

**FLÁVIA LIPARINI PEREIRA**

**POTENCIAL DAS RAÍZES DE *Smilax*  
*brasiliensis* Spreng. (SMILACACEAE) e  
*Herreria salsaparilha* Mart. (AGAVACEAE) NO  
TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES  
METABÓLICAS, INDUZIDAS POR DIETA EM  
CAMUNDONGOS BALB/c**

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte – MG  
2013

**FLÁVIA LIPARINI PEREIRA**

**POTENCIAL DAS RAÍZES DE *Smilax*  
*brasiliensis* Spreng. (SMILACACEAE) e  
*Herreria salsaparilha* Mart. (AGAVACEAE) NO  
TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES  
METABÓLICAS, INDUZIDAS POR DIETA EM  
CAMUNDONGOS BALB/c**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Maria das Graças Lins Brandão

P436p  
Pereira, Flávia Liparini  
Potencial das raízes de *Smilax brasiliensis* Spreng. (Smilacaceae) e *Herreria salsaparilha* Mart. (Agavaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos balb/c/ Flávia Liparini Pereira. – 2013.  
95 f. : il.

Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. *Smilax brasiliensis* – Teses. 2. *Herreria salsaparilha* – Teses. 3. Salsaparrilhas – Teses. 4. Saponina – Teses. 5. Dislipidemia – Teses. I. Brandão, Maria das Graças Lins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

## FLÁVIA LIPARINI PEREIRA

“POTENCIAL DAS RAÍZES DE *Smilax brasiliensis* Spreng.  
(SMILACACEAE) e *Herreria salsaparrilha* Mart. (AGAVACEAE) NO  
TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS, INDUZIDAS POR  
DIETA EM CAMUNDONGOS BALB/c”

APROVADA EM 29 DE MAIO DE 2013

### COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. DENISE CARMONA CARA MACHADO

Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS LINS BRANDÃO  
Orientadora e Presidente da Comissão

Profa. Dra. RENATA ADRIANA LABANCA

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Maria das Graças Lins Brandão, agradeço pela orientação e ensinamentos, que me possibilitaram esse imenso crescimento profissional. Muito obrigada pela acolhida, que me oportunizou também um grande amadurecimento pessoal;

Aos meus pais, Vitória e Olinto, por todo cuidado, carinho e incentivo na busca de crescimento pessoal e científico;

Aos meus irmãos queridos, Olinto e Angelo, que eu tanto amo e respeito;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA), pela contribuição na minha formação científica;

Às companheiras e companheiros do Laboratório de Farmacognosia, Verena Oliveira, Gustavo Cosenza, Ricardo Viana, Rafael Palhares, Fernandas, Nayara, Rafaela e Marina, pelos auxílios e convivência durante a execução deste trabalho. Em especial ao Frederico Borba, que se tornou um grande amigo;

Ao Laboratório de Angiogênese, Depto. de Fisiologia e Biofísica (ICB – UFMG), por disponibilizar sua infraestrutura para realização dos ensaios biológicos. Em especial à Professora Paula Peixoto Campos e ao estudante Celso Tarso Rodrigues Viana;

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido para a elaboração e concretização deste trabalho;

Aos queridos Marcos Guião, Júlio Terra, Márcio e Devenil na grande ajuda com a coleta das plantas;

Ao Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG;

À bioterista Adelaide e ao funcionário Batista, pela disponibilidade e por facilitarem a lida com os animais;

Às funcionárias Marilene, Úrsula pela gentileza e presteza;

À Gabriela Costa, Ana Flávia Pimenta, Mariana Mirelle Natividade, Nathália Joaquim, Máisa Antunes, Carolina Zuconi, Ana Lígia Ceolin e Paola Leocádio, grandes colegas do mestrado que eu espero levar para a vida toda! Muito obrigada meninas pelo convívio alegre e reconfortante;

À todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1. Dislipidemia e doenças cardiovasculares.....	17
2.2. Substâncias naturais bioativas .....	19
2.2.1. Saponinas .....	22
2.2.1.1. Mecanismos envolvidos na atividade hipolipemiante das saponinas.....	24
2.2.1.2. Ocorrência e distribuição de saponinas.....	26
2.2.2. Substâncias fenólicas: flavonoides e ácidos fenólicos .....	27
2.3. Salsaparrilhas brasileiras: <i>Smilax brasiliensis</i> Spreng. e <i>Herreria salsaparilha</i> Mart. ....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1. Materiais.....	33
3.1.1. Equipamentos.....	33
3.1.2. Reagentes e solventes .....	34
3.1.3. Outros materiais .....	35
3.2. Métodos.....	36
3.2.1. Obtenção das plantas para o estudo: <i>Smilax brasiliensis</i> e <i>Herreria salsaparilha</i> .....	36
3.2.2. Preparação das raízes para o estudo.....	37
3.2.2.1. Secagem .....	37
3.2.2.2. Moagem .....	38
3.2.3. Índices de espuma .....	38
3.2.4. Preparação dos extratos brutos e suas frações .....	39
3.2.5. Determinação da eficiência da extração.....	41

3.2.6.	Determinação do perfil fitoquímico .....	41
3.2.6.1.	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	41
3.2.6.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	42
3.2.7.	Ensaio biológicos .....	43
3.2.7.1.	Animais.....	43
3.2.7.2.	Vermifugação .....	44
3.2.7.3.	Preparo da dieta HC e suplementação com EBS e EBH .....	44
3.2.7.4.	Esquema de tratamento .....	45
3.2.7.5.	Desenho experimental.....	47
3.2.7.6.	Eutanásia .....	48
3.2.7.7.	Obtenção do soro .....	48
3.2.8.	Análises bioquímicas e morfológicas.....	48
3.2.8.1.	Dosagens sorológicas .....	48
3.2.8.2.	Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal .....	49
3.2.8.2.1.	Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz .....	49
3.2.8.2.2.	Aquisição de imagem no microscópio e mensuração da área.....	49
3.2.8.3.	Análise do peso e morfologia do fígado .....	50
3.2.8.3.1.	Processamento do fígado para a microscopia de luz .....	50
3.2.8.3.2.	Aquisição de imagem no microscópio e avaliação do grau de lesões histológicas .....	50
3.2.9.	Análise estatística.....	51
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
4.1.	Perfil fitoquímico dos extratos e suas frações .....	52
4.1.1.	Índices de espuma .....	52
4.1.2.	Rendimento das extrações.....	52
4.1.3.	Caracterização química das raízes de <i>S. brasiliensis</i> e <i>H. salsaparilha</i> por CCD .....	54
4.1.4.	Perfis cromatográficos por CLAE dos extratos brutos de <i>S. brasiliensis</i> e <i>H. salsaparilha</i> .....	58
4.2.	Efeitos do EBS e do EBH no tratamento de alterações metabólicas induzidas por dieta HC em camundongos BALB/c .....	65

4.2.1.	Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e índice de adiposidade .....	65
4.2.2.	Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal .....	67
4.2.3.	Análise do peso e morfologia do fígado .....	67
4.2.4.	Parâmetros sorológicos.....	68
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	70
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79
8.	<b>ANEXOS</b> .....	91



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Condições de análise em CLAE de <i>S. brasiliensis</i> e <i>H. salsaparilha</i> .....	42
<b>Tabela 2:</b> Gradiente de fase móvel utilizado no sistema .....	43
<b>Tabela 3:</b> Distribuição de macronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta C e HC .....	45
<b>Tabela 4:</b> Grupos de animais em estudo e tipo de dieta consumida .....	46
<b>Tabela 5:</b> Rendimento do EBS e EBH .....	52
<b>Tabela 6:</b> Eficiência do processo de extração do EBS e EBH .....	53
<b>Tabela 7:</b> Rendimento do fracionamento a partir do EBS e EBH utilizando diferentes solventes de polaridade crescente .....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Biossíntese dos metabólitos secundários .....	20
<b>Figura 2:</b> Esqueleto básico das sapogeninas .....	23
<b>Figura 3:</b> Estrutura química de saponinas esteroidais comumente encontradas em espécies do gênero <i>Smilax</i> .....	27
<b>Figura 4:</b> Exemplos de estruturas químicas representativas dos flavonoides .....	28
<b>Figura 5:</b> Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico .....	29
<b>Figura 6:</b> <i>Smilax brasiliensis</i> Spreng. e <i>Herreria salsaparilha</i> Mart. ....	36
<b>Figura 7:</b> Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto e frações das raízes moídas de salsaparrilhas.....	40
<b>Figura 8:</b> Escala temporal do desenho experimental .....	47
<b>Figura 9:</b> Gráfico do percentual de resíduo seco ao longo dos dias de percolação da <i>S. brasiliensis</i> (azul) e <i>H. salsaparilha</i> (vermelho).....	53
<b>Figura 10:</b> CCD para identificação de flavonoides em <i>S. brasiliensis</i> .....	55
<b>Figura 11:</b> Estrutura química do ácido clorogênico identificado por CCD nas raízes de <i>S. brasiliensis</i> .....	55
<b>Figura 12:</b> CCD para identificação de flavonoides em <i>H. salsaparilha</i> .....	56
<b>Figura 13:</b> CCD para identificação de saponinas em <i>S. brasiliensis</i> .....	57
<b>Figura 14:</b> CCD para identificação de saponinas em <i>H. salsaparilha</i> .....	58
<b>Figura 15:</b> Perfil cromatográfico em CLAE do EB das raízes de <i>S. brasiliensis</i> .....	59
<b>Figura 16:</b> Perfil cromatográfico em CLAE do EB das raízes de <i>H. salsaparilha</i> .....	62
<b>Figura 17:</b> Ingestão alimentar, peso corporal e índice de adiposidade.....	66
<b>Figura 18:</b> Análise histológica do tecido adiposo epididimal .....	67
<b>Figura 19:</b> Peso do Fígado/Peso corporal (%).....	68
<b>Figura 20:</b> Colesterol total e glicose de jejum (mg/dL).....	69
<b>Figura 21:</b> Triglicérides (mg/dL).....	69

## LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	– Análise de variância
APG	– Angiosperm Phylogeny Group
AVC	– Doença cerebrovascular
C	– Dieta controle
CCD	– Cromatografia de camada delgada
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CT	– Colesterol total
DATAPLAMT	– Banco de dados e amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas da UFMG
DCV	– Doenças cardiovasculares
EB	– Extrato bruto
EBS	– Extrato bruto das raízes de <i>Smilax brasiliensis</i>
EBH	– Extrato bruto das raízes de <i>Herreria salsaparilha</i>
ELISA	– <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FABUTS	– Fração n-butanol das raízes de <i>S. brasiliensis</i>
FABUTH	– Fração n-butanol das raízes de <i>Herreria salsaparilha</i>
FACETS	– Fração acetato de etila das raízes de <i>Smilax brasiliensis</i>
FACETH	– Fração acetato de etila das raízes de <i>Herreria salsaparilha</i>
FAHEXS	– Fração hexano das raízes de <i>Smilax brasiliensis</i>
FAHEXH	– Fração hexano das raízes de <i>Herreria salsaparilha</i>
HC	– Dieta rica em carboidratos
HCSI	– Dieta rica em carboidratos adicionada de 100 mg/Kg de peso/dia do extrato bruto das raízes de <i>Smilax brasiliensis</i>
HCSII	– Dieta rica em carboidratos adicionada de 200 mg/Kg de peso/dia do extrato bruto das raízes de <i>Smilax brasiliensis</i>
HCHI	– Dieta rica em carboidratos adicionada de 100 mg/Kg de peso/dia do extrato bruto das raízes de <i>Herreria salsaparilha</i>
HCHII	– Dieta rica em carboidratos adicionada de 200 mg/Kg de peso/dia

do extrato bruto das raízes de *Herreria salsaparilha*

HDL-C	– Colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade
IDL	– Lipoproteínas de densidade intermediária
IE	– Índice de espuma
IPNI	– The International Plant Names Index
LDL-C	– Colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade
LH	– Lipase hepática
LPL	– Lipoproteína lipase
MOBOT	– Missouri Botanical Garden
NP	– Difenilboratoetilamina
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PEG	– Polietilenoglicol
pH	– Potencial hidrogeniônico
Rf	– Fator de retenção
RNAm	– Ácido ribonucleico mensageiro
TG	– Triglicérides
T <sub>R</sub>	– Tempo de retenção
UV	– Ultravioleta
VLDL	– Lipoproteínas de muito baixa densidade

## RESUMO

Espécies de plantas conhecidas como salsaparrilhas são muito usadas na medicina tradicional como plantas “depurativas do sangue”. O nome salsaparrilha é conferido à espécies de gêneros diferentes, principalmente *Smilax* e *Herreria*. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de duas espécies conhecidas como salsaparrilha, *Smilax brasiliensis* Spreng. e *Herreria salsaparilha* Mart., nos parâmetros bioquímicos em camundongos tratados com dieta rica em carboidratos (HC). Raízes das plantas foram coletadas, secas, moídas e submetidas à extração com solução hidroalcolica à 80° GL. Os extratos foram obtidos após evaporação completa do solvente. Os animais foram alimentados com dieta HC ou dieta controle (C) por 8 semanas. Após este período, a dieta HC foi suplementada durante quatro semanas com duas diferentes doses, 100 e 200 mg/Kg de peso/dia, do extrato bruto de cada planta. Essas plantas apresentaram substâncias fenólicas e saponinas, que possuem reconhecida capacidade de diminuir as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol e triglicérides. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior adiposidade, hipertrofia dos adipócitos e maiores concentrações plasmáticas de glicose, colesterol e triglicérides em relação aos animais alimentados com dieta controle. Nos animais que receberam os extratos brutos, observou-se menores concentrações de glicose, colesterol e triglicérides plasmáticos em relação ao grupo HC. Conclui-se que os extratos brutos das raízes de *S. brasiliensis* e de *H. salsaparilha* representam um potencial recurso terapêutico no tratamento e prevenção de dislipidemias, de forma dose-dependente. Sugere-se que os efeitos observados nesse estudo são devidos à presença de substâncias fenólicas e saponinas nas raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*.

**Palavras-chave:** *Smilax brasiliensis*; *Herreria salsaparilha*; salsaparrilhas; saponina; “depurativo”, dislipidemia

## ABSTRACT

The plant species commonly known as salsaparrilhas are widely used in traditional medicine as "blood depurative" plants. The name salsaparrilha is given to species of different genera, especially *Smilax* and *Herreria*. The aim of this work was to evaluate the effect of two species known as salsaparrilha, *Smilax brasiliensis* Spreng. and *Herreria salsaparilha* Mart., by means of biochemical parameters in mice fed an isocaloric-high carbohydrate (HC). Plant roots were collected, dried, ground and extracted with water-alcohol solution at 80° GL. The extracts tested were obtained after complete solvent evaporation. The animals were fed HC diet or control diet (C) for 8 weeks. After this period, the HC diet was supplemented during 4 weeks with two different doses, 100 and 200 mg/Kg weight/day by the crude extract of each plant. These plants showed phenolic compounds and saponins, which have the recognized ability to decrease plasma concentrations of glucose, cholesterol and triglycerides. The animals treated with the HC fed diet had higher adiposity, adipocyte hypertrophy and higher plasma concentrations of glucose, cholesterol and triglycerides than animals treated with the C fed diet. In animals treated with crude extracts, we observed lower concentrations of glucose, cholesterol and triglyceride compared to HC group. It is concluded that crude extracts from the roots of *S. brasiliensis* and *H. salsaparilha* have potential in the prevention and treatment of dyslipidemia in a dose-dependent manner. It is suggested that the effects observed in this study are due to the presence of phenolic substances and saponin in the roots of *S. brasiliensis* and *H. salsaparilha*.

**Key word:** *Smilax brasiliensis*; *Herreria salsaparilha*; salsaparrilhas; saponin; "depurative"; dyslipidemia

# 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se por ser um dos países de maior biodiversidade do planeta. É estimado que os ecossistemas brasileiros abriguem cerca de 20% de todas as espécies biológicas do mundo (MARQUES, 2000; BRASIL, 2010). No Estado de Minas Gerais estão presentes dois dos mais importantes biomas brasileiros: o Cerrado e a Floresta Atlântica. Ambos são caracterizados por serem *hotspots* da biodiversidade, devido ao alto grau de endemismo de várias espécies (MYERS *et al.* 2000). A Floresta Atlântica, que antes ocupava cerca de 12% do território brasileiro, ou seja, aproximadamente 1.000.000 km<sup>2</sup>, está atualmente com uma distribuição bastante fragmentada e reduzida a apenas 5% de sua área original (BORÉM & OLIVEIRA-FILHO, 2002). Infelizmente, a acelerada destruição dos ecossistemas nativos vem contribuindo para uma intensa erosão genética das plantas medicinais. Como consequência, verifica-se uma progressiva perda de conhecimento tradicional sobre as mesmas.

Muitas informações sobre o uso de plantas medicinais encontram-se registradas em bibliografia histórica, especialmente aquela produzida até a década de 1950. Após esta data, o Brasil sofreu intensas transformações, causadas pela industrialização, urbanização, e até a intensa substituição dos medicamentos preparados com as plantas por produtos sintéticos, que são produzidos por grandes empresas multinacionais.

Várias plantas nativas do Brasil eram tradicionalmente utilizadas para diversos fins, e avaliar o potencial das mesmas é de extrema importância científica e social. Entre as espécies de uso mais antigo estão aquelas consideradas como “depurativas do sangue”, por exemplo, as salsaparrilhas. Bibliografia produzida por botânicos e outros pesquisadores e estudiosos, entre elas COIMBRA (1942), BRAGA (1960), CRUZ (1965), BALBACH (1974), NEVES (1980), CRUZ (1982) e MORGAN (1982), mencionam a capacidade dessas plantas em “limpar o sangue”. Levantamentos mais recentes, junto a comunidades tradicionais revelaram que o uso de plantas de nome salsaparrilha permanece como um dos principais remédios tradicionais usados

como “depurativo” (MANGANELLI & TOMEI, 1999; GARLET, 2001; GHEDINI et al., 2002; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; NEGRELLE & FORNAZZARI, 2007; RODRIGUES & CARVALHO, 2007; LOPES, 2010; CORETTE-PASA, 2011). As espécies citadas com tal capacidade foram das Famílias Smilacaceae (*Smilax aspera* L., *S. brasiliensis* Spreng., *S. campestre* Griseb., *S. cissoides* Mart., *S. cognata* Kunth, *S. herreria*, *S. japicanga* Griseb., *S. laurifolia* L., *S. medica*, *S. obliquata* Duhamel, *S. officinalis* Griseb., *S. papyracea* Duhamel, *S. peruviana*, *S. sarsaparrilla* L., *S. syphilitica* Humb. & Bonpl. ex Willd.), Agavaceae (*Herreria salsaparrilla* Mart.) e Polygonaceae (*Muehlenbeckia sagittifolia* (Ortega) Meisn.). Todas essas plantas têm, em comum, o elevado teor de saponinas, substâncias com reconhecida capacidade hipolipemiante.

Estima-se, atualmente, que 40% dos adultos com idades superiores a 25 anos sofre de hipercolesterolemia (WHO, 2008). É de senso comum que maiores níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares (DCV). As DCV são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos, incluindo doenças coronárias (ataques cardíacos), doença cerebrovascular (AVC), pressão arterial elevada, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita e insuficiência cardíaca (WHO, 2011). Sua ocorrência é multifatorial, sendo a dislipidemia um dos cinco principais fatores de risco para as mesmas. As DCV são a principal causa de morte prematura e deficiência em todo o mundo. Novos produtos hipolipemiantes são desejáveis e necessários para a prevenção e tratamento desta patologia.

O presente estudo teve como objetivo geral, avaliar o efeito de duas espécies conhecidas como salsaparrilha, *Smilax brasiliensis* Spreng. e *Herreria salsaparrilha* Mart., nos parâmetros bioquímicos em camundongos tratados com dieta rica em carboidratos (HC). Os objetivos específicos foram:

- Traçar o perfil fitoquímico dos extratos brutos e frações obtidas do mesmo (hexânicas, acetato de etila e butanólicas) por meio de métodos cromatográficos (CCD e CLAE);
- Submeter os extratos brutos, em duas diferentes doses, a ensaios *in vivo*, para verificar a sua eficácia no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta rica em carboidrato;



- Avaliar se o tratamento com o extrato bruto das plantas interferem na (i) ingestão alimentar, (ii) no ganho de peso corporal, (iii) no índice de adiposidade (adiposidade epididimal, retroperitoneal, mesentérica), (iv) na morfologia dos adipócitos (área), (v) e na morfologia do fígado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Dislipidemia e doenças cardiovasculares

As dislipidemias consistem em modificações nos níveis séricos de lipídeos, caracterizando qualquer alteração envolvendo o metabolismo lipídico, sendo classificadas em primárias (origem genética) ou secundárias (causadas por doenças, estilos de vida, medicamentos, entre outros) (SANTOS et al., 1999).

De acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (2007), as dislipidemias consideram os valores do colesterol total (CT), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicérides (TG) e colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), compreendendo quatro tipos principais bem definidos:

- I- Hipercolesterolemia isolada: valores aumentados do CT e/ou do LDL-C.
- II- Hipertrigliceridemia isolada: valores aumentados dos TG, que reflete o aumento do volume de partículas ricas em TG como as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e quilomícrons.
- III- Hiperlipidemia mista: valores aumentados do CT e dos TG.
- IV- HDL-C baixo: diminuição isolada do HDL-C ou em associação com o aumento do LDL-C e/ou dos TG.

Diversos estudos experimentais, epidemiológicos, ensaios clínicos e meta-análises estabeleceram claramente a associação entre as dislipidemias e a incidência de doença cardíaca (SPOSITO et al., 2007; STEINHAGEN-THIESSEN et al., 2008). Concluiu-se que maiores níveis plasmáticos de colesterol total e / ou triglicérides, podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares.

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos, nas quais são incluídas doenças coronarianas (ataques cardíacos),

doença cerebrovascular (AVC), pressão arterial elevada, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita e insuficiência cardíaca (WHO, 2011). Essas doenças são a principal causa de morte prematura em todo o mundo: mais pessoas morrem anualmente de DCV do que qualquer outra causa, e isto também contribui substancialmente para o aumento dos custos com assistência médica (WHO, 2007; 2011). Todos os anos cerca de 17 milhões de pessoas morrem por DCV no mundo. Esses óbitos compreendem aproximadamente 29% de todas as mortes, e cerca de 80% ocorrem em países de baixa e média renda, muitas vezes em pessoas com menos de 60 anos de idade (NDINDJOCK et al., 2011).

A ocorrência de DCV é multifatorial e a dislipidemia é um dos cinco principais fatores de risco para essas doenças. Os outros fatores são: dieta pouco saudável e inatividade física (que juntos podem resultar em sobrepeso, obesidade e a própria dislipidemia), pressão arterial elevada (hipertensão), glicemia elevada (diabetes) e tabagismo (WHO, 2007). Estima-se que a hipercolesterolemia seja responsável por causar 18% das AVCs e 56% das doenças isquêmicas do coração no mundo (WHO, 2002).

