que os compostos fenólicos correspondem a 18,6 % do EB. O acetato de etila é frequentemente utilizado por sua significativa seletividade na extração de compostos fenólicos (Scholz & Rimpler, 1989; Sluzarczyk et al., 2009; Mariod et al., 2010), o que foi evidenciado no fracionamento de *G. spathulata*, onde a FA apresentou o maior conteúdo de fenólicos entre as frações (35,2 %). Estes compostos contribuem no amargor, adstringência, cor, sabor, odor, e na estabilidade de produtos alimentícios, prevenindo-os da oxidação (Marino et al., 2001; Baydar et al., 2004; Naczki & Shahidi, 2004; Ângelo & Jorge, 2007; Mariutti & Bragagnolo, 2007; Sluzarczyk et al., 2009). Atualmente, os efeitos colaterais dos antioxidantes sintéticos presentes em alimentos tem direcionado as pesquisas na busca de alternativas, despertando interesses nos antioxidantes naturais (Murcia et al., 2004; Sarikurku et al., 2008), especialmente os compostos polifenólicos (Marino et al., 2001; Tepe et al., 2005; Li et al., 2008; Matkowski et al., 2008b). O maior conteúdo de polifenólicos e flavonóides verificado nas frações FA e FB de *G. spathulata* está diretamente relacionado à atividade antioxidante descrita por Kunz (2007). Assim como demonstrado para outras espécies, estas frações possuem um importante

potencial na proteção do estresse oxidativo e na conservação de alimentos (Matkowski et al., 2008b).

Aos flavonóides são atribuídas diversas propriedades farmacológicas, incluindo antioxidantes, antimicrobianas, antialérgicas, anti-inflamatórias, vasodilatadoras, antidiabéticas, hepato e gastroprotetoras, antivirais e antitumorais (Oomah & Mazza, 1996; Pietta, 2000; Guardia et al., 2001; Nijveldt et al., 2001; Havsteen, 2002; Marchand, 2002; Zand et al., 2002; Ren et al., 2003). Estes compostos são amplamente distribuídos em Lamiaceae (Valant-Vetschera et al., 2003; Siciliano et al., 2005; Janeska et al., 2007; Özkan et al., 2007), e frequentemente utilizados para fins taxonômicos entre os seus gêneros (Jamzad et al., 2003; Valant-Vetschera et al., 2003). O teor de flavonóides que no EB de *G. spathulata* foi de 5,94 %, na FB (13,03 %) representou 68,9 % dos compostos fenólicos presentes, demonstrando potencial farmacológico.

Os taninos condensados polimerizados são responsáveis pela adstringência, enquanto os monômeros contribuem no amargor (Ojeda et al., 2002). Desta forma, o baixo índice de amargor verificado em *G. spathulata* corrobora com o conteúdo de taninos condensados (0,25 %) verificado no EB.

As doenças inflamatórias crônicas estão entre os maiores problemas de saúde da população mundial (Yesilada et al., 1997). Apesar das plantas medicinais serem amplamente utilizadas para o tratamento de condições inflamatórias na medicina tradicional em vários países, a real eficácia e relevância de muitas espécies é ainda desconhecida (Fawole et al., 2009).

O EB de *G. spathulata* mostrou eficácia na inflamação crônica induzida por algodão peletizado em ratos, com uma expressiva inibição da inflamação (51,31 %), próximo ao apresentado pela nimesulida (I % = 60,38 %). Diversos extratos e óleos essenciais de espécies pertencentes a diferentes gêneros de Lamiaceae, como *Lamium*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Thymus*, *Teucrium*, *Origanum*, *Scutellaria*, *Sideritis*, *Stachys*, revelaram propriedades anti-inflamatórias (Baricevic et al., 2001; Maleki et al., 2001; Hernández-Pérez & Rabanal, 2002; Shen et al., 2003; Hernández-Pérez et al., 2004; Akkol et al., 2008a, 2008b; Arumugan et al., 2008; Kamatou et al., 2008; Adams et al., 2009; Loizzo et al., 2009; Menichini et al., 2009), convergindo com os resultados obtidos no presente trabalho.

O ensaio com a fração FA de *Mentha spicata* revelou uma potente atividade sobre a inflamação crônica (I % = 65,4 %). Este resultado foi semelhante ao



apresentado pela indometacina (I % = 74,2 %) e o diclofenaco (I % = 73,3 %), sendo atribuído à atividade sequestradora de radicais livres e ao conteúdo de compostos fenólicos, como flavonóides, encontrados nesta fração (Arumugan et al., 2008). Como forma de evidenciar a atividade dos flavonóides alguns estudos são conduzidos com os compostos isolados. Assim foi demonstrado que a inibição da formação do granuloma e/ou do edema de pata em ratos, através do tratamento com 30 flavonóides, via intraperitoneal (i.p.), foi dependente da estrutura do flavonóide e do método utilizado. A jaceosidina (I % = 44 %) e morina (I % = 43 %) mostraram a maior atividade na inibição da formação do granuloma, próximo ao verificado com a dexametasona (I % = 50 %) (Pelzer et al., 1998). Já a administração i.p. de rutina, quercetina e hesperidina, na dose diária de 80 mg/kg, inibiu as fases aguda e crônica da inflamação. Rutina foi o mais ativo na fase crônica (I % = 73 %), o que foi atribuído à presença do glicosídeo na posição 3, possivelmente por contribuir na farmacocinética (Guardia et al., 2001). No entanto, a atividade anti-inflamatória dos flavonóides isolados de *Eupatorium arnottianum* foi inferior à atividade exercida pelo seu EB (Clavin et al., 2007), evidenciando o sinergismo entre os compostos.

A inibição do processo inflamatório tem sido frequentemente relacionada às propriedades antioxidantes dos flavonóides (Pietta, 2000; Guardia et al., 2001; Kris-Etherton et al., 2004; Clavin et al., 2007). Porém, além da atividade antioxidante, os mecanismos de ação dos flavonóides incluem a inibição de enzimas produtoras de eicosanóides e a inibição da ativação de células inflamatórias. A wogonina, uma flavona de *Scutellaria radix*, diminuiu a expressão da COX-2 e a produção de PGE<sub>2</sub> em fibroblastos, sugerindo ser o mecanismo envolvido na atividade anti-inflamatória deste composto sobre a pele (Chi & Kim, 2005). Rutina apresentou importante atividade antiartrítica, atribuída à habilidade de inibir a produção de NO<sup>•</sup> por macrófagos, e a proliferação de linfócitos T, indutores da secreção de citocinas pró-inflamatórias (Han, 2009). Foi demonstrada ainda para rutina uma redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8), da infiltração de leucócitos, da formação do granuloma e fibrose tecidual, não afetando a transcrição do NF- $\kappa$ B. Por outro lado, a quercetina e fisetina atuam através da supressão do NF- $\kappa$ B e MAPKs. A quercetina também é responsável pela inibição da PLA<sub>2</sub> (Lee et al., 1982), da COX-2 (Williams et al., 1999), e da 5-LOX (Laughton et al., 1991), pela liberação de histamina mediada por Ig E, e pela produção de TNF- $\alpha$  (Park et al., 2008).

