

JULIANA MORAIS AMARAL DE ALMEIDA

**POTENCIAL DAS FOLHAS DE
Rudgea viburnoides (Cham.) Benth
(RUBIACEAE) NO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E SUAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA
EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2011

JULIANA MORAIS AMARAL DE ALMEIDA

POTENCIAL DAS FOLHAS DE
***Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth**
(RUBIACEAE) NO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E SUAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA
EM CAMUNDONGOS BALB/c

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

Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão

Co-orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO



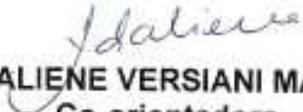
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

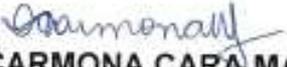
JULIANA MORAIS AMARAL DE ALMEIDA

**"POTENCIAL DAS FOLHAS DE *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth
(RUBIACEAE) NO TRATAMENTO DA OBESIDADE E SUAS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA EM
CAMUNDONGOS BALB/c"**

APROVADA EM 31 DE AGOSTO DE 2011

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA
Co-orientadora


Profa. Dra. DENISE CARMONA CARA MACHADO


Profa. Dra. LUCIENIR PAINS DUARTE


Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS LINS BRANDÃO
Orientadora

Nome da Mestranda: Juliana Morais Amaral de Almeida

Nome da Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão

Nome da Co-orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira

Linha de Pesquisa do PPGCA

Nutrição, Alimentação e Saúde

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES)

5.07.01.00-2 – Ciência de Alimentos

5.07.01.01-0 – Valor Nutritivo dos Alimentos

Instituições participantes:

Laboratório Farmacognosia, Depto. Produtos Farmacêuticos. Faculdade de Farmácia – UFMG.

Laboratório de Imunologia e Bioquímica, Depto. Bioquímica, ICB – UFMG.

Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas (DATAPLAMT),

Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) – UFMG.

Apoio financeiro CNPq e FAPEMIG.

*“Tiras a trava do teu olho, então verás claramente para tirar
o cisco do olho do teu irmão”
(Mateus 6-23)*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR – UFMG), na pessoa do Coordenador Professor Dr. Roberto Gonçalves Junqueira.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (FAFAR – UFMG), na pessoa da Dra. Isabela César, por realizar a análise cromatográfica das amostras.

Ao Laboratório de Imunologia e Bioquímica (ICB – UFMG), por disponibilizar sua infraestrutura para realização dos ensaios biológicos.

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

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus, Mestre dos Mestres, por me permitir trilhar este caminho e abençoar todos os momentos de minha jornada.

Aos meus pais, Arnaldo e Márcia, pelos exemplos de determinação e fé, e pelo incentivo na busca de crescimento espiritual, pessoal e científico.

Ao meu marido, João Henrique, pelo companheirismo, amor, apoio, paciência e sábios conselhos no decorrer da vida e, em especial, deste estudo.

À minha irmã, Mariana, pela amizade, presença, alegria e por compartilhar as experiências em pesquisa e saúde.

À minha orientadora, Professora Maria das Graças Lins Brandão, pela orientação técnica e metodológica, pelo incentivo nos estudos e trabalhos acadêmicos científicos sobre o uso das plantas.

À minha co-orientadora, Professora Adaliene Versiani Matos Ferreira, pelo voto de confiança me integrando ao seu grupo de pesquisa e pela grande contribuição e compromisso com a Ciência da Nutrição.

À Verena, Letícia, Ariela, Juliana, Darly, Celine, Núbia, Luciana, Gustavo e William pelo convívio alegre no laboratório de Farmacognosia, pelo companheirismo e incentivo durante a execução deste trabalho.

À Renata, Milene, Zélia e Marina pelos ótimos momentos compartilhados no Laboratório de Imunologia e Bioquímica, pelos ensinamentos e ajuda na execução de ensaios.

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Obesidade e inflamação.....	20
2.2. Substâncias Naturais Bioativas	25
2.3. Flavonoides e Saponinas	27
2.4. <i>Rudgea viburnoides</i> (Cham.) Benth.	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. MATERIAIS	32
3.1.1. Equipamentos.....	32
3.1.2. Reagentes e solventes	32
3.1.3. Outros materiais.....	33
3.2. MÉTODOS	34
3.2.1. Obtenção das folhas de <i>R. viburnoides</i>	34
3.2.2. Preparação das folhas para estudo	35
3.2.2.1. Secagem	35
3.2.2.2. Moagem	35
3.2.3. Preparação do extrato bruto (EB) e suas frações.....	35
3.2.4. Caracterização das substâncias químicas em EB e suas frações.....	37
3.2.5. Ensaio biológicos	38
3.2.5.1. Animais.....	38

3.2.5.2.	Vermifugação	38
3.2.5.3.	Preparo da dieta rica em carboidratos e suplementação com EB.....	38
3.2.5.4.	Esquema de tratamento	40
3.2.5.5.	Desenho experimental	40
3.2.5.6.	Eutanásia	41
3.2.5.7.	Obtenção do soro.....	41
3.2.6.	Protocolos Experimentais	42
3.2.6.1.	Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG).....	42
3.2.6.2.	Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI).....	42
3.2.6.3.	Cálculo do Índice de HOMA-IR e HOMA- β	42
3.2.6.4.	Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal	43
3.2.6.5.	Dosagens sorológicas	43
3.2.6.6.	Contagem total de leucócitos, células mononucleares e neutrófilos ...	44
3.2.6.7.	Extração de citocinas e quimiocina dos tecidos	44
3.2.6.8.	Determinação da concentração de citocinas e quimiocina por ELISA	44
3.2.7.	Análise Estatística.....	45
3.2.8.	Análise das amostras comerciais.....	45
3.2.8.1.	Obtenção das amostras	45
3.2.8.2.	Análise se o peso corresponde ao descrito na embalagem	46
3.2.8.3.	Caracterização organoléptica (análises sensoriais)	46
3.2.8.4.	Verificação da presença de materiais estranhos.....	46
3.2.8.5.	Identificação das amostras por meio do perfil em CCD	46
4.	RESULTADOS.....	48
4.1.	Efeitos do EB das folhas de <i>R. viburnoides</i> no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas induzidas por dieta.....	48
4.1.1.	TTOG na oitava semana de experimento	48
4.1.2.	TSI na oitava semana de experimento	48
4.1.3.	Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e índice de adiposidade	50

4.1.4.	Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal.....	53
4.1.5.	TTOG após quatro semanas de tratamento	53
4.1.6.	TSI após quatro semanas de tratamento.....	55
4.1.7.	Parâmetros sorológicos	57
4.1.7.1.	Glicose, Colesterol total, Triacilglicerol, Índices HOMA e Insulina	57
4.1.7.2.	Contagem de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos	57
4.1.7.3.	Adipocitocinas: Resistina e Adiponectina.....	58
4.1.8.	Concentração de citocinas e quimiocina nos tecidos hepático e adiposo epididimal.....	60
4.2.	Análise química do EB e suas frações	62
4.2.1.	Rendimentos das extrações	62
4.2.2.	Identificação de substâncias químicas no EB e suas frações por CCD.....	63
4.2.3.	Identificação das substâncias química no EB e suas frações por CLAE ...	67
4.3.	Avaliação do material comercializado	76
4.3.1.	Material botânico.....	76
4.3.2.	Análises organolépticas (análises sensoriais).....	77
5.	DISCUSSÃO	82
6.	CONCLUSÃO	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
8.	ANEXO I	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle (C) e dieta rica em carboidratos (HC)	39
Tabela 2 - Grupos de animais em estudo e tipo de dieta consumida	40
Tabela 3 – Parâmetros sorológicos e índices HOMA de animais alimentados com dieta C, HC e suplementados com HC40.....	57
Tabela 4 – Rendimento do EB das folhas de <i>R. viburnoides</i>	62
Tabela 5 - Rendimento após o processo de fracionamento do EB das folhas de <i>R.viburnoides</i> utilizando diferentes solventes	62
Tabela 6 - Peso correspondente na embalagem, peso da amostra e percentual de variação	77
Tabela 7 - Percentual de elementos estranhos nas amostras comercializadas	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento do ciclo de inflamação entre adipócitos e macrófagos no tecido adiposo obeso	22
Figura 2 - Via de sinalização da expressão dos genes inflamatórios no tecido adiposo e prevenção e/ou tratamento das patologias relacionadas com a obesidade por substâncias químicas	24
Figura 3 - Subdivisão de substâncias naturais bioativas presentes nos vegetais	26
Figura 4 - Exemplos de estruturas químicas dos flavonoides	28
Figura 5 - Exemplos de estruturas químicas das saponinas	29
Figura 6 - Estrutura química dos triterpenos (1) viburgenina e (2) traquelosperogíneo B isolado dos frutos de <i>R. viburnoides</i>	31
Figura 7 - <i>R. viburnoides</i> frutificada	34
Figura 8 - Processo de preparo dos extratos e frações	36
Figura 9 - Escala temporal do desenho experimental	41
Figura 10 - Teste de tolerância oral à glicose na oitava semana de estudo	49
Figura 11 - Teste de sensibilidade à insulina na oitava semana de estudo	50
Figura 12 - Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e índice de adiposidade	52
Figura 13 - Análise histológica de secções do tecido adiposo epididimal	54
Figura 14 - TTOG na décima segunda semana de estudo, após 4 semanas de suplementação com o extrato bruto de <i>R. viburnoides</i>	55
Figura 15 - TSI realizado na décima segunda semana de estudo, após 4 semanas de suplementação com o extrato bruto de <i>R. viburnoides</i>	56
Figura 16 - Contagem total de células (leucócitos), mononucleadas e neutrófilos	58
Figura 17 - Concentração de citocinas no soro	59
Figura 18 - Concentração de citocinas e quimiocina extraídas do fígado e tecido adiposo epididimal	61
Figura 19 - Cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação de flavonoides	64

Figura 20 A - CCD para identificação de saponinas	66
Figura 20 B - CCD para identificação de flavonoides	67
Figura 21 – Cromatogramas e espectro no UV do padrão de flavonóide rutina	68
Figura 22 - Cromatogramas e espectros no UV do EB das folhas de <i>R. viburnoides</i>	70
Figura 23 - Cromatogramas e espectros no UV da fração hexânica das folhas de <i>R. viburnoides</i>	72
Figura 24 - Cromatogramas e espectros no UV da fração acetato de etila das folhas de <i>R. viburnoides</i>	74
Figura 25 - Cromatogramas e espectros no UV da fração n-butanol das folhas de <i>R. viburnoides</i>	76
Figura 26 - Amostras comerciais de congonha	78
Figura 27 A - CCD para identificação flavonoides nas amostras comerciais	80
Figura 27 B - CCD para identificação saponinas nas amostras comerciais	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGLs	– Ácidos graxos livres
ANOVA	– Análise de variância
C	– Dieta controle
CCD	– Cromatografia de camada delgada
CCL2	– <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	– <i>Diode array detector</i>
DANT	– Doenças e agravos não transmissíveis
DATAPLAMT	– Banco de dados de amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas
EB	– Extrato bruto
ELISA	– <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FABUT	– Fração n-butanol
FACET	– Fração acetato de etila
FAHEX	– Fração hexano
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
HAS	– Hipertensão arterial sistêmica
HC	– Dieta rica em carboidratos
HC 160	– Dieta rica em carboidratos suplementada na dose 160 mg/Kg
HC 40	– Dieta rica em carboidratos suplementada na dose 40 mg/Kg
HC 80	– Dieta rica em carboidratos suplementada na dose 80 mg/Kg
HFD	– Dieta rica em gordura
IKK	– Inibidor do fator de transcrição NF-κB
IL-10	– Interleucina 10
IL-1β	– Interleucina 1- beta
IL-6	– Interleucina 6
IL-8	– Interleucina 8
IRS-1	– Substrato-1 do receptor de insulina
JNK	– Jun N-terminal quinase
MAPK	– Proteína quinase regulada pelo extracelular
MCP-1	– <i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
NF-κB	– Factor nuclear kappa B
NP	– Difenilboratoetilamina
OPD	– <i>O-phenyldiamine dihydrochloride</i>
PA	– Pressão arterial
PC	– Peso corporal
PCR-US	– Proteína C reativa ultra sensível
PEG	– Polietilenoglicol
pH	– Potencial hidrogeniônico da água
PI3K	– Fosfatidil-inositol-3-quinase
PKC	– Proteína quinase C
PPARγ	– Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
SAA	– Proteína amilóide sérica A
TLR	– <i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	– Fator de necrose tumoral
TR	– Tempo de retenção
TSI	– Teste de sensibilidade à insulina
TTOG	– Teste de tolerância oral à glicose
TZDs	– Tiazolidinedionas
UV	– Ultravioleta
VLDL	– Colesterol de baixíssima densidade

RESUMO

A obesidade é definida como uma doença multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura e a uma inflamação crônica de baixa intensidade. Algumas substâncias químicas presentes em plantas são associadas com a prevenção ou o tratamento da obesidade. A *Rudgea viburnoides* (congonha, congonha-de-bugre ou bugre), espécie comum do Cerrado, é rica em substâncias polifenólicas, flavonoides e saponinas. Muitos estudos evidenciam que estas substâncias apresentam potencial antiinflamatório e antiobesogênico. O objetivo desse estudo foi avaliar se as folhas de *R. viburnoides* eram capazes de tratar a obesidade e modular a disfunção metabólica e inflamatória observada nos animais alimentados com dieta rica em carboidratos. Folhas da planta foram coletadas, secas, moídas e submetidas à extração com solução hidroalcolica à 70%. O extrato foi obtido após evaporação completa do solvente. Os animais foram alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) ou dieta controle (C) por 8 semanas. Após este período, a dieta HC foi suplementada durante 4 semanas com três diferentes doses 40, 80 e 160 mg/Kg do extrato bruto da planta. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior adiposidade, menores tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina, maior índice HOMA-IR e menor índice HOMA- β , maiores concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6) e quimiocina (CCL2) pro-inflamatórias no fígado e tecido adiposo, maior concentração de resistina e adiponectina em relação aos animais alimentados com dieta controle. Nos animais que receberam o extrato bruto da planta na menor dose, mesmo apresentando adiposidade similar aos animais HC, observou-se reversão da intolerância à glicose e insensibilidade à insulina, menor índice HOMA-IR e maior índice HOMA- β , menores concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6) e quimiocina (CCL2) pro-inflamatórias no fígado e tecido adiposo, menor concentração de resistina e nenhuma alteração do perfil de adiponectina. A tratamento com *R.viburnoides* melhorou a tolerância oral à glicose e a sensibilidade à insulina, assim como a inflamação sistêmica e local dos animais alimentados com dieta HC.

Palavras-chaves: obesidade, *Rudgea viburnoides*, nutracêuticos

ABSTRACT

Obesity is defined as a multifactorial disease characterized by excessive fat accumulation and a chronic low grade inflammation. Some chemical substances present in plants are associated with the prevention or treatment of obesity. The *Rudgea viburnoides* (congonha, congonha-de-bugre or bugre), a common species of Cerrado (Brazilian Savana), is rich in chemical substances such as polyphenols, flavonoids, triterpenes and saponins. Several studies have shown that these substances have anti-inflammatory and anti-obesity potentials. The present study aims to evaluate whether the crude extract of *R. viburnoides* was able to modulate the metabolic and inflammatory dysfunction observed in animals fed an isocaloric-high carbohydrate diet. Leaves of the plant were collected, dried, ground and extracted with water-alcohol solution to 70%. The extracts tested were obtained after complete evaporation of the solvent. The animals were fed isocaloric high-carbohydrate (HC) diet or control diet (C) for 8 weeks. After this period, the HC diet was supplemented during 4 weeks with three different doses 40, 80 and 160 mg / kg of crude extract of *R. viburnoides*. The animals fed HC diet had higher adiposity, lower glucose tolerance and insulin sensitivity, higher HOMA-IR and lower HOMA- β , higher concentrations of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and chemokine (CCL2) in liver and adipose tissue, higher serum concentrations of resistin and lower adiponectin than animals fed C diet. The animals that received the crude extract of *R. viburnoides* at the lowest dose, although had a similar adiposity in relation to HC animals, showed reversal of glucose intolerance and insulin insensitivity, lower HOMA-IR and higher HOMA- β , lower concentrations of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and chemokine (CCL2) in liver and adipose tissue, lower serum resistin with no change in adiponectin profile. The treatment with *R. viburnoides* improved oral glucose tolerance and insulin sensitivity, as well as systemic and local inflammation of the animals fed diet HC.

Key Word: obesity, *Rudgea viburnoides*, nutraceutical

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como uma enfermidade crônica multifatorial que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura e um comprometimento da saúde por estar associada a outras condições, como dislipidemia, diabetes e hipertensão (WHO, 2004; AHIMA, 2006; REILLY et al., 2003). A OMS estima que em 2015, cerca de 2,3 milhões de pessoas no mundo estarão com excesso de peso e 700 milhões serão obesas (WHO, 2010). No Brasil, dados da última Pesquisa de Orçamentos Familiar 2008-2009 (POF), mostram percentuais preocupantes de excesso de peso e obesidade na população com mais de 20 anos de idade. A frequência de excesso de peso e obesidade entre os homens foi de 50,1% e 12,4%, respectivamente. Entre as mulheres, 48% delas foram classificadas com excesso de peso e 16,9% com obesidade.

A obesidade é caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo. O tecido adiposo é composto por adipócitos e células do estroma vascular – pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e numerosas células imunes (TILG & MOSCHEN, 2006; CANCELLO & CLÉMENT, 2006). A hipertrofia deste tecido favorece o recrutamento de macrófagos, produção anormal de citocinas pró-inflamatórias, aumento dos marcadores pró-inflamatórios de fase aguda e seus sinalizadores (CANCELLO & CLÉMENT, 2006; WELLEN, 2003; BACH-NGOHOU et al., 2002; BULLO et al., 2003). Essa condição relaciona-se às respostas inflamatórias crônicas de baixa intensidade (IYER et al., 2010; MARTINEZ, HELMING & GORDON, 2009). As alterações desencadeadas pelo desenvolvimento da obesidade resultam em desequilíbrios no metabolismo de glicose e ácidos graxos principalmente (ECKEL, GRUNDY & ZIMMET 2005; DANDONA et al., 2005). Esses, comumente se manifestam por meio de alterações cardiovasculares e resistência à insulina e/ou diabetes tipo II, agravando as doenças de maiores causas de morbidade e mortalidade nas sociedades atuais (POWELL, 2007; VAN GAAL, MERTENS & DE BLOCK, 2006). Estas patologias são denominadas doenças metabólicas associadas à obesidade e estão entre as mais comuns e deletérias enfermidades (OGDEN et. al., 2006; LEFEBVRE & SCHEEN, 2001).

Muitas plantas medicinais usadas na medicina popular já foram avaliadas quanto ao seu potencial no tratamento e/ ou prevenção dessas doenças (MOK et al., 2007; AHN

et al., 2007; NAVARRO-MOLL, 2000; NICOLETTI, 2007; TINDLE et al., 2005). Alguns extratos de plantas já são comercializados como nutracêuticos para esta finalidade (DULAK, 2005; KAMBOJ, 2000). A avaliação do potencial de produtos naturais usados tradicionalmente no tratamento da obesidade e comorbidades associadas é uma linha de pesquisa recente e em desenvolvimento (KUMAR, BANJI & HARANI, 2011; XIA & WENG, 2010; BADIMON, VILAHUR & PADRO, 2010; YUN, 2010; IYER et al., 2010; HASANI-RANJBAR et al., 2009; CEFALU et al., 2008; YIN, XING & YE, 2008; JOYAL, 2004). O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo (BROOKS et al., 2006; GIULIETTI et al., 2005; BRANDÃO et al., 2008; BRANDÃO et al., 2009), sendo fonte importante para obtenção de novas substâncias para o tratamento de enfermidades, dentre elas, a obesidade.

Várias plantas medicinais são usadas no Brasil como auxiliar em “regimes de emagrecimento”. As folhas da espécie *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae) vem sendo comercializadas e usadas para este fim (ALVES et al., 2004; NUNES et al., 2003). Ao chá da planta é atribuída também propriedade diurética, hipotensora e antireumática (SIQUEIRA, 1981; BALBACH, 1980; PENNA, 1941; FONSECA, 1940; FREISE, 1933, TRESVENZOL, et. al., 2006; CARVALHO, 2004; NUNES et. al., 2003; DICKEL, RATES & RITTER, 2007).

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o potencial da espécie *R. viburnoides* (Cham.) Benth. no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas em modelo animal. Os objetivos específicos foram:

- ✓ Traçar o perfil fitoquímico do extrato bruto e suas frações por meio de métodos cromatográficos como cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ✓ Submeter o extrato bruto, em três diferentes doses, a ensaios *in vivo* para verificar a eficácia no tratamento da obesidade induzida por dieta. Para tanto, avaliar se o tratamento com o extrato bruto da planta interfere na (i) ingestão alimentar, (ii) no ganho de peso corporal, (iii) no índice de adiposidade (adiposidade epididimal, retroperitoneal, mesentérica), (iv) na morfologia dos adipócitos (diâmetro e área), (v) na tolerância oral à glicose (vi) e na sensibilidade à insulina.

- ✓ Após determinar a melhor dose, avaliar a eficácia (vii) nos parâmetros sorológicos como dosagens bioquímicas de lipídios (triacilglicerol e colesterol total), glicose, insulina e de adipocitocinas (resistina e adiponectina), (viii) na contagem total de células sistêmicas, mononucleadas e neutrófilos e (ix) nas concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6) e quimiocina (CCL2) pro-inflamatórias nos tecidos hepáticos e adiposo epididimal.

- ✓ Avaliar as condições nas quais a planta vem sendo comercializada nos mercados populares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obesidade e inflamação

A obesidade é uma desordem complexa com múltiplos fatores desencadeantes como os genéticos e ambientais. A causa da obesidade é normalmente atribuída à combinação destes fatores e as desordens biológicas específicas que regulam a homeostase (WESTERTERP-PLANTENGA et al., 2007; LIN & LIN-SHIAU, 2006).