Calcula-se que no mundo, aproximadamente 39% dos adultos com idades superiores a 25 anos apresentam concentrações elevadas de colesterol plasmático, e no Brasil esse índice chega a 44,2% (WHO, 2008). Em relação às concentrações plasmáticas de triglicérides, não existem dados exatos na literatura nacional e mundial sobre a sua prevalência. Isso provavelmente porque, os diversos estudos apresentam disparidades metodológicas, tanto com relação à origem dos dados, quanto com relação aos critérios de classificação do perfil lipídico, impossibilitando a exatidão dos resultados.

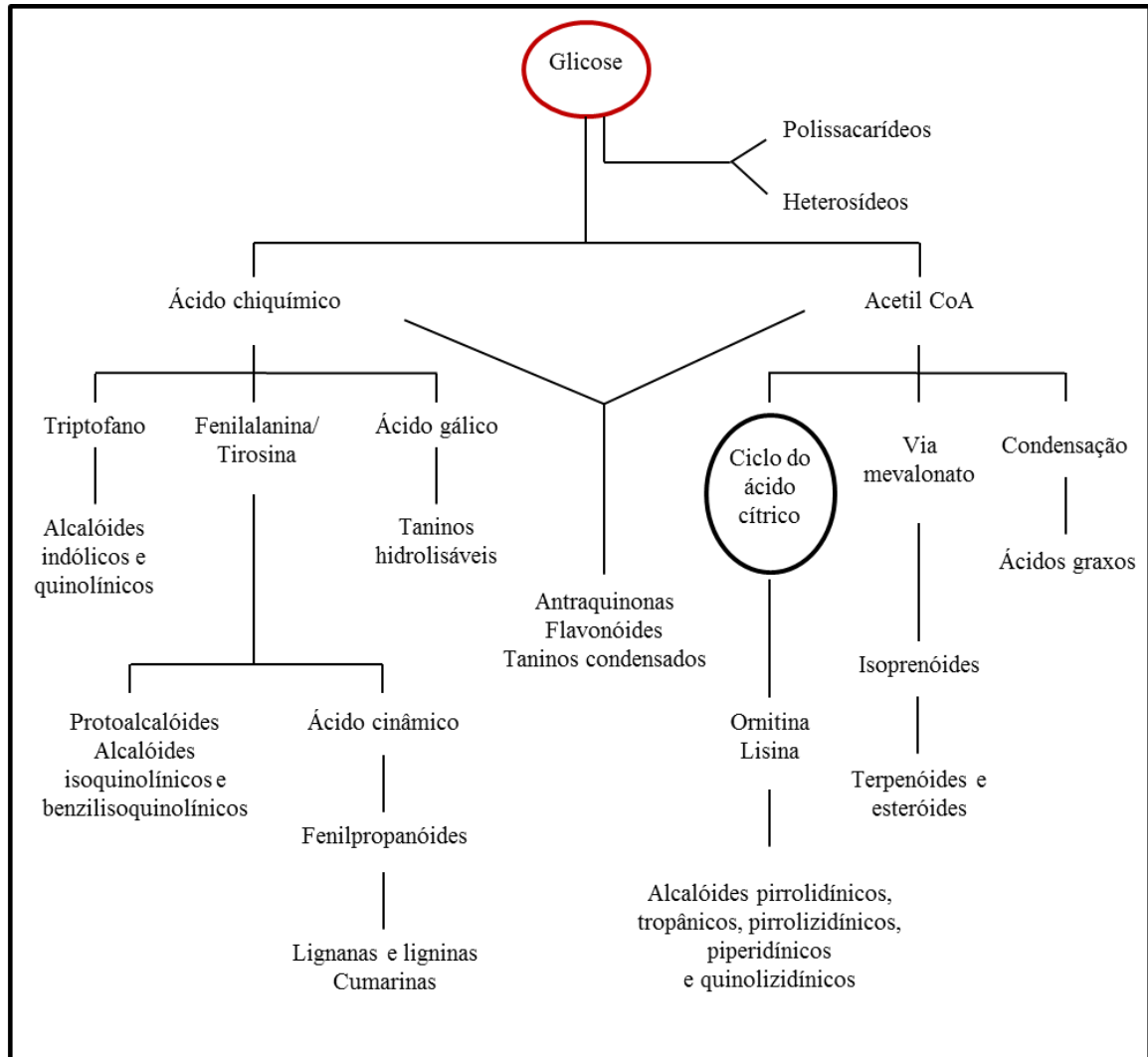
A redução no número de eventos de morbidade e mortalidade por DCV, através de fármacos redutores do colesterol plasmático, principalmente com estatinas, têm sido referida de forma positiva em inúmeros estudos (SHEPHERD et al., 1995; DOWNS et al., 1998; ALLHAT, 2002; HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2002; COLHOUN et al., 2004). No entanto, apesar de as substâncias desse grupo ainda serem consideradas as mais eficazes redutoras do colesterol total, esse medicamento requer alguns cuidados. A Cerivastatina, por exemplo, foi retirada do mercado em 2001, devido a um acentuado aumento no risco de

rabdomiólise, o que provoca a dor muscular e fraqueza, e por vezes falha renal e morte (MARCIANTE et al., 2011). Neste contexto, torna-se importante buscar novas alternativas de prevenção e tratamento, e as substâncias naturais bioativas, representam um rico potencial a ser explorado.

## **2.2. Substâncias naturais bioativas**

O conjunto de reações que continuamente ocorrem nas células vivas é denominado metabolismo. As diversas reações químicas, envolvidas na transformação de moléculas em unidades consideradas essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidas como metabolismo primário. Este engloba moléculas como os carboidratos, lipídios e proteínas. Vegetais e microorganismos apresentam um metabolismo diferenciado, capaz de produzir substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. A todo esse conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário e, esses garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação das espécies (ZANON, 2006).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em quatro classes principais: os terpenos (carotenoides, esteroides, triterpenos livres e óleos essenciais), as substâncias fenólicas (flavonoides, lignina, ácidos orgânicos e taninos), as substâncias glicosídicas (saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e os alcaloides (GARCÍA & CARRIL, 2009; SIMÕES et al., 2002). Muitas vezes podem ser estabelecidas associações entre a estrutura química e os efeitos biológicos. Os metabólitos secundários tem sua origem a partir do metabolismo da glicose, por meio de dois principais intermediários, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1).



**Figura 1: Biossíntese dos metabólitos secundários.** Fonte: SIMÕES et al., 2002

As substâncias naturais bioativas são, na maior parte, provenientes do metabolismo secundário. Atualmente, cerca de metade das substâncias úteis em medicina são derivadas de fontes naturais (VLIETINCK & APERS, 2001). Essas substâncias estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos e podem também desempenhar diversas ações em benefício da saúde humana (BASTOS et al., 2009; XIA & WENG, 2010).

De acordo com a Legislação brasileira, propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo (BRASIL, 1999). Os alimentos funcionais, de maneira simplificada, são aqueles que além da

função básica de nutrição, oportunizam algum benefício para a saúde (BLADES, 2000). Para a alegação de um alimento como funcional, é necessário provar o efeito benéfico produzido, por meio de estudos científicos, como ensaios clínicos, evidências epidemiológicas, estudos com modelos animais e esclarecimentos sobre o mecanismo de ação da substância bioativa (SARKAR, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que a ingestão de alimentos, ricos em substâncias naturais bioativas, é capaz de reduzir o risco do desenvolvimento de DCV, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (CANDIDO & CAMPOS, 2005).

Outra forma de uso das substâncias bioativas é por meio dos produtos denominados nutracêuticos, um termo que combina as palavras “nutrição” e “farmacêutico”. Trata-se de um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Tais produtos podem abranger desde nutrientes isolados, até suplementos dietéticos na forma de cápsula, pó ou outra apresentação não associada ao alimento (HUNGENHOLTZ & SMID, 2002; TAPAS et al., 2008; PINTO et al., 2012).

É importante considerar que, independente dos conceitos, os efeitos benéficos para a saúde, relacionados ao consumo de plantas, na forma de alimentos funcionais ou nutracêuticos, estão associados ao conteúdo das substâncias naturais bioativas presentes nos mesmos.

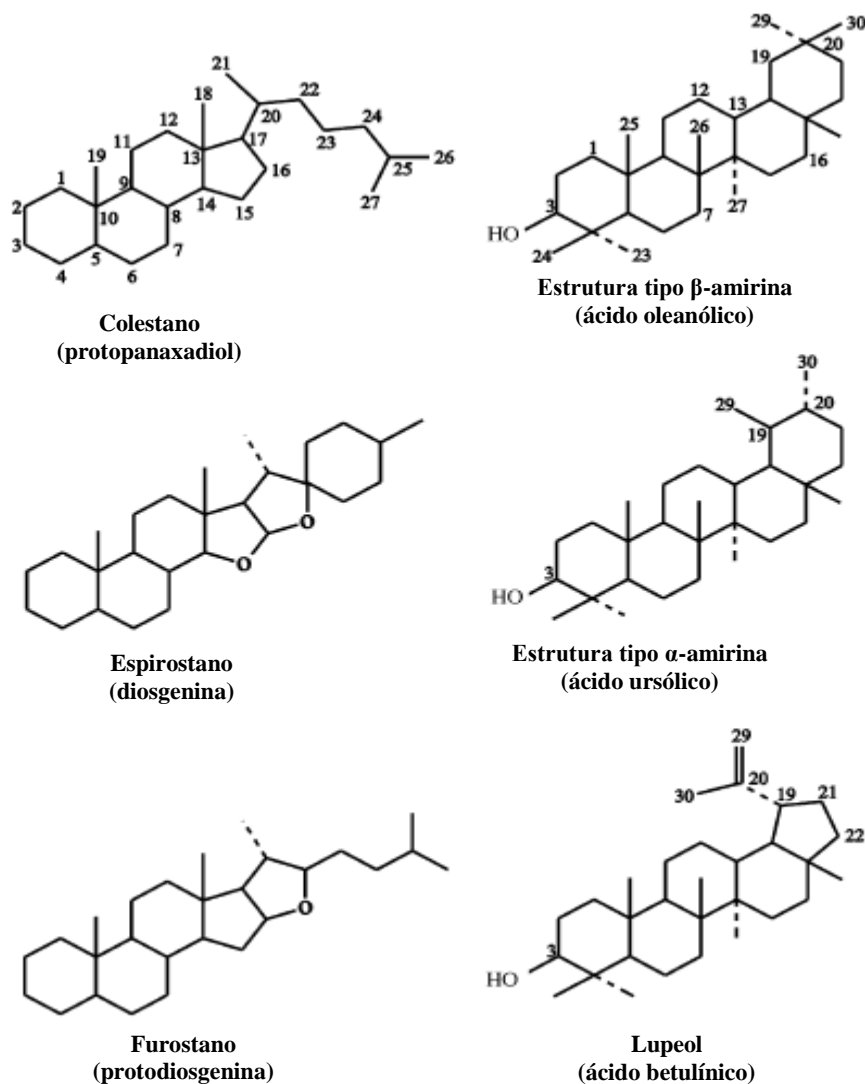
Entre as substâncias naturais bioativas, as saponinas e substâncias fenólicas se destacam no tratamento e prevenção das dislipidemias e DCV. Diversos autores relatam a capacidade das saponinas em reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol (CHEEKE, 1971; SIDHU & OAKENFULL, 1986; GEE & JOHNSON, 1988; HARWOOD et al., 1993; SAVAGE, 1993; MILGATE & ROBERTS, 1995; MATSUURA, 2001; OAKENFULL, 2001; SHIGEMATSU et al., 2001a/2001b; FRANCIS et al., 2002; SCHENKEL et al., 2002; SPARG et al., 2004; LI et al., 2008; SUN et al., 2009; AFROSE et al., 2010; EU et al., 2010; SANTOS et al., 2012; WANG et al., 2012). As saponinas possuem também potencial efeito redutor das concentrações plasmáticas dos triglicérides (SHIGEMATSU et al., 2001a/2001b; EBAID et al., 2006; HAN et al., 2006; LI et al., 2008; AFROSE et al., 2010; EU et al., 2010, UEMURA et al., 2011, SANTOS et al., 2012, WANG et al., 2012). O potencial

das substâncias fenólicas na redução do risco de hiperlipidemias e desenvolvimento de DCV também é descrito na literatura (KRIS-ETHERTON et al., 2002; AVIRAM, 2004; CHEN & LI, 2007; TAPAS et al., 2008; MLADĚNKA et al., 2010).

### **2.2.1. Saponinas**

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, tipo de estrutura que possui característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e hidrofílica (açúcares). Estas características, que levam a uma ação tensoativa, determinam algumas de suas propriedades físico-químicas e farmacológicas (SCHENKEL et al., 2002). Sua massa molecular pode variar entre 600 e 2000 Da, aproximadamente (OLESZEK, 2002; SCHENKEL et al., 2002). Em solução aquosa, as saponinas formam espuma persistente e abundante. Essa propriedade é a mais importante característica deste grupo de substâncias, da qual deriva o seu nome (do latim *sapone* = sabão). Outras propriedades geralmente atribuídas a elas, mas não necessariamente compartilhadas por todos os membros do grupo, é a elevada solubilidade em água, sabor amargo, capacidade de promover desorganização das membranas das células sanguíneas (ação hemolítica), e complexação com esteróides, razão pela qual freqüentemente apresentam ação hipocolesterolêmica (SAVAGE, 1993; SCHENKEL et al., 2002). Do ponto de vista biológico, algumas dessas propriedades são benéficas, enquanto outras são consideradas adversas.

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou ainda pelo seu caráter ácido, básico ou neutro (SCHENKEL et al., 2002). Com relação ao núcleo fundamental da aglicona (sapogenina), denominam-se saponinas triterpênicas e saponinas esteroidais (SCHENKEL et al., 2002; OLESZEK & BIALY, 2006) (Figura 2).



**Figura 2: Esqueleto básico das saponinas** – esteroidal (coluna da esquerda) e triterpênica (coluna da direita). Fonte: OLESZEK & BIALY (2006).

Além da classificação relacionada ao núcleo fundamental, esteróide ou triterpênico, as saponinas podem ainda ser subdivididas quanto ao número de cadeias de açúcares ligados à sapogenina. Aquelas que apresentam apenas uma cadeia de açúcar ligada à sapogenina são denominadas monodesmósídicas. Quando apresentam duas ou três cadeias de açúcares, ligadas a pontos diferentes da aglicona, são classificadas como bidesmósídicas ou tridesmósídicas, respectivamente (SCHENKEL et al., 2002; DINIZ, 2006; OLESZEK & BIALY, 2006; PEIXOTO, 2009). Assim, o número de constituintes e diferentes possibilidades de ligação e composição da cadeia de açúcares, faz com que ocorra uma grande diversidade natural das estruturas de saponinas. Dentro de uma mesma espécie de



planta podem ocorrer saponinas com diferentes estruturas. Este fato, associado àqueles de que as saponinas geralmente ocorrem em plantas como uma mistura de formas estruturalmente relacionadas, com polaridades muito semelhantes, seu isolamento e sua elucidação estrutural são um grande desafio (OLESZEK & BIALY, 2006).

Com relação à análise de saponinas, o principal problema consiste na sua detecção já que a maior parte delas não possuem grupos cromóforos necessários para a detecção UV. Com isto, a separação dos glicosídeos intactos ou as suas agliconas são detectadas apenas nos mais baixos comprimentos de onda UV, entre 200 e 210 nm. A detecção a comprimentos de onda mais baixos, no entanto, limita a seleção de solventes e gradientes que podem ser utilizados, sendo o gradiente de acetonitrila e água a melhor opção. Esses sistemas gradientes comprometem a linha-base, criando um problema adicional com o estudo de saponinas (OLESZEK, 2002; OLESZEK & BIALY, 2006). Apesar das limitações apresentadas, a CLAE continua sendo uma boa opção para análise desses metabólitos secundários.

#### **2.2.1.1. Mecanismos envolvidos na atividade hipolipemiante das saponinas**

Dois mecanismos de ação hipolipemiante são muito difundidos na literatura (CHEEKE, 1971; SIDHU & OAKENFULL, 1986; GEE & JOHNSON, 1988; MILGATE & ROBERTS, 1995; MATSUURA, 2001; OAKENFULL, 2001; FRANCIS et al., 2002; SCHENKEL et al., 2002; AFROSE et al., 2009):

- ✓ As saponinas mantêm-se dentro do trato gastrointestinal, sendo que algumas, com características estruturais particularmente definidas, interagem com o colesterol produzindo um complexo insolúvel. Quando este processo ocorre, há a inibição da absorção intestinal do colesterol, tanto endógeno quanto exógeno;
- ✓ As saponinas parecem afetar o metabolismo do colesterol indiretamente, através da interação com ácidos biliares, formando micelas. Esta suposição decorre

do fato de que um aumento da excreção fecal de ácidos biliares foi observado em resposta à alimentação com alguns tipos de saponinas. Estas micelas podem ter pesos moleculares muito maiores, e a reabsorção de ácidos biliares, no íleo terminal, é obstruída de forma eficaz.

Um terceiro mecanismo para a redução do colesterol foi apresentado por outros autores (GEE & JOHNSON, 1988; HARWOOD et al., 1993; MILGATE & ROBERTS, 1995). Esses autores acreditam que um aumento na taxa de esfoliação de células intestinais, causadas pela ação membranolítica de saponinas, pode resultar em aumento da perda de colesterol da membrana celular contida nas células esfoliadas.

Alguns mecanismos de ação de algumas sapogeninas e saponinas foram estudados de forma mais específica. A diosgenina, por exemplo, sapogenina esteroidal presente em grande quantidade na espécie *Trigonella foenum-graecum*, foi capaz de melhorar a dislipidemia observada em camundongos obesos, por suprimir a expressão de RNAm de genes lipogênicos no fígado. Este quadro inibiu a acumulação de lipídios nas células hepáticas (UEMURA et al., 2011). Esta mesma substância também promoveu a atividade das enzimas lipase hepática (LH) e da lipoproteína lipase (LPL) em tecidos hepáticos, de forma dose-dependente (GONG et al., 2010). Esses últimos autores sugerem que a diosgenina, por um lado, acelera o metabolismo lipídico através do aumento da atividade da LH e LPL e, por outro, reduz a absorção de colesterol, levando a um efeito hipolipemiante.

A saponina triterpênica, ácido glicirrízico, presente nas raízes do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) é uma potencial substância na melhora da dislipidemia (EU et al., 2010). Esta substância induz seletivamente a expressão da enzima LPL em tecidos não-hepáticos. Essa enzima tem a função de hidrolisar triacilgliceróis encontradas nas partículas de lipoproteínas, promovendo o armazenamento de ácidos graxos nos tecidos subjacentes.

HAN et al. (2006) sugere que a ação anti-dislipidêmica do extrato do fruto de *Kochia scoparia* (L.) Schard. (Chenopodiaceae), rico em saponinas, podem ser parcialmente mediados pelo atraso da absorção intestinal de gordura que ocorre com a inibição da atividade da lipase pancreática, observados *in vitro* no mesmo experimento.

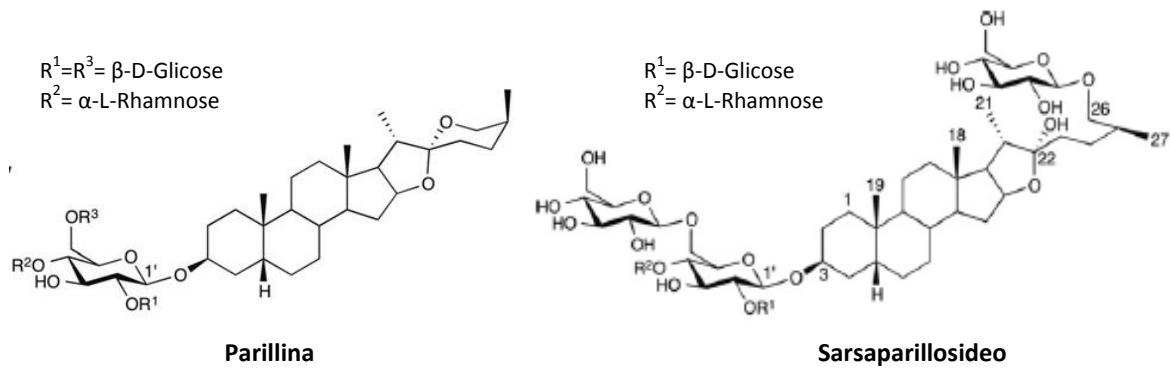
Os resultados das diferentes pesquisas revelam que existem diversos mecanismos de ação para a atividade hipolipidêmica das saponinas descritas na literatura, e isto pode ser devido às diferentes possibilidades estruturais dessas substâncias.

#### **2.2.1.2. Ocorrência e distribuição de saponinas**

As saponinas estão amplamente distribuídas em diversas espécies vegetais e alguns organismos marinhos (MILGATE & ROBERTS, 1995; FRANCIS *et al.*, 2002; OLESZEK & BIALY, 2006). Nas plantas, as saponinas funcionam, principalmente, como substâncias de defesa contra microorganismos, protegendo-as também contra fungos, insetos e moluscos (WONG, 2007; SPARG *et al.*, 2004).

As saponinas esteroidais são encontradas quase que exclusivamente em Angiospermas monocotiledôneas, principalmente nas famílias Liliaceae, Dioscoreaceae e Agavaceae. Os gêneros *Smilax*, *Dioscorea*, *Agave* e *Yucca* são especialmente ricos nessas substâncias (SCHENKEL *et al.*, 2002; SPARG *et al.* 2004). É importante salientar que o gênero *Smilax* (família Smilacaceae) era anteriormente agrupado na família Liliaceae. Já as saponinas triterpênicas, que são as mais comuns, ocorrem principalmente nas Angiospermas dicotiledôneas (SPARG *et al.*, 2004).

Estudos com espécies do gênero *Smilax* relatam a presença de uma grande quantidade de saponinas esteroidais, possíveis responsáveis pelas atividades biológicas propostas por essas espécies. As saponinas esteroidais mais comumente encontradas nessas espécies foram a parillina e sarsaparillosideo (Figura 3) (BERNARDO *et al.*, 1996; WAGNER & BLADT, 1996; BELHOUCHE *et al.*, 2008; CHALLINOR *et al.*, 2012).