Diante dos diferentes mecanismos moleculares de ação descritos para compostos polifenólicos, maiores estudos são necessários para a elucidação dos processos envolvidos na atividade anti-inflamatória do EB de *G. spathulata*. O biomonitoramento através das frações, subfrações ou compostos isolados, além de fornecer informações mais precisas sobre os constituintes farmacologicamente ativos, pode proporcionar o acesso a substâncias mais eficazes e seguras no tratamento da inflamação crônica.

---

---

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. As características morfoanatômicas da folha, quando analisadas em conjunto, contribuem no controle botânico de qualidade de *G. spathulata*.
2. A forma espatulada e a margem sub-revoluta, crenada no meio-superior, auxiliam no controle de qualidade da matéria-prima vegetal íntegra ou rasurada.
3. A epiderme uniestratificada com células retas a pouco sinuosas, estômatos diacíticos, presença de tricomas tectores e glandulares, mesofilo dorsiventral, feixes vasculares colateral fechado com bainha parenquimática, que na nervura central é incompleta e constituída por esclerênquima, bem como a ausência de cristais, auxiliam no controle de qualidade da matéria-prima íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.
4. A relação droga: solvente reduz significativamente o tempo de extração.
5. O maior teor extrativo foi verificado na fração mais polar (FB).
6. O teor de óleo essencial foi significativo quando comparado a outras espécies de Lamiaceae.
7. A análise espectrofotométrica dos extratos revelou um conteúdo expressivo de compostos polifenólicos e flavonóides, constituindo-se importantes marcadores químicos.
8. O maior conteúdo de polifenóis foi observado na FA e flavonóides na FB.
9. A autenticidade e integridade da droga vegetal e seus derivados pode ser monitorada por CCD e/ou CLAE através dos flavonóides presentes.
10. O sistema de eluição utilizado permitiu estabelecer o perfil cromatográfico por CLAE do EB de *G. spathulata* e identificar os compostos rutina e luteolina.

11. O EB de *G. spathulata* demonstrou significativa inibição da inflamação induzida por algodão peletizado em ratos, semelhante ao verificado para nimesulida.

---

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D.O. The granulomatous inflammatory response. **Am. J. Pathol.**, v. 84, n. 1, p. 164-192, jul. 1976.

Adams, M.; Berset, C.; Kessler, M.; Hamburger, M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, p. 343-359, 2009.

Agostini, F.; Santos, A.C.A.; Rossato, M.R.; Pansera, M.R.; Santos, P.L.; Serafini, L.A.; Molon, R.; Moyna, P. Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in southern Brazil. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v. 52, n. 2, p. 473-478, mar./apr 2009.

Aithal, G.P.; Day, C.P. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. **Clin. Liver Dis.**, v.11, p. 563-575, 2007.

Akerele, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-19, 1993.

Akkol, E.K.; Yalçın, F.N.; Kaya, D.; Çalis, I.; Yesilada, E; Ersöz, T. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive actions of some *Lamium* species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, p. 166-172, 2008a.

Akkol, E.K.; Göger, F.; Kosar, M.; Baser, K.H.C. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. **Food Chem.**, v. 108, p. 942-949, 2008b.

Alaerts, G.; Matthijs, N.; Smeyers-Verbeke, J.; Vander-Heyden, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **J. Chromatogr. A**, v. 1172, p. 1-8, 2007.

Albuquerque, U.P.; Medeiros, P.M.; Almeida, A.L.S.; Monteiro, J.M.; Neto, E.M.F.L.; Melo, J.G.; Santos, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 325-354, 2007.

Albuquerque, R.L. Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais do Brasil: *Plectranthus barbatus* Andr. *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. (2000). In: Costa, M.C.C.D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 81-88, 2006.

Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina/DF: EMBRAPA-CAPC, 1998.

Amaral, F.M.M.; Coutinho, D.F.; Ribeiro, M.N.S.; Oliveira, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís / Maranhão. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, n. 1, p. 27-30, 2003.

Angelo, P.M.; Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

Antônio, M.A.; Brito, A.R.M.S. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 61, p. 215–228, 1998.

APG - The Angiosperm Phylogeny Group An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 141, p. 399-436, 2003.

Appezato-da-Glória, B.; Carmello-guerreiro, S.M. **Anatomia vegetal**. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2003.

Arumugam, P.; Gayatri Priya, N.; Subathra, M.; Ramesh, A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. **Environ. Toxicol. Phar.**, v. 26, p. 92–95, 2008.

Ascensão, L.; Marques, N.; Pais, M.S. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). **Ann. Bot.**, v. 75, p. 619-626, 1995.

Babu, N.P.; Pandikumar, P.; Ignacimuthu, S. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 125, p. 356–360, 2009.

Baran, P.; Ozdemir, C. The morphological and anatomical characters of *Salvia napifolia* Jacq. in Turkey. **Bangladesh J. Bot.**, v. 35, n. 1, p. 77-84, 2006.

Baran, P.; Ozdemir, C.; Aktas, K. The morphological and anatomical properties of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) in Turkey. **Res. J. Agric. Biol. Sci.**, v. 4, n. 6, p. 725-733, 2008.

Barbosa, M.C.S.; Beletti, K. M. da S.; Corrêa, T. F.; Santos, C.A. de M. Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) comercializadas em Curitiba, PR. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.11, n. 1, p. 1-4, 2001.

Barbosa-Filho, J.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Alencar, A.A.; Batista, L.M.; Oliveira, R.A.G.; Guedes, D.N.; Falcão, H.S.; Moura, M.D.; Diniz, M.F.F.M.; Modesto-Filho, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 392-413, 2005.

Baricevic, D.; Sosa, S.; Della-Loggia, R.; Tubaro, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 125–132, 2001.