O sedentarismo e a má alimentação, característicos da sociedade moderna, vêm sendo considerados os principais fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento da obesidade. O consumo incorreto de alimentos com alta densidade calórica contribui, não somente com a epidemia da obesidade, mas também com a resistência à insulina, a intolerância à glicose, a hiperlipidemia e a hipertensão (FERREIRA et al., 2011; WOO et al., 2008; ESTADELLA et al., 2004; FRIED & RAO, 2003). O balanço energético positivo, gerado pelo maior consumo e menor gasto calórico, assim como o tipo de macronutriente ingerido, carboidratos ou lipídio, favorece a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e, conseqüentemente, a resistência à insulina (SCHENK, SABERI & OLEFSKY, 2008; GREENBERG & OBIN, 2006; BAHIA et al., 2006; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003; SALTIEL & KAHN, 2001). Na obesidade, a resistência à insulina desenvolve-se em resposta a uma complexa alteração metabólica que envolve aumento de ácidos graxos livres (AGLs) circulantes, secreção de citocinas derivadas de adipócitos e inflamação crônica de baixa intensidade (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; KANDA et al., 2006; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005; SALTIEL & KAHN, 2001).

A obesidade foi primeiramente reconhecida como uma condição de inflamação crônica, de baixa intensidade, no início da década de 90 (BACH-NGOHOU et al., 2002; BULLO et al., 2003; WAJCHENBERG, 2000). Nesta época constatou-se também a expressão do gene, que codifica a citocina pró-inflamatória, denominada fator de necrose tumoral-alfa (*TNF- α*), no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993). O aumento desta citocina neste tecido foi relacionado à redução da sensibilidade à insulina em roedores submetidos a um protocolo de obesidade induzida pela dieta (SHORE & JOHNSTON, 2006; BERRY et al., 2006; HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993).

O tecido adiposo é um tecido heterogêneo composto por adipócitos maduros e por células da fração estroma-vascular. Essa fração inclui pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos (TILG & MOSCHEN, 2006; CANCELLO & CLÉMENT, 2006). Na obesidade, verifica-se que o aumento de macrófagos no tecido adiposo, em particular no tecido adiposo visceral, é inicialmente precedido pelo processo de migração de monócitos do sangue para esse tecido. Os monócitos quando presentes no tecido adiposo visceral diferenciam-se em macrófagos (FERRANTE, 2007; CANCELLO & CLÉMENT, 2006; WELLEN, 2003; BACH-NGOHOU et al., 2002; BULLO et al., 2003). O aumento do processo de quimiotaxia de monócitos, a partir do sangue para o tecido adiposo visceral, é mediado pela CCL2 (MCP-1 monocyte chemotactic protein-1). O receptor para essa proteína, denominado CCR2, é expresso em monócitos presentes no sangue e em macrófagos teciduais. Além disso, a expressão da CCL2 correlaciona-se positivamente à adiposidade, sendo a sua expressão gênica maior no tecido adiposo visceral quando comparada ao subcutâneo (CANCELLO e CLEMENTE, 2006; KANDA et al., 2006).

A resposta inflamatória promove o aumento da síntese de diversas adipocinas. As adipocinas são citocinas produzidas pelo tecido adiposo e macrófagos residentes. Essas estão relacionadas à regulação da inflamação sistêmica, e dentre elas, a adiponectina tem ação anti-inflamatória (COOK & SEMPLE, 2010; BULLO et al., 2007; GREENBERG & OBIN, 2006) e a resistina tem ação pró-inflamatória (LEHRKE et al., 2004; VERMA et al., 2003). Há forte correlação entre a redução da concentração plasmática de adiponectina, aumento da concentração de resistina e o aumento da resistência periférica à ação da insulina. Quando há diminuição da adiposidade, observa-se um aumento da concentração plasmática de adiponectina, diminuição de resistina, redução da resposta inflamatória e, como consequência, uma diminuição da resistência periférica à ação da insulina (COOK & SEMPLE, 2010; SHAH et al., 2008; TILG & MOSCHEN, 2006; FANTUZZI et al.; 2005).

Um conjunto de fatores, dentre eles, a síntese de adipocinas, quimiocinas e citocinas, hipertrofia de adipócitos, hipoxia no tecido adiposo e endotoxemia devido ao aumento da concentração sanguínea de lipopolissacarídeos contribuem para uma maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; MARTINEZ, HELMING & GORDON, 2009; KENNEDY et al., 2009).

Em indivíduos obesos, o recrutamento e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo promovem inflamação local (Figura 1). Conforme relatado anteriormente, essa inflamação é uma condição determinante no desencadeamento da resistência periférica à insulina, cuja gênese está diretamente relacionada ao aumento da concentração plasmática de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e leptina (BULLO et al., 2007; SHAH et al., 2008; HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993).

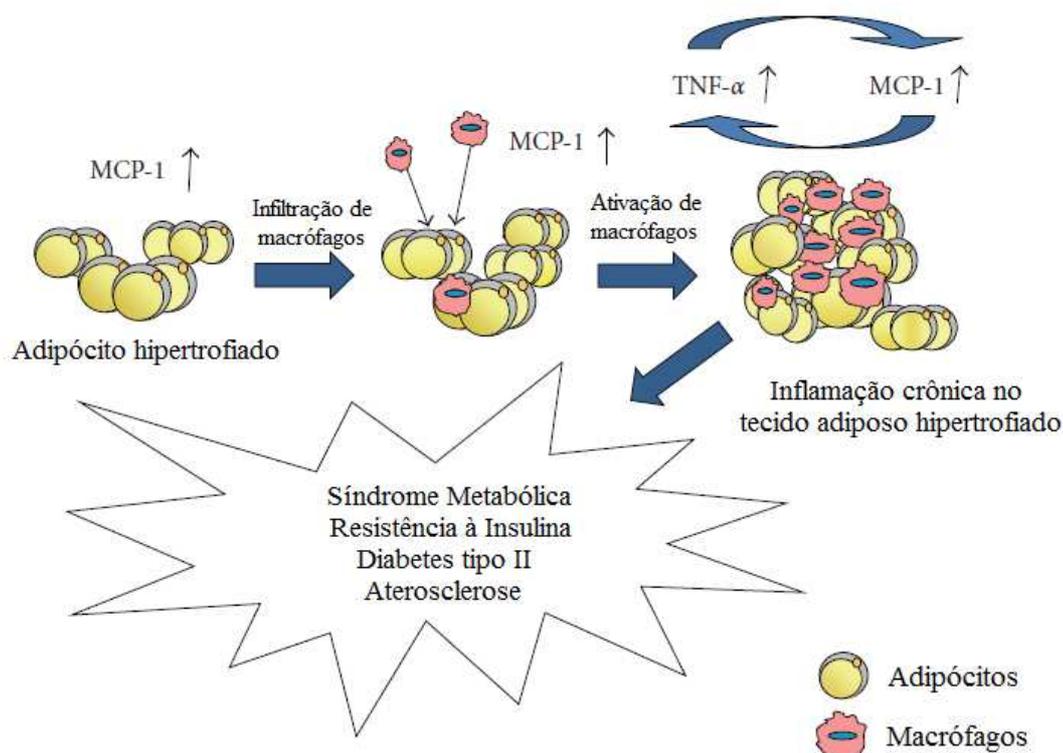


Figura 1 – Desenvolvimento do ciclo de inflamação entre adipócitos e macrófagos no tecido adiposo obeso (adaptado de HIRAI et al., 2010).

O TNF- α causa resistência à insulina ao inibir a fosforilação da tirosina presente no substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1). Outros mecanismos de inibição da fosforilação do IRS-1 por mediadores inflamatórios incluem a ativação crônica das proteínas Jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase C (PKC) e quinase do inibidor do fator de transcrição NF- κ B (IKK) (BULLO et al., 2007; FERRANTE, 2007). Além da síntese do TNF- α , o tecido adiposo produz outras adipocinas, como a IL-6 e a CCL2, que atuam em diversas vias metabólicas, bem como na resposta pró-inflamatória (LUMENG, BODZIN & SALTIEL, 2007; KANDA et al., 2006).

Observa-se um aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados na circulação sanguínea em resposta atividade lipolítica aumentada no tecido adiposo (CARVALHO, COLAÇO & FORTES, 2006; CABALLERO, 2003). Ácidos graxos não esterificados inibem o IRS-1 e, por consequência, induzem a resistência periférica à insulina no músculo esquelético e no fígado. Entre os mecanismos associados à resistência periférica à insulina induzida por ácidos graxos não esterificados estão: (i) o estresse oxidativo, (ii) a ativação da PKC e (iii) o estresse do retículo endoplasmático (KENNEDY et al., 2009; SHAH et al., 2008). O aumento do fluxo de ácidos graxos não esterificados a partir do tecido adiposo para o fígado promove resistência periférica à ação da insulina nesse tecido, devido ao aumento da expressão e atividade da enzima glicose-6-fosfatase, da gliconeogênese e da glicogenólise (SHAH et al., 2008; FERRANTE, 2007).

A maior causa de desenvolvimento da obesidade e, conseqüentemente, das desordens inflamatórias é o consumo excessivo e/ou desproporcional de gordura e/ou carboidratos, além do desequilíbrio energético. O excesso de peso em indivíduos obesos é nutricionalmente paradoxal. Nestes, podem ser observado deficiência nutricional mesmo diante de um grande consumo de alimentos, ricos em energia e pobres em nutrientes (HIRAI et al., 2010; LING & BISTRAN, 2009). Em contrapartida, há evidências de que dietas ricas em nutrientes têm o potencial de reduzir o peso e melhorar os parâmetros inflamatórios relacionados à obesidade (MARKOVIC & NATOLI, 2009; BARNES, 2008; FU et al., 2005).

As alterações metabólicas relacionadas à obesidade podem ser prevenidas ou atenuadas com a ingestão de alimentos que contenham substâncias com o potencial de controlar a inflamação sistêmica e localizada em órgãos metabólicos como o adiposo e o hepático (HIRAI et al., 2010; WOO et al., 2007; KIM et al., 2003). Dentre essas se encontram as substâncias polifenólicas, saponinas, terpenóides e inúmeras vitaminas e minerais (KUMAR, BANJI & HARANI, 2011; XIA & WENG, 2010; RODRIGUEZ et al., 2006; RICCARDI, CAPALDO & VACARO, 2005; CALDER & KEW, 2002).

A resposta inflamatória na obesidade é regulada por diversos fatores transcricionais. NF- κ B e JNK representam importantes moduladores da expressão gênica inflamatória via TLR4 (tool-like receptor) nos tecidos adiposos. Sugere-se que as substâncias

químicas contidas nos alimentos podem alterar o eixo TLR4/NF- κ B ou TLR4/JNK (Figura 2). Essa alteração poderia ser útil na prevenção da resistência à insulina (HIRAI et al., 2010; DING, JIN & CHEN, 2010; SEYMOUR et al., 2009).

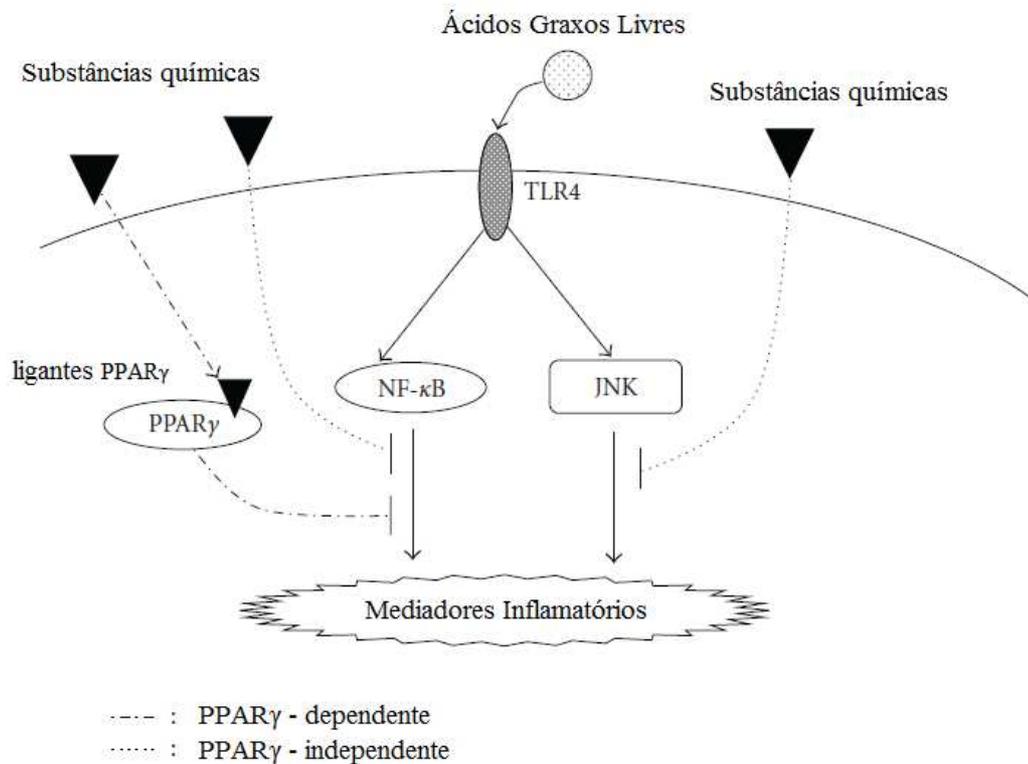


Figura 2 - Via de sinalização da expressão dos genes inflamatórios no tecido adiposo e prevenção e/ou tratamento das patologias relacionadas com a obesidade por substâncias químicas (adaptado de HIRAI et al., 2010).

Além dessas vias de sinalização, sabe-se que o PPAR γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos) é de fundamental importância na inflamação. Este fator de transcrição está envolvido na diferenciação e armazenamento de gordura nos adipócitos e, conseqüentemente, com a sinalização anti-inflamatória via adipócito (DING, JIN & CHEN, 2010; GOTO et al., 2010; KARSTEN, 2008). Os ativadores sintéticos de PPAR γ , tiazolidinedionas (TZDs), suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α (RICOTE et. al., 1998), estimulam a captação de glicose e melhoram a sensibilidade à insulina (SPIEGELMAN, 1997).

Assim, as substâncias químicas, inclusive as de fontes naturais, que atuam como ligantes de PPAR γ podem ter potencial múltiplo, incluindo efeitos antidiabéticos e anti-inflamatórios (HIRAI et al., 2010; DING, JIN & CHEN, 2010; SEYMOUR et al., 2009).

2.2. Substâncias Naturais Bioativas

Alimentos de origem vegetal são fontes de energia, proteína, vitaminas e minerais e a única ou principal fonte de vitamina C, folato, fibras e substâncias químicas bioativas, dos quais o metabolismo humano também é dependente (BASTOS, ROGERO & ARÊAS, 2009; IYER et al., 2010; HASANI-RANJBAR et al., 2009; CEFALU et al., 2008;). Elas ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos e podem desempenhar diversas funções em benefício da saúde humana (KUMAR, BANJI & HERANI, 2011; XIA & WENG, 2010; BADIMON, VILAHUR & PADRO, 2010; YUN, 2010; YIN, XING & YE, 2008; CARRATU & SANZINI, 2005; JOYAL, 2004).

Estudos epidemiológicos, que avaliam o efeito de dietas ricas em alimentos de origem vegetal, apresentam resultados interessantes. Sugere-se que a ingestão de alimentos ricos em substâncias químicas bioativas é capaz de reduzir o risco do desenvolvimento de doenças crônicas, como as cardiovasculares, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (CARRATU e SANZINI, 2005; CÂNDIDO & CAMPOS, 2005). Esses alimentos, ricos em substâncias bioativas, são denominados alimentos funcionais (SOUZA et al., 2003; BRASIL, 1999).

Outra forma de uso das substâncias químicas bioativas é por meio dos produtos denominados nutracêuticos. Os nutracêuticos são definidos como “aquele ingrediente alimentar, aditivo ou produto elaborado a partir de um alimento que se comercializa na forma de cápsula, pó ou outra apresentação não associada ao alimento, e que apresentem benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença” (ALONSO, 2009; HUNGENHOLTZ & SMID, 2002). Já os suplementos nutricionais são produtos alimentícios feitos com o propósito de serem ingeridos na forma de tabletes, farinha, géis, cápsulas de gel ou gotas e que forneçam vitaminas, minerais, princípios ativos de plantas, aminoácidos ou outra substância dietética (incluindo um concentrado metabólico, componente, extrato ou combinação de qualquer um dos referidos acima) podendo estar associado a um alimento (NOONAN & NOONAN, 2004; KWAK & JUKES, 2001).

É importante considerar que, independente dos conceitos, os efeitos benéficos à saúde, prevenção e ou tratamento das doenças, deve-se ao conteúdo de substâncias químicas, presentes nos alimentos ou seus produtos. Diferentes grupos de substâncias são consideradas bioativas como carotenóides, compostos fenólicos, fitoesteróis e fitoestanois (fitoesteróis saturados), tocotrienóis, compostos organosulfurados, carboidratos não digeríveis, dentre outras (HIRAI et al., 2010; HASANI-RANJBAR et al., 2009; RODRIGUEZ et. al., 2006).

As substâncias naturais bioativas são, em sua maioria, produtos do metabolismo secundário. Geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (CARRIL & GARCIA, 2009; MANACH et al., 2004; SIMÕES, 1999). Algumas substâncias são próprias de alguma espécie ou gênero de plantas, outras são reunidas por um complicado critério de classificação. A Figura 3 mostra um diagrama extraído da literatura sobre esse assunto (FILHO, 2010).

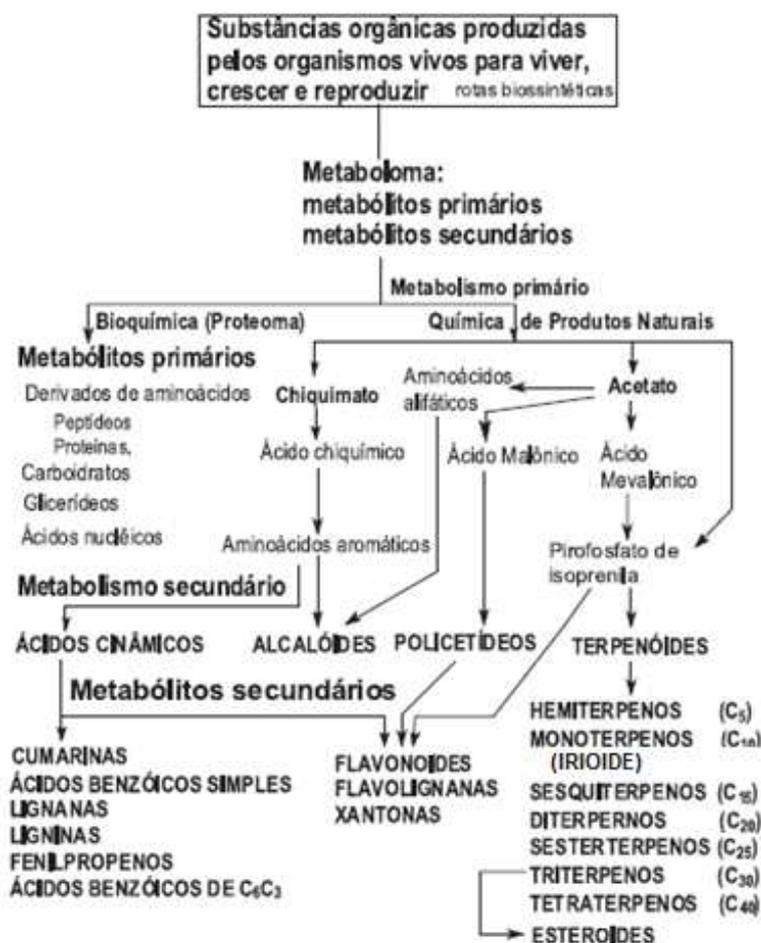


Figura 3 – Subdivisão de substâncias naturais bioativas presentes nos vegetais (adaptado de FILHO, 2010).

As substâncias naturais bioativas se agrupam em quatro classes principais: os terpenos (hormônios, pigmentos ou óleos essenciais), as substâncias fenólicas (flavonoides, lignina e taninos), as substâncias glicosídicas (saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e os alcalóides (CARRIL & GARCIA, 2009; SIMÕES, 1999).

Essas substâncias, em sua maioria presente em plantas, exercem várias ações do ponto de vista biológico, como atividade antioxidante, modulação de enzimas de destoxificação, estimulação do sistema imune, redução da agregação plaquetária, modulação do metabolismo hormonal, redução da pressão sanguínea, atividade antibacteriana e antiviral, entre outras (ALONSO, 2009; BAKKALI et al., 2008; CARRATU e SANZINI, 2005; SPARG, LIGHT & STADEN, 2004).

A importância de plantas com capacidade anti-inflamatória e antioxidante vem crescendo diante da perspectiva de sua utilização para prevenção de certas doenças, principalmente as doenças e agravos não transmissíveis (DANT), entre elas a obesidade (KUMAR, BANJI & HARANI, 2011; DINDA et al., 2010; HASANI-RANJBAR, 2009). A capacidade das substâncias naturais em regular a produção de citocinas e sequestrar radicais livres explicam, em parte, a correlação entre sua ingestão com a redução do risco de doenças (BADIMON, VILAHUR & PADRO, 2010; IYER et al., 2010; CEFALU et al., 2008). Outro possível mecanismo para esta correlação refere-se à modulação gênica que interfere em diferentes processos intracelulares envolvidos na resposta inflamatória e na defesa contra o estresse oxidativo (GOTO et al., 2010; BASTOS, ROGERO & ARÊAS, 2009; SEYMOUR et al., 2009; JOYAL, 2004).

Muitos estudos mostram o potencial de plantas ricas em flavonoides e saponinas como anti-inflamatórias (YANG, et. al., 2010; KANG et al., 2009; PAE et al., 2008; DEMBINSKA-KIEC et al., 2008; CEFALU et al., 2008) e essas substâncias estão presentes nas folhas da *R. viburnoides*, objeto do presente estudo.