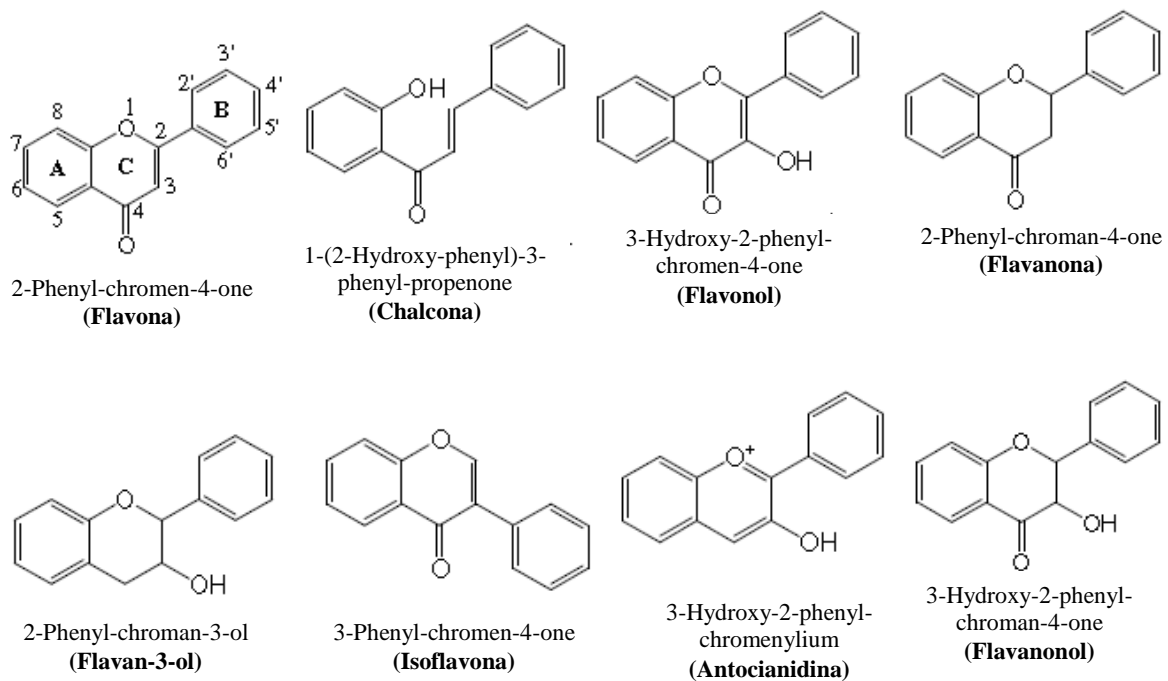


**Figura 3: Estrutura química de saponinas esteroidais comumente encontradas em espécies do gênero *Smilax*.** (Fonte: CHALLINOR et al., 2012)

## 2.2.2. Substâncias fenólicas: flavonoides e ácidos fenólicos

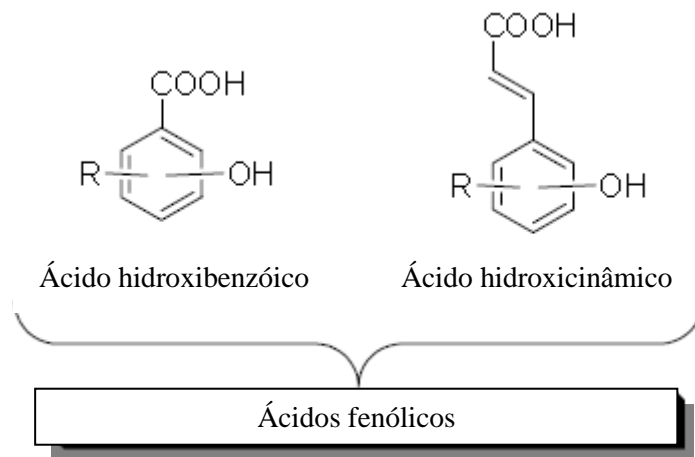
As substâncias fenólicas, comumente chamadas de polifenóis, constituem um dos grupos de substâncias bioativas mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal. As mais importantes, encontrados nos vegetais, são os flavonoides e ácidos fenólicos (BRAVO, 1998; ZUANAZZI, 2002).

Os flavonoides possuem diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental e dois anéis aromáticos (A e B), unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico C (Figura 4) (BRAVO, 1998; ZUANAZZI, 2002; TAPAS et al., 2008)



**Figura 4: Exemplos de estruturas químicas representativas dos flavonoides.** Fonte: TAPAS et al., 2008.

Os ácidos fenólicos se caracterizam por terem um grupo carboxila ligado ao anel benzênico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas em função da sua estrutura: derivados do ácido benzóico e os derivados de ácido cinâmico (Figura 5) (ROBBINS, 2003; KHADEM & MARLES, 2010).



**Figura 5:** Ácidos fenólicos derivados do ácido ácido benzóico e do ácido cinâmico. Fonte: KHADEM & MARLES, 2010

A estrutura dos ácidos fenólicos, assim como a dos flavonoides, confere propriedades antioxidantes. Essas propriedades são úteis, tanto para a conservação dos alimentos, quanto para saúde. Essas substâncias são indicadas para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, câncer entre outras doenças (SOARES, 2002; ROBBINS, 2003; KHADEM & MARLES, 2010).

Diversas ações biológicas têm sido atribuídas aos flavonoides, como, atividade antioxidante, antiinflamatória, antialérgica, anticancerígena, hepatoprotetora e ainda efeitos positivos sobre o sistema cardiovascular (BRAVO, 1998; ZUANAZZI, 2002 KRIS-ETHERTON et al., 2002; AVIRAM, 2004; CHEN & LI, 2007; TAPAS et al., 2008; MLADĚNKA et al., 2010).

Os flavonoides são os antioxidantes mais abundantes encontrados na alimentação humana. Mais de 4.000 diferentes flavonoides já foram identificados nos alimentos, sendo as maçãs, cebolas, amoras, mirtilos, chocolates, frutas vermelhas, frutas cítricas, nozes e bebidas, como chá, cerveja e vinho, suas principais fontes alimentares (BRAVO, 1998; MLADĚNKA et al., 2010).

### **2.3. Salsaparrilhas brasileiras: *Smilax brasiliensis* Spreng. e *Herreria salsaparilha* Mart.**

Salsaparrilha é o nome originalmente atribuído às espécies de gênero *Smilax*, plantas nativas das Américas. As espécies de *Smilax* são ainda conhecidas no Brasil sob os nomes japecanga, japecanguinha, japecanga-verdadeira, japecanga-mineira, japicanga, jupicanga, inhapecanga, inhapicanga, nhupicanga, salsaparrilha-de-minas, salsaparrilha-dasboticas, sarza, zarza, salsa-americana, salsa-de-espinho, salsa-do-campo, legação e dente-de-cachorro (MEDEIROS et al., 2007; LORENZI & MATOS, 2008).

O gênero *Smilax* tem aproximadamente 300 espécies, e se distribui por todo o continente Americano nas regiões temperadas, subtropicais e, principalmente, nas regiões tropicais. Ele integra o grupo das monocotiledôneas, na Ordem Liliales e família Smilacaceae (ANDREATA, 1997; ANDREATA, 2009; JUDD et al., 2009; ANDREATA, 2010; SILVA, 2010). No Brasil, as principais espécies desse gênero usadas na medicina popular são: *Smilax brasiliensis* Spreng., *S. campestris* Griseb. e *S. fluminensis* Steud. (LORENZI & MATOS, 2008).

A importância medicinal das espécies desse gênero é reconhecida desde o início da colonização do continente pelos europeus. Durante séculos, a principal fonte de renda na região amazônica era a extração de produtos nativos conhecidos como “drogas do sertão”, dentre eles o cacau (*Theobroma cacao*), o Urucum (*Bixa orellana* L.), a canela (*Cinnamomum* spp.), e as salsaparrilhas (*Smilax* spp.). O naturalista alemão que percorreu o Brasil no século XIX, Von Martius, forneceu descrições detalhadas sobre o uso de duas espécies de salsaparrilha *Smilax longifolia* Rich. e *S. syphilitica* Humb. & Bonpl. ex Willd. pelos brasileiros. As raízes dessas plantas tinham grande valor comercial, devido ao seu uso como diuréticos e para o tratamento de doenças venéreas (BREITBACH et al., 2013).

Alguns estudos foram realizados buscando avaliar o possível efeito “depurativo do sangue” de espécies de *Smilax* nativas do Brasil. Um dos primeiros foi realizado por PARIS et al. (1952), que avaliou o potencial de *S. ornata* Lem. e *S. japicanga* Griseb no tratamento da hanseníase. Esse estudo confirmou o efeito anti-hanseníaco da espécie brasileira *S. japicanga*.

DEBENEDETTI et al. (2000) estudou o efeito diurético do extrato aquoso de três plantas, *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. Ex Hicken, *Bauhinia candicans* Benth. e a espécie nativa *Smilax campestris* Griseb. As raízes de *S. campestris* não demonstraram experimentalmente o efeito diurético. FERREIRA et al. (1999) observou que o extrato aquoso dessa mesma planta, em doses elevadas, pode causar um aumento em longo prazo na mutagenicidade espontânea, o que requer maiores cuidados quanto ao seu uso indiscriminado na medicina popular. O grupo de substâncias químicas encontrados nas espécies de *S. campestris* são flavonóides, saponinas e esteróis (ALICE et al., 1991).

O perfil químico de algumas espécies de *Smilax* nativas do Brasil foi determinado no estudo de MARTINS (2009), que avaliou as espécies *S. brasiliensis*, *S. cissoides* e *S. polyantha*. Foi demonstrado que elas são constituídas por uma mistura complexa de substâncias fenólicas, flavonóides e saponinas. Os extratos metanólicos da raiz, rizóforos e folhas das espécies *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. fluminensis*, *S. polyantha* e *S. syphilitica* foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e revelaram a presença de diversas substâncias. No entanto, somente os picos correspondentes ao ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico foram identificados (MARTINS, 2009; SILVA, 2010; SOARES, 2010).

A outra espécie conhecida como salsaparrilha no Brasil é do gênero *Herreria*. O gênero *Herreria* tem aproximadamente 18 espécies que se distribuem pela América do Sul e Madagascar. Esse gênero pertence ao grupo das monocotiledôneas, na Ordem Asparagales (IPNI, 2011; MOBOT, 2011). De acordo com o APG II (Angiosperm Phylogeny Group II), esse gênero pertence à família Agavaceae. Recentemente, a família Agavaceae foi incluída na família Asparagaceae Juss. (1789), segundo o APG III.

Dentre as espécies do gênero *Herreria* Ruiz & Pav., existem no Brasil oito nativas, sendo cinco delas endêmicas: *H. cipoana* Ravenna, *H. grandiflora* Griseb., *H. interrupta* Griseb., *H. latifolia* Woodson e *H. salsaparilha* Mart.. Essas plantas estão distribuídas, principalmente, nos domínios de Floresta Atlântica e Cerrado (LOPES & PIRANI, 2010). Não existem, na literatura científica, estudos da espécie *H. salsaparilha* com relação às suas atividades farmacológicas e perfil químico.



Informações contidas em livros populares sobre plantas medicinais são a maior fonte de dados disponíveis.

Diante da escassez de informações sobre as espécies nativas de salsaparrilhas, e a necessidade de avaliar o seu potencial como “depurativa do sangue”, no presente estudo foram estudadas as alterações bioquímicas causadas por extratos de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* em camundongos BALB/c tratados com dieta HC.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Equipamentos

- Aparelho de GPS (Etrex)
- Balança analítica (Shimadzu, AY220)
- Banho maria (Fisatom, 550)
- Bomba de vácuo (Tecnal, TE0581)
- Câmera digital (Sony DSC-W550)
- Centrífuga refrigerada (Hermle, Z323K)
- Cromatógrafo líquido (Shimadzu), com injetor automático e detector Dioden Array
- Espectrofotômetro Leitor de ELISA (Bio-tek Instruments, EL800)
- Estufa para secagem de plantas (Sociedade Fabbe)
- Freezer (Electrolux, FE26)
- Geladeira
- Homogeneizador (Omni Internacional, TH)
- Microcâmera (JVC, TK-1270/RGB)
- Microscópio ótico (Olympus, B201)
- Moinho de facas (Tecnal, TE-625)
- Rotavapor (Fisatom, 802)
- Sistema de purificação de água (MILLI-Q, Plus)
- Vórtex (Phoenix, AP56)

### 3.1.2. Reagentes e solventes

- Acetato de etila
- Acetonitrila (Merck)
- Ácido acético glacial
- Ácido fórmico
- Ácido sulfúrico (Synth)
- Álcool etílico (Synth)
- Anisaldeído sulfúrico
- Cloreto de sódio
- Cloridrato de xilazina (Syntec)
- Clorofórmio
- Diclorometano
- Dietilamina
- Difetilboratoetilamina
- EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- Fluoreto de fenilmetilsufonila
- Formaldeído
- Hexano
- Hidróxido de alumínio (Teuto)
- Metanol
- n-butanol (Synth)
- PBS (solução salina tamponada com fosfato)
- Polietilenoglicol

### 3.1.3. Outros materiais

- Açúcar refinado (União)
- Alcoômetro (Alla France)
- Coluna para CLAE Phenomenex Kinetex, C18 (250 mm x 4,6 mm) 3 µm
- Corantes hematoxilina e eosina
- Ivermectina (Bayer®)
- Kits enzimáticos (Katal®)
- Leite condensado (Moça®)
- Membrana filtrante (Milipore)
- Parafina histológica (Synth)
- Pipeta automática multicanal e de volume variável (HTL, Multimate)
- Placas de alumínio coberta com sílica gel
- Placas de poliestireno (Nunc)
- Quetamina (Vetaset)
- Ração Labina®
- Solução de Türk

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Obtenção das plantas para o estudo: *Smilax brasiliensis* e *Herreria salsaparilha*

Amostras férteis foram coletadas e herborizadas conforme metodologias usuais (BRIDSON & FORMAN, 1999) para identificação taxonômica. Raízes de *S. brasiliensis* Spreng. (Figura 6a) foram coletadas no município Ribeirão das Neves, Minas Gerais, na localização geográfica 19°48'28,8"S 044°06'12,4"W, em 24 de fevereiro de 2012. Já as raízes de *H. salsaparilha* Mart. (Figura 6b) foram coletadas em São Gonçalo do Rio das Pedras, no município do Serro, Minas Gerais, na localização geográfica 18°25'51,1"S 043°27'51,3"W, em 15 de março de 2012. As identificações taxonômicas das espécies foram realizadas pelo botânico Felipe Zamborlini Saiter e as identificações genéticas pelo doutorando em Genética da UFMG, Rafael Melo Palhares.

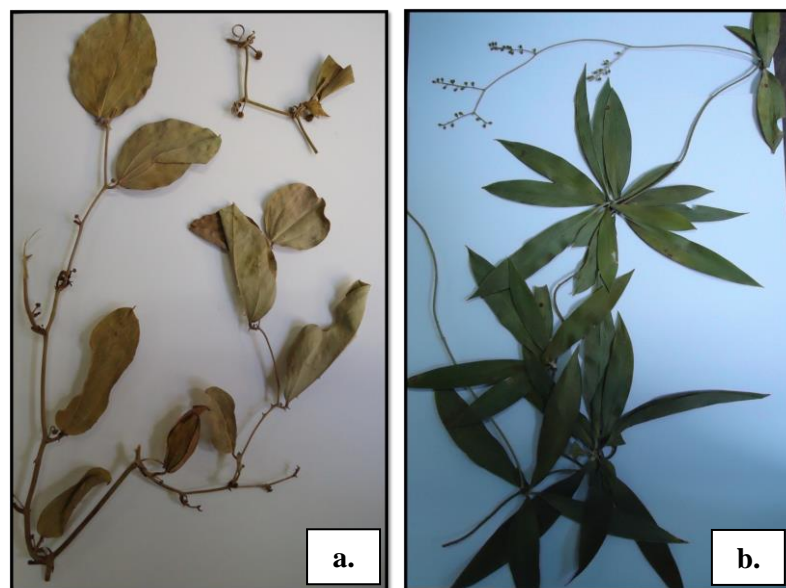


Figura 6a. *Smilax brasiliensis* Spreng. e b. *Herreria salsaparilha* Mart.

De acordo com a Instrução Normativa nº 154 (BRASIL, 2007), a coleta e transporte de material botânico para fins científicos, quando estas não são realizadas dentro de unidade de conservação federal ou não envolvem espécies ameaçadas, prescindem de autorização (ou licença). Todavia, foi realizado o registro voluntário, proposto pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), antes da coleta e transporte dos materiais (ANEXO I). Autorização para o estudo químico e avaliação das atividades biológicas das plantas foi concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (ANEXO II).

As espécies coletadas possuem exsiccatas depositadas no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG) sob os registros BHCB 156639 para *S. brasiliensis* e BHCB 156640 para *H. salsaparilha*. As drogas vegetais estão depositadas no DATAPLAMT sob o número DAT-161 para *S. brasiliensis* e DAT-240 para *H. salsaparilha*.

### **3.2.2. Preparação das raízes para estudo**

#### **3.2.2.1. Secagem**

As amostras de raízes de *S. brasiliensis* foram secadas em estufa a 35°C, entre os dias 24 e 29 de fevereiro de 2012. Já as amostras de raízes de *H. brasiliensis* foram secadas a 35°C, entre os dias 16 e 30 de março de 2012. Após a secagem, foram obtidos 906,22 g das raízes secas de *S. brasiliensis* e 353,15 g das raízes secas de *H. brasiliensis*.

### 3.2.2.2. Moagem

Após secagem, os materiais foram pulverizados em moinhos de facas, até a granulometria de 14 mesh. As amostras secas e moídas de cada espécie foram armazenadas em frascos de vidro, em temperatura de -1°C, para posterior extração.

### 3.2.3. Índices de espuma

Para confirmar a presença de saponinas nas raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparrilha*, foi realizado o teste para a determinação dos índices de espuma (IE). Utilizou-se a metodologia da Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Um grama das raízes das plantas reduzidas a pó fino (malha de 180 µm) foi transferido para um erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. Manteve-se sob fervura moderada durante 30 minutos. Resfriou-se e filtrou-se em papel de filtro, para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume, através do filtro, até 100 mL. Em seguida, o decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, ajustando o volume do líquido em cada tubo a 10 mL com água. Tampou-se os tubos e agitou-se com movimentos vigorosos, por 15 segundos, com duas agitações por segundo. Deixou-se em repouso por 15 minutos e mediu-se a altura da espuma.

Quando, em qualquer um dos tubos, a altura da espuma medida foi de 1 cm, a diluição do material vegetal nesse tubo (A) é considerado o índice de espuma. Para obter um resultado mais preciso, uma diluição intermediária foi preparada quando o tubo foi o primeiro ou o segundo na série. O índice de espuma foi calculado segundo a equação:

$$IE = \frac{1000}{A}$$

Sendo A o volume, em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

### 3.2.4. Preparação dos extratos brutos e suas frações

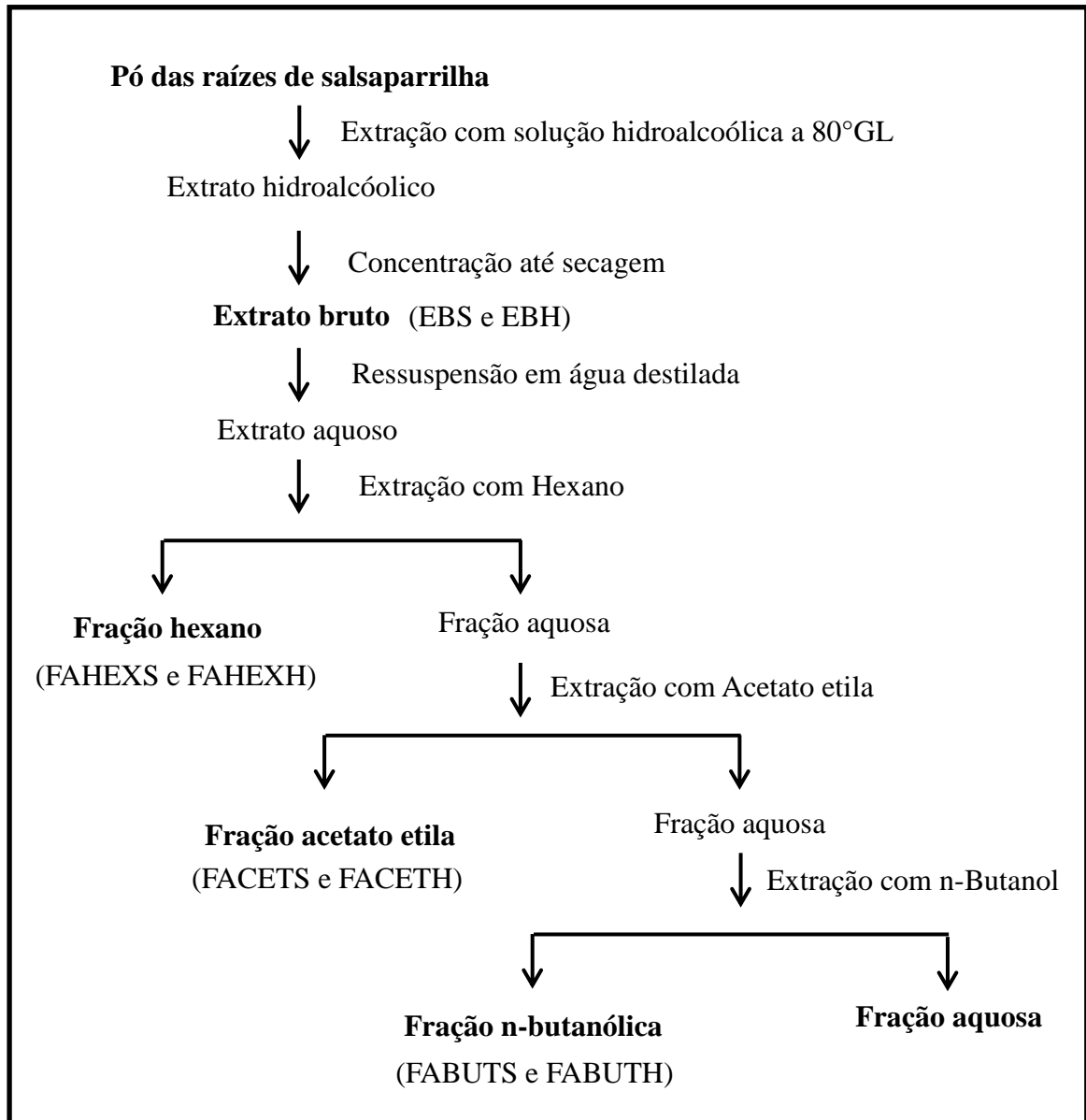
O processo utilizado foi a percolação a frio. Utilizou-se álcool etílico 80° GL, como solvente extrator. Após o processo de percolação, os percolatos de cada espécie foram concentrados à vácuo em evaporador rotativo, com temperatura máxima de 50°C. Obtiveram-se, assim, os extratos brutos das raízes de *S. brasiliensis* (EBS) e *H. salsaparilha* (EBH). Estes extratos foram obtidos à partir de 846,4 g de pó das raízes de *S. brasiliensis* e 313,0 g de pó das raízes de *H. salsaparilha*. Calculou-se o rendimento dos extratos brutos de cada planta.

Para o preparo das frações, 30,0 g de EBS e 33,3 g de EBH foram separadamente diluídos em água destilada, e submetidos à partição líquido-líquido, em funil de separação. O fracionamento foi realizado com o objetivo de obter frações enriquecidas em substâncias de polaridade semelhantes. O restante dos extratos brutos foram armazenados em frascos de vidro, a 1°C, para posterior utilização nos testes farmacológicos.