- Barni, S.T.; Cechinel-Filho, V.; Couto, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 4, p. 865-870, out./dez. 2009.
- Barreiro, E.J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.
- Barros, F.M.C.; Pereira, K.N.; Zanetti, G.D.; Heizmann, B.M. Plantas de Uso Medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 26, n. 5, p. 652-62, 2007.
- Barros, L.; Heleno, S.A.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. **LWT- Food Sci. Technol.**, v.43, p. 544–550, 2010.
- Barroso, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, 1ª ed., v. 3, Viçosa, UFV: Impr. Univ. p. 98-105, 1991.
- Basílio, I.J.L.D.; Agra, M.F.; Rocha, E.A.; Leal, C.K.A.; Abrantes, H.F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.
- Bauer, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? **Drug Inf. J.**, v. 32, p. 101-110, 1998.
- Baydar, H.; Sagdiç, O.; Özkan, G.; Karadogan, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169–172, 2004.
- Bello, C.M.; Montanha, J.A.; Schenkel, E.P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.12, n. 2, p. 75-83, 2002.
- Bersani-Amado, C.A.; Taniguchi, S.F.; Sudo, L.S.; Kimura, E.; Oga, S. Effect of piroxicam  $\beta$ -ciclodextrin complexo n experimental inflammation. **Gen. Pharmac.**, v.26, n. 4, p. 809-813, 1995.
- Billingham, M.E.J.; Davis, G.E. Experimental models of arthritis in animals as screening tests for drugs to treat arthritis in man. *In*: Vane, J.R.; Ferriera, S.H. (Eds.) **Anti-inflammatory Drugs**. HandBook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, New York, p. 108–144, 1979.
- Bonzani, N.; Espinar, A.L. Estudios anatomicos de tres espécies de Lamiaceae usada em medicina popular. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 12, n. 3, p. 113-123, 1993.
- Borella, J.C.; Fontoura, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, n. 2, p. 63-67, 2002.

Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackov, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 1822–1828, 2006.

Brandão, M.G.L.; Alves, R.M.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, P.; Vieira, M.T.; Moreira-Campos, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.5, n.1, p. 56-59, 2002.

Brandão, M.G.L.; Cosenza, G.P.; Moreira, R.A.; Monte-Mor, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 3, p. 408-420, jul./set. 2006.

Brandão, M.G.L.; Freire, N.; Vianna-Soares, C.D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Cad. Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 613-616, 1998.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17**, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRASIL. Convenção sobre Diversidade Biológica. **Medida Provisória Nº 2.186-16**, de 23 de agosto de 2001. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da saúde. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 48**, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Decreto Nº 5813**, de 22 junho de 2006. Estabelece diretrizes para garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, o desenvolvimento de tecnologias, inovações e o fortalecimento da cadeia produtiva, o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/projetos.htm>, 2007. Acessado em: 14/04/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Portaria Nº 782**, de 27 de junho de 2008. Institui a Comissão da Farmacopéia Brasileira e aprova o seu regimento interno.

Budel, J.M.; Duarte, M.R.; Santos, C.A.M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 1, p. 41-48, 2004.

British Herbal Pharmacopoeia. 4. ed. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1996.

Calixto, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência Hoje**, v. 21, n. 123, p. 26–30, 1996.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-89, 2000.

Calixto, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciencia e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, jul./set. 2003.

Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel, A.; Perfeito, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 314-319, 2008.

Carvalho, C.M.G.; Prudente, L.R.; Pereira, A.C.; Paula, J.R.; Bara, M.T.F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.

Chakraborti, A.K.; Garg, S.K.; Kumar, R.; Motiwala, H.F.; Jadhavar, P.S. Progress in COX-2 Inhibitors: A Journey So Far. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 15, p. 1562-1593, fev./2010.

Chaudhuri, A.K.N.; Karmakar, S.; Roy, D.; Pal, S.; Pal, M.; Sen, T. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (Sikkim variety). **Pharmacol. Res.**, v. 51, p. 169–175, 2005.

Chi, Y.S.; Kim, H.P. Suppression of cyclooxygenase-2 expression of skin fibroblasts by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. **Prostag. Leukotr. Ess.**, v. 72, p. 59–66, 2005.

Chimin, A.; Lima, E.L.; Beltrame, F.L.; Pereira, A.V.; Esmerino, L.A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) comercializadas no estado do Paraná. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 4, p. 591-7, 2008.

Chirinos, R.; Betalleluz-Pallardel, I.; Huamán, A.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Campos, D. HPLC-DAD characterization of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. **Food Chem.**, v. 113, p. 1243–1251, 2009.

Cibecol Industrial Farmacêutica Ltda. Porto Alegre, RS, Brasil. Disponível em: <http://www.cibecol.com.br/produtos.php?in=problemas&problema=30>. Acesso em 19/04/2010.

Cirio, G.M.; Doni-Filho, L.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; Zanin, S.M.W. Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*,

Mart. ex. Reiss (espinheira-santa) como insumo para a indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 67-76, jul./dez. 2003.

Clavin, M.; Gorzalczany, S.; Macho, A.; Muñoz, E.; Ferraro, G.; Acevedo, C.; Martino, V. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 585–589, 2007.

Coimbra, R. **Notas de Fitoterapia**. 1ª ed., Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo. p. 166, 1942.

Corrêa, M.F.P.; Melo, G.O.; Costa, S.S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18 (supl.), p. 785-797, dez. 2008.

Corrêa, R.M.; Pinto, J.E.B.P.; Reis, E.S.; Costa, L.C.B.; Alves, P.B.; Niculan, E.S.; Brant, R.S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

Costa, A.F. **Farmacognosia: Farmacognosia experimental**. v. 3, 2. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1032 p., 1982.

Costa, A.F. **Farmacognosia**. v. 2, 4. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1117 p., 1994.

Costa, L.C.B.; Castro, E.M.; Pinto, J.E.B.P.; Alves, E.; Bertolucci, S.K.V.; Rosal, L.F. & Moreira, C.M. Aspectos da anatomia foliar de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) em diferentes condições de qualidade de luz. **Rev. Bras. Biociências**, v. 5 (supl. 1), p. 6-8, 2007.

Costa, M.C.C.D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 2, p. 81-88, 2006.

Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Weiss, R.B. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Semin. Oncol.**, v. 24, n. 2, p. 156–163, 1997.

Cutter, E.G. **Anatomia vegetal. Parte II – Órgãos. Experimentos e interpretações**. Ed. Rocca, São Paulo, 1987.

De Melo, G.O.; Malvar, D.C.; Vanderlinde, F.A.; Rocha, F.F.; Pires, P.A.; Costa, E.A.; Matos, L.G.; Kaiser, C.R.; Costa, S.S. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, n. 2, p. 228-232, 2009.

Delaporte, R.H.; Guzen, K.P.; Takemura, O.S.; Palazzo de Mello, J.C. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 2, p. 133-136, abr./jun. 2005.