2.3. Flavonoides e Saponinas

Os flavonoides ocorrem na forma de agliconas, de glicosídeos ou de derivados metilados (SIMÕES, 1999; MIDDLETON, 1984). As agliconas contêm quinze átomos de carbono em seu núcleo básico: dois anéis de seis membros (A e B) ligados a uma

unidade de três carbono (C) (SOUSA et al, 2007; TAPAS, SAKARKAR & KAKDE, 2008). A Figura 4 mostra a estrutura química básica dos flavonoides (1) e de outras classes derivadas de flavonoides (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

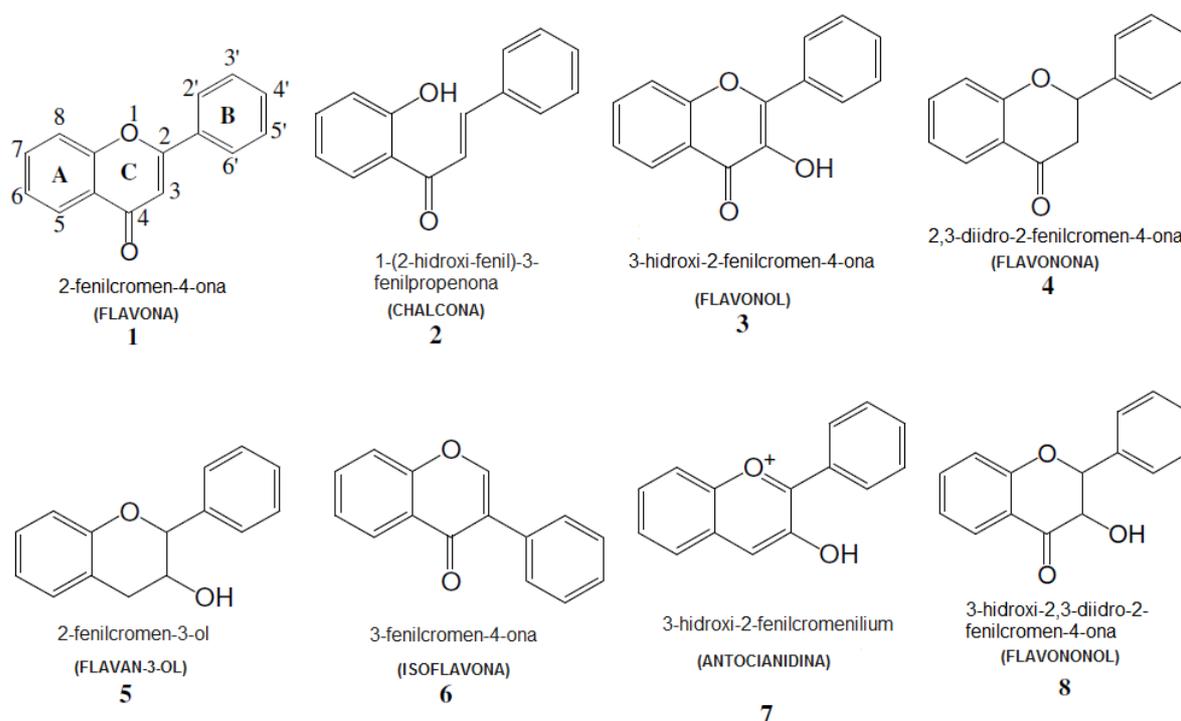


Figura 4 – Exemplos de estruturas químicas dos flavonoides (adaptado de TAPAS, SAKARKAR & KAKDE, 2008).

Os flavonoides são os metabólitos secundários presentes em quantidades mais relevantes nos vegetais (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004, apud SIMÕES et al., 2004). A eles, são atribuídas as funções de proteção para a planta contra insetos, fungos e bactérias, proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível e inibidores de enzimas (CARRIL & GARCIA, 2009; MANACH et al., 2004). Como é típico para as substâncias fenólicas, elas apresentam potencial antioxidantes e quelantes de metais. Também a eles são atribuídas propriedades farmacológicas anti-inflamatórias, antialérgicas, hepatoprotetoras, antitrombóticas, antivirais e anticancerígenas (TAPAS, SAKARKAR & KAKDE, 2008; DILLARD & GERMAN, 2000).

Já as saponinas são substâncias encontradas como glicosídeos esteroidais, glicosídeos alcalóides esteroidais ou glicosídeos triterpênicos. As saponinas podem ocorrer na forma de aglicona (sem molécula de açúcar) sendo denominadas, assim, de

sapogeninas. As saponinas apresentam característica tensoativas, ou seja, são capazes de se dissolverem em água originando soluções afrogênicas (espumantes), por diminuição da tensão superficial do líquido (CARRIL & GARCIA, 2009; MANETTI, DELAPORTE & LAVERDE, 2009; GNOATTO, SCHENKEL & BASSANI, 2005). A Figura 5 mostra exemplos de estruturas químicas comuns às saponinas esteroidais e triterpênicas.

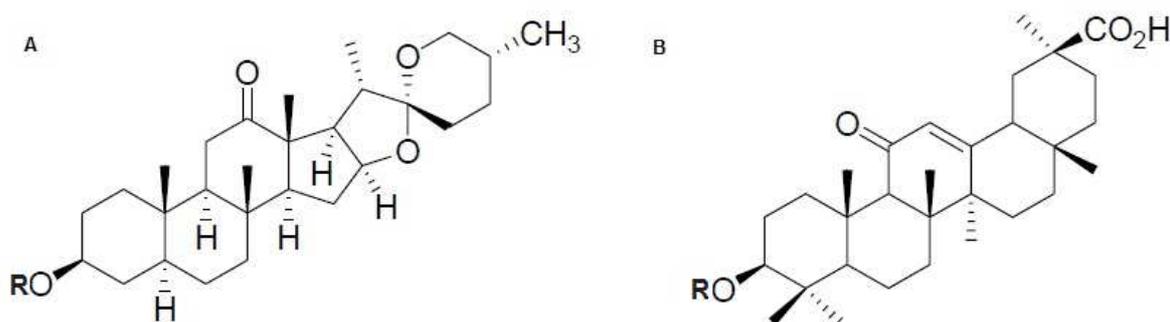


Figura 5 – Exemplos de estruturas químicas das saponinas. Glicosídeos saponosídicos do tipo esteróide (A., R=H hecogenina) e do tipo triterpênico (B., R=H ácido glicirretínico) (adaptado de MANETTI, DELAPORTE & LAVERDE, 2009).

Nos últimos 50 anos, pesquisas revelaram inúmeras atividades biológica e farmacológica para as saponinas entre elas antidiabética, contraceptiva, antifúngica, anti-inflamatória e outras (DINDA et al., 2010; XI et al., 2010; BHAVSAR et al., 2009; ZHAO et al., 2008).

Espécies da família Rubiaceae, a qual pertence *R. viburnoides*, já foram estudadas para avaliar seu potencial hipoglicemiante, antiinflamatório e/ou antioxidante como *Palicourea rigida* Kunth (ROSA et al., 2010), *Nauclea latifolia* Sm. (GOJI et al.; 2010), *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (BARROS et al., 2008), *Posoqueria acutifolia* Mart. (SOUSA et al., 2007), *Mitragyna ciliata* Aubrev. & Pellegr. (DONGMO et al.; 2003) e *Uncaria tomentosa* (Willd.) (AGUILAR et al., 2002). Sugere-se que estas propriedades são devidas principalmente à presença de substâncias polifenólicas e saponinas (GOJI et al.; 2010; HAMERSKI et al., 2005; OLEA et al., 1997; YOUNG et al., 1998).

2.4. *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.

À *R. viburnoides* são atribuídos os nomes populares de congonha, congonha-de-bugre ou bugre (BALBACH, 1980; PENNA, 1941; CORRÊA, 1909), cotó (FONSECA, 1940; FREIRSE, 1933), cotó-cotó (BALBACH, 1980; PENNA, 1941; HOEHNE, 1920), chá-de-bugre (PENNA, 1941), congonha-de-getio (HOEHNE, 1920; CORRÊA, 1909). Esses mesmos nomes populares são também atribuídos a outras espécies medicinais como *Villaresia congonha* Miers (Cardiopteridaceae) (CRUZ, 1982; FREISE, 1933, HOEHNE, 1920), *Luxemburgia polyandria*, A. St.-Hil. (Ochnaceae) (CRUZ, 1982; PENNA, 1941), *Palicourea densifolia* J. A. Schultes (Rubiaceae) (BALBACH, 1980; PENNA, 1941) e *Cordia salicifolia* Cham. (Boraginaceae) (PENNA, 1941; BALBACH, 1980).

A planta é comum no cerrado brasileiro, sendo suas folhas e cascas utilizadas tradicionalmente no Brasil e pela medicina popular sob a forma de chás (TRESVENZOL et. al., 2006; CARVALHO, 2004; NUNES et. al., 2003; DICKEL, RATES & RITTER, 2007). A esta espécie são atribuídas propriedades anti-reumáticas, antissifílicas, bem como, para o tratamento da dispepsia, como diurética, hipotensora e “depurativa do sangue” (BALBACH, 1980; SIQUEIRA, 1981; PENNA, 1941; FONSECA, 1940; FREISE, 1933; SIQUEIRA, 1981; YOUNG et al., 1998; CORRÊA, 1984).

R. viburnoides (Figura 7, pg. 34) é uma árvore de 4-5 m, de altura, dotada de copa globosa, com ramos novos densos-tomentosos e quando jovem, é um arbustro. O tronco é curto e tortuoso com 15-25 cm de diâmetro, casca espessa, mais ou menos suberosa e fissurada superficialmente. As folhas são opostas simples, curto-pecioladas, grossas e rugosas, discoloradas, glabras na face superior e fusco-tomentosas com nervuras salientes na face inferior e possuem de 9-17 cm de comprimento por 3-8 cm de largura. As flores são brancas, perfumadas e se reúnem em inflorescências do tipo panículas, terminais e nas axilas da extremidade dos ramos. O fruto uma drupa ovóide, de cor vermelho escura ou preta quando maduro, tem polpa carnosa e uma única semente. A espécie floresce em mais de uma época do ano, porém predominando durante os meses de agosto a setembro. Os frutos amadurecem, predominantemente, em junho e julho, sendo muito procurados pelos pássaros (LORENZI, 1998).

Anatomicamente, verificou-se que folhas de *R. viburnoides* apresentam epiderme pilosa, com estrias cuticulares e estômatos paracíticos. Idioblastos com ráfides foram observados no mesófilo e cristólitos e canais mucilaginosos na medula da nervura central (MANTOVANI et al., 1995; ALVES et al, 2004).

A planta é muito pouco estudada. Prospecção fitoquímica e o perfil cromatográfico realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciaram a presença de taninos, flavonoides, triterpenos, esteróides e saponinas (ALVES et al, 2004). Dos frutos desta planta, YOUNG e colaboradores (1998) isolaram e identificaram um novo triterpeno, a viburgenina. Esses autores isolaram também saponinas e os triterpenos traquelosperogíneo B e arjungenino (Figura 6).

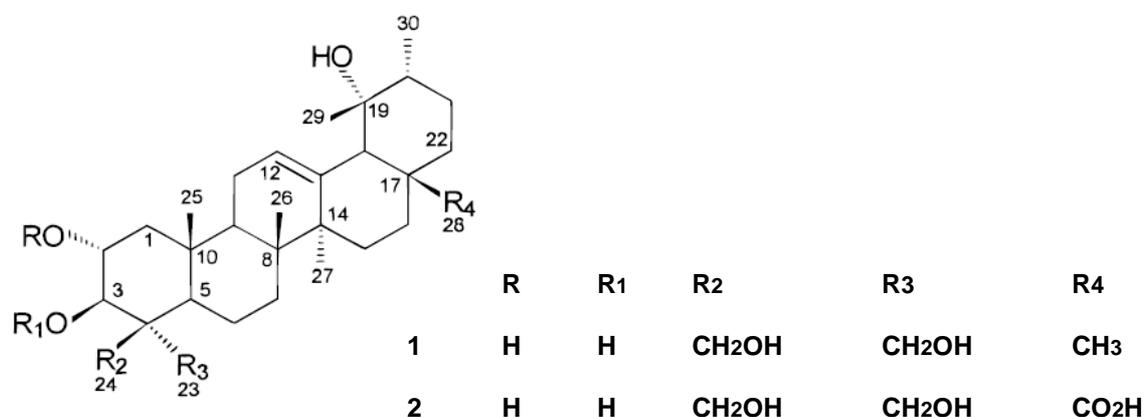


Figura 6 – Estrutura química dos triterpenos (1) viburgenina e (2) traquelosperogíneo B isolado dos frutos de *R. viburnoides* (adaptado de YOUNG et al., 1998).

Outro estudo demonstrou que o extrato etanólico bruto e suas frações (hexânica, diclorometano, acetato de etila e metanol/ água), apresentam atividade antioxidante dose-dependente (LIUBA, 2009).

Diante do possível efeito antioxidante e antiinflamatório da espécie *R. viburnoides*, tornou-se interessante investigar se o extrato bruto oriundo da mesma é capaz de tratar a obesidade e as alterações metabólicas desencadeadas por dieta em modelo animal. Assim, o presente estudo justifica-se pelo crescente interesse no desenvolvimento de novos produtos, como os nutracêuticos, para o tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Equipamentos

- Aparelho de GPS (Etrex)
- Microscópio (Olympus, B201)
- Balança analítica (Shimadzu, AY220)
- Banho Maria (Fisatom, 550)
- Bomba de vácuo (Tecnal, TE0581)
- Centrífuga refrigerada (Hermle, Z323K)
- Cromatógrafo composto de bomba quaternária, injetor automático e detector e -UV-DAD (Agilent, 1100)
- Destilador (Quimis)
- Estufa para secagem de plantas (Sociedade Fabbe)
- Freezer (Electrolux, FE26)
- Homogeneizador (Omni Internacional, TH)
- Leitor de ELISA (Bio-tek Instruments, EL800)
- Liofilizador (Interprise II)
- Microcâmera (JVC, TK-1270/RGB)
- 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

Os solventes utilizados eram de grau analítico, exceto os usados na CLAE, que era de grau cromatográfico (acetoneitrila).

- Acetato de Etila
- Acetonitrila (Merck)
- Ácido acético
- Ácido fórmico

- Ácido sulfúrico (Synth)
- Açúcar refinado (União)
- Água
- Água oxigenada (Synth)
- Albumina de soro bovino
- Álcool etílico (Synth)
- Anisaldeído sulfúrico
- Aprotinina
- Cloreto de Sódio
- Cloreto Benzetônio
- Cloridrato de Xilazina (Syntec)
- Clorofórmio
- Difenilboratoetilamina
- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)
- Fluoreto de Fenilmetilsufonila
- Hexano
- Hidróxido de Alumínio (Teuto)
- Ivermectina (Bayer®)
- Leite condensado (Moça®)
- Metanol
- n-butanol (Synth)
- Nitrogênio Líquido (White Martins)
- Polietilenoglicol
- Quetamina (Vetaset)
- Ração Labina®
- Rutina
- Tween 20 (Sigma Chemical Co)

3.1.3. Outros materiais

- Alcoômetro (Alla France)
- Coluna para CLAE Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) 5µm (Merck ®)
- Glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA)
- Kits enzimáticos (Katal®)
- Kits ELISA (R&D Systems®)

- Membrana filtrante (Milipore)
- Pipeta automática multicanal e de volume variável (HTL, Multimate)
- Placas de poliestireno (Nunc)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção das folhas de *R. viburnoides*

As folhas de *R. viburnoides* (Cham.) Benth. foram coletadas na cidade de Curvelo, Minas Gerais, na localização geográfica S 18°52'43,3" HO 44°35'31,2", em 14 de abril de 2010. A identificação taxonômica da espécie foi realizada pela botânica Dr^a Juliana de Paula-Souza.



Figura 7 – *R. viburnoides* frutificada (Fonte: DATAPLAMT, 2010).

A espécie coletada possui uma exsicata depositada no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG) sob o número BHCB 148205.

3.2.2. Preparação das folhas para estudo

3.2.2.1. Secagem

As amostras de folhas de *R. viburnoides* foram secadas em estufa a 35°C, por 48h. As folhas foram secadas entre os dias 18 e 23 de abril de 2010. Foram obtidos 1124,87 g de folhas secas.

3.2.2.2. Moagem

Após secagem, as folhas foram pulverizadas em moinhos de facas, até granulometria de 14 mesh. As amostras secas e moídas foram armazenadas em frascos de vidro em temperatura de -1°C, para posterior extração.

3.2.3. Preparação do extrato bruto (EB) e suas frações

O processo utilizado para a preparação do extrato bruto da *R. viburnoides* foi a percolação a frio. Para a produção desse extrato, foi utilizado pó das folhas e álcool etílico 70 GL°, como solvente extrator.

Após o processo de percolação, o percolato foi concentrado à vácuo até resíduo, obtendo-se o extrato bruto (EB). Em seguida, parte do extrato bruto foi liofilizada para obtenção de um resíduo seco que foi usado nos testes farmacológicos. A outra parte do extrato bruto foi submetida a fracionamento químico. Este teve por objetivo separar componentes de acordo com suas polaridades. Para isso, cerca de 90g do EB foi resuspenso em água destilada. A suspensão obtida foi transferida para um funil de separação e, em seguida, solventes, com diferentes polaridades, foram adicionados.

Primeiramente, o hexano foi adicionado para extrair componentes de baixa polaridade tais como, gorduras, clorofila, óleos essenciais e triterpenos, formando a fração hexânica (fahex). Contrariando a ordem de extração com solventes de polaridade crescente, a extração com n-butanol antecedeu a extração com acetato de etila. Isto foi necessário porque com o acetato de etila, houve formação de emulsão persistente, que impediu a separação das fases. Esta solução foi concentrada à vácuo até completa

evaporação do acetato de etila, seguindo a extração com n-butanol. Assim, o n-butanol saturado com água foi adicionado para a extração de glicosídeos, saponinas e outros compostos de alta polaridade, formando a fração n-butanólica (fabut). Em seguida, o acetato de etila foi adicionado para extrair componentes de polaridade intermediária, principalmente, os flavonoides, formando a fração acetato de etila (Facet). Uma vez terminado esse fracionamento, as frações obtidas foram concentradas à vácuo até secagem completa e armazenadas a 4 °C. A Figura 8 ilustra o processo de fracionamento adotado.

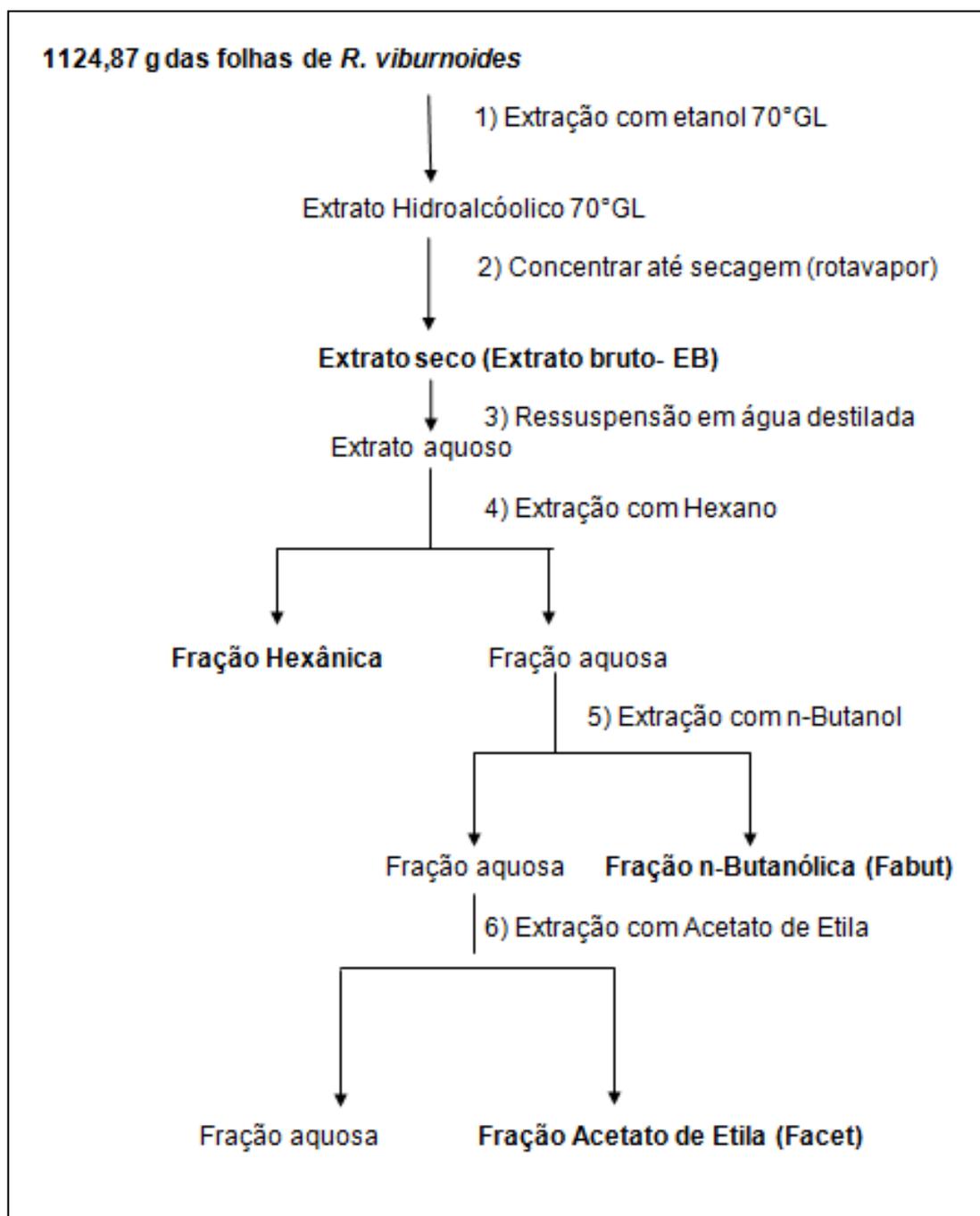


Figura 8 – Processo de preparo dos extratos e frações

3.2.4. Caracterização das substâncias químicas em EB e suas frações

a) *Cromatografia em camada delgada (CCD)*: Para a caracterização dos flavonoides e saponinas em EB, Fahex, Fabut e Facet, 20 mg de cada amostra foram dissolvidos em 2 mL de metanol. Uma pequena alíquota (10 – 20 µL) foi aplicada, com o auxílio de um capilar graduado, em uma placa de vidro 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 & BLANDT, 1996).