Primeiramente, o hexano foi adicionado para extrair componentes de baixa polaridade, tais como gorduras, clorofila, óleos essenciais e triterpenos, formando as frações hexânicas (FAHEXS e FAHEXH). As frações aquosas resultantes do procedimento anterior foram submetidas à partição com acetato de etila, com o objetivo de obter componentes de polaridade intermediária, principalmente os flavonoides (FACETS e FACETH). As frações aquosas resultantes desta partição foram então, extraídas com n-butanol saturado com água, solvente de alta polaridade. Obteve-se assim as frações n-butanol (FABUTS e FABUTH). Esta etapa teve como objetivo extrair as saponinas e outros glicosídeos. Uma vez terminado esse fracionamento, as soluções obtidas das partições foram evaporadas até secura, a temperatura máxima de 50°C, em rotavapor. Os extratos e as frações



obtidas foram mantidos refrigerados a 1°C. A Figura 7 representa o protocolo seguido para a preparação do extrato bruto e frações.



**Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto e frações das raízes moídas de salsaparrilhas.** Extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*, **EBS**; e suas frações hexânica, **FAHEXS**; acetato de etila, **FACETS**; e n-butanol, **FABUTS**. Extrato bruto das raízes de *H. salsaparilha*, **EBH**; e suas frações hexânica, **FAHEXH**; acetato de etila, **FACETH**; e n-butanol, **FABUTH**.

### **3.2.5. Determinação da eficiência da extração**

A eficiência da extração foi feita a partir da determinação da porcentagem de resíduo seco, produzida durante a extração (Farmacopéia Brasileira, 2010). Ao longo dos sete dias de percolação, foram transferidos 2 mL do extrato de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* para cápsula de porcelana previamente tarada, e evaporou-se até seca em banho-maria. Em seguida, dessecou-se em estufa a 100-105 °C, por 3 horas. Deixou-se esfriar em dessecador, sobre sílica, e pesou-se. A porcentagem de resíduo seco foi calculada sobre o volume de extrato utilizado. As análises foram feitas em triplicata, durante cada dia de percolação.

### **3.2.6. Determinação do perfil fitoquímico**

#### **3.2.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Foram aplicadas técnicas para caracterização dos flavonóides e saponinas, possíveis constituintes ativos das plantas, em EBS, EBH e suas frações. Aproximadamente 10 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1 mL de metanol. Uma pequena alíquota (10 – 20 µl) foi aplicada em uma placa de alumínio coberta com sílica gel. Essa placa foi colocada em uma cuba cromatográfica contendo o eluente específico para cada classe de substância. Após a eluição, a mesma foi borrifada com o revelador apropriado para a caracterização de cada classe de substâncias (WAGNER & BLADT, 1996).

Para a identificação de flavonóides, o eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água (60:20:20:15). A placa foi revelada com difenilboratoetilamina 1% em metanol (NP) seguido de polietilenoglicol 4000 5% em

etanol (PEG). A placa foi aquecida por 5 min, a 105 °C e, em seguida, visualizada em luz ultravioleta (UV) a 365 nm.

Para a caracterização das saponinas, o eluente utilizado foi uma mistura de clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (64:32:12:8). As placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico, aquecidas por 5 minutos a 105°C, e visualizadas no visível (WAGNER & BLADT, 1996).

### 3.2.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada também com o objetivo de identificar os componentes presentes no extrato. As análises foram realizadas a partir da adaptação da metodologia da farmacopeia norte-americana (USP, 2012) para identificação de saponinas em *Panax ginseng*. A tabela 1 resume as condições de análise.

**Tabela 1:** Condições de análise em CLAE dos extratos brutos das raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*

Condições	Valores
Pré-coluna	C18, 3 µm
Coluna	Phenomenex Kinetex, C18 (250 mm de comprimento x 0,46 mm de diâmetro interno e partículas de 3 µm)
Temperatura	25°C
Vazão da fase móvel	1,5 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Tempo de análise	77 minutos
Detector	Ultravioleta UV/VIS
Ajuste do detector	Comprimento de onda de 203 nm

A fase móvel utilizada encontra-se descrita abaixo e o gradiente utilizado está descrito na tabela 2.

Fase móvel:

Eluente A: Água.

Eluente B: Acetonitrila e água (4:1)

**Tabela 2:** Gradiente de fase móvel utilizado no sistema.

Tempo (min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	76	24
12	76	24
28	65	35
51.5	56.5	43.5
52.5	0	100
64.5	76	24
77	76	24

Para o preparo das amostras, dois gramas do EBS e EBH foram dissolvidos em 10 mL de uma solução de álcool e água (4:6), para se obter uma concentração final de 200 mg/mL. A mistura foi deixada no ultrassom por 5 minutos, para a completa solubilização dos extratos.

### 3.2.7. Ensaios biológicos

#### 3.2.7.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, idade aproximada de 4 a 5 semanas, provenientes Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO – ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, contendo, no máximo, 8 animais/ gaiola no Biotério

da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

Os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram executados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG). Os procedimentos foram aprovados conforme CERTIFICADO Nº 212/2012 (ANEXO III).

### **3.2.7.2. Vermifugação**

Os animais foram vermifugados com ivermectina, solução a 0,08%, veiculado na mamadeira de água, por 7 dias, Os ensaios biológicos se iniciaram logo depois.

### **3.2.7.3. Preparo da dieta HC e suplementação com EBS e EBH**

Para a verificação do efeito “depurativo do sangue” das plantas, os camundongos foram alimentados com dieta rica em carboidratos (HC), com o objetivo de induzir alterações metabólicas. Em seguida, suplementou-se a dieta HC com o extrato bruto de *S. brasiliensis* e *H. salsaparrilha* para verificar os efeitos dessa suplementação.

O modo de preparo da dieta HC consistiu em peneirar o pó da ração comercial e acrescentar a este a mistura de água, açúcar e leite condensado, até a obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, pelets foram confeccionados manualmente. Esta dieta é composta por 45% de leite condensado, 45% de ração Labina® em pó e 10% de açúcar. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à água e dieta.

A tabela 3 apresenta a densidade calórica e a distribuição dos macronutrientes, em porcentagem de quilocalorias, provenientes da dieta controle (C) e da dieta HC. É

importante enfatizar que a dieta HC contem, pelo menos, 30% de açúcares refinados, principalmente a sacarose.

**Tabela 3:** Distribuição de macronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta C e HC.

	<b>Dieta C</b>	<b>Dieta HC</b>
<b>Proteínas (%)</b>	31,1	20,0
<b>Lipídios (%)</b>	3,1	5,8
<b>Carboidratos (%)</b>	65,8	74,2
<b>Energia (Kcal/g)</b>	4,0	4,4

C = dieta controle; HC = dieta rica em carboidratos. Fonte: OLIVEIRA *et al.* (2012)

Com relação às dietas HC suplementadas com EBS e EBH, diluiu-se, inicialmente, a quantidade determinada dos extratos (100 ou 200 mg/Kg de peso/dia) em água. Essas soluções foram acrescentadas ao pó da ração Labina® e peneirados três vezes, para garantir a total homogeneidade dos extratos na dieta. Em seguida, adicionou-se açúcar e leite condensado, até a formação de uma massa, com a qual manualmente se confeccionou os pellets (idênticos aos da dieta rica em carboidratos sem extrato).

#### **3.2.7.4. Esquema de tratamento**

A indução das alterações metabólicas por dieta ocorreu durante as oito primeiras semanas do experimento. Até a oitava semana os camundongos foram divididos em dois grupos: 40 animais foram alimentados com a dieta HC e os oito restantes receberam a dieta C (Tabela 4). Da 9<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de estudo, os animais que recebiam dieta HC foram realocados em outros quatro novos grupos que passaram a se alimentar de dieta HC adicionada de duas concentrações diferentes (100 e 200 mg/Kg de peso/dia) de cada extrato bruto (EBS e EBH). A relação de todos os

tratamentos realizados e os respectivos grupos de animais é também descrita na tabela.

**Tabela 4:** Grupos de animais em estudo e tipo de dieta consumida.

<b>Grupos</b>	<b>Tratamento</b>
<b>C</b>	Ração comercial Labina® durante 12 semanas
<b>HC</b>	Dieta HC durante 12 semanas
<b>HCSI</b>	Dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 100 mg/Kg de peso/dia de EBS
<b>HCSII</b>	Dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 200 mg/Kg de peso/dia de EBS
<b>HCHI</b>	Dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 100 mg/Kg de peso/dia de EBH
<b>HCHII</b>	Dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 200 mg/Kg de peso/dia de EBH

A ingestão alimentar média foi determinada diariamente por meio da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante na gaiola dos animais, durante as semanas de experimento. O valor obtido foi dividido pelo número de animais que estavam na caixa. O mesmo foi realizado para avaliar o consumo e verificar as doses de tratamento, quando os animais passaram a receber dieta HC suplementados com o EBS ou o EBH.

A mensuração do peso corporal foi realizada uma vez por semana, em balança semi-analítica, com capacidade para 500 gramas e variação de 0,01 gramas.

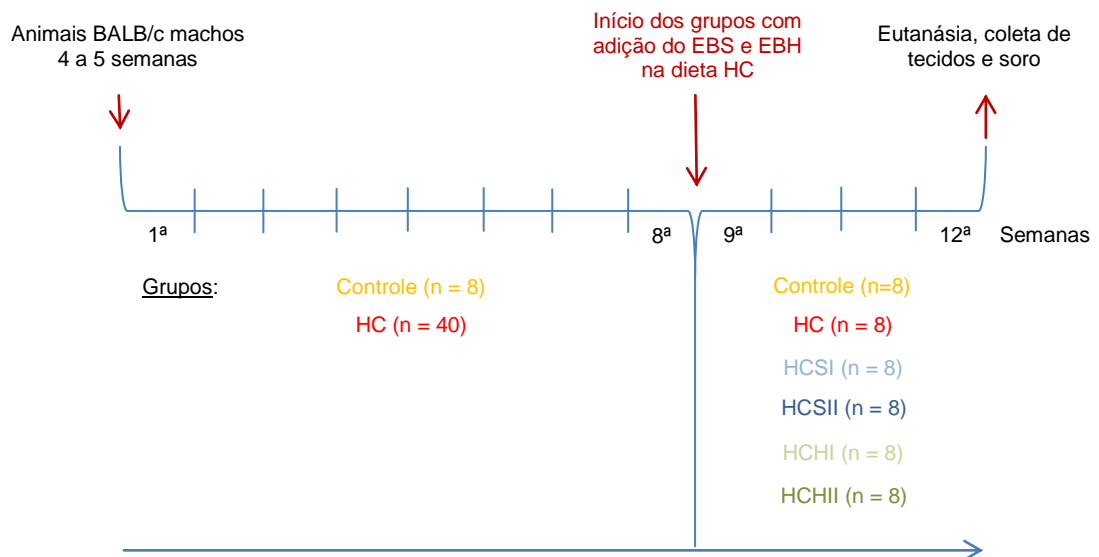
O índice de adiposidade (IA) foi calculado pela relação entre a somatória dos pesos de tecido adiposo visceral, compostos pelo tecido adiposo epididimal, mesentérico e retroperitoneal (g), e o peso de cada animal (g), seguido de multiplicação por 100. O IA foi calculado a partir da fórmula:

$$IA = \frac{(TAE + TAM + TAR)}{PC} \times 100$$

Sendo TAE o tecido adiposo epididimal, TAM o tecido adiposo mesentérico, TAR o tecido adiposo retroperitoneal e PC o peso de cada animal.

### 3.2.7.5. Desenho experimental

O desenho experimental, com a escala temporal seguida durante o período de estudo (90 dias), pode ser visualizado na Figura 7. Da primeira à oitava semana, os animais receberam dieta controle ou HC. Ao início da 9ª semana de experimento, parte dos animais (n=32), que recebiam a dieta HC, foram suplementados com duas concentrações diferentes do EBS ou EBH e, assim, permaneceram até a 12ª semana. Nessa semana todos os animais foram eutanasiados (Figura 8).



**Figura 8: Escala temporal do desenho experimental.** Grupos de animais alimentados com dieta controle, dieta rica em carboidratos (HC), dieta HC suplementada com 100 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSI) e *H. salsaparilha* (HCHI) e dieta HC suplementada com 200 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSII) e *H. salsaparilha* (HCHII).



### **3.2.7.6. Eutanásia**

Após 90 dias de estudo, os animais foram mantidos em jejum, por aproximadamente 12 horas e então foram submetidos à eutanásia por exsanguinação pelo plexo axilar, após terem sido anestesiados com solução de ketamina (60 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Os tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal e o fígado foram removidos e conservados em freezer a - 20°C.

### **3.2.7.7. Obtenção do soro**

O sangue foi coletado do plexo axilar dos animais, colocado em tubos e centrifugado (3000 r.p.m.) durante 10 minutos à 4°C, para obtenção do soro. Em seguida, o material foi aliqotado em tubos individuais e congelado (-20°C), para posterior dosagem sérica de glicose, triglicérides e colesterol total.

## **3.2.8. Análises bioquímicas e morfológicas**

### **3.2.8.1. Dosagens sorológicas**

Foram priorizadas as análises de glicose, colesterol total e triglicérides plasmáticas, tendo em vista o objetivo de avaliar o efeito “depurativo” das plantas. A glicose, o colesterol total e triglicérides, presentes no soro, foram quantificados por Kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG) segundo as instruções do fabricante.

### **3.2.8.2. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal**

#### **3.2.8.2.1. Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz**

Foram realizadas as análises morfológicas do tecido adiposo epididimal com o objetivo de verificar o tamanho dos adipócitos. Fragmento do tecido adiposo epididimal, com cerca de 50-100 mg, foram removidos e imersos em solução fixadora de formaldeído à 10% em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, por um período de 48 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a etapa de desidratação com o álcool 70°, seguida de diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5 µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia (OLIVEIRA et al., 2012). As lâminas histológicas foram preparadas no laboratório de apoptose (ICBUFGM).

#### **3.2.8.2.2. Aquisição de imagem no microscópio e mensuração da área**

Para a determinação do tamanho dos adipócitos, as lâminas foram analisadas em microscópio, equipado com uma câmera digital (Motican 2500). Imagens de cinco campos de cada animal foram capturadas e a área seccional foram obtidas através da medida aleatória de 50 adipócitos por animal (n=5). Em seguida realizou-se a análise com o programa ImageJ para o processamento de imagens digitais e cálculo da área média dos adipócitos (OLIVEIRA et al., 2012).

### **3.2.8.3. Análise do peso e morfologia do fígado**

Para avaliar se os tratamentos com os extratos brutos de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* poderiam estar levando a algum dano hepático, foi avaliado o peso do fígado destes animais (n=5). De acordo com CHAN et al. (2010), a hepatotoxicidade pode ser verificada através do percentual do peso do fígado sobre o peso corporal final dos animais.

#### **3.2.8.3.1. Processamento do fígado para a microscopia de luz**

Foram realizadas as análises morfológicas do fígado com o objetivo de verificar possíveis efeitos tóxicos. Fragmentos do fígado, foram removidos e imersos em solução fixadora de formaldeído à 10% em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, por um período de 48 horas. Em seguida, procedeu-se a etapa de desidratação com o álcool 70°, seguida de diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5 µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia. As lâminas histológicas foram preparadas no laboratório de apoptose (ICB/UFMG).

#### **3.2.8.3.2. Aquisição de imagem no microscópio e avaliação do grau de lesões histológicas**

Para a avaliação do grau de lesões histológicas no fígado, as lâminas (n=5) foram analisadas em microscópio, equipado com uma câmera digital (Motican 2500).

### **3.2.9. Análise estatística**

Após ter sido realizado o teste de normalidade e verificado que as amostras apresentavam distribuição Gaussiana, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way”, seguida de pós-teste Newman-Keuls. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil fitoquímico dos extratos e suas frações

#### 4.1.1. Índices de espuma

O valor encontrado para as raízes de *S. brasiliensis* foi de 125, já para as raízes de *H. salsaparilha* o valor encontrado foi de 833,3. Este ensaio confirma a presença de saponinas nas raízes de ambas as espécies.

#### 4.1.2. Rendimento das extrações

O rendimento das extrações, encontrado após o processo de percolação, encontra-se na Tabela 5. Observa-se que as raízes de *H. salsaparilha* fornecem um teor de substâncias muito acima do que as raízes de *S. brasiliensis*.

**Tabela 5:** Rendimento dos extratos brutos de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*.

Espécie	Pó da planta (g)	Sigla	Peso obtido (g)	Rendimento
<i>S. brasiliensis</i>	846,4	EBS	81,49	9,63%
<i>H. salsaparilha</i>	313,0	EBH	118,79	37,95%

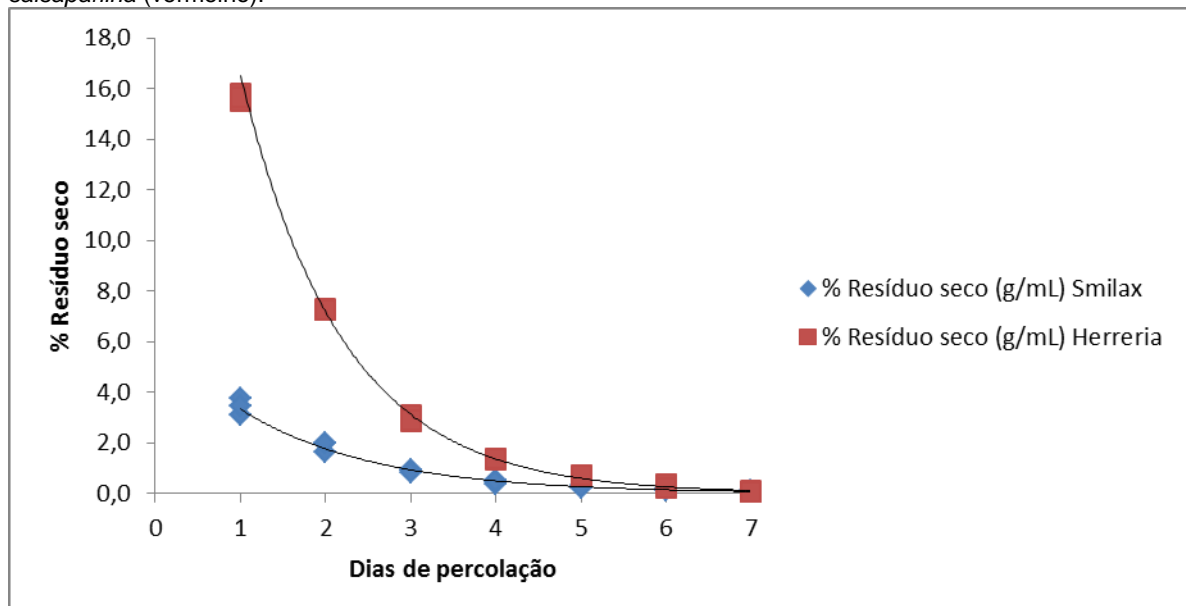
**EBS** = Extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*; **EBH** = Extrato bruto das raízes de *H. salsaparilha*.

A eficiência do processo de extração, ao longo dos sete dias, encontra-se na tabela 6. E a figura 9 demonstra o gráfico do percentual de resíduo seco ao longo dos dias de percolação.

**Tabela 6:** Eficiência do processo de extração dos extratos brutos de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*

Nº de Extração (percolação)	% Resíduo seco (g/mL) $\pm$ DP	Eficiência da extração (%)	% Resíduo seco (g/mL) $\pm$ DP	Eficiência da extração (%)
	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>H. salsaparilha</i>	<i>H. salsaparilha</i>
1	3,43 $\pm$ 0,310	48,25	15,65 $\pm$ 0,140	55,25
2	1,86 $\pm$ 0,189	26,16	7,27 $\pm$ 0,040	25,66
3	0,89 $\pm$ 0,071	12,48	2,94 $\pm$ 0,131	10,38
4	0,46 $\pm$ 0,079	6,40	1,36 $\pm$ 0,025	4,80
5	0,27 $\pm$ 0,043	3,75	0,70 $\pm$ 0,008	2,47
6	0,13 $\pm$ 0,008	1,88	0,32 $\pm$ 0,110	1,12
7	0,08 $\pm$ 0,010	1,08	0,09 $\pm$ 0,029	0,32
Total	7,11	100%	28,33	100%

**Figura 9:** Gráfico do percentual de resíduo seco ao longo dos dias de percolação da *S. brasiliensis* (azul) e *H. salsaparilha* (vermelho).



Com o objetivo de separar as substâncias químicas de acordo com suas polaridades, os extratos foram submetidos a um fracionamento utilizando solventes

de polaridade crescente. Os rendimentos obtidos com os solventes hexano (FAHEXS e FAHEXH), acetato de etila (FACETS e FACETH) e n-butanol (FABUTS e FABUTH) encontram-se na Tabela 7. É possível já verificar uma maior quantidade de substâncias extraídas com o n-butanol, o que confirma a existência de elevada concentração de substâncias polares, especialmente as saponinas.

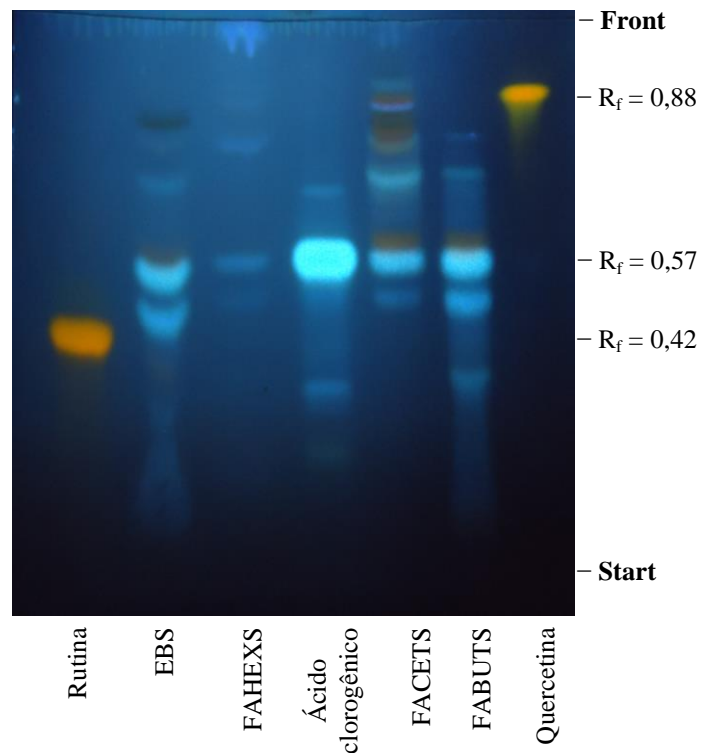
**Tabela 7:** Rendimento do fracionamento a partir do EBS e EBH utilizando diferentes solventes de polaridade crescente.