Deutsches Arzneibuch. 10. Aufl Stuttgart: Deutscher Apotheker, Eschborn: GOVI, 1991.

Di Primio, R.F. **Flora do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, p. 244-247, 1946.

Di Stasi, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 230 p., 1996.

Dickson, W.C. **Integrative Plant Anatomy**. Harcourt Academic Press, San Diego, 2000.

Dinarello, C.A. Pro-inflammatory cytokines. **Chest.**, v. 118, p. 503-508, 2000.

Duarte, M.R.; Bardal, D. Qualidade de amostras de fármacos vegetais comercializados em Curitiba – PR. **Rev. Visão Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. 65-68, 2002.

Duarte, M.R.; Lima, M.P. Análise farmacopéia de amostras de camomila – *Matricaria recutita* L., Asteraceae. **Rev. Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 89-92, 2003.

Duarte, M.R.; Lopes, J.F. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Leonurus sibiricus* L., Lamiaceae. **Lat. AM. J. Pharm.**, v. 24, n. 1, p. 68-74, 2005.

Duarte, M.R.; Lopes, J.F. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 4, p. 549-556, 2007.

Dundar, E.; Olgun, E.G.; Isiksoya, S.; Kurkcuoglu, M.; Baser, K.H.C.; Bal, C. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, p. 399–408, 2008.

Elias, S.R.M.; Assis, R.M.; Stacciarini-Seraphin, E.; Rezende, M.H. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). **Rev. Bras. Bot.**, v.26, n.2, p.169-174, jun. 2003.

Elisabetsky, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 8, p. 697–702, 1987.

Elisabetsky, E.; Setzer, R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. In: Parker, E.P. (Ed.) *The Amazon Caboclo: historical and contemporary perspectives*. Williamsburgh, p. 243-278, 1985.

Engel, I.C.; Ferreira, R.A.; Cechinel-Filho, V.; Meyre-Silva, C. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 258-264, abr./jun. 2008.

Erkan, N.; Ayranci, G.; Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chem.**, v. 110, 76–82, 2008.

Erken, S. Morphological and Anatomical Studies on *Thymbra sintonisii* Bornm. & Aznav. (Labiatae). **Turk. J. Bot.**, v. 29, p. 389-397, 2005.

Fahn, A. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. **Ann. Bot.**, v. 57, p. 631-637, 1986.

Fahn, A. **Plant anatomy**. 4. ed. Pergamon Press, Oxford, 587 p., 1990.

Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 381-391, out./dez. 2005.

Farias, M.R.; Schenkel, E.P.; Bergold, A.M.; Petrovick, P.R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

Farias, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais, IN: Simões, C.M.O. [org.] et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed., Editora UFRGS, Porto Alegre, p. 263-288, 2007.

Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 1. ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, p. 572, 1926.

Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte I (1988). São Paulo: Atheneu Editora.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte II, Fascículo 1 (1996). São Paulo: Atheneu Editora.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte II, Fasc. 2 (2000). São Paulo: Atheneu Editora.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte II, Fasc. 3 (2002). São Paulo: Atheneu Editora.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte II, Fasc. 4 (2003). São Paulo: Atheneu Editora.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte II, Fasc. 5 (2004). São Paulo: Atheneu Editora.

Fawole, O.A.; Ndhala, A.R.; Amoo, S.O.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, p. 237–243, 2009.

FDA - Food and Drug Administration, **Guidance for Industry: Botanical Drug Products**, June 2004, p. 11, <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CenterforDrugEvaluationandResearch/ucm106136.pdf>, acessado em 01/06/2010.

Fecka, I.; Turek, S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 10908–10917, 2007.

Felipe, G.M.; Alencastro, F.M.M.R. **Am. Acad. Brasil.**, v. 38 (supl), p. 125-157, 1966.

Fenner, R.; Betti, A.H.; Mentz, L.A.; Rates, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 42, n. 3, jul./set. 2006

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

Fiorucci, S.; Meli, R.; Bucci, M.; Cirino, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, n. 11, p. 1433–1438, 2001.

Flora brasiliensis: A obra. v. VIII, Parte I, Fasc. 22, Prancha 35. Publicado em 24-Jul-1858. Disponível em: [http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon\\_id=23558](http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=23558). Acessado em 04/06/2010.

Font Quer, P. **Plantas medicinales: El Diocórides Renovado**. 12<sup>a</sup> ed., Barcelona: Editorial Labor, p. 640, 1990.

Fonseca, P.; Librandi, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 44, n. 2, abr./jun. 2008.

Fries, J.F. NSAID gastropathy: The second most deadly rheumatic disease? **J. Rheumatol.**, v. 18, p. 6-10, 1991.

Funari, C.S.; Ferro, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, n. 2, p. 178-182, abr./jun. 2005.

Gairola, S.; Naidoo, Y.; Bhatt, A.; Nicholas, A. An investigation of the foliar trichomes of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd [Lamiaceae]: An important medicinal plant of Southern Africa. **Flora**, v. 204, p. 325–330, 2009.

Gattuso, M.A.; Gattuso, S.J. **Manual de procedimientos para analisis de drogas en polvo**. Ed. Universidade Nacional de Rosário, Argentina, 1999.

Gerlach, D. **Botanische mikrotechnik**, 2 ed., Stuttgart, Georg-Thieme Verlag, 211 p., 1977.

Gerrits, P.O.; Smid, L.A. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **J. Microsc.**, v. 132, n. 1, p. 81-85, 1983.

Gonçalves, E.; Lorenzi, H. **Morfologia vegetal** - Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 416 p., 2007.

Gonzales, E.; Iglesias, I.; Carretero, E.; Villar, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 329–333, 2000.

Grünwald, J. The European phytomedicines market: figures, trends, analysis. **Herbal Gram**, v. 34, p. 60-65, 1998.

Guardia, T.; Rotelli, A.E.; Juarez, A.O.; Pelzer, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **IL Farmaco**, v. 56, p. 683–687, 2001.

Guerra, P.M.; Nodari, O.R. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O. [org.] et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.13-25, 2001.

Gürbüz, I.; Üstün, O.; Yesilada, E.; Sezik, E.; Kutsal, O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. **J. Ethnopharmacol.**, v. 88, p. 93–97, 2003.

Güvenç, A.; Okada, Y.; Akkol, E.k.; Duman, H.; Okuyama, T.; Çalis, I. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. **Food Chem.**, v. 118, p. 686–692, 2010.