Para a identificação de flavonoides, o eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (100:11:11:26). A placa foi revelada com difenilboratoetilamina 1% em metanol (NP) seguido de polietilenoglicol 4000 1% 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: metanol: água (70:30:4). A placa foi revelada com anisaldeído sulfúrico. A placa foi aquecida por 5 min, a 105 °C e visualizada no visível.

b) *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*: A CLAE foi utilizada com o objetivo de identificar os componentes presentes no extrato, em especial os flavonoides e saponinas. O cromatógrafo utilizado (Agilent®) constitui de bomba quaternária, auto injetor, forno com temperatura programável, detector DAD (*diode array detector*) e programa (*software*) para captura e análise dos dados.

As condições cromatográficas utilizadas para a identificação foram: coluna, Phenomenex C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Merck); detecção, 205 - 254 nm; volume de injeção; 20 µL; fluxo, 1 mL/min; sistema de solvente, acetonitrila (A) e água (B); gradiente de eluição: 5% a 100% de A de 0 a 60 min, 100% de A de 60 a 70 min. Reequilíbrio da coluna: 100% a 5% de A de 70-75 min, 5% de A de 75-80 min.

b.1) *Padrão de flavonóide*: A rutina foi o flavonóide utilizado como padrão para a determinação de tempos de retenção. Esta substância (0,5 mg) foi dissolvida,

separadamente, em 0,5 mL do sistema de solvente acetonitrila:água (1:1) usado na CLAE de modo a se obter uma concentração final de 0,5 mg/mL.

b.2) *Amostras*: No preparo das amostras utilizou-se 4 mg do EB e suas frações (fahex, fabut e facet) que foram dissolvidos em 4 mL do sistema solvente acetonitrila:água (1:1) usado na CLAE de modo a se obter, também, uma concentração final de 1 mg/mL.

3.2.5. Ensaios biológicos

3.2.5.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c jovens (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, 6 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 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), e foram aprovados conforme CERTIFICADO Nº 159/2010 (ANEXO I).

3.2.5.2. Vermifugação

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

3.2.5.3. Preparo da dieta rica em carboidratos e suplementação com EB

Para induzir o aumento de adiposidade dos animais, utilizou-se uma ração rica em carboidratos, conforme receita padronizada pelo nosso grupo de pesquisa – para o

preparo de 1Kg de ração rica em carboidratos são necessários 395g de leite condensado, 395g de ração Labina® em pó, 70g de açúcar e 86mL de água.

A Tabela 1 apresenta a distribuição de macronutrientes e minerais, assim como a porcentagem de quilocalorias provenientes da dieta controle e da dieta palatável, obtidos através da análise bromatológica da dieta realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG.

Tabela 1 - Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle (C) e dieta rica em carboidratos (HC)

	Dieta Controle (C)	Dieta Rica em Carboidratos (HC)
Proteínas (%)	26,3	17,5
Lipídios (%)	2,6	5,0
Carboidratos (%)	55,6	64,8
Fibra bruta (%)	6,2	4,1
Minerais (%)	9,3	8,5
Energia (Kcal/g)	4,0	4,4

A dieta rica em carboidrato foi suplementada com o extrato bruto de *R.viburnoides* nas doses de estudo à partir da 8ª semana para parte dos animais que já a recebiam. O EB liofilizado foi incorporado à dieta na sua fase inicial de preparo, sendo adicionado aos ingredientes secos, homogeneizado por três vezes em peneira comum. Em seguida, os demais ingredientes (úmidos) foram incorporados aos secos, formando uma massa, com a qual manualmente se confeccionou os pelets (idênticos aos da dieta rica em carboidratos sem extrato).

A ingestão alimentar média foi determinada diariamente à partir 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 e receber ração rica em carboidratos suplementada com o extrato bruto.

O peso corporal (PC) foi avaliado uma vez por semana em balança semi-analítica com capacidade para 500 gramas e variação de 0,01 gramas. O ganho de peso foi calculado a partir da fórmula: (peso do dia – peso registrado na última pesagem) – delta de ganho de peso semanal.

O índice de adiposidade foi calculado pela relação entre a somatória dos pesos dos tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal (g) e o peso de cada animal (g), seguido de multiplicação por 100.

3.2.5.4. Esquema de tratamento

O tratamento com o extrato bruto de *R. viburnoides* foi feito nas doses 40, 80 e 160 mg/Kg/dia. Todas as doses foram incorporadas na dieta rica em carboidratos a partir da 8ª semana. A relação de todos os tratamentos realizados e os respectivos grupos de animais é descrita a seguir (Tabela 2). Após a escolha da melhor dose, realizaram-se os demais protocolos experimentais.

Tabela 2 - Grupos de animais em estudo e tipo de dieta consumida

Grupos	Dieta
1 - CONTROLE	Ração controle Labina®
2 - HC	Ração rica em carboidratos sem suplementação
3 - HC 40	Ração rica em carboidratos suplementada com EB (40 mg/Kg/dia)
4 - HC 80	Ração rica em carboidratos suplementada com EB (80 mg/Kg/dia)
5 - HC 160	Ração rica em carboidratos suplementada com EB (160 mg/Kg/dia)

3.2.5.5. Desenho experimental

O desenho experimental com escala temporal seguida durante o período de estudo (90 dias), com ração controle e dieta rica em carboidratos está demonstrado na Figura 9. A partir da 8ª semana de estudo parte dos animais (n=36) que recebiam a dieta HC passaram a consumir também o extrato bruto de *R. viburnoides* e assim permaneceram até a 12ª semana. Nessa semana todos os animais foram eutanasiados (Figura 9, pg.41).

3.2.5.6. Eutanásia

Após 90 dias de estudo os animais foram colocados de jejum, no período noturno, por aproximadamente 12 horas e então foram submetidos à eutanásia por exsanguinação, após terem sido anestesiados com 100 µL de ketamina: xilazina: PBS (3:1:4). Os tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal e o fígado foram removidos e conservados em freezer - 20°C.

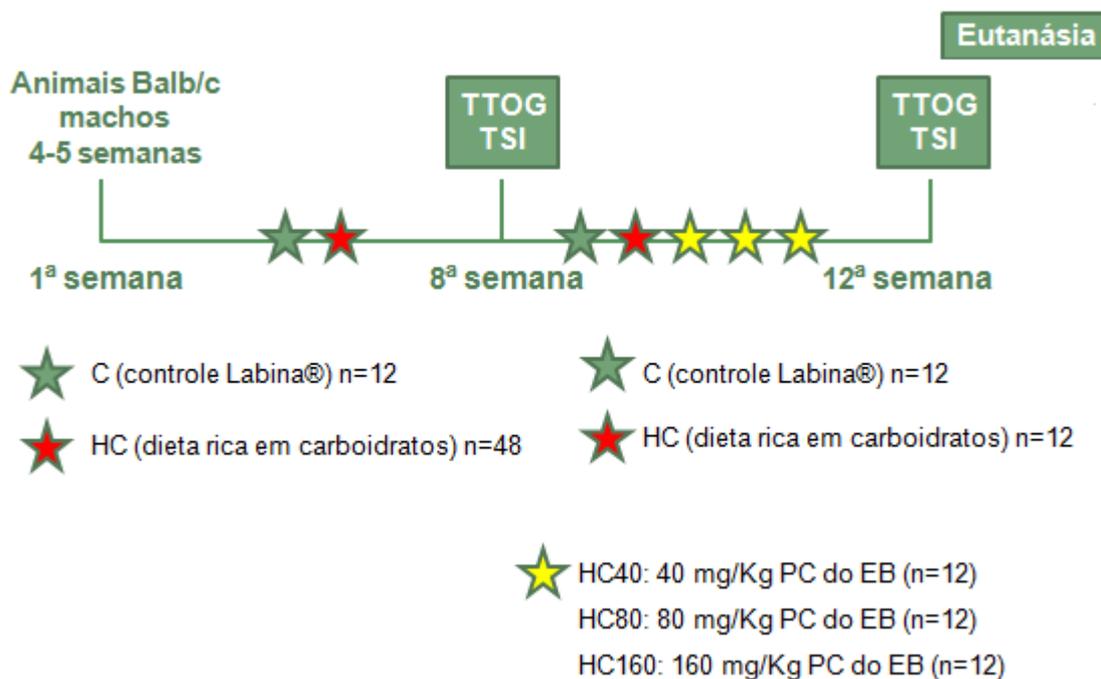


Figura 9 – Escala temporal do desenho experimental

3.2.5.7. Obtenção do soro

O sangue foi coletado em tubos, centrifugado (3000 r.p.m) durante 10 minutos à 4°C para obtenção do soro e, em seguida, aliqotado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior dosagem sérica de glicose, triglicérides, colesterol, insulina, adiponectina e resistina.

3.2.6. Protocolos Experimentais

3.2.6.1. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

Para o teste de tolerância oral à glicose foram utilizados camundongos no estado de jejum de aproximadamente 12 horas. Os animais receberam, via oral, por gavagem, D-glicose na dose de 0,2g/100g de PC, e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0 (estado de jejum), 15, 30, 60 e 90 minutos após a gavagem, utilizando um glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA). As amostras de sangue foram obtidas da cauda dos animais após um pequeno corte.

3.2.6.2. Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI)

Para o teste de sensibilidade à insulina foram utilizados camundongos no estado alimentado. Os animais receberam, por injeção intrapeitoneal, insulina na concentração de 0,75UI/100g de PC, e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0 (estado alimentado), 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção, utilizando um glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA). As amostras de sangue também foram obtidas da cauda dos animais após um pequeno corte.

3.2.6.3. Cálculo do Índice de HOMA-IR e HOMA-β

A resistência à insulina foi avaliada pela aplicação dos índices HOMA-IR (homeostasis model of assessment) e HOMA-β (homeostasis model of assessment for β-cell function). O primeiro índice avalia a sensibilidade à insulina e o outro a função das células-β pancreáticas. O HOMA-IR foi calculado usando a fórmula (glicemia de jejum (mmol/L) x insulina de jejum (μU/mL) / 22,5) e o HOMA-β a fórmula [(insulina de jejum (μU/mL) x 20) / glicemia de jejum (mmol/L) – 3,5] descrita por MATTHEWS et al. (1985) e atualizado por BONORA et al. (2000) .

3.2.6.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

3.2.6.4.1. Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz

Fragmento do tecido adiposo epididimal com cerca de 50-100mg 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 24 horas. Em seguida, procedeu-se a etapa de desidratação com a álcool 70°, a diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia.

3.2.6.4.2. Aquisição de imagem no microscópio e mensuração da área a diâmetro

Para a determinação do tamanho dos adipócitos, as lâminas foram analisadas através de microscópio, equipado com uma câmera digital (Motican 2500). O perímetro e a área seccional foram obtidos através da medida aleatória de 50 adipócitos por lâmina, e posterior análise com o programa ImageJ para o processamento de imagens digitais.

3.2.6.5. Dosagens sorológicas

O triacilglicerol, colesterol total e glicose presentes no soro foram quantificados por Kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG) segundo as instruções do fabricante. As dosagens de insulina, adiponectina e resistina foram quantificadas por meio da técnica de ELISA (“kits” comerciais – Millipore para insulina e R&D Systems para adiponectina e resistina).

3.2.6.6. Contagem total de leucócitos, células mononucleares e neutrófilos

Para contagem total de leucócitos, uma amostra de sangue foi diluída na proporção 1:10 em solução de Türk. O sangue foi obtido da cauda dos animais após um pequeno corte na ponta da mesma. A contagem total foi realizada em microscópio ótico (Olympus), usando câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada após aplicação da técnica de coloração com kit panóptico das lâminas com esfregaço sanguíneo.

3.2.6.7. Extração de citocinas e quimiocina dos tecidos

Fragmentos do tecido adiposo epididimal e fígado (100mg) foram homogeneizados em 1mL de solução de extração de citocinas e quimiocina (NaCl 0,4 mol/L; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mmol/L; cloreto de benzetônio 0,1mmol/L; EDTA 10 mmol/L; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8g NaCl, 0,2g KCl e 2,89g Na₂HPO₄.12H₂O diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10min a 10000 r.p.m. a 4°C e o infranadante foi recolhido para a dosagem pela técnica de ELISA.

3.2.6.8. Determinação da concentração de citocinas e quimiocina por ELISA

As amostras dos tecidos adiposo epididimal e fígado extraídas no procedimento supracitado e alíquotas do soro foram diluídas na proporção de 1:4 para o tecido adiposo, 1:10 para o fígado e para o soro 1:100 para resistina e 1:2000 para adiponectina, em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. As concentrações de TNF- α , IL-6 e CCL2 nos tecidos e resistina e adiponectina no soro foram determinados utilizando-se anticorpos obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas, e estão resumidamente descritas abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Nunc, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4°C. Os anticorpos de detecção foram

diluídos em PBS, pH 7,4, com 0,1% de albumina bovina, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase e revelada com OPD (“o-phenylendiamine dihydrochloride”-Sigma). A reação foi interrompida com H₂SO₄ a 1 mol/L. A leitura foi feita no leitor de ELISA com filtro para um comprimento de onda de 492nm.

Para as concentrações de insulina utilizou-se kit ELISA Millipore® que permitiu a quantificação não radioativa de insulina no soro dos animais, seguindo as orientações do fabricante.

3.2.7. 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. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média±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).

3.2.8. Análise das amostras comerciais

O objetivo dessas análises foi verificar as condições com que a planta vem sendo comercializada nos mercados populares, tendo em vista que a mesma é empregada em “regimes de emagrecimento”. Foram aplicados métodos farmacopéicos para análises em drogas vegetais (partes da planta que são usadas como remédio), visando avaliar a sua identidade e condições sanitárias.

3.2.8.1. Obtenção das amostras

Cinco amostras de drogas vegetais comercializadas com os nomes populares de congonha, congonha de bugre e bugre foram adquiridas em ervanarias provenientes do Mercado Central de Belo Horizonte.

3.2.8.2. Análise se o peso corresponde ao descrito na embalagem

As amostras foram pesadas e o resultado obtido foi comparado com o indicado na embalagem. É permitida uma tolerância de variações de até 9% do peso total conforme a Lei nº 9933, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999a) e a Portaria Inmetro nº 96, de 07 de abril de 2000 (BRASIL, 2000).

3.2.8.3. Caracterização organoléptica (análises sensoriais)

As amostras foram submetidas à caracterização organoléptica, no que se refere à cor, odor e textura (WHO, 1998). As amostras de congonha foram comparadas com a amostra identificada de *R. viburnoides* utilizadas neste estudo.

3.2.8.4. Verificação da presença de materiais estranhos

Os fármacos vegetais devem ser isentos de fungos, de insetos e de outras contaminações de origem animal. Salvo indicação ao contrário, a porcentagem de elementos estranhos não deve ser superior a 2% m/m.

Todas as amostras foram separadas manualmente dos materiais estranhos à droga a olho nu com o auxílio de uma pinça. Em seguida, pesou-se o material separado e determinou-se seu percentual com base no peso da amostra submetida ao ensaio. A quantidade de amostra submetida ao ensaio foi igual à quantidade total após pesagem do material.

3.2.8.5. Identificação das amostras por meio do perfil em CCD

3.2.8.5.1. Preparação dos extratos

Utilizou-se o mesmo processo adotado para a amostra coletada e avaliada neste estudo. Folhas trituradas foram submetidas à percolação a frio, com álcool etílico a 70%, como solvente extrator. Após o processo de percolação, o percolato foi concentrado à vácuo até resíduo, obtendo-se o extrato bruto (AC1, AC2, AC4 a AC5).

Esses foram solubilizados em metanol, antes de serem aplicados às placas para determinação do perfil cromatográfico.

3.2.8.5.2. Determinação do perfil cromatográfico por CCD

Foram determinados perfis cromatográficos para flavonoides e saponinas por CCD, com placas de sílica gel Merck, para todas as amostras adquiridas. O padrão de referencia utilizado foi a extrato bruto a 70% das folhas de *R.viburnoides* identificadas para este estudo.

Para flavonoides utilizou-se o eluente acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26) e revelação com NP/PEG, seguido de observação no UV e para saponinas utilizou-se clorofórmio: metanol: água (70:30:4) e revelação com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento e observação na luz visível.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do EB das folhas de *R. viburnoides* no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas induzidas por dieta

4.1.1. TTOG na oitava semana de experimento

Com o objetivo de verificar se a dieta HC alterou o metabolismo da glicose, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose na oitava semana de experimento. Conforme pode ser observado na Figura 10 A (pg.49), nos tempos 15 e 30 minutos após gavagem de glicose, os animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores concentrações de glicose quando comparado aos animais controle (C). A Figura 10 B (pg.49) apresenta a área sob a curva do TTOG indicando a menor tolerância à glicose nos animais alimentados com dieta HC.

4.1.2. TSI na oitava semana de experimento

Com o objetivo de verificar se a dieta HC alterou a sensibilidade à insulina, os animais foram submetidos ao teste de sensibilidade à insulina na oitava semana de experimento. Conforme pode ser observado na Figura 11 A e B (pg.50), os animais alimentados com dieta HC apresentaram menor sensibilidade à insulina em todos os tempos de aferição da glicose quando comparados aos animais alimentados com dieta C.

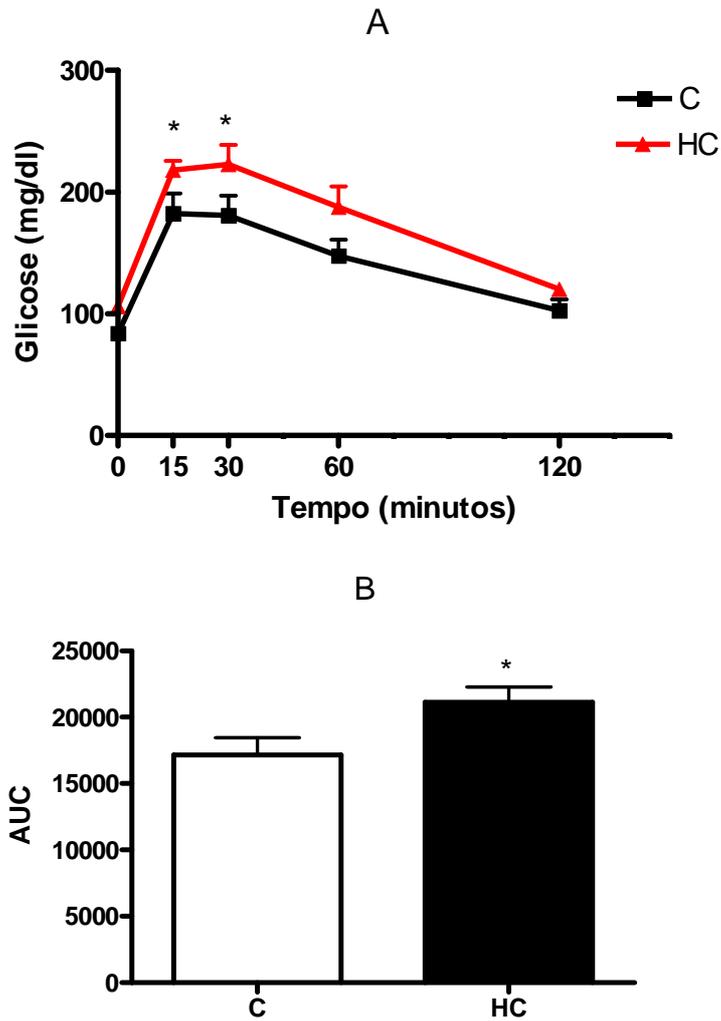


Figura 10 – Teste de tolerância oral à glicose na oitava semana de estudo. (A) Glicemia nos tempos 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos após gavagem de 0,2g/100g de PC de glicose. (B) Área sob a curva do TTOG. As barras representam a média \pm erro padrão, n=9. *p<0,05 vs C.

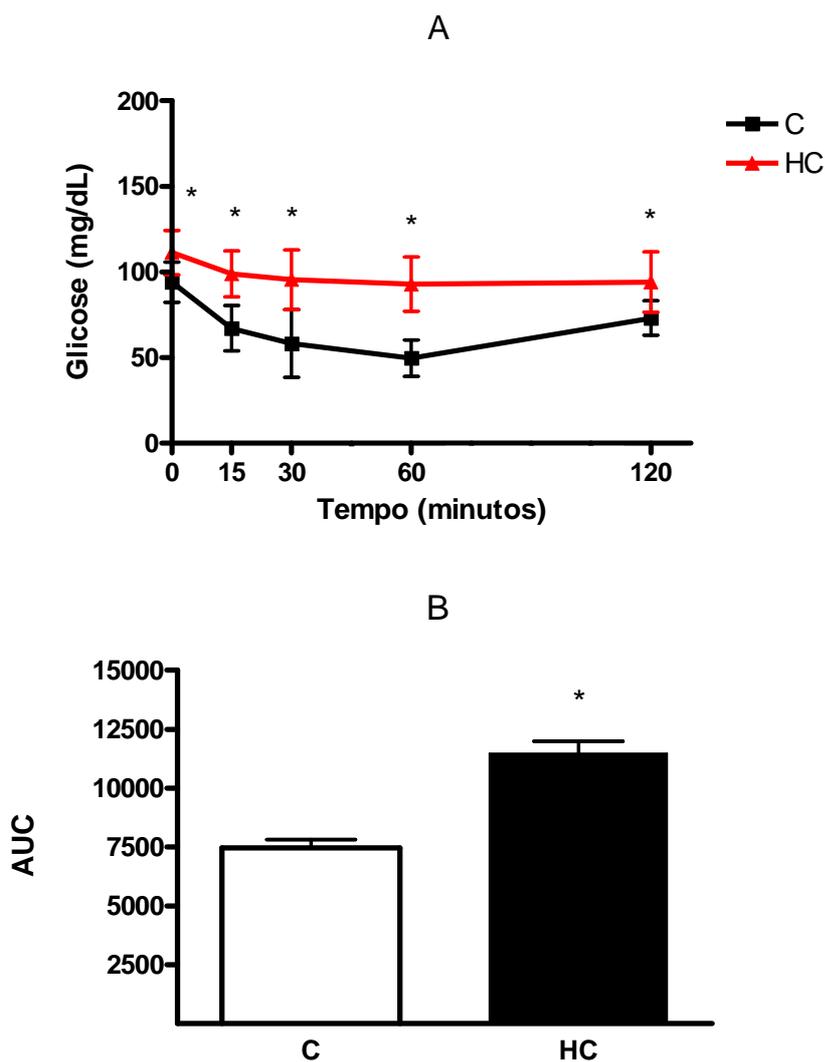


Figura 11 – Teste de Sensibilidade à Insulina na oitava semana de estudo. (A) Glicemia nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após injeção intraperitoneal de 0,75UI/100g de PC de insulina. (B) Área sob a curva do TSI. As barras representam a média ± erro padrão, n=9. *p<0,01 vs C.