Espécie	Partição	Sigla	Peso (g)	Rendimento
<i>S. brasiliensis</i>	Extrato bruto	EBS	30,02	-
	Hexano	FAHEXS	1,56	5,20%
	Acetato de etila	FACETS	1,55	5,16%
	n-butanol	FABUTS	5,15	17,15%
<i>H. salsaparilha</i>	Extrato bruto	EBH	33,33	-
	Hexano	FAHEXH	0,02	0,06%
	Acetato de etila	FACETH	0,38	1,14%
	n-butanol	FABUTH	2,43	7,30%

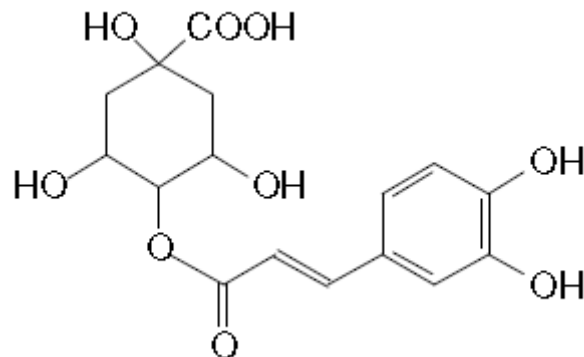
**EBS** = Extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*; **FAHEXS** = fração hexânica do EBS; **FACETS** = fração acetato de etila do EBS; **FABUTS** = fração n-butanólica do EBS. **EBH** = Extrato bruto das raízes de *H. salsaparilha*; **FAHEXH** = fração hexânica do EBH; **FACETH** = fração acetato de etila do EBH; **FABUTH** = fração n-butanólica do EBH.

#### 4.1.3. Caracterização química das raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* por CCD

As Figuras 10 e 12 mostram o perfil cromatográfico, em CCD, obtido para flavonóides no EBS e suas frações, e no EBH e suas frações, respectivamente. Observa-se que os padrões de referência rutina e quercetina apresentaram fluorescência alaranjada, nos Rf 0,42 e Rf 0,88, respectivamente. As bandas de fluorescência azul nos extratos brutos e frações são devido à presença de ácidos fenólicos. O padrão de referência de ácido clorogênico, no Rf 0,57, de coloração azul, foi observado no EBS, FAHES, FACETS e FABUTS. Essas fluorescências são específicas para estas substâncias, após revelação com o revelador próprio para elas. A estrutura da substância fenólica, ácido clorogênico, identificada por CCD no extrato bruto e frações das raízes de *S. brasiliensis* está representada na Figura 11.

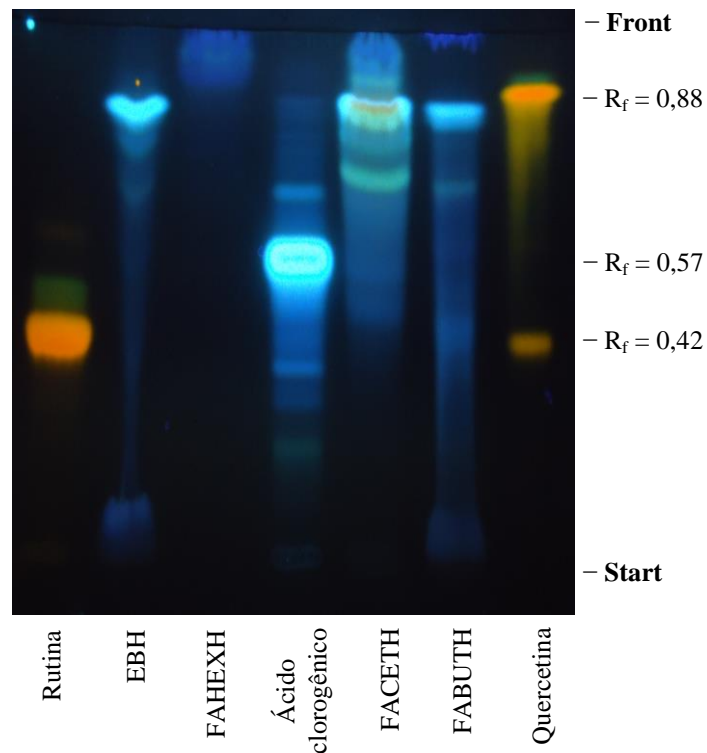


**Figura 10 – CCD para identificação de flavonoides em *S. brasiliensis*.** Padrões rutina, ácido clorogênico e quercetina. Extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*, **EBS**; e suas frações hexânica, **FAHEXS**; acetato de etila, **FACETS**; e n-butanol, **FABUTS**. Eluente, acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água (60:20:20:15); revelador, difenilboratoetilamina a 1% em metanol (NP) seguido de polietilenoglicol 4000 a 5% em etanol (PEG); visualização, luz ultravioleta a 365 nm.



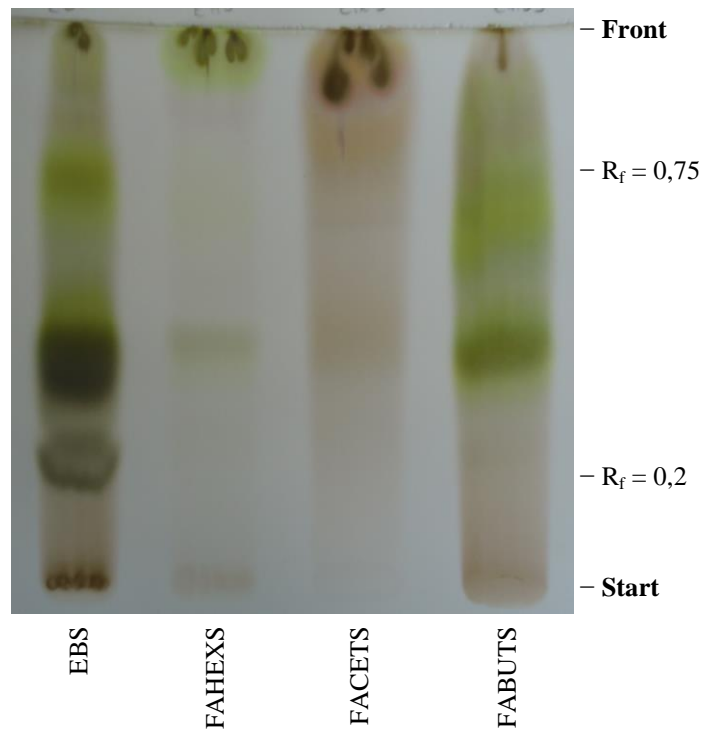
**Figura 11:** Estrutura química do ácido clorogênico identificado por CCD nas raízes de *S. brasiliensis*.



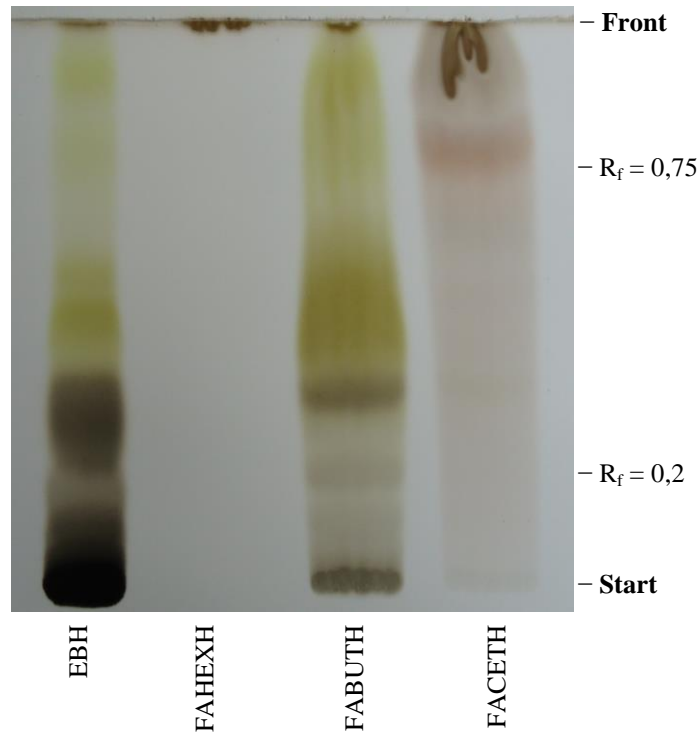


**Figura 12 – CCD para identificação de flavonoides em *H. salsaparilha*.** Padrões rutina, ácido clorogênico e quercetina. Extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*, **EBH**; e suas frações hexânica, **FAHFXH**; acetato de etila, **FACETH**; e n-butanol, **FABUTH**. Eluente, acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água (60:20:20:15); revelador, difenilboratoetilamina a 1% em metanol (NP) seguido de polietilenoglicol 4000 a 5% em etanol (PEG); visualização, luz ultravioleta a 365 nm.

As Figuras 13 e 14 mostram o perfil cromatográfico, em CCD, obtido para saponinas, no EBS e suas frações, e no EBH e suas frações, respectivamente. As placas foram reveladas com reagente anisaldeído sulfúrico, próprio para substâncias como saponinas e triterpenos. A CCD confirmou a presença de saponinas nos extratos brutos e nas frações n-butanol. De acordo com WAGNER & BLADT (1996), salsaparrilhas, do gênero *Smilax*, apresentam 6 manchas amarelo-marrons entre Rf de 0,2 e 0,75, que indicam a presença, entre outras substâncias, de parillina e sarsaparillosideo. É provável que as manchas amarelo-marrons, observadas no nosso estudo, sejam também devido à presença dessas mesmas substâncias.



**Figura 13 – CCD para identificação de saponinas em *S. brasiliensis*.** Extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*, **EBS**; e suas frações hexânica, **FAHEXS**; acetato de etila, **FACETS**; e n-butanol, **FABUTS**. Eluente, clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (64:32:12:8); revelador, anisaldeído sulfúrico; visualização, luz visível.

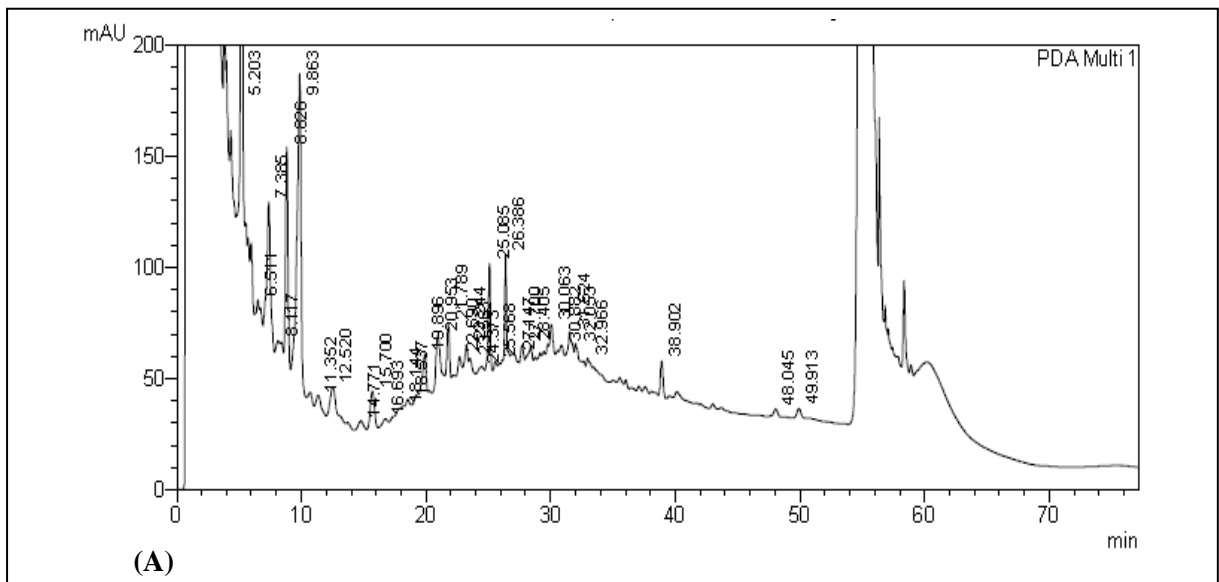


**Figura 14 – CCD para identificação de saponinas em *H. salsaparilha*.** Extrato bruto das raízes de *H. salsaparilha*, **EBH**; e suas frações hexânica, **FAHEXH**; acetato de etila, **FACETH**; e n-butanol, **FABUTH**. Eluente, clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (64:32:12:8); revelador, anisaldeído sulfúrico; visualização, luz visível.

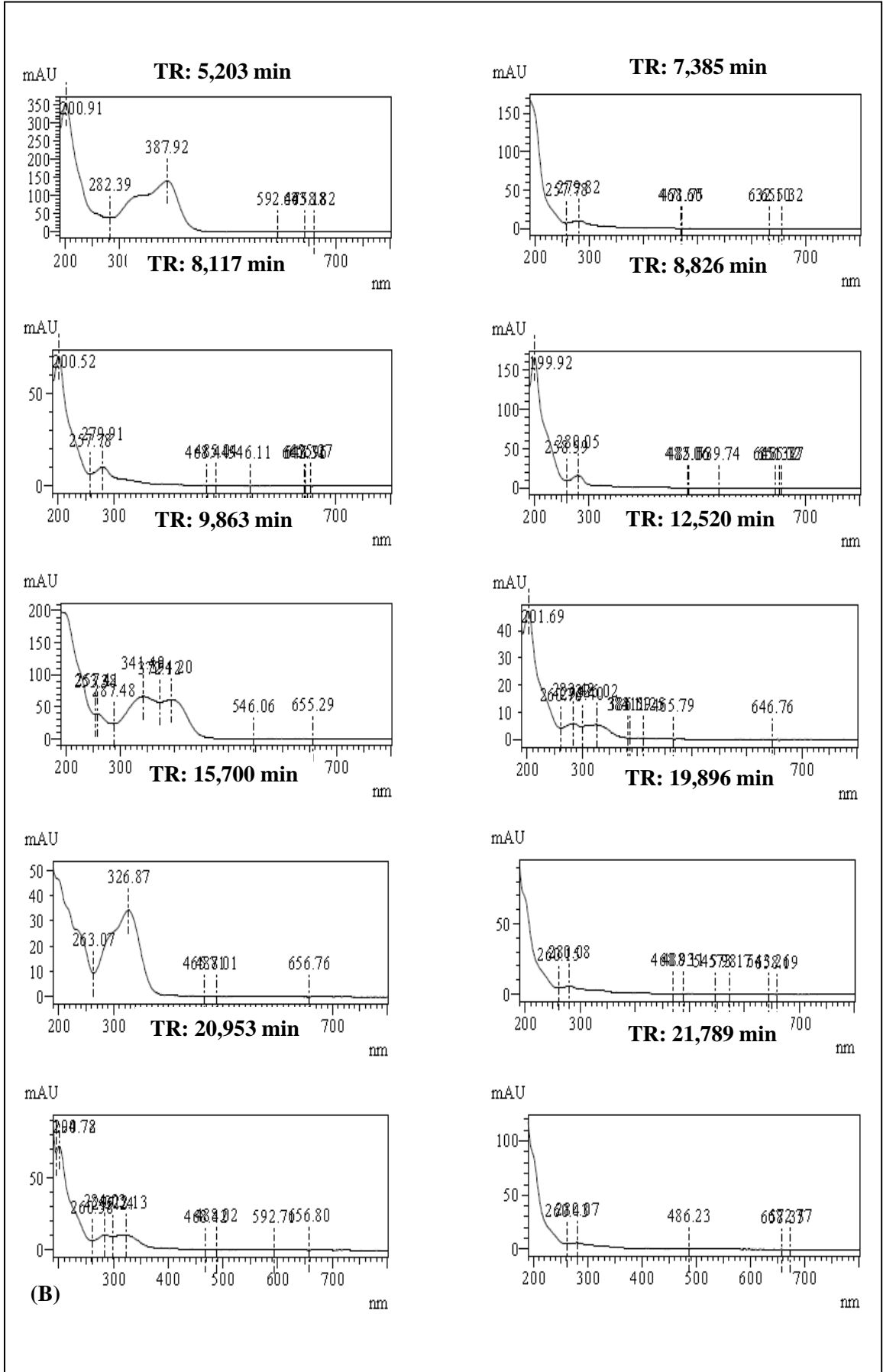
#### 4.1.4. Perfis cromatográficos por CLAE dos extratos brutos de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*

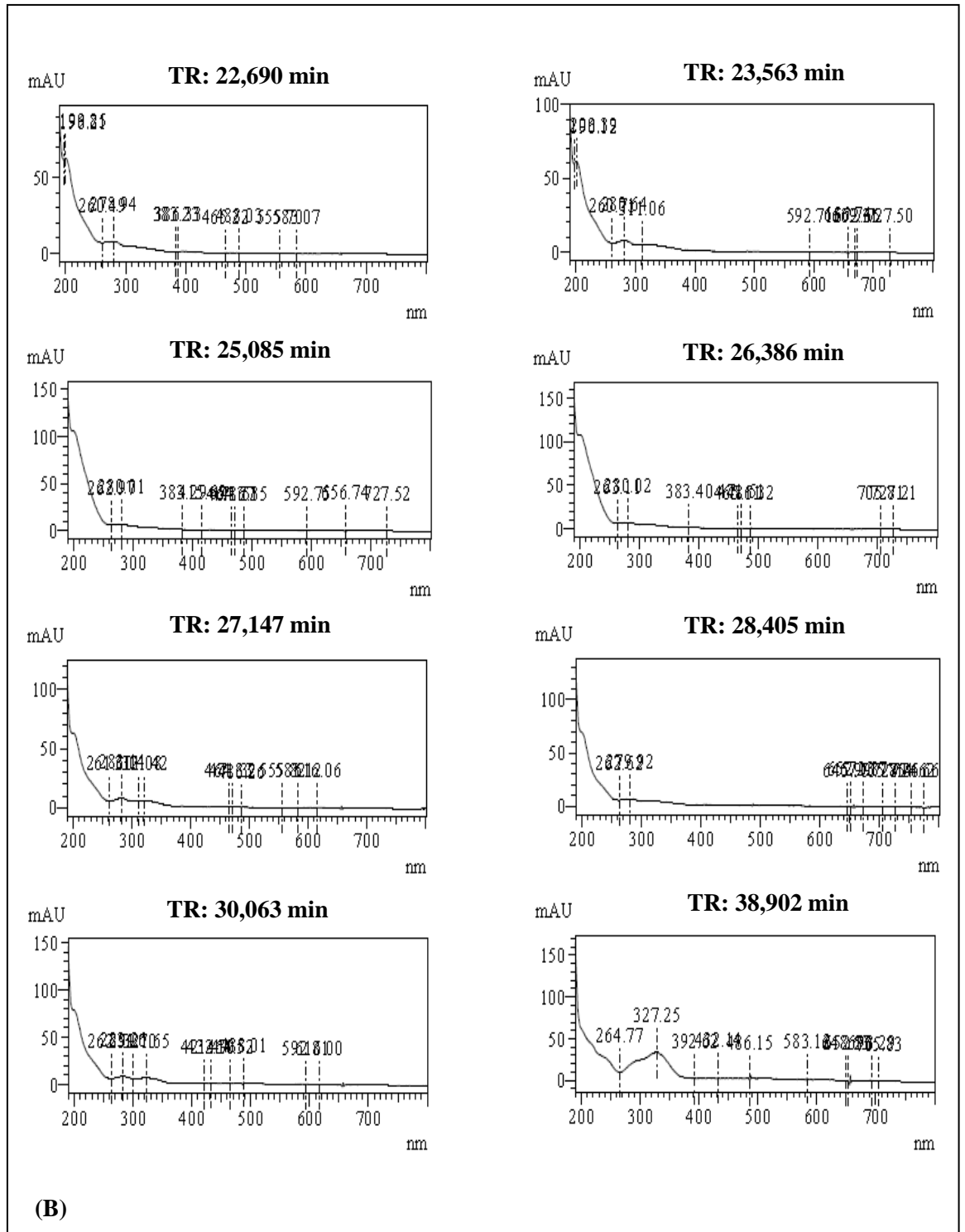
A CLAE foi utilizada com a finalidade de aprimorar a caracterização das substâncias químicas presentes nas raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*. Na figura 15A e 16A encontram-se os cromatogramas obtidos para o EBS e EBH, com detecção no Ultravioleta no comprimento de onda ( $\lambda$ ) 203 nm, respectivamente. No cromatograma do EBS, é possível observar a presença de várias substâncias de elevada polaridade, entre tempos de retenção ( $T_R$ ) de 0 a 15 min, enquanto outro grupo de substâncias foi detectado em  $T_R$  de 15 a 50 min. No cromatograma do EBH, também é possível observar a presença de várias substâncias de elevada polaridade entre  $T_R$  de 0 a 15 min, e outro grupo de substâncias entre  $T_R$  de 20 a 40

min. Os espectros no UV obtidos para EBS e para o EBH estão também demonstrados nas figuras 15B e 16B, respectivamente. Os espectros do EBS apresentaram absorção no UV condizentes para substâncias fenólicas, como ácidos orgânicos e saponinas. Já os picos referentes ao EBH apresentaram espectros no UV com absorção em baixo comprimento de onda, indicando a presença de grande quantidade de diferentes saponinas.

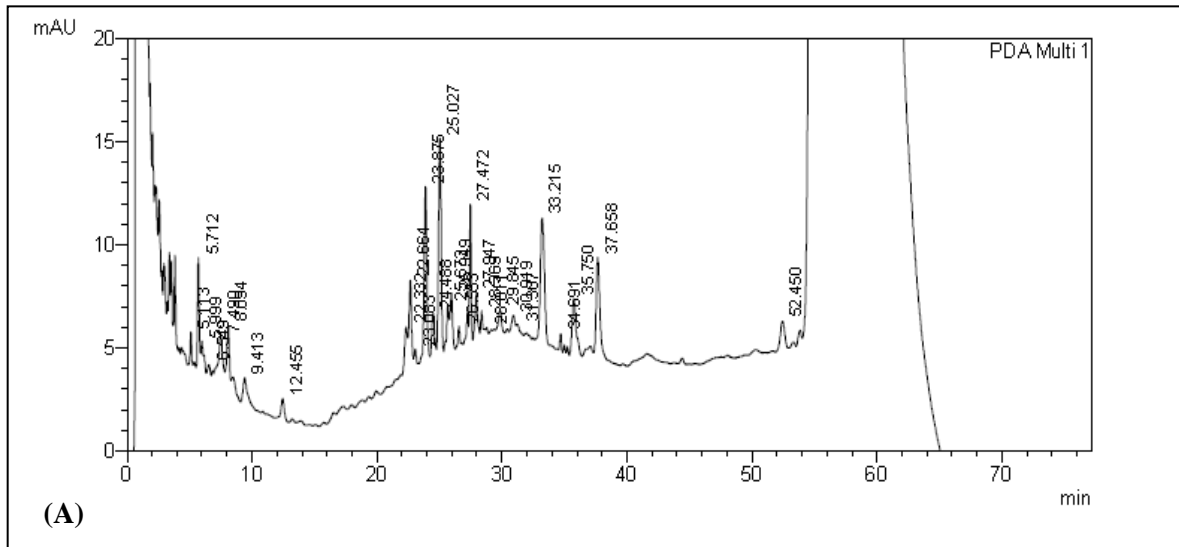


**Figura 15A – Perfil cromatográfico em CLAE do EB das raízes de *S. brasiliensis*.** Coluna Phenomenex Kinetex C18 (250 x 4,6 mm) 3  $\mu$ m; detecção 203 nm (A); volume de injeção foi de 20  $\mu$ L; fluxo, 1,5 mL/min; sistema solvente, gradiente de acetonitrila e água.