Habibvash, F.N.; Rajamand, M.A.; Heidari, R.; Sarghein, S.H.; Ricani, M.H. Study of some *Salvia* L. (Lamiaceae) species native to west Azarbaijan (Iran) considering their phenolic compounds. **Pak. J. Nutr.**, v. 6, n. 5, p. 443-446, 2007.

Han, J.; Ye, M.; Qiao, X.; Xu, M.; Wang, B.; Guo, D. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 47, p. 516–525, 2008.

Han, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 9, p. 207–211, 2009.

Hartisch, C.; Kolodziej, H.; von Bruchhausen, F. Dual inhibitory activities of tannins from *Hamamelis virginiana* and related polyphenols on 5-lipoxygenase and lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase. **Planta Med.**, v. 63, n. 2, p. 106–110, 1997.

Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeut.**, v. 96, p. 67–202, 2002.

Hernández-Pérez, M.; Rabanal, R.M. Evaluation of the antiinflammatory and analgesic activity of *Sideritis canariensis* var. *pannosa* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 43-47, 2002.



Hernández-Pérez, M.; Sánchez-Mateo, C.C.; Montalbetti-Moreno, Y.; Rabanal, R.M. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 279–284, 2004.

Hickey, L.J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. **Bol. Soc. Arg. Bot.**, v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.

Ho, S.-C.; Wu, S.-P.; Lin, S.-M.; Tang, Y.-L. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chem.**, v. 122, p. 768–774, 2010.

Hong, J.; Bose, M.; Ju, J.; Ryu, J.H.; Chen, X.; Sang, S.; Lee, M.J.; Yang, C.S. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1671–1679, 2004.

Huhtanen, C.N. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. **J. Food Prot.**, v. 43, p. 195–196, 1980.

Iwalewa, E.O.; McGaw, L.J.; Naidoo, V.; Eloff, J.N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 6, p. 2868–2885, 2007.

Jamzad, Z.; Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Simmonds, M.S.J.; Ingrouille, M.; Jalili, A. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 31, p. 587–600, 2003.

Janeska, B.; Stenofa, M.; Alipieva, K. Assay of flavonoids aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. **Acta Pharm.**, v. 57, p. 371–377, 2007.

Jang, M.; Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 25, n. (2–3), p. 65–77, 1999.

Joly, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7<sup>a</sup> ed., São Paulo: Editora Nacional, p. 582-586, 1985.

Julião, L.S.; Tavares, E.S.; Lage, C.L.S.; Leitão, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13 (supl.), p. 36-38, 2003.

Kamatou, G.P.P.; Makunga, N.P.; Ramogola, W.P.N.; Viljoen, A.M. South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. **J. Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 664–672, 2008.

Kapu, S.D.; Ngwai, Y.B.; Kayode, O.; Akah, P.A.; Wambebe, C.; Gamaniel, K. Anti-inflammatory, analgesic antilymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, n. 1, p. 7–13, 2001.

Karaman, S.; Digrak, M.; Ravid, U.; Ilcim, A. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 183–186, 2001.

Kaya, A.; Baser, K.H.C.; Satil, F.; Tumen, G. Morphological and anatomical studies on *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. (Labiatae). **Turk J. Bot.** v. 24, p. 273-278, 2000.

Khanavi, M.; Hajimahmoodi, M.; Cheraghi-Niroomand, M.; Kargar, Z.; Ajani, Y.; Hadjiakhoondi, A.; Oveisi, M.R. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n. 6, p. 1143-1147, mar. 2009.

Khanna, S.K.; Viswanatham, P.N.; Krishnan, P.S.; Sanwai, G.G. Phytochemistry, v. 7, p. 1513-1517, 1968; IN: Naczka, M. & Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. **J. Chromatogr. A**, v.1054, p. 95-111, 2004.

Koca, F. Morphological and anatomical properties of *Micromeria myrtifolia* Boiss. Et Hohen. **Acta Pharm. Turcica**, v. 44, p. 235-242, 2002.

Kofidis, G.; Bosabalidis, A.M.; Moustakas, M. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). **Ann. Bot.**, v. 92, p. 635-645, 2003.

Korolkovas, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 1, jan./jun. 1996.

Kris-Etherton, P.M.; Lefevre, M.; Beecher, G.R.; Gross, M.D.; Keen, C.L.; Etherton, T.D. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. **Annu. Rev. Nutr.** v. 24, p 511–538, 2004.

Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. **Food Chem.**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

Kunz, V.T. **Glechon spathulata Benth.**: Estudo químico e farmacológico. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2007.

Lanni, C.; Becker, E.L. Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by p-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid and quercetin. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 76, n. 3, p. 214–217, 1985.

Laughton, M.J.; Evans, P.J.; Moroney, M.A.; Houlst, J.R.; Halliwell, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary

additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, n. 9, p. 1673–1681, 1991.

Lee, T.P.; Matteliano, M.L.; Middleton, E.Jr. Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. **Life Sci.**, v. 31, n. 24, p. 2765–2774, 1982.

Lemée, A. **Dictionnaire descriptif et synonymique des genres de plantes phanérogames**, tomo III, Paris: Brest, p. 264, 1931.

Li, C.; Du, H.; Wang, L.; Shu, Q.; Zheng, Y.; Xu, Y.; Zhang, J.; Yang, R.; Ge, Y. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia* section Moutan) yellow flowers. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 18, p. 8496–8503, 2009.

Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Saab, A.M.; Statti, G.A.; Cindio, B.; Houghton, P.J.; Menichini, F.; Frega, N.G. Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. **Food Chem.**, v. 117, p. 174–180, 2009.

Lu, Y.; Foo, Y. Polyphenolics of *Salvia* – a review. **Phytochemistry**, v. 59, p. 117–140, 2002.

Maleki, N.; Garjani, A.; Nazemiyeh, H.; Nilfouroushan, N.; Eftekhar-Sadat, A.T.; Allameh, Z.; Hasannia, N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 213–218, 2001.

Marchand, L.L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p. 296–301, 2002.

Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 67, p. 187–195, 2001.

Mariod, A.A.; Ibrahim, R.M.; Ismail, M.; Ismail, N. Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seed cakes. **Food Chem.**, v. 118, p. 120–127, 2010.

Mariutti, L.R.B.; Bragagnolo, N. Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, n. 2, p. 96–103, abr./jun. 2007.

Marliere, L.D.P.; Ribeiro, A.Q.; Brandão, M.G.L.; Klein, C.H.; Acurcio, F.A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18 (supl.), p. 754–760, 2008.

Martins, M.B.G. Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* X *suaveolens* (Lamiaceae). **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 205–218, 2002.