4.1.3. Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e índice de adiposidade

Depois de confirmado que os animais alimentados com dieta HC apresentaram menores tolerância à glicose e sensibilidade à insulina após 8 semanas de dieta, iniciou-se o tratamento com três diferentes doses do extrato bruto de *R. viburnoides* durante quatro semanas, com o objetivo de verificar se o extrato influenciaria em parâmetros metabólicos.

O consumo de ração entre os animais alimentados com dieta C, HC, HC40, HC80 e HC160 não foi diferentes entre os grupos (Figura 12 A, pg.52). Em relação ao ganho de PC (Figura 12 B, pg.52), observa-se que os animais quando alimentados com dieta HC apresentaram ganho de peso também similar aos animais alimentados com dieta C, assim como os demais grupos de animais alimentados com dieta HC suplementada.

Conforme pode ser observado na Figura 12 C (pg.52), animais alimentados com dieta HC apresentaram maior índice de adiposidade quando comparados aos animais que consumiram dieta C. Não houve alteração desse índice para os grupos de animais que receberam dieta HC suplementada com extrato bruto de *R. viburnoides* nas diferentes doses estudadas em relação ao seu respectivo controle (HC).

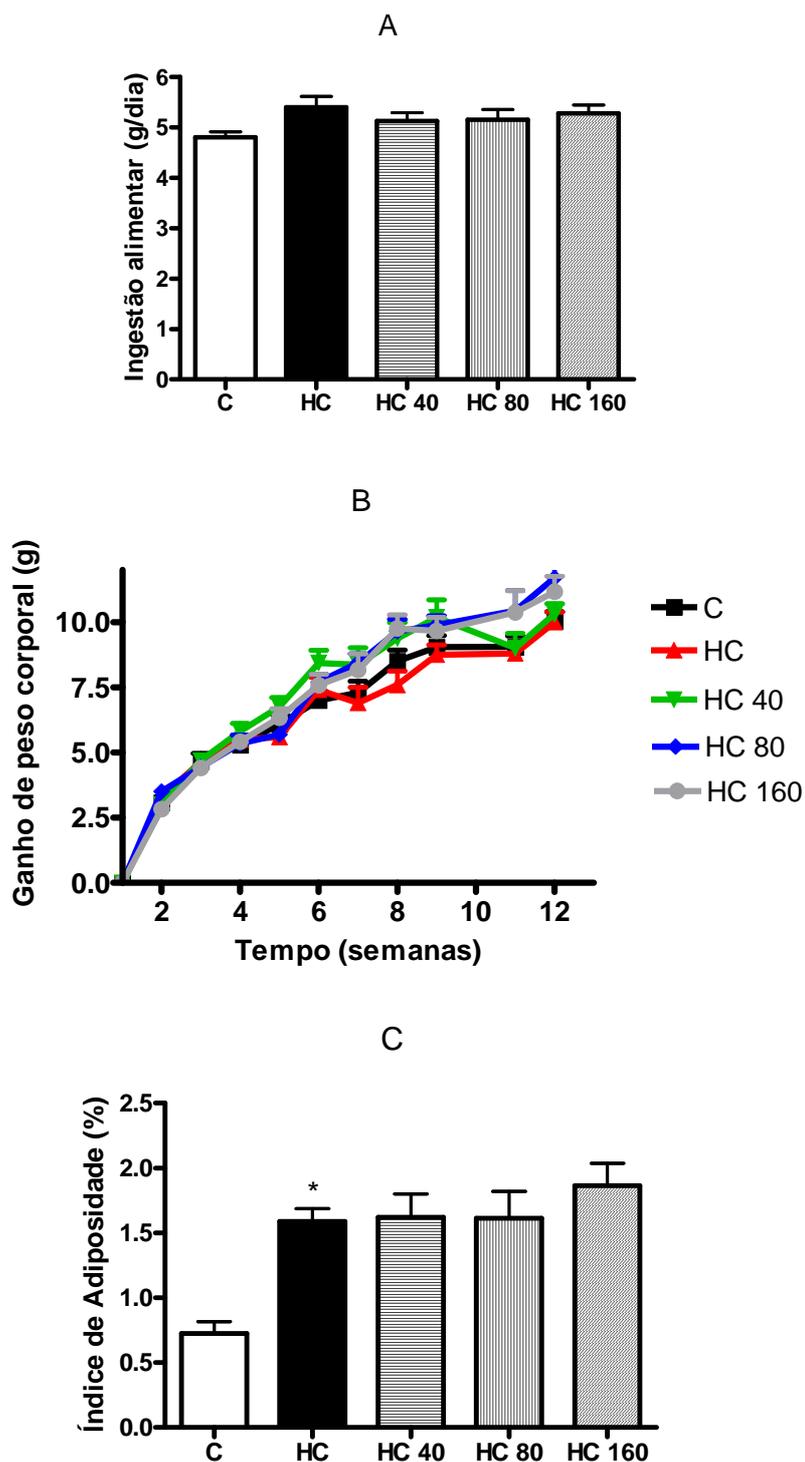


Figura 12 - Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e índice de adiposidade de animais controle (C), alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) e com dieta rica em carboidrato suplementada com extrato de *R. viburnoides* nas doses 40, 80 e 160 mg/Kg peso corporal. (A) Ingestão alimentar média durante as 12 semanas experimentais (as barras representam médias \pm erro padrão, $n=9-12$). (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 erro padrão, n=9-12. *p<0,01 vs C.

4.1.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

A análise morfológica do tecido adiposo epididimal mostrou que os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento da área (Figura 13 B, pg.53) e do diâmetro (Figura 13 C, pg.54) dos adipócitos quando comparados ao controle (C). Já os animais que receberam suplementação com HC40 apresentaram área e diâmetro menores que os animais HC. Entretanto, os demais animais que receberam suplementação HC80 e HC160 o aumento da área e diâmetro dos adipócitos não foi diferente do controle HC.

4.1.5. TTOG após quatro semanas de tratamento

Com o objetivo de verificar se o consumo de dieta HC suplementada com as diferentes doses do extrato bruto de *R. viburnoides* seria capaz de reverter a alteração do metabolismo de glicose dos animais, realizou-se novamente na 12^a semana de experimento, o teste de tolerância oral a glicose após 4 semanas de suplementação.

Conforme pode ser observado na Figura 14 A e B (pg.55), de acordo com o esperado, os animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores concentrações de glicose nos tempos 15, 30 e 60 minutos após gavagem de glicose em relação ao controle (C). Apenas os animais HC40 apresentaram menores concentrações de glicose nos tempos 15, 30 e 60 minutos após gavagem de glicose, apresentando melhor tolerância oral à glicose quando comparados aos animais HC.

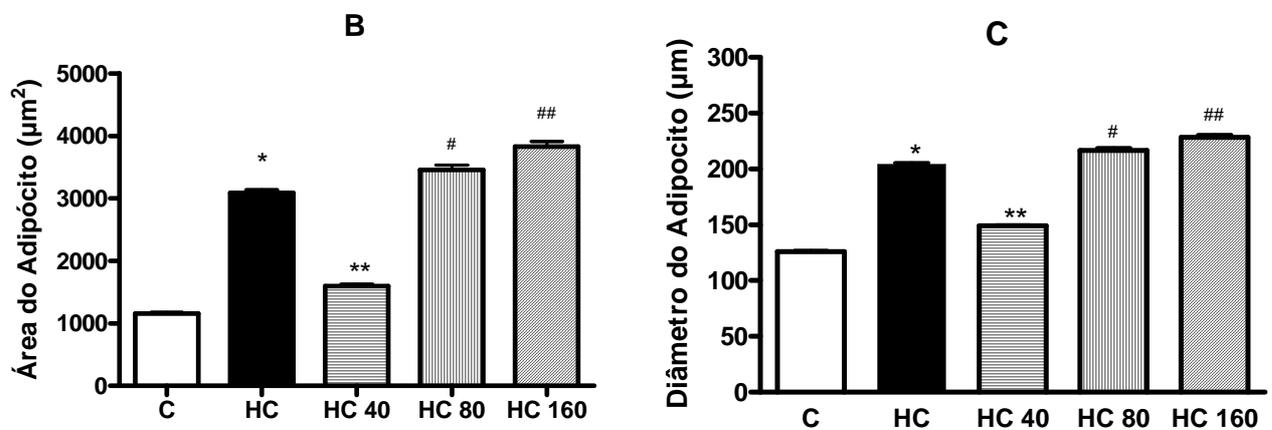
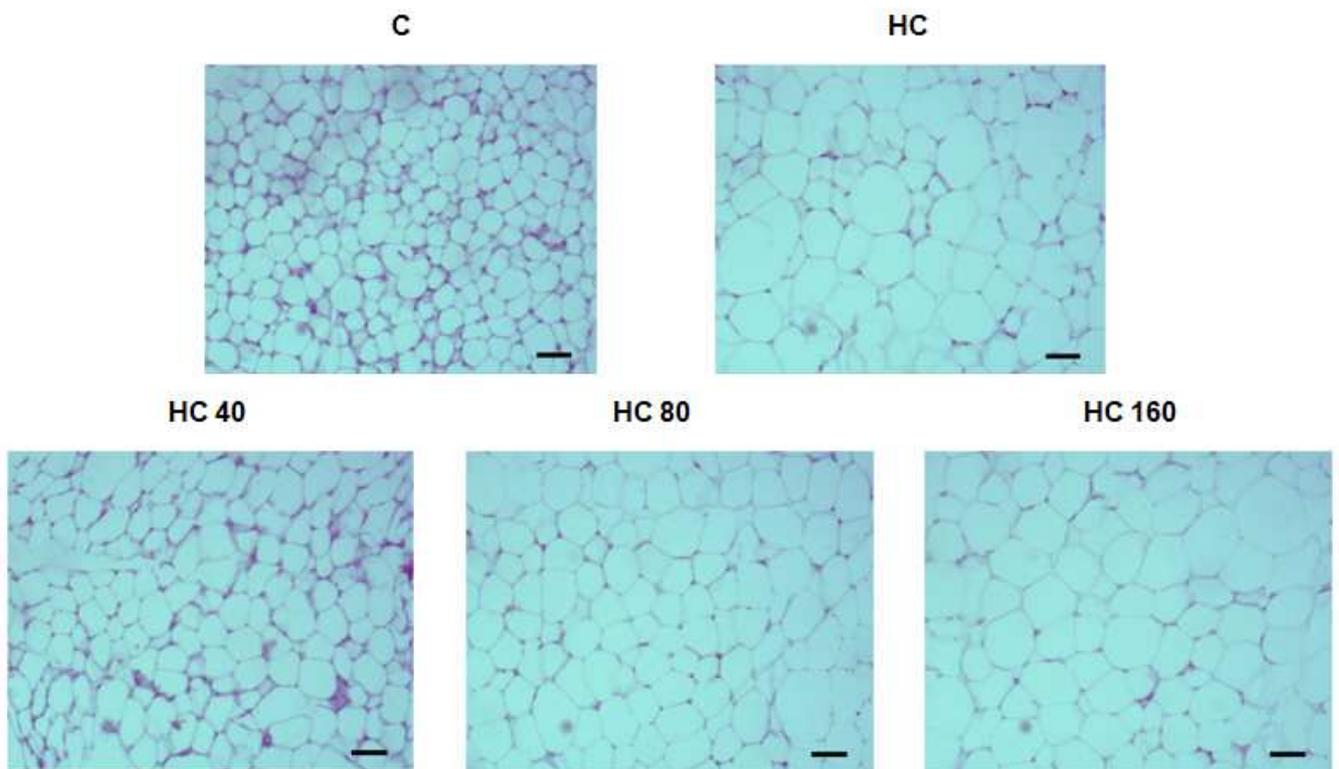


Figura 13 – Análise histológica de secções do tecido adiposo epididimal. (A) Figuras representativas da morfologia do tecido adiposo epididimal dos animais controle (C), alimentados com dieta rica em carboidratos (HC), suplementado com extrato nas doses 40 (HC 40), 80 (HC 80) e 160 (HC 160) mg/Kg em aumento de 10x. Barra de escala, 50µm. (B e C) – Determinação da área (B) e diâmetro (C) de adipócitos dos animais controle, HC e respectivas doses. As barras representam as médias \pm erro padrão, n=5. *p<0,01 vs C. **p<0,01 vs HC. # p<0,01 vs HC40. ## p<0,01 vs HC80.

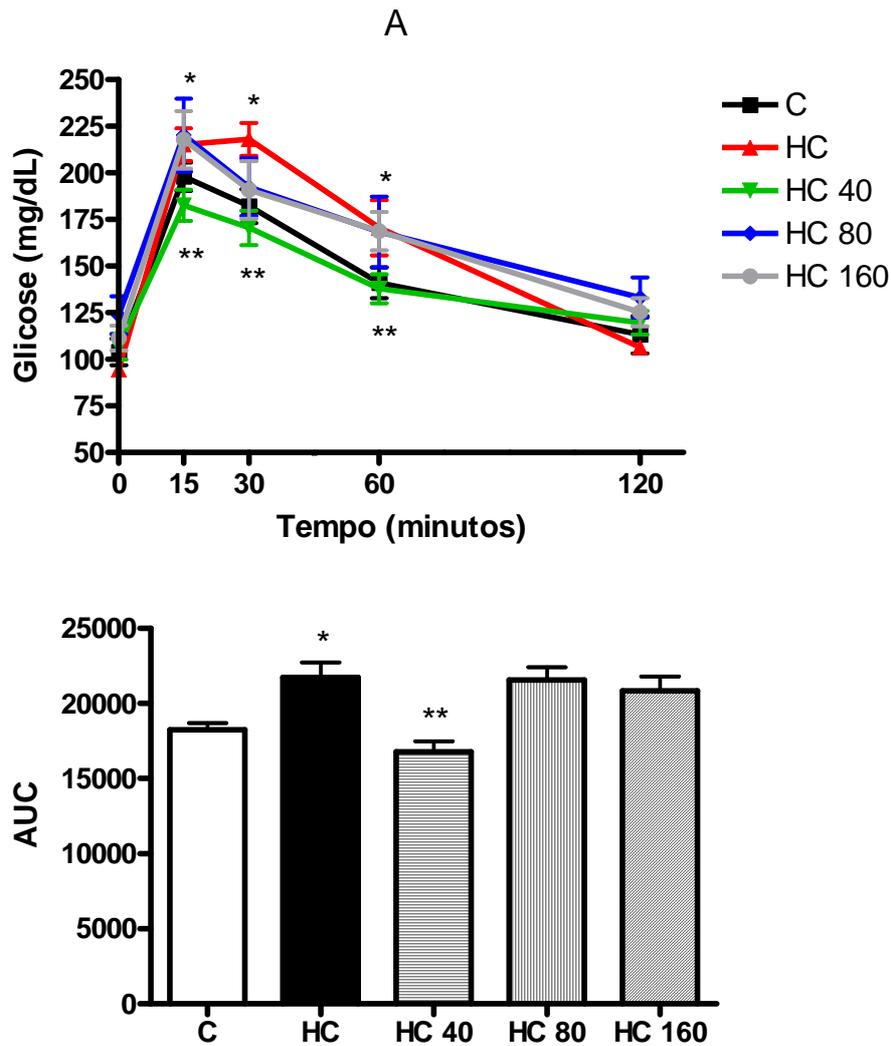


Figura 14 – TTOG na décima segunda semana de estudo, após 4 semanas de suplementação com o extrato bruto de *R. viburnoides*. (A) Glicemia nos tempos 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos após gavagem de 0,2g/100g de PC de glicose. (B) Área sob a curva do TTOG - as barras representam as médias \pm erro padrão, n=9-12. * $p < 0,05$ vs C. ** $p < 0,05$ vs HC.

4.1.6. TSI após quatro semanas de tratamento

Uma vez que os animais HC40 apresentaram melhor tolerância à sobrecarga de glicose, os mesmos foram submetidos ao teste de sensibilidade à insulina, conforme pode ser observado na Figura 15 (pg.56). Os animais alimentados com dieta HC apresentaram menor sensibilidade à insulina quando comparados aos controles. A

suplementação da dieta com HC40 atenuou a insensibilidade à insulina induzida por dieta HC (Figura 15 A e B).

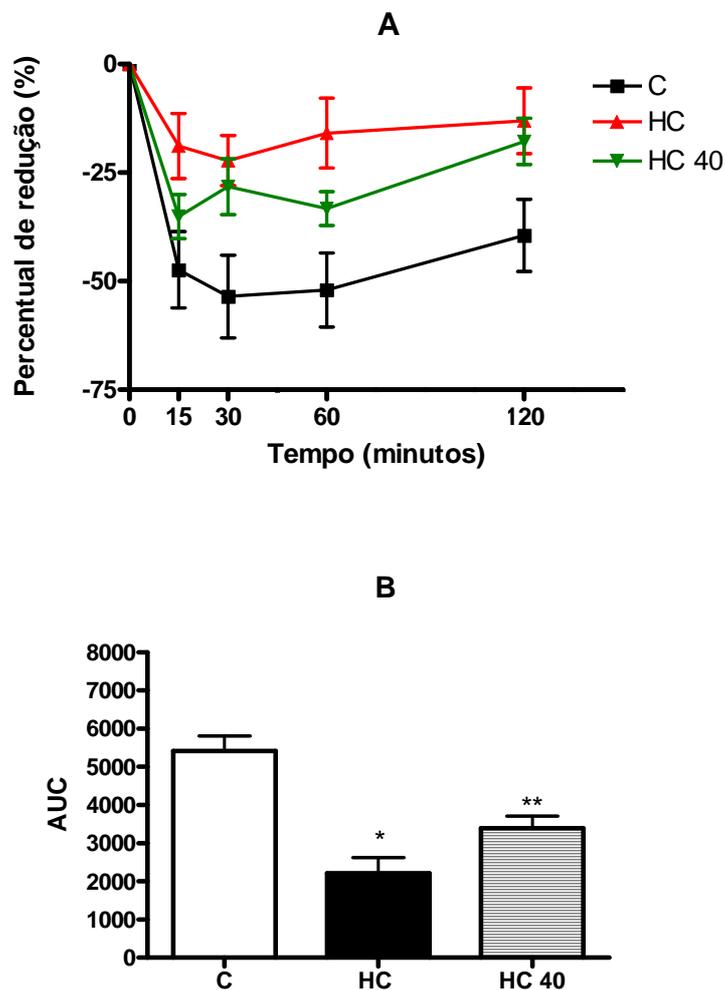


Figura 15 – Teste de sensibilidade à insulina realizado na 12^a semana de estudo, após 4 semanas de suplementação com o extrato bruto de *R. viburnoides*. (A) Percentual de diminuição da glicemia nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após injeção intraperitoneal 0,75UI/100g PC de insulina em animais alimentados com dieta controle (C), alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) e HC suplementada com extrato bruto na dose 40mg/Kg PC. (B) Área sob a curva - as barras representam a média \pm erro padrão, n=6-8. *p<0,05 vs C. ** p<0,05 vs HC.

4.1.7. Parâmetros sorológicos

4.1.7.1. Glicose, Colesterol total, Triacilglicerol, Índices HOMA e Insulina

As alterações no metabolismo de glicose e lipídios dos animais estudados foram avaliadas pelas dosagens de glicose, colesterol total, triglicérides, índices HOMA-IR e HOMA- β e insulina. Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que os animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triacilglicerol, assim como maior HOMA-IR e menor HOMA- β . Os animais suplementados com dieta HC40 apresentaram menores concentrações plasmáticas de glicose e colesterol, assim como menor HOMA-IR e maior HOMA- β que o controle (HC). As concentrações plasmáticas de insulina não foram diferentes entre os grupos.

Tabela 3 – Parâmetros sorológicos e índices HOMA de animais alimentados com dieta controle (C), alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) e suplementados com extrato bruto de *R.viburnoides* (HC40). n=8. *p<0,05 vs C; ** p<0,05 vs HC.

Perfil Séricos	Grupos		
	CONTROLE	HC	HC 40
Glicose (mg/dL)	147,05 \pm 35,20	225,47 \pm 39,69*	83,29 \pm 26,30**
Insulina (ng/mL)	0,251 \pm 0,05	0,236 \pm 0,03	0,238 \pm 0,09
HOMA-IR	2,21 \pm 0,35	3,31 \pm 1,21*	0,99 \pm 0,41**
HOMA- β	23,43 \pm 5,08	9,71 \pm 4,29*	95,69 \pm 50,23**
Colesterol total (mg/dL)	276,10 \pm 45,94	389,38 \pm 56,21*	322,12 \pm 23,80**
Triacilglicerol (mg/dL)	145,39 \pm 24,27	236,19 \pm 39,83 *	231,28 \pm 45,72

4.1.7.2. Contagem de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos

Para avaliar células inflamatórias sistêmicas realizaram-se a contagem de leucócitos totais e contagem diferencial para células mononucleares e neutrófilos no sangue dos animais. Observa-se aumento do número de células totais (leucócitos) e

mononucleares nos animais que receberam dieta HC em relação aos C. Os animais suplementados com HC40 apresentaram número de células totais e monócitos em menor número quando comparados aos animais que se alimentaram com dieta HC. Não houve diferença em relação ao número de neutrófilos para nenhum desses grupos.