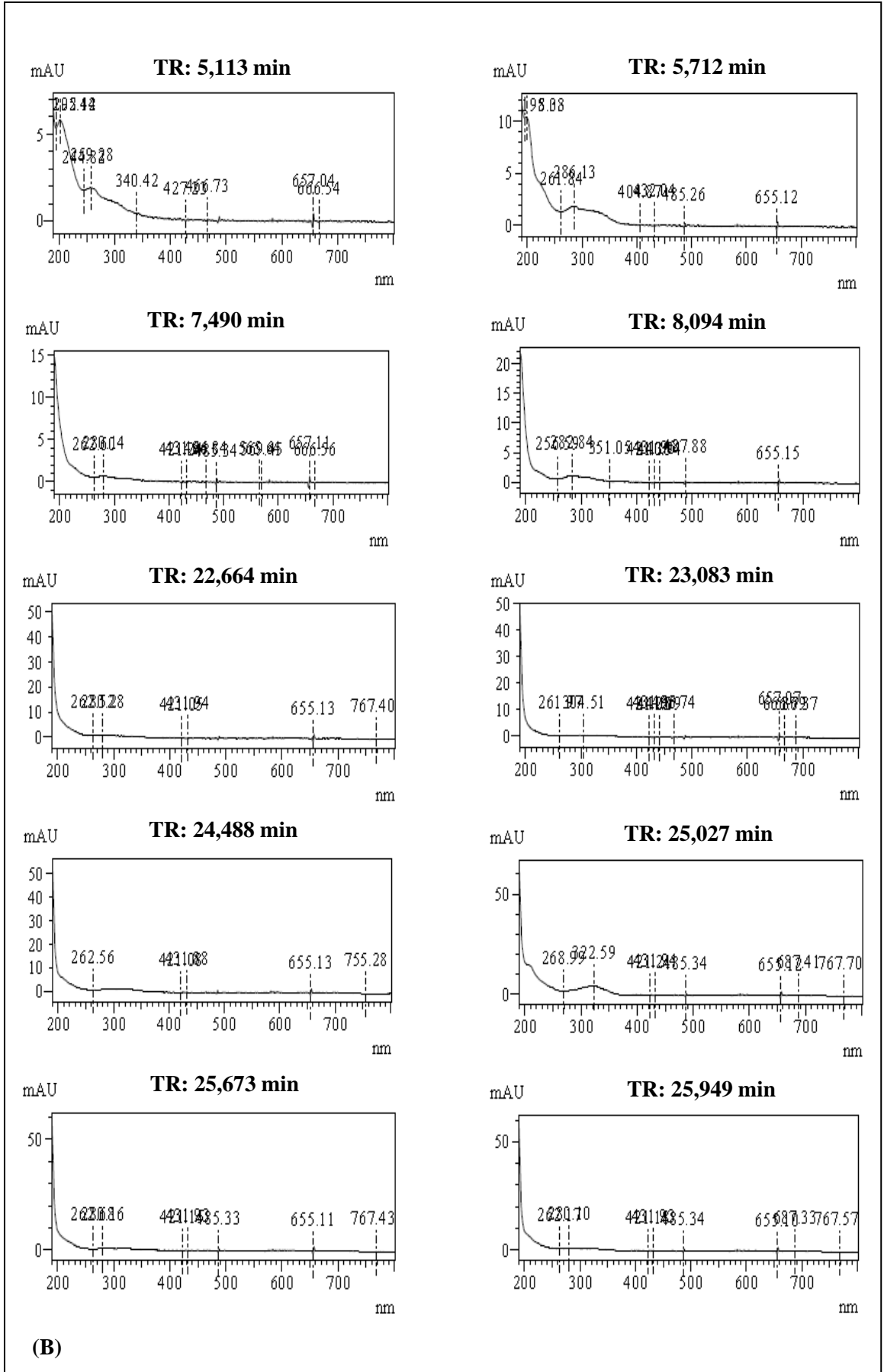




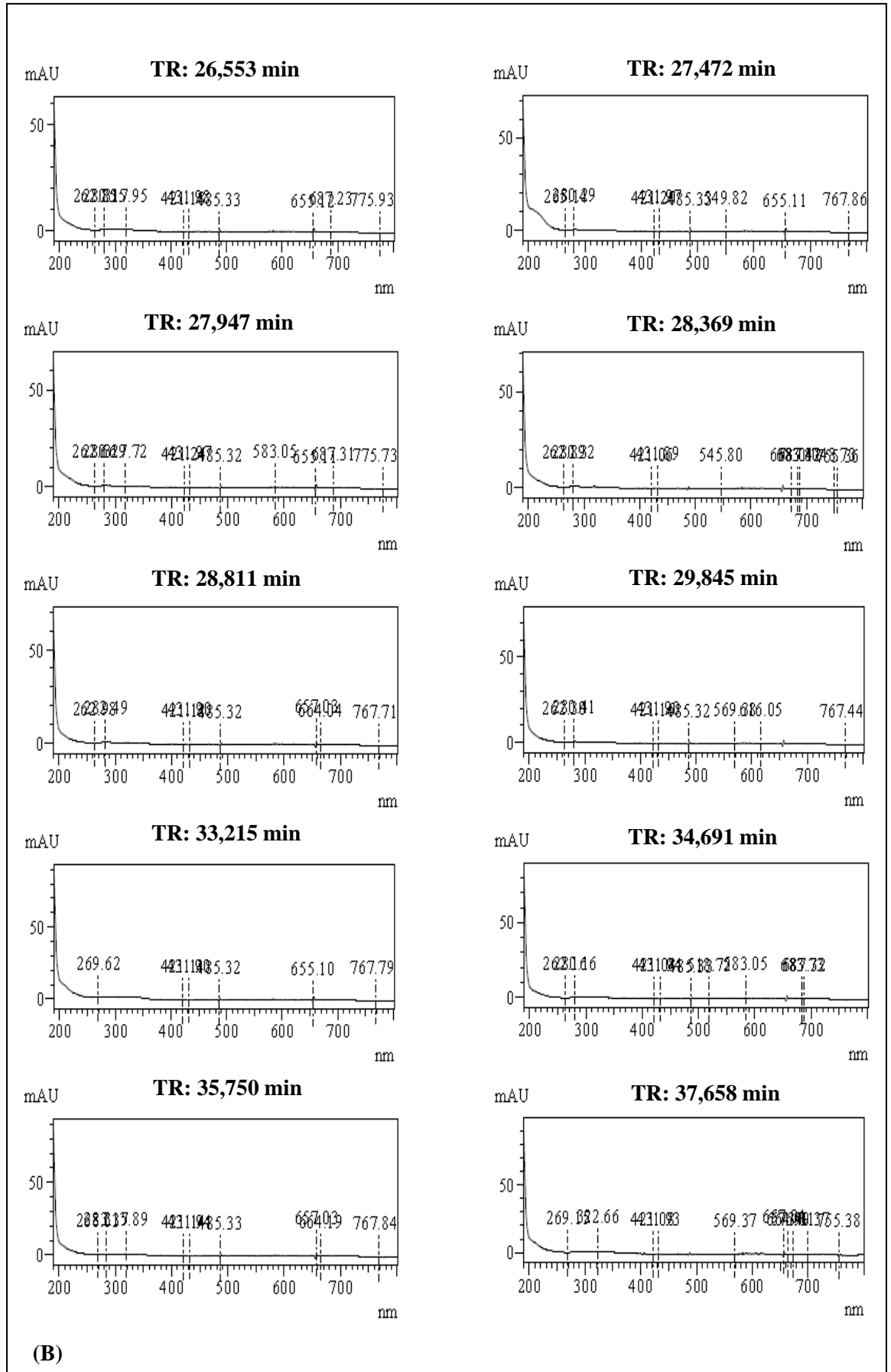
**Figura 15** – Perfil cromatográfico em CLAE do extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis*. Coluna Phenomenex Kinetex C18 (250 x 4,6 mm) 3 µm; detecção 203 nm (A); volume de injeção foi de 20 µL; fluxo, 1,5 mL/min; sistema solvente, gradiente de acetonitrila e água. Espectros no UV (B).

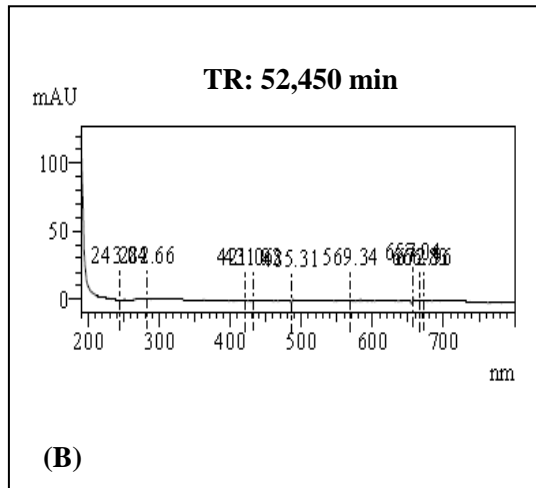


**Figura 16A – Perfil cromatográfico em CLAE do extrato bruto das raízes de *H. salsaparilha*.** Coluna Phenomenex Kinetex C18 (250 x 4,6 mm) 3  $\mu$ m; detecção 203 nm (A); volume de injeção foi de 20  $\mu$ L; fluxo, 1,5 mL/min; sistema solvente, gradiente de acetonitrila e água.









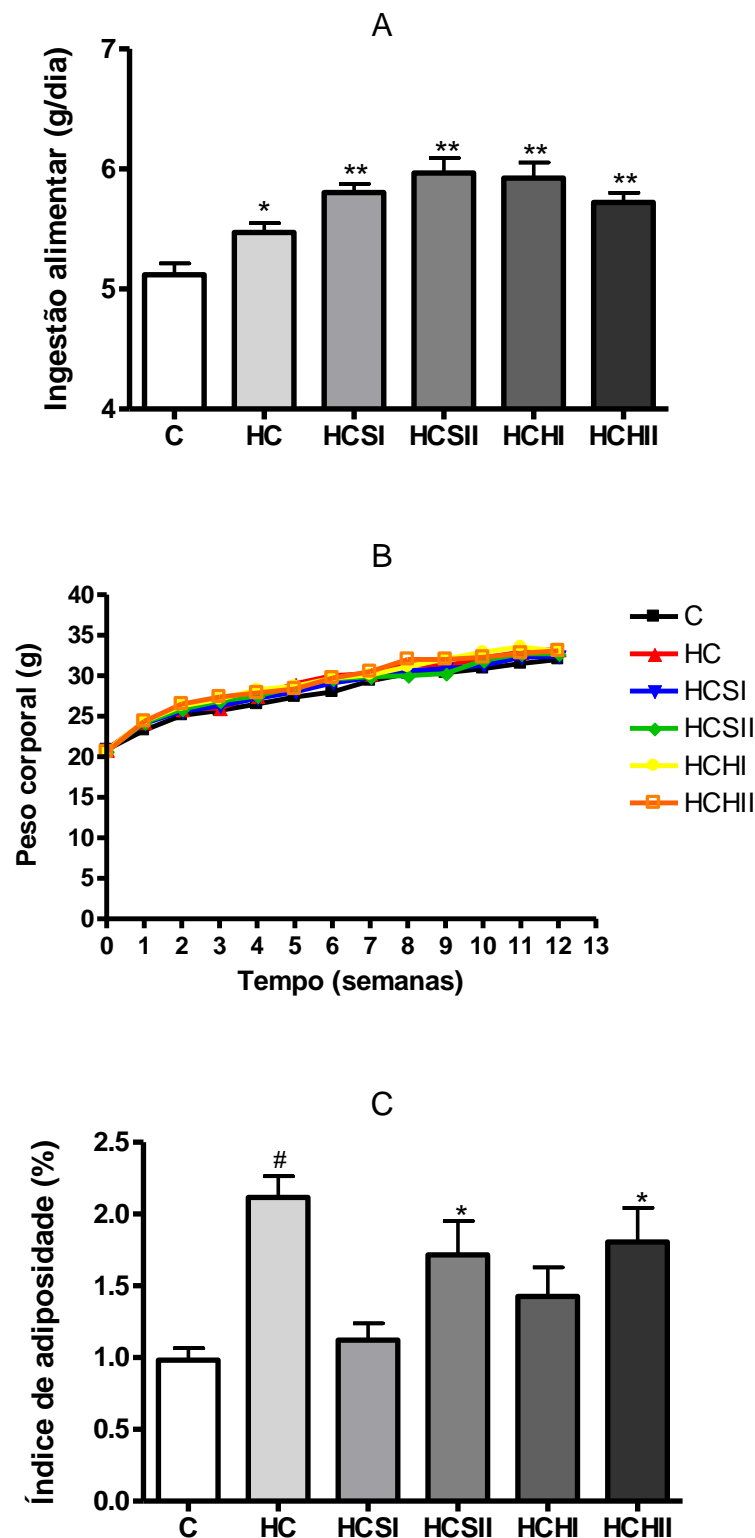
**Figura 16 – Perfil cromatográfico em CLAE do extrato bruto das raízes de *H. salsaparilha*.** Coluna Phenomenex Kinetex C18 (250 x 4,6 mm) 3  $\mu$ m; detecção 203 nm (A); volume de injeção foi de 20  $\mu$ L; fluxo, 1,5 mL/min; sistema solvente, gradiente de acetonitrila e água. Espectros no UV (B).

## 4.2. Efeitos do EBS e do EBH no tratamento de alterações metabólicas induzidas por dieta HC em camundongos BALB/c

### 4.2.1. Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e índice de adiposidade

O consumo de ração entre os animais alimentados com dieta HC, HCSI, HCSII, HCHI e HCHII foi superior ao consumo de animais alimentados com dieta controle (Figura 17A). Em relação ao peso corporal (Figura 17B), observa-se que os animais alimentados com dieta C apresentaram peso corporal similar aos animais alimentados com dieta HC, com e sem suplementação dos extratos.

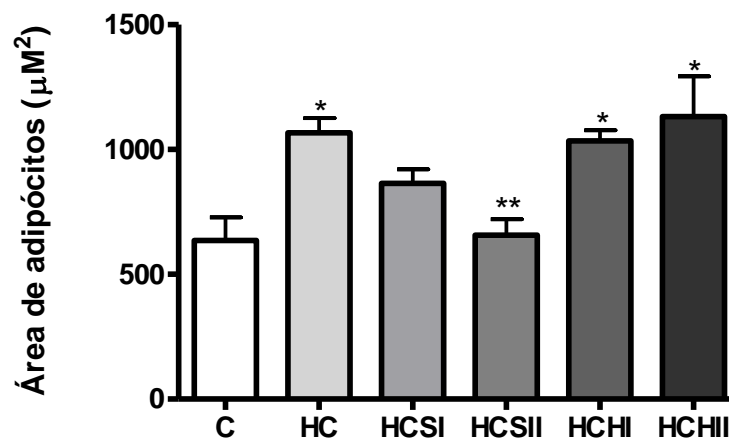
Conforme pode ser observado na figura 17C, animais alimentados com dieta HC apresentaram maior índice de adiposidade quando comparados aos animais que consumiram dieta C. Os grupos de animais que receberam dieta HC suplementada com extrato bruto de *S. brasiliensis* e de *H. salsaparilha* nas doses de 100 mg/Kg de peso/dia apresentaram índice de adiposidade semelhantes ao grupo controle.



**Figura 17 - Ingestão alimentar, peso corporal e índice de adiposidade** de animais controle (C), alimentados com dieta rica em carboidratos (HC), alimentados com dieta HC suplementada com 100 mg/Kg de peso corporal/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSI) e *H. salsaparilha* (HCHI) e dieta HC suplementada com 200 mg/Kg de peso corporal/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSII) e *H. salsaparilha* (HCHII). (A) Ingestão alimentar média durante as quatro semanas finais do experimento (as barras representam médias  $\pm$  desvio padrão dos dias avaliados). (B) Representação do ganho de peso corporal, avaliação semanal. (C) Percentual de tecido adiposo - soma da biometria dos sítios adiposos em relação ao peso corporal do animal. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão, n=8. \*p<0,05 vs C, # p<0,01 vs C, \*\*p<0,001 vs C.

#### 4.2.2. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

A análise histológica do tecido adiposo epididimal mostrou que os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento da área dos adipócitos quando comparados ao grupo C (Figura 18). Os animais que receberam dieta HC, adicionada de 200 mg/Kg/dia do extrato bruto de *S. brasiliensis*, apresentaram área dos adipócitos menores que os animais HC e similares ao grupo C. Nos demais animais que receberam dieta HCSI, HCHI e HCHII, o aumento da área dos adipócitos foi similar ao controle HC.

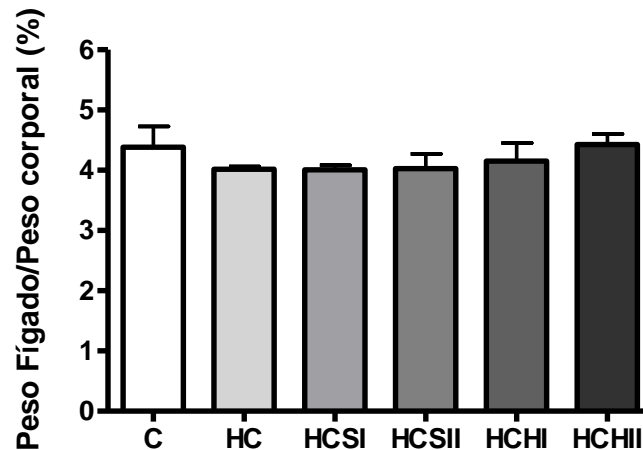


**Figura 18 - Análise histológica do tecido adiposo epididimal** de animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidratos (HC), dieta HC suplementada com 100 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSI) e *H. salsaparilha* (HCHI) e dieta HC suplementada com 200 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSII) e *H. salsaparilha* (HCHII). \* $p < 0,05$  vs C, \*\* $p < 0,05$  vs HC.

#### 4.2.3. Análise do peso e morfologia do fígado

Os resultados demonstram que não houve aumento do peso do fígado em nenhum dos tratamentos (Figura 19). O estudo morfológico também não constatou alterações

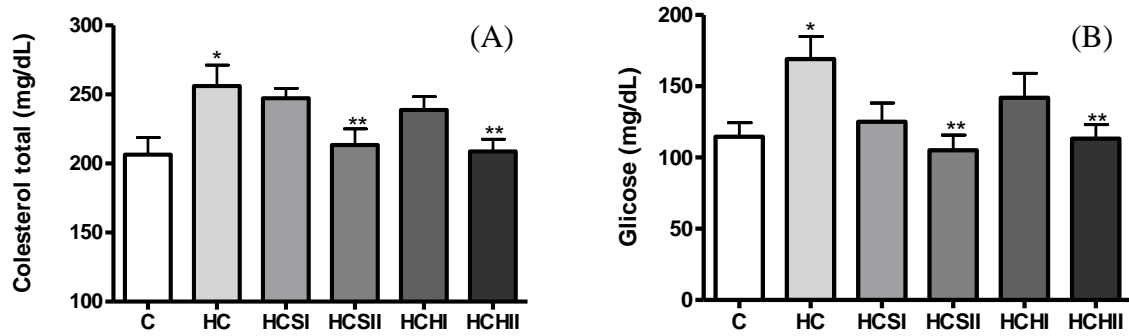
microscópicas significativas no fígado dos animais sacrificados ao final do experimento (resultado não demonstrado).



**Figura 19 – Peso do Fígado / Peso corporal (%)** de animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidratos (HC), dieta HC suplementada com 100 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSI) e *H. salsaparilha* (HCHI) e dieta HC suplementada com 200 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSII) e *H. salsaparilha* (HCHII).

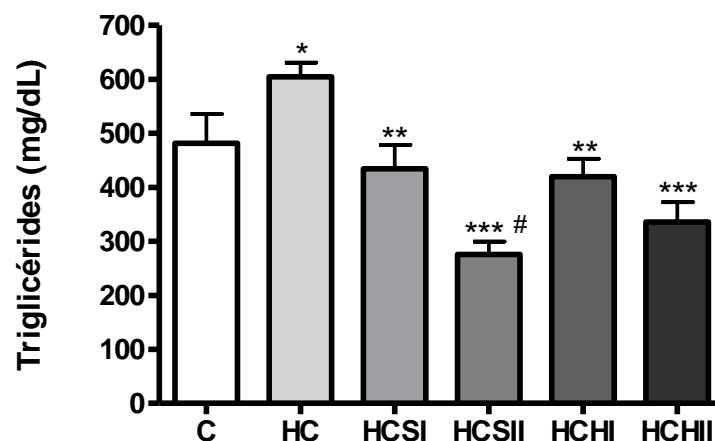
#### 4.2.4. Parâmetros sorológicos

Para verificar as alterações no metabolismo de glicose e lipídios dos animais estudados, foram realizadas as dosagens de glicose de jejum, colesterol total e triglicérides. Observou-se que os grupos que receberam dieta HC apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total e glicose em relação ao grupo C. Já os grupos que receberam extrato bruto de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* na dose de 200 mg/Kg/dia tiveram uma redução significativa nas concentrações de colesterol total e glicose, comparadas ao grupo HC (Figura 20).



**Figura 20 - Colesterol total e glicose de jejum (mg/dL)** de animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidratos (HC), dieta HC suplementada com 100 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSI) e *H. salsaparilha* (HCHI) e dieta HC suplementada com 200 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSII) e *H. salsaparilha* (HCHII). \* $p < 0,05$  vs C, \*\* $p < 0,05$  vs HC.

O grupo que recebeu dieta HC apresentou um aumento ( $p < 0,05$ ) nas concentrações plasmáticas de triglicérides em relação ao grupo C. Todos os grupos que receberam suplementação com os extratos bruto tiveram uma redução significativa nas concentrações de triglicérides em relação ao HC. Observou-se inclusive uma redução significativa nas concentrações de triglicérides no grupo que recebeu dieta HC suplementada com extrato bruto de *S. brasiliensis* na dose de 200 mg/Kg/dia em relação ao grupo controle (Figura 21).



**Figura 21: Triglicérides (mg/dL)** de animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidratos (HC), dieta HC suplementada com 100 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSI) e *H. salsaparilha* (HCHI) e dieta HC suplementada com 200 mg/Kg/dia de extrato bruto de *S. brasiliensis* (HCSII) e *H. salsaparilha* (HCHII). \* $p < 0,05$  vs C; \*\* $p < 0,01$  vs HC; \*\*\* $p < 0,001$  vs HC; # $p < 0,01$  vs C.

## 5. DISCUSSÃO

O nome “Salsaparrilha” é atribuído na medicina tradicional brasileira à espécies de gêneros diferentes, principalmente *Smilax* e *Herreria*. O uso de suas raízes, pelos Ameríndios, incentivou os navegadores europeus do século XV a levarem a planta para a Europa, sendo recomendadas desde aquela época como “depurativa do sangue” e fortificante, além de diuréticas e sudoríficas. Neste estudo, ficou demonstrado que as espécies *Smilax brasiliensis* e *Herreria salsaparilha* (endêmicas do Brasil) possuem grande potencial hipolipidêmico.