- Matkowski, A.; Zielinska, S.; Oszmianski, J.; Lamer-Zarawska, E. Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 7892–7896, 2008a.
- Matkowski, A.; Tasarz, P.; Szypuła, E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. **J. Med. Plants Res.**, v. 2, n. 11, p. 321-330, 2008b.
- Maul, A.A.; De Oliveira, M.N. Extração supercrítica da mangerona (*Glechon spathulata* Bentham, LABIATAE). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 35 (supl. 1), p. 93, 1999.
- Mauro, C.; Silva, C.P.; Missima, J.; Ohnuki, T.; Rinaldi, R.B.; Frota, M. Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 4, p. 608-613, 2008.
- McKay, D.L.; Blumberg, J.B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytother. Res.**, v. 20, p. 619–633, 2006.
- Medri, M.E.; Lleras, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Acta Amazônica**, v. 10, p. 463-493, 1980.
- Melo, J.G.; Martins, J.D.G.R.; Amorim, E.L.C.; Albuquerque, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2007.
- Melo, J.G.; Nascimento, V.T.; Amorim, E.L.C.; Andrade Lima, C.S.; Albuquerque, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, n. 2, p. 111-120, 2004.
- Menichini, F.; Conforti, F.; Rigano, D.; Formisano, C.; Piozzi, F.; Senatore, F. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium essential* oils from Greece. **Food Chem.**, v. 115, p. 679–686, 2009.
- Mentz, L.A.; Lutzemberger, L.C.; Schenkel, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.
- Merken, H.M.; Beecher, G.R. Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- Metcalf, C. R.; Chalk, L. **Anatomy of the dicotyledons**. v. 2, Clarendon Press, Oxford, p. 1041-1053, 1965.

- Miceli, N. ; Tavianoa, M.F. ; Giuffridab, D.; Trovatoa, A. ; Tzakouc, O. ; Galati, E.M. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 261–266, 2005.
- Migliato, K.F.; Moreira, R.R.D.; Mello, J.C.P.; Sacramento, L.V.S.; Corrêa, M.A.; Salgado, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 94-101, jan./mar. 2007.
- Montanari, C.A.; Bolzani, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- Montanha, J.A.; Moellerke, P.; Bordignon, S.A.L.; Schenkel, E.P.; Roehe, P.M. Antiviral activity of brazilian plant extracts. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.
- Moon, H.K.; Vinckier, S.; Smets, E.; Huysmans. H. Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae:Lamiaceae). **Plant Syst. Evol.**, v. 275, p. 93–108, 2008.
- Morgan, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição, propriedades**. São Paulo: Editora Hemus, 555 p., 1997.
- Moroney, M.A.; Alcaraz, M.J.; Forder, R.A.; Carey, F.; Hoult, J.R. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 40, n. 11, p. 787–792, 1988.
- Moura, A.C.A.; Silva, E.L.F.; Fraga, M.C.A.; Wanderley, A.G.; Afiatpour, P.; Maia, M.B.S. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **Phytomedicine**, v. 12, p. 138–142, 2005.
- Murcia, M.A.; Egea, I.; Romojaro, F.; Parras, P.; Jimenez, A.M.; Martinez-Tome, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1872–1881, 2004.
- Naczki, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. **J. Chromatogr. A**, v.1054, p. 95-111, 2004.
- Naghbi, F.; Mosaddegh, M. ; Motamed, S.M. ; Ghorbani, A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. **Iran. J. Pharm. Res.**, v. 2, p. 63-79, 2005.
- Niemegeers, C.J.E.; Van Bruggen, W. ; Awouters, F. ; Janssen, P.A. The effects of suprofen in rats with implanted cotton pellets. **Arzneim. Forsch.**, v. 25, p. 1524-1526, 1975.
- Nijveldt, R.J.; Nood, E.; Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; Norren, K.; Leeuwen P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 418–425, 2001.

Nunes, K.M.; Barbosa, W.L.R.; Ozela, E.F.; Silva Júnior, J.O.C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 28, n. 3, p. 344-350, 2009.

Oiye, S.O.; Muroki, N.M. Use of spices in foods. **J. Food Technol. Afr.**, v. 7, n. 2, p. 39-44, abr./jun. 2002.

Ojeda, H.; Andary, C.; Kraeva, E.; Carbonneou, A.; Deloire, A. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv Shiraz. **Am. J. Enol. Viticult.**, v. 53, p. 261–267, 2002.

Olajide, O.A.; Makinde, J.M.; Awe, S.O. Effects of the aqueous extract *Bridella ferruginea* stem bark on carrageenan induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 1, p. 113–117, 1999.

Oliveira, F.; Akisue, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Ed. Atheneu, São Paulo, 216 p., 1989.

Oomah, B.D.; Mazza, G. Flavonoids and antioxidative activities in Buckwheat. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 1746–1750, 1996.

Organização Mundial da Saúde (OMS) - **Declaration of Alma-Ata**. In: International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, USSR, 6-12 september 1978.

OMS - **Guidelines for the Assessment of Herbal Medicine**. Munich, Germany, p. 2., 1991. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/WHO TRM 91.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/WHO_TRM_91.4.pdf), Acesso em 01/06/2010.

OMS - **Quality control methods for plant materials**. Geneva, Switzerland, 1998.

OMS – **WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations**: thirty seven report. Geneva, Switzerland, 2003.

Özkan, G.; Kuleasan, H.; Çelik, S.; Göktürk, R.S.; Ünal, O. Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. **Food Control**, v. 18, p. 509–512, 2007.

Özkan, M. Glandular and eglandular hairs of *Salvia recognita* Fish. & Mey. (Lamiaceae) in Turkey. **Bangladesh J. Bot.**, v. 37, n. 1, p. 93-95, 2008.

Paiva, E.A.S.; Machado, S.R. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v. 48, n. 1, p. 147-153, jan. 2005.

Palazzo de Mello, J.C.; Petrovick, P.R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

Park, H.H.; Lee, S.; Son, H.-Y.; Park, S.-B.; Kim, M.-S.; Choi, E.-J.; Singh, T.S.K.; Ha, J.-H.; Lee, M.-G.; Kim, J.-E.; Hyun, M.C.; Kwon, T.K.; Kim, Y.H.; Kim, S.-H. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 10, p. 1303-1311, 2008.

Patel, D.M.; Prajapati, D.G.; Patel, N.M. Seed mucilage from *Ocimum americanum* linn. as disintegrant in tablets: Separation and evaluation. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 69, n. 3, p. 431-435, 2007.

Patora, J.; Klimek, B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). **Acta Pol. Pharm.**, v. 59, n.2, p. 139-143, 2002.