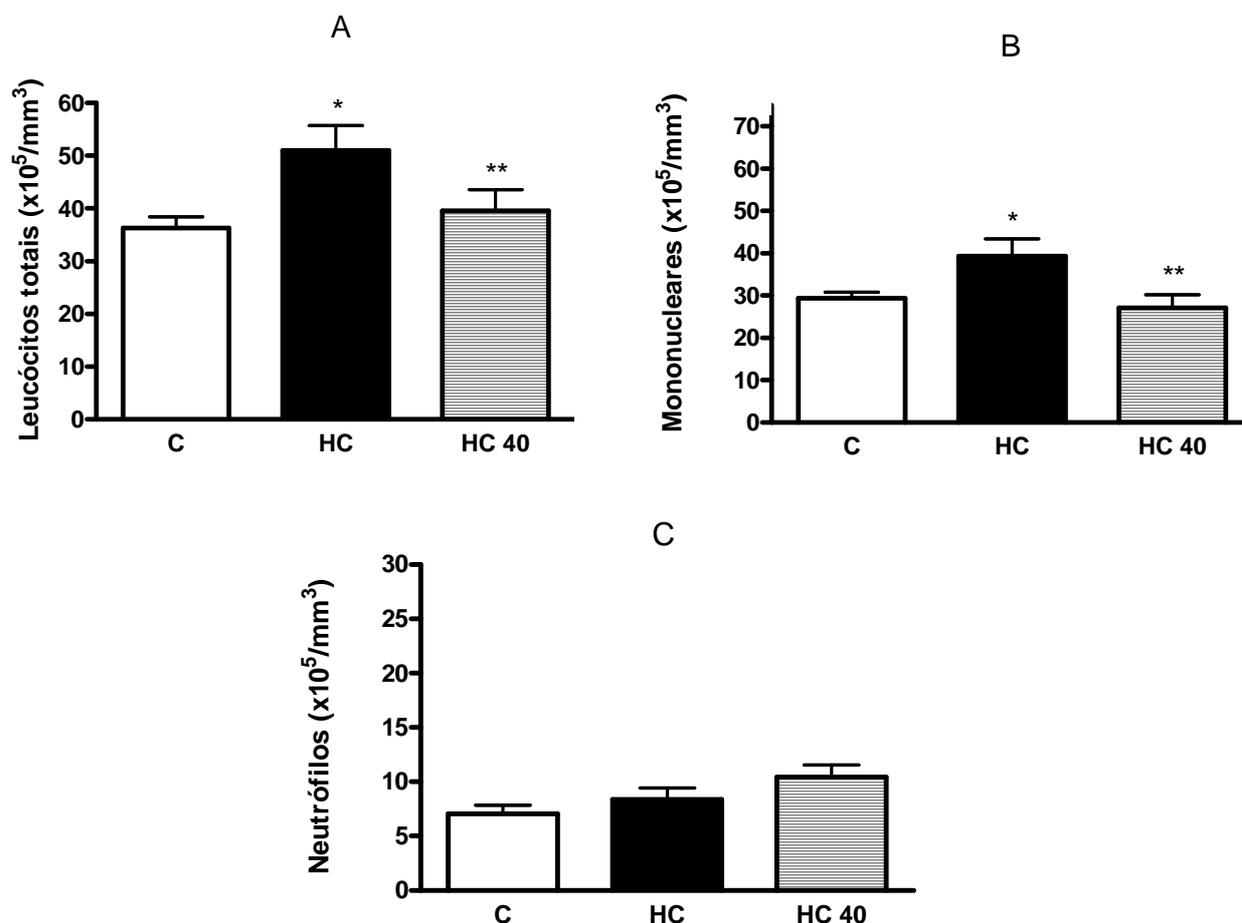


Figura 16 – Contagem total de células (leucócitos), mononucleadas e neutrófilos. Animais alimentados com dieta controle (C), com dieta rica em carboidratos (HC) e suplementados com extrato bruto de *R.viburnoides* (HC40 - 40mg/Kg PC). n=8. * $p<0,05$ vs C; ** $p<0,05$ vs HC.

4.1.7.3. Adipocitocinas: Resistina e Adiponectina

Para avaliar a sensibilidade à insulina e, também, a inflamação sistêmica, realizaram-se as dosagens sorológicas de resistina e adiponectina. Conforme pode ser observado na Figura 17 (pg.59), animais alimentados com dieta HC apresentaram maior

concentração sérica de resistina e menor concentração sérica de adiponectina em relação aos animais C. Os animais suplementados com HC40 apresentaram valores significativamente menores de resistina em relação ao grupo HC. (Figura 17 A). Entretanto, os animais suplementados nessa mesma dose com extrato não apresentaram diferença em relação ao seu respectivo controle (HC) para os valores de adiponectina (Figura 17 B).

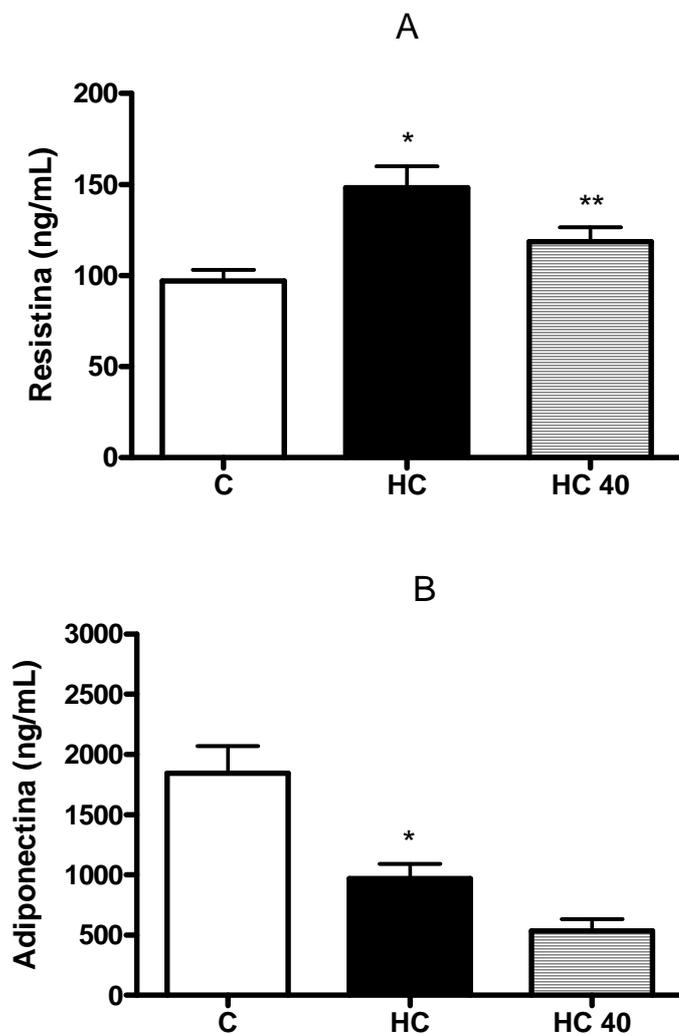


Figura 17 – Concentração de adipocitocinas no soro. Animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidratos (HC) e dieta rica em carboidratos suplementada com extrato bruto de *R. viburnoides* (HC 40). Concentração de resistina (A) e adiponectina (B). n=5-8. *p<0,01 vs C. ** p<0,05 vs HC.

4.1.8. Concentração de citocinas e quimiocina nos tecidos hepático e adiposo epididimal

Para avaliar a inflamação local, realizaram-se as determinações das concentrações de citocinas e quimiocina nos tecidos adiposo epididimal e hepático. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores concentração de IL-6, TNF- α e CCL2 no tecido hepático (Figura 18 A, B e C, pg.61) e adiposo epididimal (Figura 18 D, E e F, pg.61) em relação aos controles (C). Os animais suplementados com HC40 apresentaram menores concentrações de IL-6, TNF- α e CCL2 em ambos os tecidos em relação aos animais alimentados com dieta HC.

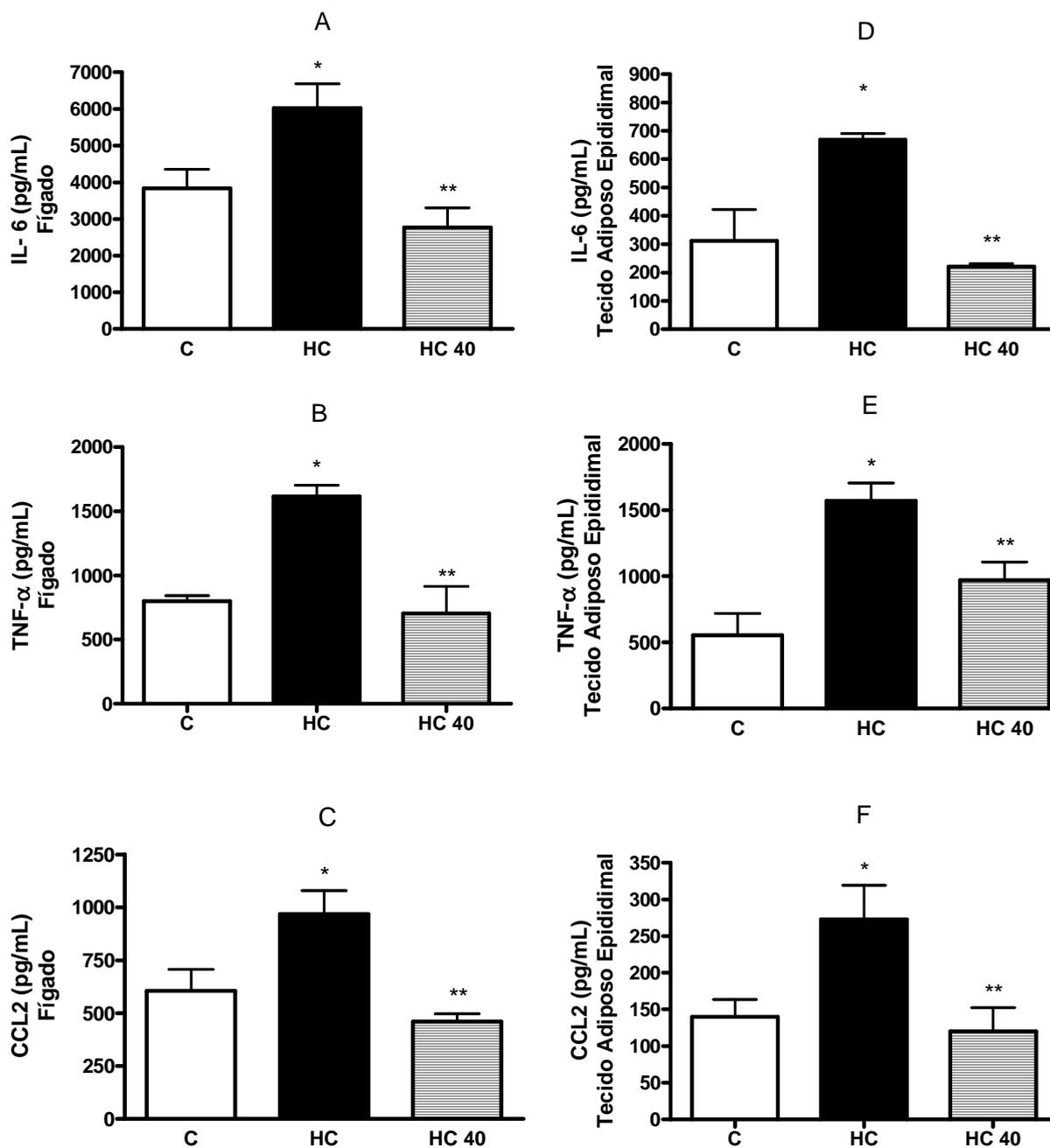


Figura 18 - Concentração de citocinas e quimiocina extraídas do fígado e tecido adiposo epididimal de camundongos. Animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidratos (HC) e animais alimentados com dieta HC suplementada com extrato de *R. viburnoides* (HC40). Concentrações hepáticas de IL-6 (A), TNF- α (B) e CCL2 (C). Concentrações no tecido epididimal de IL-6 (D), TNF- α (E) e CCL2 (F). As barras representam a média \pm erro padrão. n= 5-7. *p<0,01. vs C. **p<0,05 vc HC.

4.2. Análise química do EB e suas frações

4.2.1. Rendimentos das extrações

O processo utilizado na preparação do extrato bruto das folhas de *R. viburnoides* foi a percolação a frio. Após o processo de percolação, o percolato foi concentrado à vácuo até secagem completa, obtendo-se o extrato bruto (EB). Esse extrato foi obtido a partir de 1.124,87g de pó das folhas extraído com álcool etílico 70%. O rendimento encontrado após o processo de percolação foi de 31,78% (p/p) (Tabela 4).

Tabela 4 – Rendimento do EB das folhas de *R. viburnoides*.

Pó da planta (g)	Peso extrato (g)	Rendimento (%)
1.124,87	357,51	31,78

Esse extrato foi submetido a um fracionamento que teve por objetivo separar as substâncias químicas de acordo com suas características de polaridade. O fracionamento foi feito a partir de 88,76 g do EB. O rendimento obtido com os diferentes solventes, hexano (Fahex), acetato de etila (Facet) e n-butanol (Fabut) encontra-se na Tabela 5. Por se tratar de uma mistura complexa, rica em substâncias polares, o fracionamento do EB permitiu separar das mesmas.

Tabela 5 - Rendimento após o processo de fracionamento do EB das folhas de *R.viburnoides* utilizando diferentes solventes.

Partição	Extrato/Fração	Peso (g)	Rendimento %
Extrato bruto	EB	88,76	-
Hexano	Fahex	12,38	13,95
Acetato de etila	Facet	30,38	34,23
n-butanol	Fabut	9,37	10,56

4.2.2. Identificação de substâncias químicas no EB e suas frações por CCD

A Figura 19 (pg.64) mostra o perfil cromatográfico, em CCD, obtido para flavonoides no EB, Fahex, Facet e Fabut das folhas de *R. viburnoides*. As bandas de fluorescência amarelas e alaranjadas, com Rfs entre 0,40 e 0,60 encontradas em todas as amostras, indicam a presença de flavonoides. As fluorescências alaranjadas indicam a presença de flavonoides do tipo quercetina, enquanto as amarelas podem ser devido a flavonoides do tipo vitexina (WAGNER & BLANDT, 1996). O padrão de rutina (PR) apresentou fluorescência alaranjada com Rf 0,41 que foi também revelado no EB e suas frações. Outras duas bandas fluorescentes encontradas na rutina são devido à uma degradação espontânea da estrutura do heterosídeo. As bandas de fluorescência azul no EB e suas frações são devido à presença de ácidos orgânicos, do tipo clorogênicos. Essas fluorescências são específicas para estas substâncias, após revelação com o revelador próprio para elas.

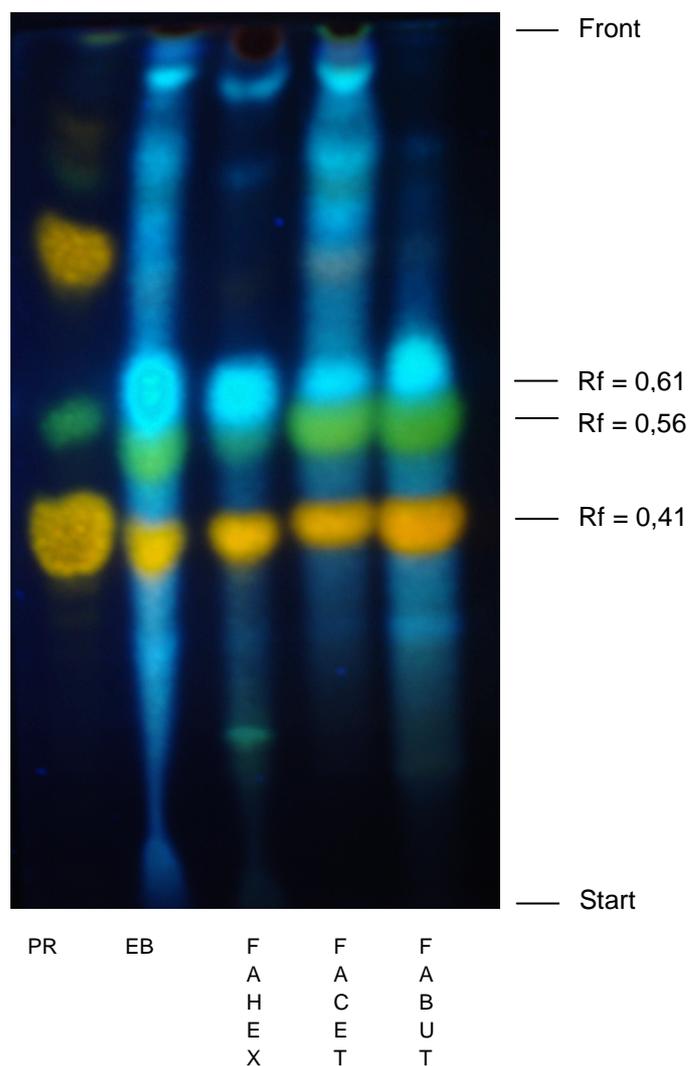


Figura 19. Cromatografia em camada delgada para identificação de flavonoides. PR, Padrão de rutina; EB, extrato bruto das folhas de *R. viburnoides*; FAHEX, fração hexânica; FACET, fração acetato de etila; FABUT, fração n-butanol. Eluente, acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26); revelador, difenilboratoetilamina a 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 a 1% em etanol (PEG); visualização, luz ultravioleta a 365 nm.

A Figura 20 A (pg.66) mostra o perfil cromatográfico, em CCD para saponinas do EB, Fahex, Facet e Fabut das folhas de *R. viburnoides*, revelado com reagente anisaldeído sulfúrico, utilizado para revelar substâncias como saponinas e triterpenos. O padrão de saponina comercial (SP) apresentou-se com duas bandas marrons escuras, com Rfs de 0,05 e 0,10. Manchas com esta mesma coloração, e próximas a estes Rfs, puderam

ser observadas também no EB. O EB apresentou outras bandas de coloração variadas, de marrom claro a azul, com Rfs entre 0,30 e 0,85. As bandas amarelas com Rfs entre 0,30 e 0,45 encontradas no EB, Facet e Fabut e as bandas azuis com Rf entre 0,53 e 0,64 encontradas no EB, Fahex, Facet e Fabut também indicam a presença de saponinas.

Para confirmar se as bandas amarelas encontradas nos Rfs mais polares (0,30 e 0,45; Figura 20 A, pg.66) correspondem a saponinas e não a flavonoides, realizou-se uma CCD para a identificação de flavonoides. Utilizou-se o mesmo eluente para saponinas, mas o revelador utilizado foi para flavonoides. A placa 20 B (pg.67) apresentou bandas fluorescentes, com Rfs 0,25 e 0,34, correspondem à flavonoides. Isto confirma que as bandas amarelas, reveladas anteriormente, presentes na placa 20 A (Rf = 0,30 e 0,45) são indicativas da presença de saponinas.

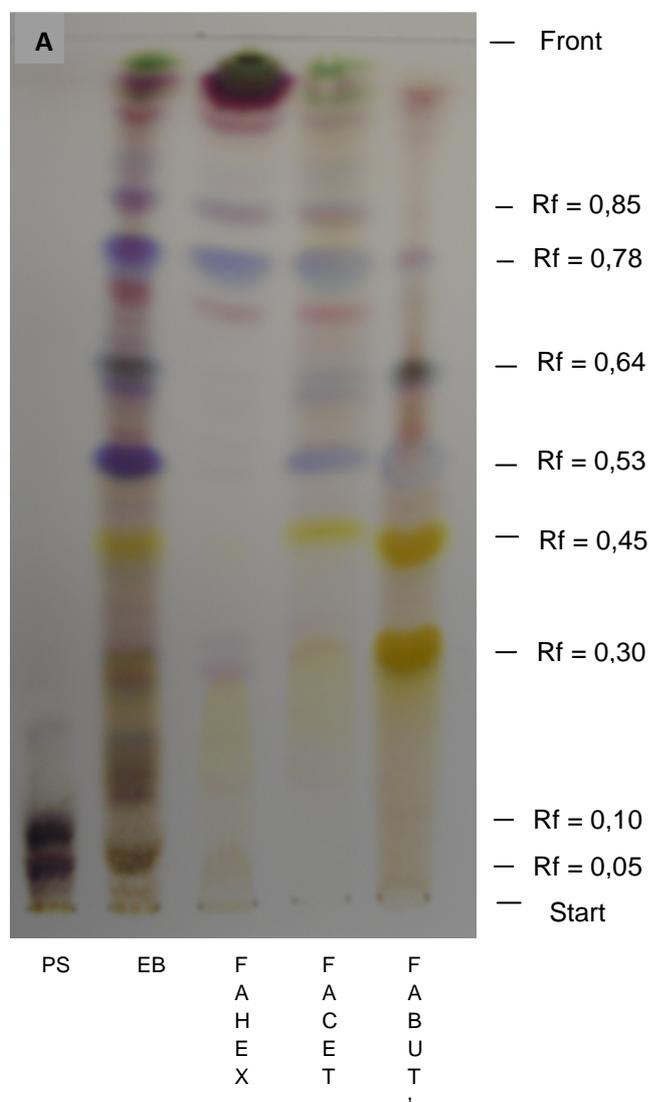


Figura 20. A - Cromatografia em camada delgada para identificação de saponinas. PS, Padrão de saponina comercial; **EB,** extrato bruto das folhas de *R. viburnoides*; **FAHEX,** fração hexânica; **FACET,** fração acetato de etila; **FABUT,** fração n-butanol. *Eluente,* clorofórmio, metanol e água (70:30:04); *revelador,* anisaldeído sulfúrico; *visualização,* luz visível.