Camundongos BALB/c receberam, inicialmente, apenas dieta rica em carboidratos simples (HC). Após 8 semanas, já foi possível verificar alterações metabólicas no mesmo modelo animal (ALMEIDA, 2011 e OLIVEIRA, 2012). Iniciou-se então, o tratamento com duas diferentes doses do extrato bruto das raízes de *S. brasiliensis* e das raízes de *H. salsaparilha*. Esse tratamento foi realizado durante quatro semanas, com o objetivo de verificar se os extratos influenciariam nos parâmetros metabólicos observados anteriormente.

As doses escolhidas para os ensaios farmacológicos basearam-se nos resultados de um estudo do perfil lipídico realizados com as raízes de *Smilax chinensis* (L.) (VENKIDESH *et al.*, 2010). Isto foi feito tendo em vista que as espécies do gênero *Smilax* apresentam similaridade química, e que não existem, na literatura científica, qualquer estudo farmacológico com *S. brasiliensis*. O mesmo foi feito para *H. salsaparilha*, porque essas também contém saponinas. VENKIDESH *et al.* usaram as doses de 200 e 400mg/ Kg de peso/dia. Neste estudo, a dose de 200mg/ Kg de peso/dia já apresentou resultado positivo. Foi usada também a dose de 100mg/ Kg de peso/dia, com o objetivo de verificar a amplitude da atividade observada.

Estudos têm demonstrado que uma alimentação em longo prazo com dieta rica em carboidratos (especialmente açúcares refinados), está associada ao aumento de adiposidade visceral, excessiva produção de mediadores pró-inflamatórios, menor tolerância oral à glicose, baixa sensibilidade à insulina e dislipidemia (FRIED & RAO, 2003; FORTINO *et al.*, 2007; LASKER *et al.*, 2008; ROBERT *et al.*, 2008; FERREIRA

et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Corroborando com dados da literatura, no presente estudo, os animais alimentados com a dieta HC apresentaram aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da adiposidade visceral e concentrações significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) de glicose, colesterol total e triglicérides plasmáticos.

A natureza dos macronutrientes presentes na dieta, assim como a quantidade calórica consumida, influenciam fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento de doenças crônicas como a obesidade, a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares (FORTINO et al., 2007; ROBERT et al., 2008; BRESSAN et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Assim, é de fundamental importância considerar a natureza de todos os componentes presentes na dieta e observar o efeito dos mesmos na saúde.

No presente estudo, a dieta padrão, recebida pelos animais do grupo controle, continha carboidratos complexos e gorduras de fonte vegetal. A dieta HC foi composta pela ração padrão, acrescida de açúcar e leite condensado. Já as dietas HCSI, HCSII, HCHI e HCHII eram compostas pela dieta HC suplementadas com duas diferentes doses dos extratos das plantas estudadas. Sabe-se que, um fluxo excessivo de carbonos oriundos de carboidratos (glicose, frutose, lactose, etc) pode ser transformado em gordura, por meio do processo biológico denominado lipogênese de novo (PARKS, 2002). O aumento considerável da lipogênese acarreta no desenvolvimento de dislipidemias e no acúmulo de gordura corporal (PARKS, 2002; UYEDA et al., 2002).

A prevenção e o tratamento das dislipidemias devem envolver, principalmente, mudanças de hábitos alimentares, exercícios físicos e combate ao tabagismo. Recomenda-se dieta pobre em colesterol e gorduras saturadas, e a redução de carboidratos simples para pacientes dislipidêmicos (DUARTE, 2012). Já com relação à atividade física, é recomendada a prática de exercícios aeróbicos, de três a seis vezes por semana, em sessões de duração de 30 a 60 minutos (SPOSITO et al., 2007). Diversos estudos de meta-análise e revisão demonstram a importância da dieta e dos exercícios físicos para a melhora das concentrações lipídicas (DUARTE, 2012).

Não havendo controle desejável das concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides, a IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose



(2007) preconiza o uso de estatinas em pacientes hipercolesterolêmicos, e fibratos em pacientes hipertrigliceridêmicos. Uma terapia combinada, com estatinas e fibratos, também vem sendo utilizada em ensaios clínicos. Entretanto, é necessário cautela na utilização de estatinas devido à quantidade e severidade dos efeitos adversos das mesmas (DUARTE, 2012). Nesse contexto, fornecer substâncias naturais bioativas, na forma de nutracêuticos, pode representar uma alternativa terapêutica interessante para auxiliar no tratamento e prevenção das dislipidemias.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), desde a década de 70, reconhece a importância das plantas medicinais como recurso terapêutico e vem estimulando o desenvolvimento de medicamentos e a sua inclusão nos serviços de saúde. Em 2002, a OMS editou um documento onde reconhece que aquelas plantas utilizadas há séculos são importantes e devem ser aproveitadas, mas precisam passar por processos biotecnológicos de validação. Para que a planta ou seus produtos sejam validados, é necessário que a atividade farmacológica e ausência de toxicidade sejam atestadas, por meio de estudos em laboratório (BRANDÃO et al., 2010).

Muitos extratos de plantas, em diversas partes do mundo, já foram testados e tiveram seus efeitos comprovados como antioxidantes, hipoglicemiantes e redutores das concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides. Esses efeitos foram atribuídos às substâncias químicas presentes em diversas plantas, dentre elas, principalmente, as saponinas e as substâncias fenólicas (GEE & JOHNSON, 1988; KANG et al., 1995; NAKAMURA et al., 1999; MATSUURA, 2001; HAN et al., 2006; CHEN & LI, 2007; SON et al., 2007; AFROSE et al., 2009; REN et al., 2009; VISAVADIYA & NARASIMHACHARYA, 2009; AFROSE et al., 2010; EU et al., 2010; GONG et al., 2010; UEMURA et al., 2011). Como forma de contribuir para o melhor conhecimento das potencialidades da flora brasileira, no presente estudo, foi avaliado o potencial do extrato bruto das raízes de *Smilax brasiliensis* Spreng. e *Herreria salsaparilha* Mart. na prevenção e tratamento de dislipidemias. Essas plantas são espécies endêmicas do Brasil e popularmente conhecidas como salsaparrilhas. Diversos livros e estudos etnofarmacológicos atribuem às raízes de salsaparrilhas a capacidade “depurativa”.

O termo “depurativo” é largamente utilizado em estudos etnofarmacológicos e pela população em geral. Atualmente, na medicina, esse termo se refere ao conceito de

diálise, processo de extração dos produtos residuais e do excesso de água do corpo. Entretanto, em etnofarmacologia, “depurativo” é frequentemente utilizado para indicar plantas medicinais com efeitos diuréticos, laxantes, hipoglicêmicos e hipolipidêmicos. Nesse estudo, tratou-se por “depurativo” a capacidade de reduzir as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol e triglicérides, tendo em vista que as Famílias botânicas das salsaparrilhas possuem elevado teor de saponinas, substâncias com reconhecida capacidade hipolipemiante.

As análises químicas das raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* evidenciaram a presença tanto de saponinas como de flavonoides. Os resultados da análise da CCD para saponinas do EBS e EBH evidenciaram a presença de várias bandas características para essas substâncias. Os perfis cromatográficos em CCD para flavonoides mostram que o EBS e suas frações são ricos em ácidos fenólicos do tipo ácido clorogênico. Os resultados obtidos por CLAE do EBS e EBH apresentaram diversos picos cujos espectros no UV indicam absorção característica de saponinas. Na CLAE do EBS, os espectros no UV apresentaram também absorção característica de substâncias fenólicas do tipo chalconas, precursores na via biossintética de flavonoides.

No que se refere à *S. brasiliensis*, os resultados das análises químicas estão de acordo com o estudo de MARTINS (2009), que avaliou três espécies nativas do Brasil de *Smilax* (*S. brasiliensis*, *S. cissoides* e *S. polyantha*) e demonstrou que elas são constituídas por uma mistura complexa de substâncias fenólicas, flavonoides e saponinas. Outros estudos com os extratos metanólicos da raiz, rizóforos e folhas das espécies *S. campestris*, *S. fluminensis* e *S. syphilitica*, analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também revelaram a presença de diversas substâncias. No entanto, nesses estudos, somente os picos correspondentes ao ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico foram identificados (MARTINS, 2009; SILVA, 2010; SOARES, 2010). Já com relação à *H. salsaparilha*, não foram encontrados, na literatura científica, estudos sobre o perfil químico da espécie e, tampouco, do gênero *Herreria*.

As análises químicas, tanto em CCD quanto em CLAE, demonstraram diferenças entre as espécies, *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*. A CCD do EBS demonstrou a

presença de ácido clorogênico, o que não foi observado no EBH. Na CLAE do EBS não foi observado qualquer divisão de substâncias pelo tempo de retenção ( $T_R$ ), enquanto que no cromatograma do EBH é possível observar dois grupos de substâncias de  $T_R$  diferentes ( $T_R$  inferiores a 12 min e  $T_R$  superiores a 22 min). Tendo em vista que essas duas plantas são conhecidas pelo mesmo nome popular (salsaparrilhas), essas análises são de fundamental importância para o controle de qualidade das mesmas.

O extrato bruto de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* foram suplementados à dieta HC para avaliar seu potencial sobre os parâmetros metabólicos característicos de uma dieta rica em carboidratos simples. Os extratos brutos caracterizam-se por uma mistura complexa de substâncias bioativas, em baixas concentrações. A suplementação com os extratos brutos objetivou observar a atuação dos mesmos como futuros produtos nutracêuticos.

Não foi observada diferença significativa nos pesos corporais entre os grupos estudados. Entretanto, os animais alimentados com a dieta HC, em relação aos animais controle, apresentaram índice de adiposidade significativamente maior ( $p < 0,01$ ) e hipertrofia dos adipócitos, evidenciado pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da área das células adiposas. A maior adiposidade desses animais está relacionada, possivelmente, com a composição nutricional da dieta, rica em carboidratos refinados. Os grupos de animais que receberam dieta HC suplementada com extrato bruto de *S. brasiliensis* e de *H. salsaparilha* nas doses de 100 mg/Kg de peso/dia, apresentaram índice de adiposidade semelhantes ao grupo controle. Entretanto, os grupos que receberam a dosagem superior (200 mg/Kg de peso/dia) dos dois extratos, apresentaram índice de adiposidade semelhante ao grupo HC. Já com relação à área dos adipócitos, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no grupo que recebeu a maior dosagem (200 mg/Kg de peso/dia) do extrato bruto de *S. brasiliensis* em relação ao grupo HC. Isso pode ser devido ao fato das espécies de *S. brasiliensis* apresentarem espectros no UV condizentes com substâncias fenólicas. Recentemente, estudos têm demonstrado que diversos flavonoides possuem efeitos anti-hipertroficantes dos adipócitos, através da regulação de diferentes ações (MIYATA et al., 2011). Adipócitos hipertrofiados desencadeiam maior produção de espécies reativas de oxigênio, aumento de ácidos graxos livres e

citocinas pró-inflamatórias no plasma, aumentando a resistência à insulina e risco de DCV (CHAWLA et al., 2011).

Neste estudo, os animais que receberam dieta HC tiveram ingestão alimentar significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o grupo controle, e todos os animais que receberam suplementação com os extratos brutos tiveram ingestão alimentar ainda maior. É importante observar que, apesar do consumo alimentar ter sido maior nos grupos HCSI, HCSII, HCHI e HCHII com relação ao grupo controle, esses não apresentaram peso corporal superior aos demais grupos. O grupo HC apresentou concentrações de glicose em jejum significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) ao grupo controle. Já os grupos que receberam dieta HC suplementada com a maior dose dos extratos (HCSII e HCHII), tiveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de glicose comparadas ao grupo HC.

No presente estudo, os animais alimentados com dieta HC apresentaram valores séricos de colesterol total e triglicérides elevados ( $p < 0,05$ ), em relação aos alimentados com dieta controle. Já os grupos que receberam a dieta HC suplementadas com os extratos brutos das plantas estudadas tiveram uma melhora muito representativa no perfil lipídico dos animais. Como discutido anteriormente, uma alimentação em longo prazo com dieta rica em carboidratos simples, está associada à dislipidemia e esta, é fator de risco para DCV (PARKS, 2002; UYEDA et al., 2002; FORTINO et al., 2007; ROBERT et al., 2008; BRESSAN et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Os grupos HCSII e HCHII tiveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de colesterol total comparadas ao grupo HC. Com relação às concentrações plasmáticas de triacilglicerol, todos os grupos que receberam os extratos brutos tiveram uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) comparados ao grupo HC. Observou-se inclusive uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) nas concentrações de triglicérides no grupo HCSII em relação ao grupo controle. Isso demonstra que a dieta HC, suplementada com a maior dose do extrato bruto de *S. brasiliensis*, foi ainda mais eficiente do que a dieta controle.

Para avaliar se os tratamentos com os extratos brutos de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha* poderiam estar levando a algum dano hepático, foi avaliado o peso do fígado destes animais. A hepatotoxicidade pode ser verificada pelo peso do fígado,

pois uma das primeiras manifestações da sua lesão é o acúmulo de gorduras, via inibição da secreção de triglicerídeos (CHAN et al., 2010). Os resultados demonstram que não houve aumento do peso do fígado em nenhum dos tratamentos e estudo morfológico também não constatou alterações microscópicas significativas no fígado dos animais sacrificados ao final do experimento. As lâminas histológicas do fígado de todos os animais estudados não apresentaram sinais de hepatotoxicidade.

Após a verificação dos efeitos benéficos dos extratos das plantas estudadas, é de fundamental importância identificar quais as possíveis substâncias bioativas presentes nesses extratos, que são os responsáveis pelos efeitos benéficos observados. Muitos estudos relatam o potencial de extratos ricos em substâncias fenólicas no tratamento das alterações do metabolismo de glicose. Diversos mecanismos são propostos, dentre eles, o estímulo da liberação de insulina e a inibição de enzimas, como  $\alpha$ -glicosídeos e  $\alpha$ -amilases, envolvidas no metabolismo de glicose (TAPAS et al., 2008; PEREIRA et al., 2011; KAPPEL et al., 2012; LUYEN, 2013).

Outra classe de substâncias químicas que demonstram efeitos benéficos à saúde são as saponinas. Diversos estudos relatam a capacidade dessas substâncias de complexar com esteróides, formando um complexo insolúvel. Quando na luz do intestino, elas são capazes de promover uma redução nos níveis plasmáticos de colesterol. Diversos autores relatam a capacidade hipocolesterolêmica das saponinas, dentre eles, CHEEKE (1971), SIDHU & OAKENFULL (1986), GEE & JOHNSON (1988), HARWOOD et al. (1993), SAVAGE (1993), MILGATE & ROBERTS (1995), MATSUURA (2001), OAKENFULL (2001), SHIGEMATSU et al. (2001a; 2001b), FRANCIS et al. (2002), SCHENKEL et al. (2002), SPARG et al. (2004), LI et al. (2008), SUN et al. (2009), AFROSE et al. (2010), EU et al. (2010), SANTOS et al. (2012) e WANG et al. (2012). E diversos autores também relatam a capacidade das saponinas na redução dos triglicérides (SHIGEMATSU et al., 2001a/2001b, EBAID et al., 2006; HAN et al., 2006; LI et al., 2008; AFROSE et al., 2010; EU et al., 2010, UEMURA et al., 2011, SANTOS et al., 2012, WANG et al., 2012).

Diante desta correlação, apontada pela literatura, entre as substâncias fenólicas e saponinas, e seus potenciais de ação no tratamento e prevenção de dislipidemias, e diminuição da glicemia, sugere-se que os mesmos efeitos observados neste estudo devem-se à presença dessas substâncias nos EB de *S. brasiliensis* e de *H. salsaparilha*. A identificação exata das substâncias bioativas responsáveis pelos efeitos observados exige a realização de novos estudos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os extratos brutos das raízes de *S. brasiliensis* e de *H. salsaparilha* apresentam potencial na prevenção e tratamento de dislipidemias, de forma dose-dependente. Os efeitos observados (diminuição das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol e triglicérides) estão correlacionados à presença de substâncias fenólicas e saponinas nas raízes de *S. brasiliensis* e *H. salsaparilha*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFROSE, S.; HOSSAIN, M.S.; MAKI, T.; TSUJII, H.. **Karaya root saponin exerts a hypocholesterolemic response in rats fed a high-cholesterol diet.** Nutrition Research 29, 350–354, 2009.
- AFROSE, S.; HOSSAIN, M.S.; SALMA, U.; MIAH, A.G.; TSUJII, H.. **Dietary karaya saponin and *Rhodobacter capsulatus* exert hypocholesterolemic effects by suppression of hepatic cholesterol synthesis and promotion of bile acid synthesis in laying hens.** Cholesterol, vol. 2010, 7p., 2010. doi:10.1155/2010/272731.
- ALICE, C.B.; VARGAS, V.M.F.; SILVA, G.A.A.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; SCHAPOVAL, E.E.S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J.A.P.; HENRIQUES, A.T.. **Screening of plants used in South Brazil folk medicine.** Journal of Ethnopharmacology, 35(2), 165-171, 1991.
- ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. **Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT).** The Journal of the American Medical Association (JAMA), v. 288, n.23, p. 2998–3007, 2002.
- ALMEIDA, J.M.A. **Potencial das folhas de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth (Rubiaceae) no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas induzidas por dieta em camundongos Balb/c.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2011. 119p.
- ANDREATA, R.H.P.. Smilacaceae. In: FORZZA, R.C. *et al.* **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**, Volume 2. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- ANDREATA, R.H.P. 2009. **A New Species of *Smilax* and a Key to All Species from Minas Gerais, Brazil.** Systematic Botany, v.34, n.1, p.28-31, 2009.
- ANDREATA, R.H.P.. **Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae).** Pesquisas, Botânica 47: 5-243, 1997.
- AVIRAM, M. **Flavonoids-rich nutrients with potent antioxidante activity prevent atherosclerosis development: the licorice example.** International Congress Series, v.1262, p.320-327, 2004.
- BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica.** 17 ed. São Paulo: Edições "A Edificação do Lar", p. 919, 1974.



- BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; AREAS, J.A.G. **Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade.** Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v.53, n.5, p.646-656, 2009.
- BELHOUCHE, Z.; SAUTOUR, M.; MIYAMOTO T.; LACAILLE-DUBOIS, M.-A. **Steroidal saponins from the roots of *Smilax aspera* subsp. mauritanica.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.56, n.9, p.1324–1327, 2008.
- BERNARDO, R.R.; PINTO, A.V.; PARENTE, J.P. **Steroidal saponins from *Smilax officinalis*.** Phytochemistry, v.43, n.2, p.465-469, 1996.
- BLADES, M. **Functional food or nutraceuticals.** Nutrition & Food Science, n. 2, v. 30, p. 73-75, 2000.
- BORÉM, R.A.T.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. **Fitossociologia do estrato arbóreo em uma topossequência alterada de mata atlântica, no município de Silva Jardim-RJ, Brasil.** Revista Árvore 26(6): 727-742, 2002.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: Especialmente do Ceará.** 2 ed., 540p., Fortaleza. Imprensa Oficial, 1960.
- BRANDÃO, M.G.L.; PAULA-SOUZA, J.; GRAEL, C.F.F.; SCALON, V.; SANTOS, A.C.P. **Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais.** Anais do XIV Seminário sobre a Economia Mineira, 2010.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Décima Conferência das Partes (Cop 10), Biodiversidade no Brasil.** Nagoya, Japão, 2010.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 154, de 01 de março de 2007. **Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - Sisbio.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 02 mar. 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. **Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou saúde em sua rotulagem.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 03 dez. 1999.
- BRAVO, L. **Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance.** Nutrition Reviews, v.56, n. 11, p.317-333, 1998.
- BREITBACH, U.B.; NIEHUES, M.; LOPES, N.P.; FARIA, J.E.Q.; BRANDÃO, M.G.L. **Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century.** Journal of Ethnopharmacology, v. 147, n.1, p.180–189, 2013.
- BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H.H.M.; ZULET, M.A.; MARTÍNEZ; J.A. **Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em**

- padrões alimentares e fatores dietéticos específicos.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v.53, n.5, p.572-581, 2009.
- BRIDSON, D.; FORMAN, L. **The herbarium: handbook.** 3 ed., Royal Botanic Gardens, Kew, 334 p., 1999.
- CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos funcionais.** Uma revisão. Boletim da SBCTA. v.29, n.2, p.193- 203, 2005.
- COLHOUN, H.M.; BETTERIDGE, D.J.; DURRINGTON, P.N.; HITMAN, G.A.; NEIL, H.A.W.; LIVINGSTONE, S.J.; THOMASON, M.J.; MACKNESS, M.I.; CHARLTON-MENYS, V.; JOHN H FULLER, J.H. **Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial.** The Lancet, v.364, p.685–696, 2004.
- CHALLINOR, V.L.; PARSONS, P.G.; CHAP, S.; WHITE, E.F.; BLANCHFIELD, J.T.; LEHMANN, R.P.; JAMES J. DE VOSS, J.J. **Steroidal saponins from the roots of Smilax sp.: Structure and bioactivity.** Steroids, v.77, p.504-511, 2012.
- CHAN, Y.C.; CHANG, S.C.; LIU, S.Y.; YANG, H.L.; HSEU, Y.C.; LIAO, J.W. **Beneficial effects of yam on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v.1, p.161-167, 2010.
- CHAWLA, A.; NGUYEN, K.D.; GOH, Y.P.S. **Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease.** Nature Reviews Immunology, v.11, n.11, p.738-749, 2011.
- CHEEKE, P.R. **Nutritional and physiological implications of saponins: a review.** Canadian Journal of Animal Science, . 51: p.621-632, 1971.
- CHEN, J.; LI, X. **Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice.** Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16 (Suppl 1): p.290-294, 2007.
- COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia: Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia.** 1 ed. Rio de Janeiro: Edição de Carlos da Silva Araújo, S.A., 1942.
- CORETTE-PASA, M. **Abordagem etnobotânica na comunidade de Conceição-Açu. Mato Grosso, Brasil.** Polibotânica, n. 31, pp. 169-197, México, 2011.
- CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil.** 1ª ed., Volume 2, p. 427-864, Belo Horizonte, 1965.
- CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil,** Civilização Brasileira S.A, 1982.
- DEBENEDETTI, S.; MIÑO, J.; ROJO, A.; ACEVEDO, C.. **Ensayo del Efecto Diurético de los Extractos Acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill.**

**Ex Hicken, *Bauhinia candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb.** Acta Farnz. Bonaerense, 19 (1): 17-20, 2000.

DINIZ, L.R.L.. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a função renal.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2006.

DOWNS, J.R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S.; WHITNEY, E.; SHAPIRO, D.R.; BEERE, P.A.; LANGENDORFER, A.; STEIN, E.A.; KRUYER, W.; GOTTO, A.M. **Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels.** The Journal of the American Medical Association (JAMA), v. 279, n.20, p. 1615–1622, 1998.

DUARTE, J.G. **Avaliação farmacoeconômica e epidemiológica das terapias hipolipemiantes.** 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 2012.