Paula, J.P.; Gomes-Carneiro M.R.; Paumgarten, F.J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 88, p. 253–260, 2003.

Pedernera, A.M.; Guardia, T.; Calderón, C.G.; Rotelli, A.E.; Rocha, N.E.; Di Genaro, S.; Pelzer, L.E. Anti-ulcerogenic and anti-inflammatory activity of the methanolic extract of *Larrea divaricata* Cav. in rat. **J. Ethnopharmacol.**, v. 105, p. 415–420, 2006.

Pelzer, L.E.; Guardia, T.; Juarez, A.O.; Guerreiro, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**, v. 53, p. 421–424, 1998.

Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

Polya, G.M. **Biochemical targets of plant bioactive compounds.** A pharmacological reference guide to sites of action and biological effects. CRC Press, Florida, 2003.

Prata, M.; Haddad, C.; Goldemberg, S. Uso do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 3, p. 43-48, 1988.

Pupo, S.C.; Pérez Davison, G.; Martínez-Sánchez, G.; Takemura, O.S.; Silva, A.V.; onçalves, G.F.; Delaporte, R.H. Avaliação da atividade antiinflamatória crônica do extrato etanólico de *Bouchea fluminensis* (Verbenaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 3, p. 364-368, 2008.

Rainsford, K.D. Relationship of nimesulid safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. **Rheumatology**, v. 38 (suppl. 1), p. 4-10, 1999.

Ramassamy, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 545, p. 51–64, 2006.

Rasineni, G.K.; Siddavattam, D.; Reddy, A.R. Free radical quenching activity and polyphenols in three species of Coleus. **J. Med. Plants Res.**, v. 2, n. 10, p. 285-291, out. 2008.

Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001a.

Rates, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001b.

Regnault-Roger, C.; Ribodeau, M.; Hamraoui, A.; Bateau, I.; Blancharda, P.; Gil-Munoz, M.I.; Barberan, F.T. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). **J. Stored Prod. Res.**, v. 40, p. 395–408, 2004.

Ren, W.; Qian, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Res. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 519–534, 2003.

Ricklefs, R.E. **A Economia da Natureza**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 470 p., 1993.

Ritter, M.R.; Sobierajski, G.R.; Schenkel, E.P.; Mentz, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, n. 2, p. 51-62, jul.-dez. 2002.

Rodrigues, R.M.M.S.; Martini, M.H.; Chiarini, P.F.T.; Prado, S.P.T. Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffim.), em flocos, comercializados no estado de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 25-30, 2005.

Rosa, A.O.; Rapoport, S. Intracellular- and extracellular-derived Ca<sup>2+</sup> influence phospholipase A2-mediated fatty acid release from brain phospholipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1791, p. 697–705, 2009.

Roth, S. H. NSAID gastropathy: A new understanding. **Arch. Intern. Med.**, v. 156, p. 1623-1628, 1996.

Ruetze, M.; Schmitt, U. Glykol-methacrylat (GMA) als Einbettungssystem in histologische Untersuchungen von Koniferen-Nadeln. **Eur. J. Path.**, v. 16, p. 321-324, 1986.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, S. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem.**, v. 91, p. 621–632, 2005.

Sahoo, N.; Manchikanti, P.; Dey, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, (IN PRESS), 2010.



- Santos, M.D.; Almeida, M.C.; Lopes, N.P.; Souza, G.E.P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.
- Sarikurkcü, C.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Harmandar, M. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 4239-4246, 2008.
- Satıl, F.; Ünal, M.; Hopa, E. Comparative morphological and anatomical studies of *Hymenocrater bituminosus* Fisch. & C.A. Mey. (Lamiaceae) in Turkey. **Turk. J. Bot.**, v. 31, p. 269-275, 2007.
- Scavone, O. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Coleus barbatus* Benth., Labiatae. **Rev. Fac. Farm. Bioquím.**, v. 3, p. 249-270, 1965.
- Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 91, p. 21-40, 2001.
- Scholz, E.; Rimpler, H. Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. In: Mariod et al. (2010) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seed cakes. **Food Chem.**, v. 118, p. 120-127, 1989.
- Schultz, A.R.H. **Introdução à botânica sistemática**. v. 2, 5ª ed. rev., Porto Alegre: Editora UFRGS, 1985.
- Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U.; Voll, M.; Wesker, K. **Atlas de Anatomia - Cabeça e Neuroanatomia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007.
- Sekiya, K.; Okuda, H. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 105, n. 3, p. 1090-1095, 1982.
- Sharma, S.; Stutzman, J.D.; Kelloff, G.J.; Steele, V.E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 5848-5855, 1994.
- Sharma, S.; Sangwan, N.S.; Sangwan, R.S. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. **Curr. Sci. India**, v. 84, n. 4, p. 544-550, feb. 2003
- Shen, Y.C.; Chiou, W.F.; Chou, Y.C.; Chen, C.F. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 465, p. 171-181, 2003.
- Shikov, A.N.; Pozharitskaya, O.N.; Makarov, V.G.; Makarova, M.N. Anti-inflammatory effect of *Pinus sibirica* oil extract in animal models. **J. Nat. Med.**, v. 62, p. 436-440, 2008.

Siciliano, T.; Bader, A.; Vassallo, A.; Braca, A.; Morelli, I.; Pizza, C.; DeTommasi, N. Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 33, p. 341–351, 2005.

Silveira, J.H. Uso da biodiversidade para produção de medicamentos. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 25 jun., 2003.

Silverstein, F.E.; Faich, G.; Goldstein, J.L. et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid Arthritis: The CLASS Study: A Randomized Controlled Trial. **JAMA**, v. 284, n. 10, p. 1247–1255, 2000.

Simões, C.M.O. [org.] et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1104 p., 2007.

Simões, C.M.O.; Spitzer, V. **Óleos Voláteis**. In: Simões, C.M.O. [org.] et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, p. 467-495, 2007.

Singh, G.; Triadafilopoulos, G. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. **J. Rheumatol.**, v. 56 (suppl), p. 18–24, 1999.

Slusarczyk, S.; Hajnos, M.; Skalicka-Wozniak, K.; Matkowski, A. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. **Food Chem.**, v. 113, p. 134–138, 2009.

Soares, M.L.; Rezende, M.H.; Ferreira, H.D.; Figueiredo, A.D.L.; Bustamante, K.G.L.; Bara, M.T.F.; Paula, J.R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 352-360, out./dez. 2005.

Sosa, S.; Altinier, G.; Politi, M.; Braca, A.; Morelli, I.; Della Loggia, R. Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 271–277, 2005.