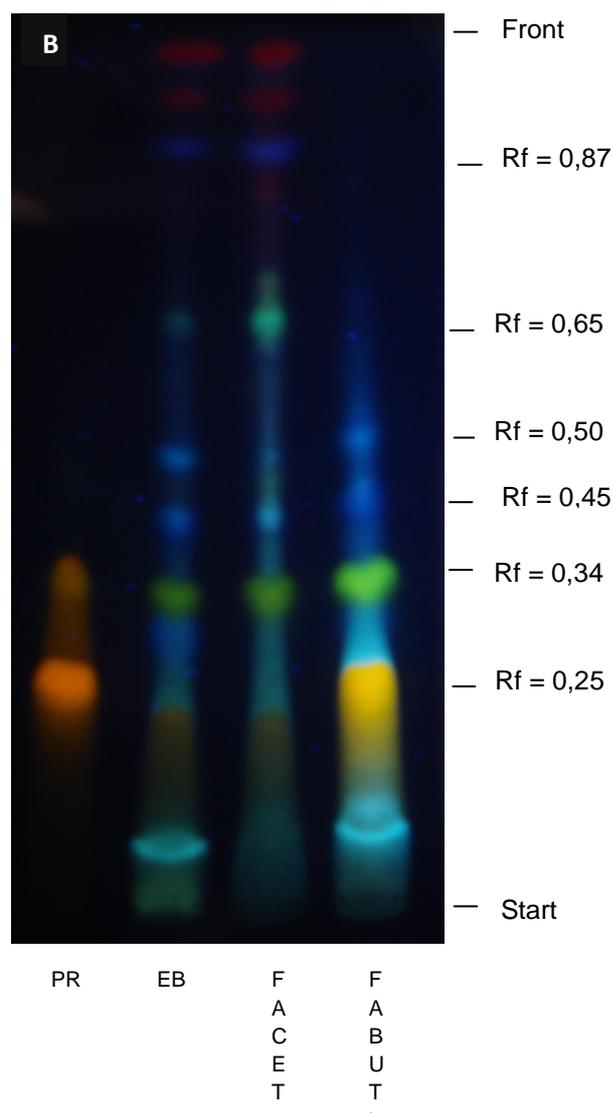


Figura 20. B - Cromatografia em camada delgada para identificação de flavonoides. PR, Padrão de rutina; EB, extrato bruto das folhas de *R. viburnoides*; FACET, fração acetato de etila; FABUT, fração n-butanol. *Eluente*, clorofórmio, metanol e água (70:30:04); *revelador*, difenilboratoetilamina a 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 a 1% em etanol (PEG); *visualização*, luz ultravioleta a 365 nm.

4.2.3. Identificação das substâncias química no EB e suas frações por CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada com a finalidade de complementar a caracterização das substâncias químicas presentes nas folhas de *R. viburnoides*. O padrão utilizado neste sistema cromatográfico foi a rutina, flavonóide

encontrado anteriormente nos ensaios de CCD. Na Figura 21 encontra-se o cromatograma obtido para esta substância nos comprimentos de onda (λ) 205 (A) e 254 nm (B) e o seu respectivo espectro no ultravioleta. Observa-se um pico majoritário no tempo de retenção (TR) 15,42 min (A'), acompanhado de outro de menor amplitude (B'). O espectro de UV apresentou bandas condizentes com a estrutura de um flavonóide do tipo quercetina, a rutina.

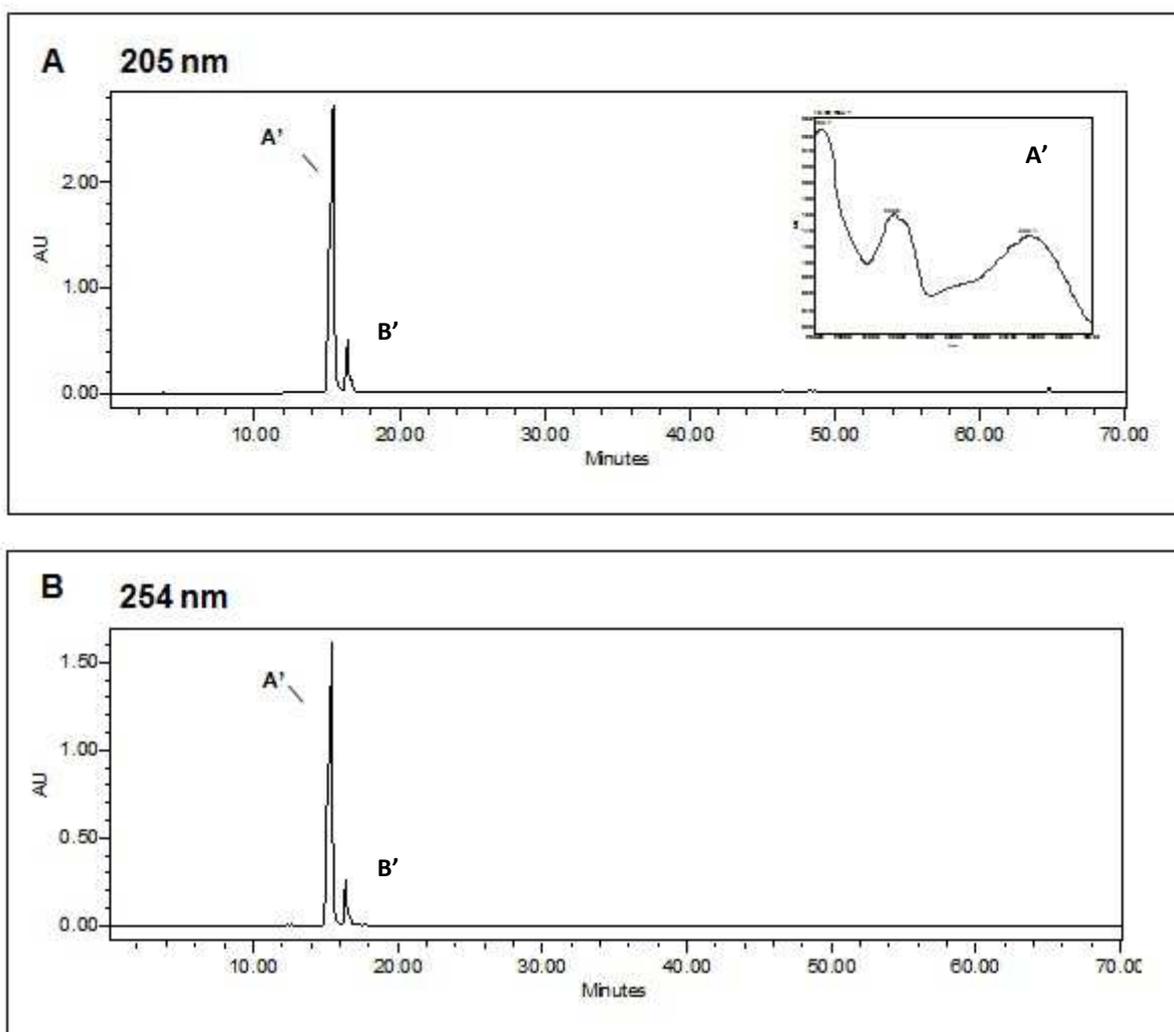
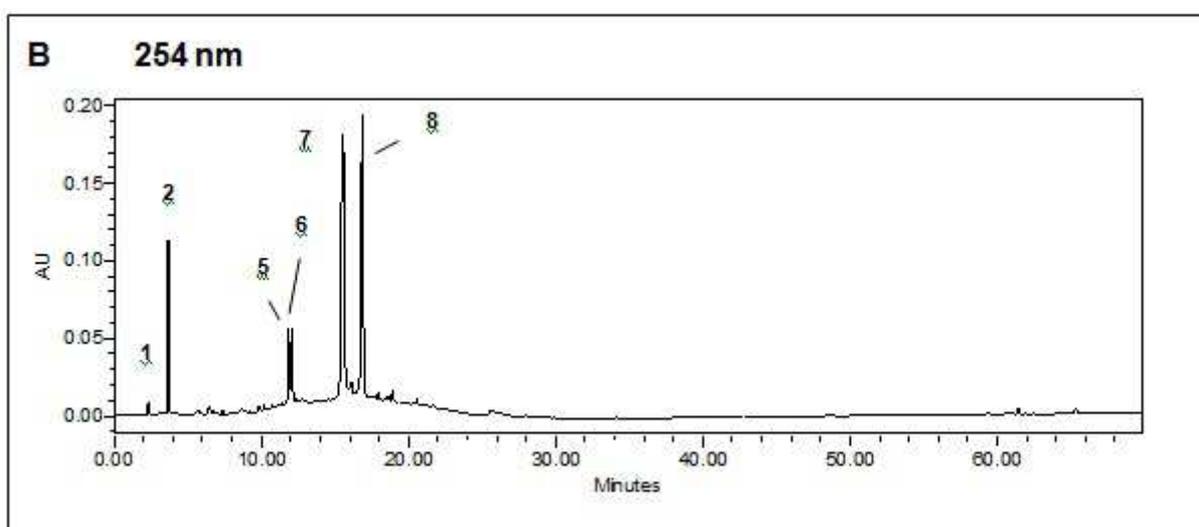
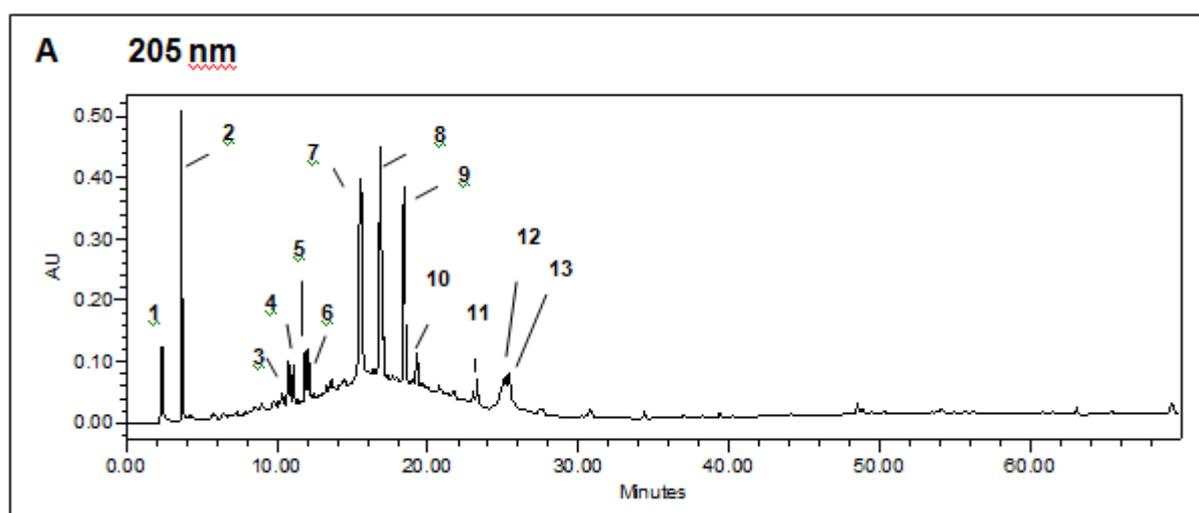


Figura 21 – Cromatogramas e espectro no UV do padrão de flavonóide rutina. Coluna, Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m; *detecção*, 254 nm (A) e 205 nm (B) ; *volume de injeção*, 20 μ l; *fluxo*, 1 ml/min; *sistema solvente*, acetonitrila e água (1:1). TR: rutina 15,42 min (A').

O cromatograma do EB apresentou, em 205 nm (Figura 22 A, pg.70), 13 picos nos TRs entre 0 e 26 minutos, indicando a presença de substâncias de polaridade elevada. Os picos nos TRs 2,29 min (1), 3,68 min (2), 10,75 (3) e 11,06 (4) apresentaram espectro

no UV correspondentes a ácidos orgânicos (WAGNER & BLANDT, 1996). Os espectros das substâncias 5 e 6, nos TRs 11,68 e 12,09, respectivamente, apresentaram bandas de absorção condizentes com a das chalconas (MABRY, MARKHAM & THOMAS, 1970), enquanto os picos nos tempos de 15,58 min (7) e 16,87 min (8) apresentam espectro no UV correspondente a flavonoides do tipo quercetina. Os picos 9 (18,41 min), 10 (19,26 min), 11 (23,26 min), 12 (24,61) e 13 (25,37) só apresentaram absorção no UV em comprimentos de onda baixos, indicando se tratar de substância alifáticas, sem grupos cromóforos. Essas substâncias não foram detectadas nos λ 254 nm (Figura 22 B, pg.69) confirmando a possibilidade de se tratar de triterpenos ou saponinas (OLESZEK, 2002).



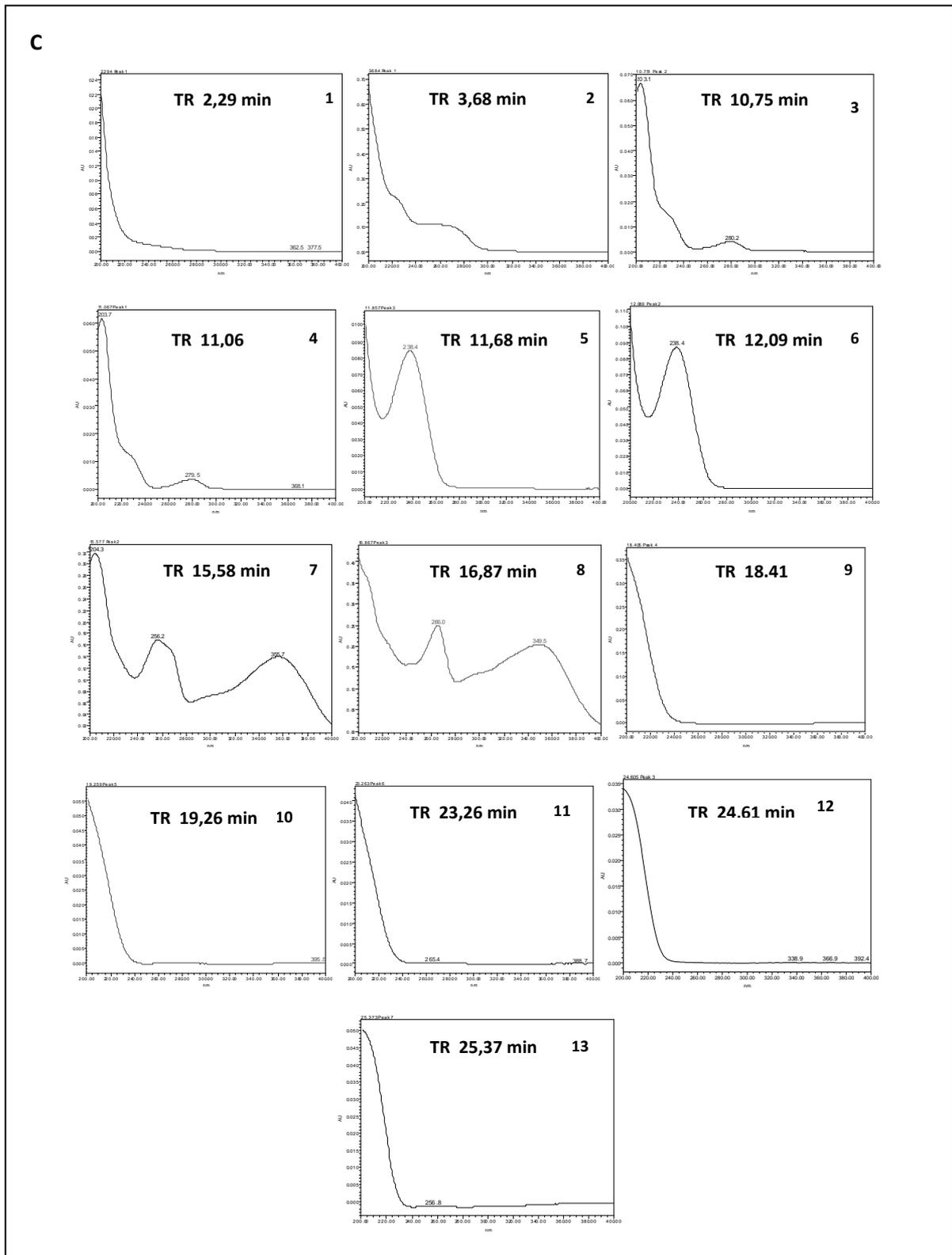
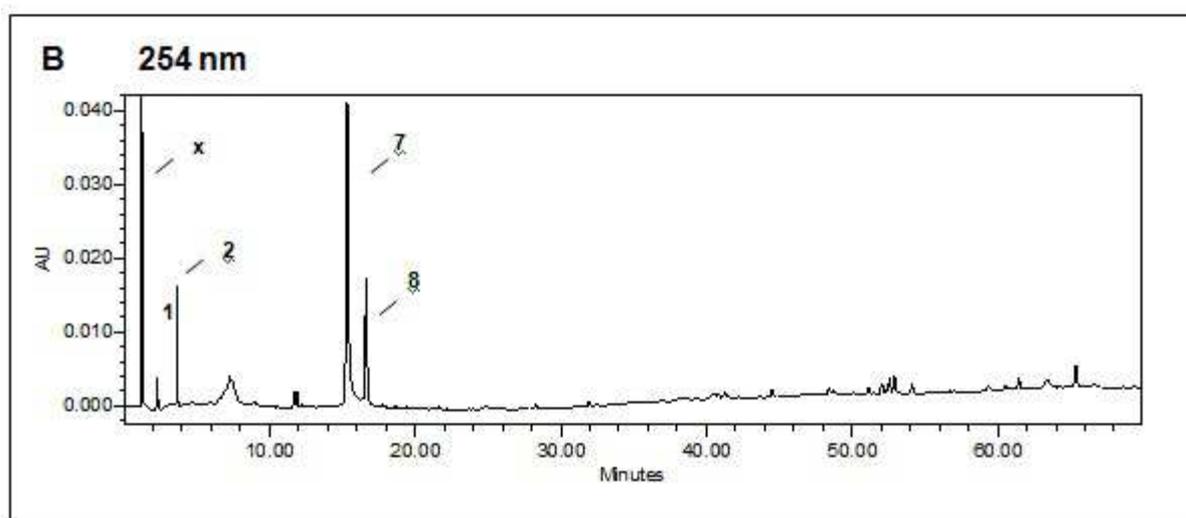
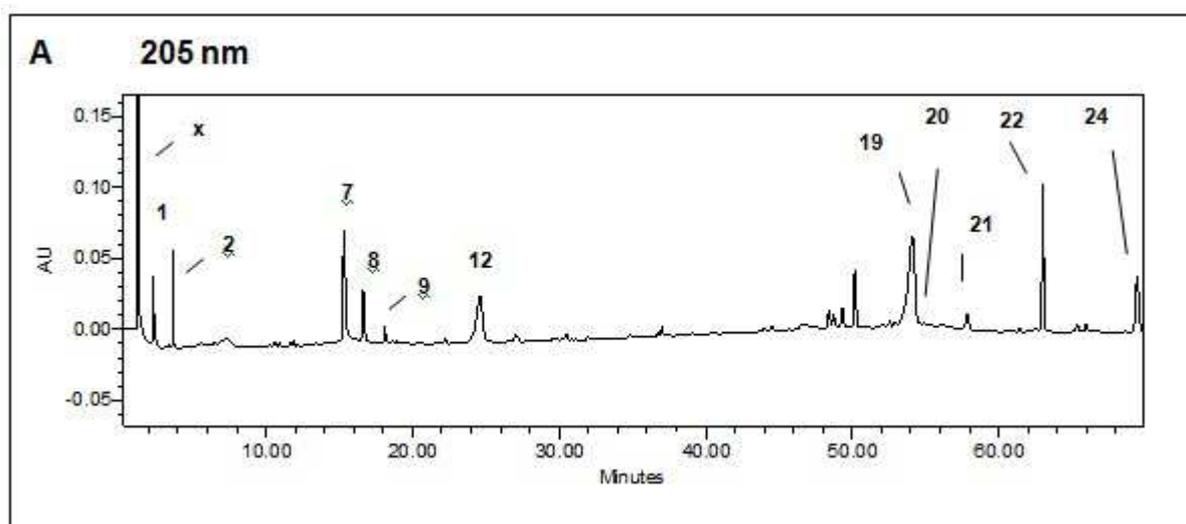


Figura 22. Cromatogramas e espectros no UV do EB das folhas de *R. viburnoides*. Coluna, Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm; detecção, 254 nm (A) e 205 nm (B) ; volume de injeção, 20 µL; fluxo, 1 mL/min; sistema solvente, acetonitrila e água (1:1). Picos com TRs (C).

As Figuras 23 (pg.72), 24 (pg.74) e 25 (pg.76) apresentam os cromatogramas e espectros no UV obtidos fahex, facet e fabut. As Figuras 23 A e B apresentam os cromatogramas da fahex, em 205 e 254 nm. Na detecção a λ 205 nm (Figura 23 A, pg.71) foram observados os picos 1 (2,31 min), 2 (3,69 min), 7 (15,58 min), 8 (16,63 min), 9 (18,10 min) e 12 (24,61 min) na região de alta polaridade. Na região do cromatograma referente às substâncias de baixa polaridade (TRs 54,10 min, 54,18 min, 57,83 min, 63,00 min e 69,44 min), foram detectadas substâncias, que não haviam sido observadas em EB (19, 20, 21, 22 e 24). Nos espectros no UV para essas substâncias não foram observadas bandas de absorção para substâncias fenólicas.