EBAID, G.M.X.; FAINE, L.A.; DINIZ, Y.S.; RODRIGUES, H.G.; GALHARDI, C.M.; RIBAS, B.O.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. **Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake.** Food and Chemical Toxicology, v.44, n.2, p. 293–299, 2006.

EU, C.H.A.; LIM, W.Y.A.; TON, S.H.; KADIR, K.A. **Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats.** Lipids in Health and Disease, v.9, n.81, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERREIRA, A.V.M.; MARIO, E.G.; PORTO, L.C.J.; ANDRADE, S.P.; BOTION, L.M. **High-Carbohydrate Diet Selectively Induces Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Mice Liver.** Inflammation, v. 34, n. 2, p.130-145, 2011.

FERREIRA, I.C.F.S; VARGAS, V.M.F.. **Mutagenicity of Medicinal Plant Extracts in *Salmonella* / microsome Assay.** Phytother. Res. 13, 397–400, 1999.

FORTINO, M.A.; LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A. **The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model.** Nutrition, v.23, p.489–497, 2007.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. **The biological action of saponins in animal systems: a review.** British Journal of Nutrition, 88, 587-605, 2002.

FRIED, S.K.; RAO, S.P. **Sugar, hypertriglyceridemia and cardiovascular disease.** The American Journal of Clinical Nutrition, v.78, p.S873-S880, 2003.

- GARCÍA, A. A.; CARRIL, E.P.U. **Metabolismo secundário de plantas**. Reduca (Biología), v.2, n.3, p.119-145, 2009.
- GARLET, T.M.B.; IRGANG, B.E. **Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.4, n.1, p.9-18, 2001.
- GEE, J.M.; JOHNSON, I.T. **Interactions between hemolytic saponins, bile salts and small intestinal mucosa in the rat**. The Journal of Nutrition, n.118, p. 1391-1397, 1988.
- GHEDINI, P.C.; DORIGONI, P.A.; ALMEIDA, C.E.; ETHUR, A.B.M.; LOPES, A.M.V.; ZÁCHIA, R.A. **Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS. II – Emprego de preparações caseiras de uso medicinal**. Rev. bras. Plantas medicinais, Botucatu, v.5, n.1, p.46-55, 2002.
- GONG, G.; QIN, Y.; HUANG, W.; ZHOU, S.; WU, X.; YANG, X.; ZHAO, Y.; LI, D. **Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis**. Chemico-Biological Interactions. v.184, n.3, p.366-375, 2010.
- HAN, L.-K.; NOSE, R.; LI, W.; GONG, X.-J.; ZHENG, Y.-N.; YOSHIKAWA, M.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. **Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from *Kochia scoparia* Fruit**. Phytotherapy Research. v.20, p. 877–882, 2006.
- HARWOOD JR., H.J.; CHANDLER, C.E.; PELLARIN, L.D.; BANGERTER, F.W.; WILKINS, R.W.; LONG, C.A.; COSGROVE, P.G.; MALINOW, M.R.; MARCETTA, C.A.; PETTINI, J.L.; SAVOY, Y.E.; MAYNE, J.T. **Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin b-tigogenin cellobioside (CP-88818; tiqueside)**. Journal of Lipid Research. v. 34, p. 377–395, 1993.
- HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP. **MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial**. The Lancet, v. 360, n. 9326, p. 7–22, 2002.
- HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. **Nutraceutical production with food-grade microorganisms**. Current Opinion in Biotechnology., v.13, p.497-507, 2002.
- IPNI - *The International Plant Names Index*, 2011. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. Artmed, Porto Alegre, 2009.

- KANG, S.Y.; KIM, S.H.; SCHINI, V.B.; KIM, N.D. **Dietary Ginsenosides Improve Endothelium-dependent Relaxation in the Thoracic Aorta of Hypercholesterolemic Rabbit.** *General Pharmacology*, v.26, n.3, p. 483-487, 1995.
- KAPPEL, V.D.; PEREIRA, D.F.; CAZAROLLI, L.H.; GUESSER, S.M.; SILVA, C.H.B.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; SILVA, F.R.M.B. **Short and Long-Term Effects of *Baccharis articulata* on Glucose Homeostasis.** *Molecules*, v.17, n.6, p.6754-6768, 2012.
- KHADEM, S.; MARLES, R.J. **Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies.** *Molecules*, v.15, p.7985-8005, 2010.
- KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. **Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer.** *The American Journal of Medicine*, v.113 (9B), p.71S-88S, 2002.
- LASKER, D.A.W.; EVANS, E.M.; LAYMAN, D.K. **Moderate carbohydrate, moderate protein weight loss diet reduces cardiovascular disease risk compared to high carbohydrate, low protein diet in obese adults: A randomized clinical trial.** *Nutrition & Metabolism*, v.5, n.30, 2008.
- LI, H.; WANG, Q.-J.; ZHU, D.-N.; YANG, Y. **Reinioside C, a triterpene saponin of *Polygala aureocauda* Dunn, exerts hypolipidemic effect on hyperlipidemic mice.** *Phytotherapy Research*. v.22, p. 159–164, 2008.
- LOPES, C.V.G. **O conhecimento etnobotânico da comunidade quilombola do Varzeão, Dr. Ulysses (PR): no contexto do desenvolvimento rural sustentável.** 2010. 75 p. Tese (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- LOPES, R.C.; PIRANI, J.R.. Agavaceae. In: FORZZA, R.C. *et al.* **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**, Volume 1. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- LORENZI, H; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2ª edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 544 p., 2008.
- LUYEN, N.T.; TRAM, L.H.; HANH, T.T.H.; BINH, P.T.; DANG, N.H.; MINH, C.V.; DAT, N.T. **Inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and lipase from *Chrysanthemum morifolium*.** *Phytochemistry Letters*, v.6, n.3, p.322–325, 2013.
- MANGANELLI, R.E.U.; TOMEI, P.E. **Ethnopharmacobotanical studies of Tuscan Archipelago.** *Journal of Ethnopharmacology*, 65, p. 181-202, 1999.
- MARCIANTE, K.D.; DURDA, J.P.; SUSAN R. HECKBERT, S.R.; LUMLEY, T.; RICE, K.; MCKNIGHT, B.; TOTAH, R.A.; TAMRAZ, B.; KROETZ, D.L.; FUKUSHIMA,

- H.; KASPERA, R.; BIS, J.C.; GLAZER, N.L.; LI, G.; AUSTIN, T.R.; TAYLOR, K.D.; ROTTER, J.I.; JAQUISH, C.E.; KWOK, P-Y.; TRACY, R.P.; PSATY, B.M. **Cerivastatin, Genetic Variants, and the Risk of Rhabdomyolysis.** *Pharmacogenet Genomics*, v. 21, n. 5, p. 280–288, 2011.
- MARQUES, M.B. **Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil.** *Revista História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 7(1): 07-21, 2000.
- MARTINS, A.R. **Morfoanatomia, germinação e perfil químico de espécies de *Smilax* L. (Smilacaceae).** 2009. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2009.
- MATSUURA, H. **Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease.** *The Journal of Nutrition*, v.131, n.3, p.1000S-1005S, 2001.
- MEDEIROS, M.F.; VALLE, L.S.; ANDREATA, R.H.P. **Histórico e o uso de “Salsa parrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento.** *Revista Brasileira de Biociências*. Porto Alegre, 5(1): 27-29, 2007.
- MILGATE, J.; ROBERTS, D.C.K. **The nutritional and biological significance of saponins.** *Nutrition Research*. v. 15, n. 8, p. 1223-1249, 1995.
- MIYATA, Y.; TANAKA, H.; SHIMADA, A.; SATO, T.; ITO, A.; YAMANOUCHI, T.; KOSANO, H. **Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin.** *Life Sciences*, v.88, n.13-14, p.613-618, 2011.
- MLADĚNKA, P.; ZATLOUKALOVÁ, L.; FILIPSKÝ, T.; HRDINA, R. **Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity.** *Free Radical Biology & Medicine*, v.49, n.6, p.963–975, 2010.
- MOBOT - *Missouri Botanical Garden*, 2011. Banco de dados. Disponível em <<http://www.mobot.org>>.
- MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição e propriedades.** São Paulo, Hemus. 555p., 1982.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature* 403(6772): 853-858, 2000.
- NAKAMURA, Y.; TSUMURA, Y.; TONOGAI, Y.; SHIBATA, T. **Fecal Steroid Excretion Is Increased in Rats by Oral Administration of Gymnemic Acids Contained in *Gymnema sylvestre* Leaves.** *The journal of Nutrition*, v.129, n.6, p.1214-1222, 1999.
- NDINDJOCK, R.; GEDEON, J.; MENDIS, S.; PACCAUD, F.; BOVET, P. **Potential impact of single-risk-factor versus total risk management for the prevention of cardiovascular events in Seychelles.** *Bulletin of the World Health Organization*, 89:286-295, 2011.

- NEGRELLE, R.R.B.; FORNAZZARI, K.R.C. **Estudo etnobotânico em duas comunidades rurais (Limeira e Ribeirão Grande) de Guaratuba (Paraná, Brasil)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.9, n.2, p.36-54, 2007.
- NEVES, E.S. **Introdução ao levantamento da flora medicinal de Rondônia**. Porto Velho, 1980.
- OAKENFULL, D. **Soy Protein, Saponins and Plasma Cholesterol the American Society of Nutritional Sciences**. The Journal of Nutrition, [S.l.], n.131, p.2971, 2001.
- OLESZEK, W.A. **Chromatographic determination of plant saponins**. Journal of Chromatography A, v.967, n.1, p. 147-162, 2002.
- OLESZEK, W.A.; BIALY, Z.. **Chromatographic determination of plant saponins – An update (2002-2005)**. Journal of Chromatography A, 1112:78-91, 2006.
- OLIVEIRA, M.C.; MENEZES-GARCIA, Z.; HENRIQUES, M.C.C.; SORIANI, F.M.; PINHO, V.; FARIA, A.M.C.; SANTIAGO, A.F.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, A.V.M. **Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice**. Obesity, 2013. doi: 10.1002/oby.20230.
- OLIVEIRA, V.B. **Potencial dos frutos de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos Balb/c**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2012. 135p.
- PARIS, R.; VAILLANT, M.; BENARD, M. **The saponosides of two sarsaparilla plants (*Smilax ornata* Lem. and *Smilax japicanga* Griseb.) used against leprosy**. Annales Pharmaceutiques Françaises, 10(5): 328-335, 1952.
- PARKS, E.J. **Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations**. British Journal of Nutrition, v.87, p.S247-S253, 2002.
- PEIXOTO, M.P.G.. **Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): Desenvolvimento de metodologia analítica, estudo físico-químico e biológico**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- PEREIRA, D.F.; CAZAROLLI, L.H.; LAVADO, C.; MENGATTO, V.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; GUEDES, A.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. **Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis**. Nutrition, v.27, n.11-12, p.1161-1167, 2011.
- PINTO, G.; CAIRA, S.; CUOLLO, M.; LILLA, S.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. (2012). **Bioactive Casein Phosphopeptides in Dairy Products as Nutraceuticals for Functional Foods, Milk Protein**. Dr. Walter Hurley (Ed.): InTech, 2012.

- REN, N.; KAPLAN, R.; HERNANDEZ, M.; CHENG, K.; JIN, L.; TAGGART, A.K.P.; ZHU, A.Y.; GAN, X.; WRIGHT, S.D.; CAI, T.-Q. **Phenolic acids suppress adipocyte lipolysis via activation of the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74a/PUMA-G)**. *Journal of Lipid Research*, v.50, n.5, p.908-914, 2009.
- ROBBINS, R.J. **Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.2866-2887, 2003.
- ROBERT, L.; NARCY, A.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A.; RÉMÉSY, C. **Lipid Metabolism and Antioxidant Status in Sucrose vs. Potato-Fed Rats**. *Journal of the American College of Nutrition*, v.27, n.1, p.109–116, 2008.
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais**. *Rev. bras. Plantas medicinais, Botucatu*, v. 9, n.2, p.17-35, 2007.
- SANTOS, J.E.; GUIMARÃES, A.C.; DIAMENT, J. **Consenso Brasileiro sobre dislipidemias: detecção, avaliação e tratamento**. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia*, v.43, n.4, 1999.
- SANTOS, F.A.; FROTA, J.T.; ARRUDA, B.R.; MELO, T.S.; SILVA, A.A.C.S.; BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S. **Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice**. *Lipids in Health and Disease*, v.11, n.98, 2012.
- SARKAR, S. **Functional foods as self-care and complementary medicine**. *Nutrition & Food Science*, n. 3, v. 37, p. 160-167, 2007.
- SAVAGE, G.P. Saponins. In: MACRAE, R.; ROBINSON, R.K.; SADLER, M.J. (Ed.). **Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**. Volume 8, London: Academic Press, 1993.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L.. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.
- SHEPHERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; MACFARLANE, P.W.; MCKILLOP, J.H.; PACKARD, C.J. **Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia**. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *The New England Journal of Medicine*. v.333, n.20, p.1301–1307, 1995.
- SHIGEMATSU, N.; ASANO, R.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. **Effect of administration with the extract of *Gymnema sylvestre* R. Br leaves on lipid metabolism in rats**. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v.24, n.6, p.713–717, 2001a.



- SHIGEMATSU, N.; ASANO, R.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. **Effect of long term-administration with *Gymnema sylvestre* R. Br on plasma and liver lipid in rats.** Biological & Pharmaceutical Bulletin. v.24, n.6, p.643–649, 2001b.
- SIDHU, G.S.; OAKENFULL, D.G. **A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins.** British Journal of Nutrition, 55, 643-649, 1986.
- SILVA, J.M. **Anatomia e perfil químico de duas espécies do gênero *Smilax* L. (*Smilacaceae*).** 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 4<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.
- SOARES, A.N.. **Morfoanatomia, perfil químico e propagação de *Smilax fluminensis* Steud. (*Smilacaceae*).** 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- SOARES, S.E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** Revista de Nutrição, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
- SON, I.S.; KIM, J.H.; SOHN, H.Y.; SON, K.H.; KIM, J.-S.; KWON, C.-S. **Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.71, n.12, p.3063-3071, 2007.
- SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J. van. **Biological activities and distribution of plant saponins.** Journal of Ethnopharmacology, 94: 219-243, 2004.
- SPOSITO, A.C. et al. **IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.88, suppl.1, 2007.
- STEINHAGEN-THIESSEN, E.; BRAMLAGE, P.; LÖSCH, C.; HAUNER, H.; SCHUNKERT, H.; VOGT, A.; WASEM, J.; JÖCKEL, K.-H.; MOEBUS, S. **Dyslipidemia in primary care – prevalence, recognition, treatment and control: data from the German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS).** Cardiovascular Diabetology, v.7, n.31, 2008.
- SUN, H.-X.; XIE, Y.; YE, Y.-P. **Advances in saponin-based adjuvants.** Vaccine 27: 1787-1796, 2009.
- TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. **Flavonoids as Nutraceuticals: A Review.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 7, n.3, p.1089-1099, 2008.
- UEMURA, T.; GOTO, T.; KANG, M.-S.; MIZOGUCHI, N.; HIRAI, S.; LEE, J.-Y.; NAKANO, Y.; SHONO, J.; HOSHINO, S.; TAKETANI, K.; TSUGE, N.;

- NARUKAMI, T.; MAKISHIMA, M.; TAKAHASHI, N.; KAWAD, T. **Diosgenin, the Main Aglycon of Fenugreek, Inhibits LXRA Activity in HepG2 Cells and Decreases Plasma and Hepatic Triglycerides in Obese Diabetic Mice.** Journal of Nutrition, 141(1):17-23, 2011.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. 35<sup>a</sup> ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2012.
- UYEDA, K.; YAMASHITA, H.; KAWAGUCHI, T. **Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage.** Biochem. Pharmacol., v.63, n.12, p.2075-2080, 2002.
- VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. **Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, jan./dez. 2006.
- VENKIDESH, R.; MANDAL, S.C.; PAL, D.; LAKSHMI, M.S.; SARAVANAKUMAR, A. **Antidiabetic activity of *Smilax chinensis* (L.) in alloxan induced diabetic rats.** International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.2, n.2, 2010.
- VISAVADIYA, N.P.; NARASIMHACHARYA, A.V.R.L. **Asparagus Root Regulates Cholesterol Metabolism and Improves Antioxidant Status in Hypercholesteremic Rats.** Evidence-based Complementary Alternative Medicine, v.6, n.2, p.219-226, 2009.
- VLIETINCK, A.J; APERS, S. Biological Screening Methods in the Search for Pharmacologically Active Natural Products. In: TRINGALI, C. **Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterisation, and biological properties.** Taylor & Francis, 2001. Cap.01: p.1-3.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis.** 2<sup>a</sup> edição. Berlin, Spriger Verlag, p.73-93, 1996.
- WANG, T.; CHOI, R.C.Y.; LI, J.; BI, C.W.C.; RAN, W.; CHEN, X.; DONG, T.T.X.; BI, K.; TSIM, K.W.K. **Trillin, a steroidal saponin isolated from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*, exerts protective effects against hyperlipidemia and oxidative stress.** Journal of Ethnopharmacology, 139: 214-220, 2012.
- WONG, C.C.. **Isolation of saponins from *Solanum mammosum* and characterization of their anticancer activity by proteomics.** 2007. Dissertação (Mestrado em Filosofia) – University of Hong Kong, Hong Kong, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Cardiovascular diseases (CVDs).** Geneva: Fact sheet n° 317, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Health Observatory Data Repository.** Geneva, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk.** Geneva, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **The World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life.** Geneva, 2002.

XIA, X.; WENG, J. **Targeting metabolic syndrome: Candidate natural agents.** Journal of Diabetes, v.2, n.4, p.243–249, 2010.

ZANON, R.B. **Metabólitos secundários em *Vernonia tweedieana* Backer.** 2006. 180 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 4<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

## **8. ANEXOS**

# ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 33104-1	Data da Emissão: 15/02/2012 16:53
-----------------	-----------------------------------

### Dados do titular

Nome: Flávia Liparini Pereira	CPF: 085.397.257-54
-------------------------------	---------------------

### Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como o de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .

### Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
FAMILIA	Agavaceae
GENERO	Smilax

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 33617989**



## ANEXO II



0276770511396480

### AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010183/2013-2

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

**Instituição:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

**CNPJ:** 172.179.850/0001-04

**Representante Legal:** RENATO DE LIMA SANTOS

**Cargo/Função:** Pró-Reitor de Pesquisa

**CPF:** 071.522.838-26 **RG:** 178837088

**Projeto:** Documentação, recuperação e avaliação do potencial de plantas com histórico de uso tradicional"

**Coordenador do Projeto:** Maria das Gracas Lins Brandão

**CPF:** 343.750.584-04 **RG:** M1375127 - SSP-MG / MG

**Finalidade do projeto:** Esta proposta é uma continuidade das ações previstas no projeto aprovado no edital REFLORA, que tem como objetivo principal recuperar dados, imagens e amostras de plantas úteis nativas do Brasil, registradas por naturalistas Europeus que percorreram o país no século XIX. Os projetos são executados pela equipe do DATAPLAMT, é sediado nas dependências do Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG e na Faculdade de Farmácia. O DATAPLAMT é o único grupo de pesquisas do Brasil envolvido diretamente na linha de investigação do mundo envolvido diretamente com a linha da história natural das plantas úteis brasileiras. Informações sobre as plantas úteis são recolhidas da bibliografia e materiais botânicos históricos. A ocorrência das plantas está sendo mapeada, incluindo localização dos indivíduos (GPS) e caracterização genéticas (DNA-BARCODE). Partes das plantas usadas na preparação dos remédios serão submetidas identificação a partir de dados morfo-anatomia, a obtenção de perfil químico (TLC, CLAE, CG) e avaliação de atividades biológicas para as atividades proclamadas (antimaláricas, amebicida, antioxidante, diurética, hipocolesterolêmica, antiobesidade, antimicrobiana). Este projeto integra as atividades da Rede Temática CEEAA aprovado no edital SISBIOTA do CNPq.

#### Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): Espécies de plantas citadas por Auguste de Saint-Hilaire no século 19: (1) *Croton antisiphiliticus* Mart., (2) *Croton campestris* A.St.-Hil., (3) *Maprounea brasiliensis* A.St.-Hil., (4) *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil., (5) *Polyouratea hexasperma* (A.St.-Hil.) Baill., (6) *Oxalis cordata* A.St.-Hil., (7) *Remijia ferruginea* (A.St.-Hil.) DC., (8) *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook.f., (9) *Richardsonia rosea* A.St.-Hil., (10) *Spermacoce ferruginea* A.St.-Hil., (11) *Ticorea febrifuga* A.St.-Hil., (12) *Hortia brasiliensis* Vand. ex DC., (13) *Smilax brasiliensis*, (14) *Hemeria salsapamilha*, (15) *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A.Juss. ex Mart., (16) *Hybanthus poaya* (A.St.-Hil.) Baill., (17) *Abutilon sculentum*, (18) *Myrciaria aureana*, (19) *Brossimum gaudichadii*, (20) *Caladium striapes*, (21) *Canna glauca*, (22) *Abutilon esculentum*, (23) *Calyptanthes aromatica*, (24) *Rinorea laevigata*, (25) *Dioscorea trifida*, (26) óleo resina de *Copaifera*, (27) *Xylopia aromatica*, (28) *Rudgea viburnoides*.

Tipo de material/quantidade de amostras: exsicatas e amostras de drogas vegetais (partes das plantas usadas na preparação dos remédios) de cinco indivíduos.

**Local de depósito de subamostra:** NÃO INFORMADO

**Equipe do projeto:** MARIA DAS GRACAS LINS BRANDAO / CPF 343.750.584-04

VERENA BARTKOWIAK DE OLIVEIRA / CPF 066.191.226-47

FLAVIA LIPARINI PEREIRA / CPF 085.397.257-54

GUSTAVO PEREIRA COSENZA / CPF 040.627.886-59

RICARDO PAULO VIANA / CPF 055.544.616-62

VAGNER RODRIGUES SANTOS / CPF 140.104.296-15

RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAUJO / CPF 028.827.596-90  
ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA / CPF 038.284.756-39  
DENISE CARMONA CARA MACHADO / CPF 093.055.068-44  
MARIA APARECIDA GOMES / CPF 550.495.756-72  
RENATA ADRIANA LABANCA / CPF 005.042.356-80

**Validade da Autorização:** 11/04/2013 a 01/04/2015

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010183/2013-2. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, somente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 11 de Abril de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao  
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

*Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 0276770511396480 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.*

## ANEXO III



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 212 / 2012, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES CONHECIDAS COMO SALSAPARRILHA NO TRATAMENTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS”, que tem como responsável Maria das Graças Lins Brandão , está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 13/08/2012. Este certificado espira-se em 13/08/2017.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 212 / 2012, related to the Project entitled “POTENCIAL OF THE SPECIES KNOWN AS SARSAPARILLA IN THE TREATMENT OF HYPERCHOLESTEROLEMIA IN MICE”, under the supervision of Maria das Graças Lins Brandão , is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/08/2012. This certificate expires in 13/08/2017.

**FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS**

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 13/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)