Sousa, O.V.; Oliveira, M.S.; Cunha, R.O.; Costa, B.L.S.; Zancanella, C.R.; Leite, M.N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13 (supl. 1), p. 30-34, 2003.

Souza, V.C.; Lorenzi, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

Sossae, F.C. Anatomia e fitoquímica foliar de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu, 1995.

Spicer, B.A.; Baker, R.C.; Hatt, P.A.; Laycock, S.M.; Smith, H. The effects of drugs on sephadex-induced eosinophilia and lung hyper-responsiveness in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 821–828, 1990.

Subbaramaiah, K.; Chung, W.J.; Michaluart, P.; Telang, N.; Tanabe, T.; Inoue, H.; Jang, M.; Pezzuto, J.M.; Dannenberg, A.J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21875–21882, 1998.

Süleyman, H.; Demirezer, L.O.; Kuruüzüm, A.; Banoglu, Z.N.; Göçer, F.; Ozbans, G.; Gepdiremen, A. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L. roots. **J. Ethnopharmacol.**, v. 65, p. 141–148, 1999.

Süleyman, H.; Odabasoglu, F.; Aslan, A.; Cakir, A.; Karagoz, Y.; Gocer, F.; Halici, M.; Bayir, Y. Anti-inflammatory and antiulcerogenic effects of the aqueous extract of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. **Phytomedicine**, v. 10, p. 552–557, 2003.

Surh, Y.-J.; Chun, K.-S.; Cha, H.-H.; Han, S.S.; Keum, Y.-S.; Park, K.-K.; Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. **Mutat. Res.**, v. 480–481, p. 243–268, 2001.

Swingle, K.F.; Shideman, F.E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of Cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 183, p. 226–234, 1972.

Talhok, R.S.; Karam, C.; Fostok, S.; El-Jouni, W.; Barbour, E.K. Anti-Inflammatory bioactivities in plant extracts. **J. Med. Food**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2007.

Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem.**, v. 90, p. 333–340, 2005.

Toledo, M.G.T.; Alquini, Y.; Nakashima, T. Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 40, n. 4, p. 487-493, 2004.

Tribble, D. AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 99, n. 4, p. 591–595, 1999.

Trugilho, P.F.; Mori, F.A.; Lima, J.T.; Cardoso, D.P. Determinação do teor de taninos na casca de Eucalyptus spp. **Rev. Cerne**, v. 9, n. 2, p. 246-254, jul./dez. 2003.

Tseng, C.; Wolfe, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Med. Clin. N. Am.**, v. 84, n. 5, p. 1329-1344, 2000.

Tunón, H.; Olavsdotter, C.; Bohlin, L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 48, p. 61-76, 1995.

- Uslu, C.; Karasen, R.M.; Sahin, F.; Taysi, S.; Akcay, F. Effects of aqueous extracts of *Satureja hortensis* L. on rhinosinusitis treatment in rabbit. **J. Ethnopharmacol.**, v. 88, p. 225–228, 2003.
- Valant-Vetschera, K.M.; Roitman, J.N.; Wollenweber, E. Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 31, p. 1279–1289, 2003.
- Veiga-Júnior, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- Vogel, H.; Gonzalez, M.; Faini, F.; Razmilic, I.; Rodriguez, J.; San Martin, J.; Urbina, F. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-species known as bailahuén. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 97–100, 2005.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 320 p., 1984.
- Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals Part I. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97–107, 2009.
- Werker, E.; Ravid, U.; Putievsky, E. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. **Israel J. Bot.**, v. 34, p. 31-45, 1985.
- Werker, E.; Putiewsky, E.; Ravid, U.; Dudai, N.; Katzir, I. Glandular hairs and essential oil in developing of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Ann. Bot.**, v. 71, p. 43-50, 1993.
- Williams, C.A.; Harborne, J.B.; Geiger, H.; Hoult, J.R. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 417–423, 1999.
- Williamson, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 401–409, 2001.
- Wojdyło, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chem.**, v. 105, p. 940–949, 2007.
- Wu, Y.; Zhou, C.; Song, L.; Li, X.; Shi, S.; Mo, J.; Chen, H.; Bai, H.; Wu, X.; Zhao, J.; Zhang, R.; Hao, X.; Sun, H.; Zhao, Y. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, p. 243–250, 2006.
- Xiao, J.; Jiang, X.; Chen, X. Antibacterial, anti-inflammatory and diuretic effect of flavonoids from *Marchantia convoluta*. **Afr. J. Tradit. Complem.**, v. 2, p. 244–252, 2005.
- Xifreda, C.C.; Mallo, A.C. Las especies argentinas de *Glechon* (Lamiaceae, Mentheae). **Darwiniana**, v. 42, n. (1 - 4), p. 333 – 346, 2004.

Yang, F.; OZ, H.S.; Barve, S.; De Villiers, W.J.S.; McClain, C.J.; Varilek, G.W. The Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate blocks Nuclear Factor- $\kappa$ B activation by inhibiting I $\kappa$ BKinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, p. 528–533, 2001.

Yarnell, E.; Abascal, K. Herbs for treating herpes simplex infections. **Altern. Complem. Ther.**, p. 83-88, abr. 2005.

Yesilada, E.; Ustün, O.; Sezik, E.; Takaishi, Y.; Ono, Y.; Honda, G. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: Interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ . **J. Ethnopharmacol.**, v. 58, n. 1, p. 59-73, 1997.

Yoon, J.H.; Baek, S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Med. J.**, v. 46, n. 5, p. 585–596, 2005.

Yunes, A.R.; Pedrosa, R.C.; Filho, V.C. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 146-152, 2001.

Zand, R.S.R.; Jenkins, D.J.A.; Diamandis, E.P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **J. Chromatogr. B**, v. 777, p. 219–232, 2002.

Zaroni, M.; Pontarolo, R.; Abrahão, W.S.M.; Fávero, M.L.D; Correa Júnior, C.; Stremel, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 1, p. 29-39, 2004.

Zgórká, G.; Glowniak, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. **J. Pharm. Biomed.**, v. 26, p. 79–87, 2001.

Zheng, J.; Wu, L.-J.; Zheng, L.; Wu, B.; Song, A.-H. Two new monoterpenoid glycosides from *Mentha spicata*. **L. J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 5, p. 69–73, 2003.

Zheng, W.; Wang, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 5165–5170, 2001.

Zuccolotto, T.; Apel, M.; Rates, S.M.K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 25-31, 1999.

Zuin, V.G.; Yariwake, J.H.; Bicchi, C. Avaliação da qualidade de drogas vegetais a base de Passiflora spp. comercializadas no Brasil: presença de resíduos de pesticidas. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 6, n. 2, p. 60-66, 2004.