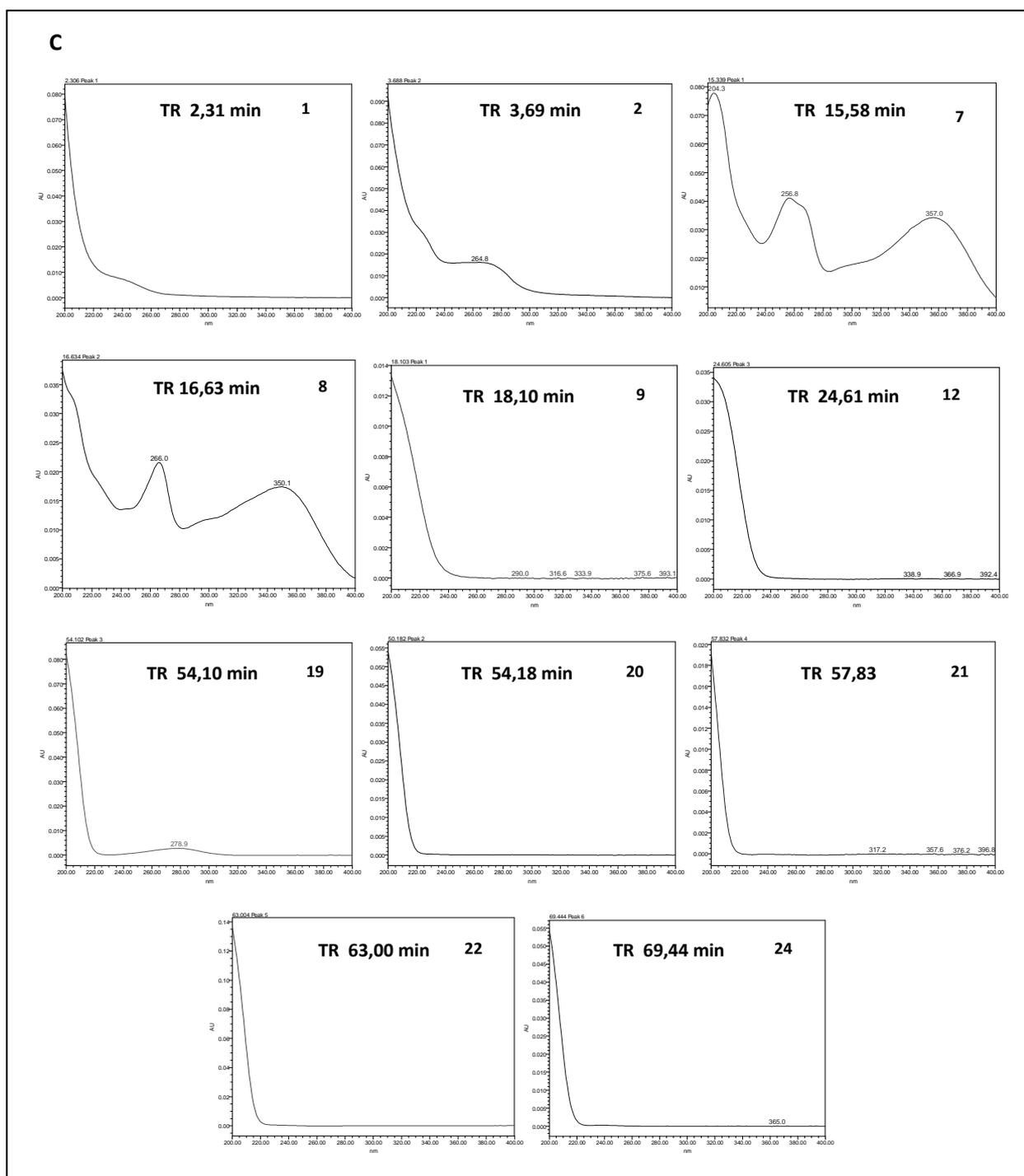
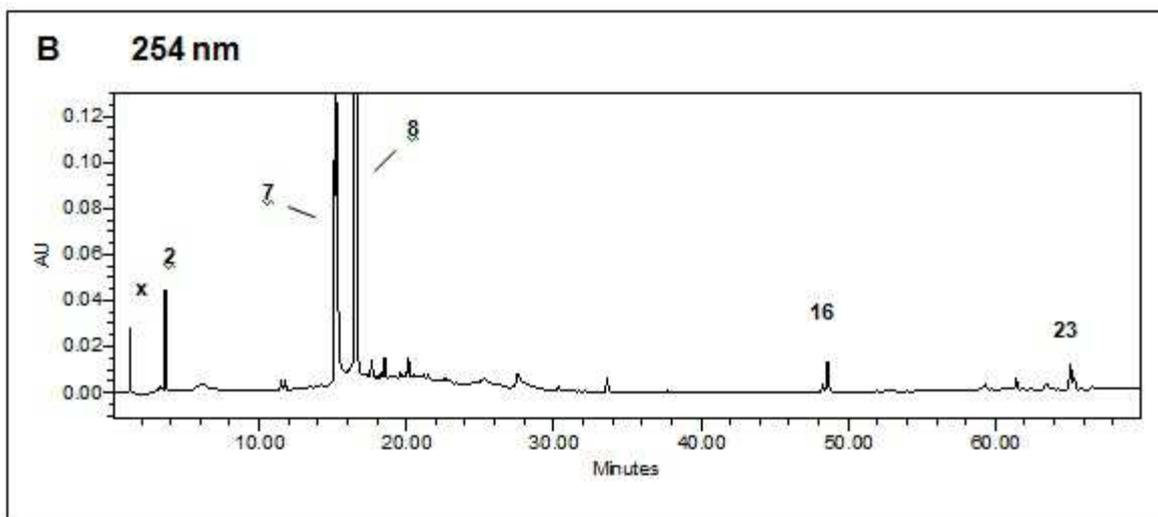
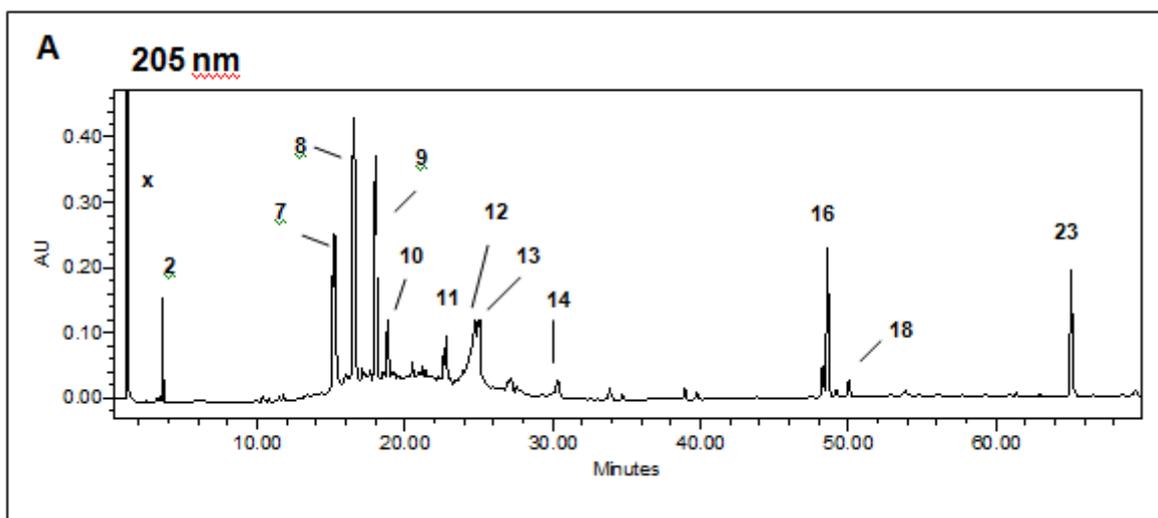


Figura 23. Cromatogramas e espectros no UV da fração hexânica das folhas de *R. viburnoides*. Coluna, Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m; detecção, 254 nm (A) e 205 nm (B) ; volume de injeção, 20 μ L; fluxo, 1 mL/min; sistema solvente, acetonitrila e água (1:1). Picos com TRs (C).

O cromatograma da facet a 205 nm (Figura 24 A, pg.73) apresentou picos que eluíram nos TRs com UV característicos para flavonoides do tipo quercetina (7 e 8). Outros picos (16, 18 e 23), de menor amplitude, foram observados na região de menor

polaridade. Na Figura 24 B, a λ 254 nm, os picos de retenção característicos de flavonoides apresentam maior amplitude que os demais picos (7 e 8).



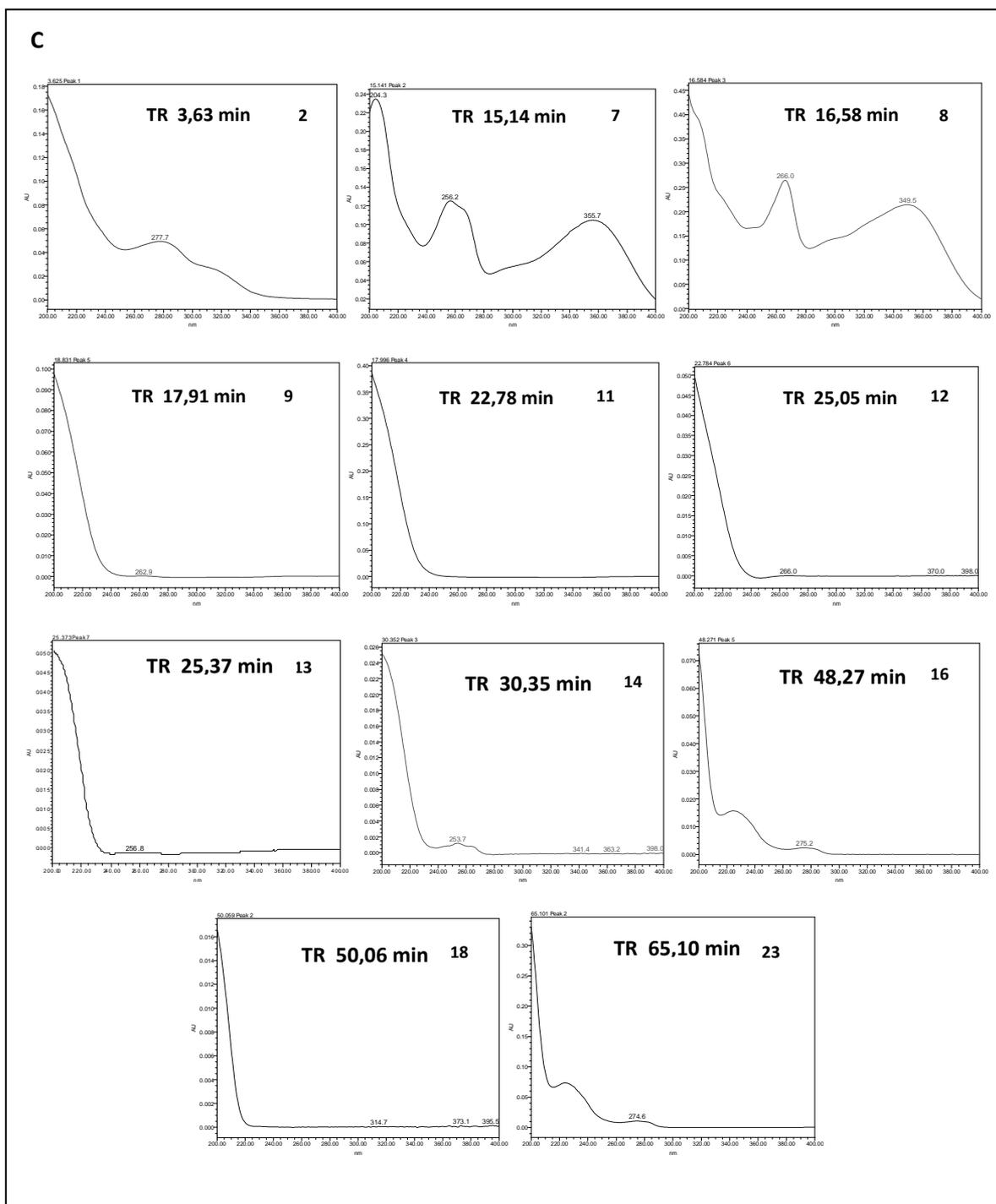
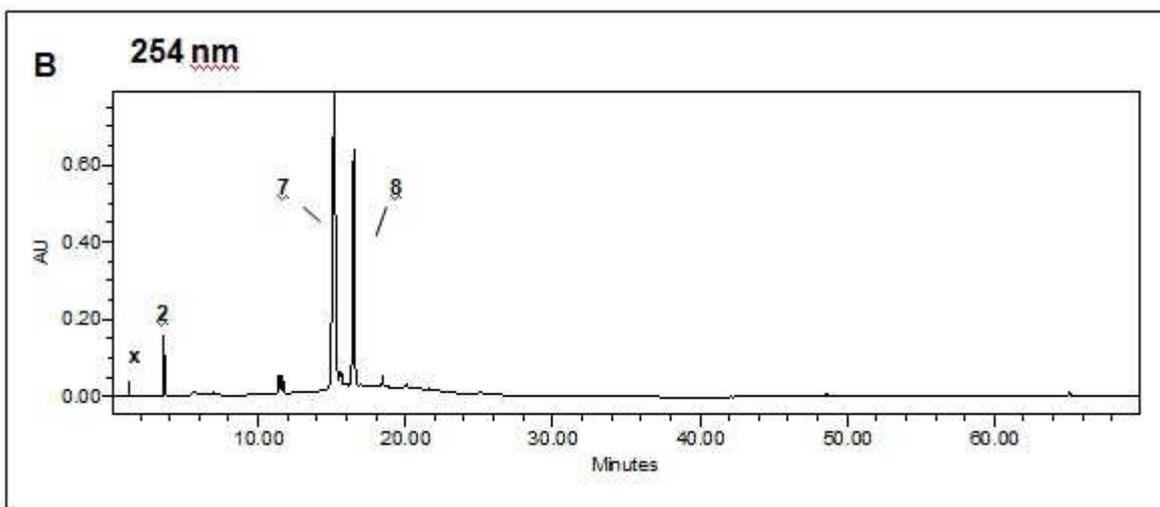
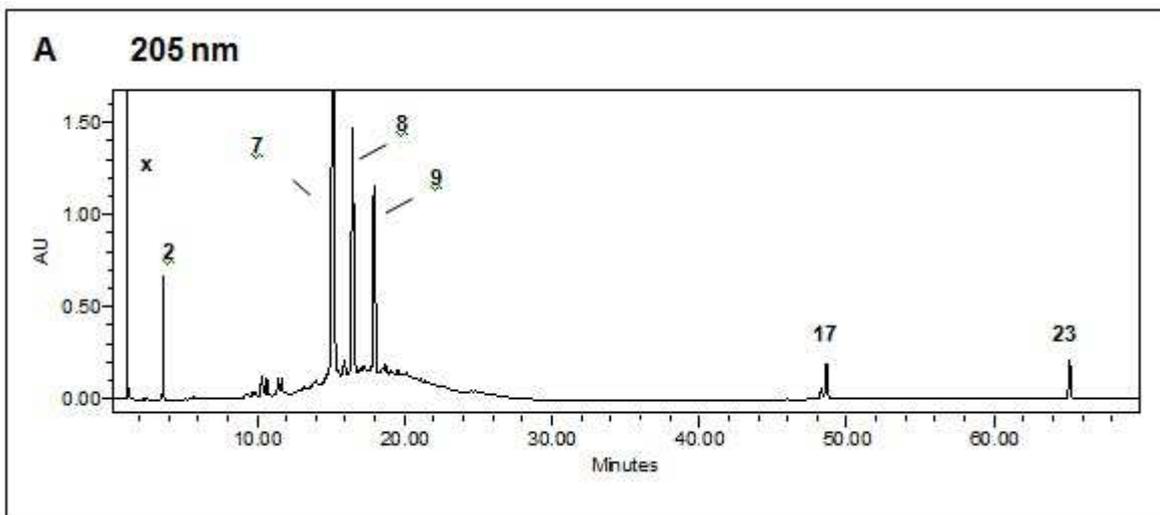


Figura 24. Cromatogramas e espectros no UV da fração acetato de etila das folhas de *R. viburnoides*. Coluna, Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m; detecção, 254 nm (A) e 205 nm (B) ; volume de injeção, 20 μ L; fluxo, 1 mL/min; sistema solvente, acetonitrila e água (1:1). Picos com TRs (C).

A Figura 25 A (pg.75) mostra o cromatograma da fabuta a λ 205 nm. Conforme o esperado, foram observado picos de maior amplitude na região para substâncias de polaridade elevada, e ausência de picos referentes às substâncias apolares. Os

espectros no UV das substâncias com TRs 15,18 min (7) e 16,50 min (8) estão presentes em ambos os cromatogramas (205 e 254 nm), confirmando se tratar de flavonoides, pelas características do espectro.



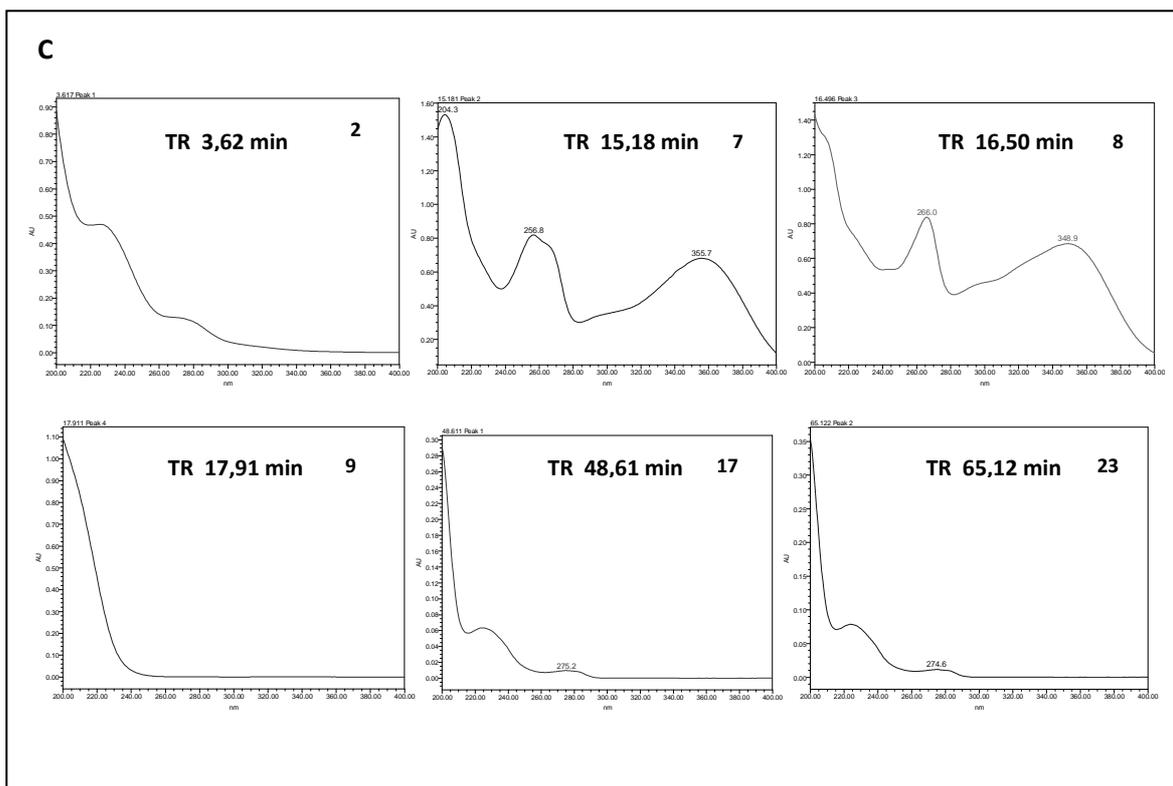


Figura 25. Cromatogramas e espectros no UV da fração n-butanol das folhas de *R. viburnoides*. Coluna, Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m; detecção, 254 nm (A) e 205 nm (B) ; volume de injeção, 20 μ L; fluxo, 1 mL/min; sistema solvente, acetonitrila e água (1:1). Picos com TRs (C)

A substância 9 não foi detectada em nenhuma análise usando o comprimento de onda a 254 nm. Este resultado, associado à ausência de bandas referentes a substâncias fenólicas no UV, parece indicar que se trata de uma saponina. Já as substâncias 10, 11 e 12 não foram detectadas na fabut indicando, portanto, que se tratam de triterpenos livres.

4.3. Avaliação do material comercializado

4.3.1. Material botânico

Foram avaliadas cinco amostras comerciais de congonha, adquiridas em mercado popular de Belo Horizonte. A análise para verificar se o peso da amostra correspondia ao rotulado, mostrou que duas delas (A3C e A4C) apresentaram variação de peso

superior a 9%, conforme especificado na Portaria nº 96 (BRASIL, 2000). Essas amostras apresentaram variação de peso de 50,23 e 12,38%, respectivamente.

Tabela 6 - Peso correspondente na embalagem, peso da amostra e percentual de variação.

Código	Peso informado (g)	Peso da amostra (g)	Varição de peso (%)
A1C	60	58,65	-2,25
A2C	90	86,44	-3,96
A3C	60	90,14	50,23
A4C	60	67,43	12,38
A5C	40	38,23	-4,43

4.3.2. Análises organolépticas (análises sensoriais)

Todas as amostras apresentaram característica similares ao padrão de *R.viburnoides*. As folhas apresentaram coloração verde-acastanhada, inodoras, grossas e rugosas (Figura 26, pg.78).



Figura 26 - Amostras comerciais de congonha.

Na análise para verificar a presença de elementos estranhos, verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram percentuais acima de 2% m/m (Tabela 7, pg.79). Os principais elementos estranhos detectados foram galhos e fragmentos de madeira. A amostra A3C apresentou folhas com manchas esbranquiçadas características de contaminação por fungos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Tabela 7 - Percentual de elementos estranhos nas amostras comercializadas.

Código	Peso da amostra (g)	Peso elementos estranhos (g)	Elementos estranhos (%)
A1C	58,65	15,50	26,43
A2C	86,44	45,04	52,11
A3C*	90,14	90,14	100,00
A4C	67,43	55,54	82,37
A5C	38,23	29,10	76,12

*amostra excluída – contaminação com fungos

Os extratos obtidos das amostras A1C, A2C, A4C e A5C foram analisadas por CCD. Elas apresentaram manchas com fluorescências nos mesmos Rfs para flavonoides, observadas para a amostra referência de *R. viburnoides* (Figura 27 A, pg.80). Na CCD para saponinas, também se observou o mesmo padrão de bandas e Rfs para as amostras e padrão. Este resultado indica que as amostras correspondem à espécie *R.viburnoides* (Figura 27 B, pg.81).

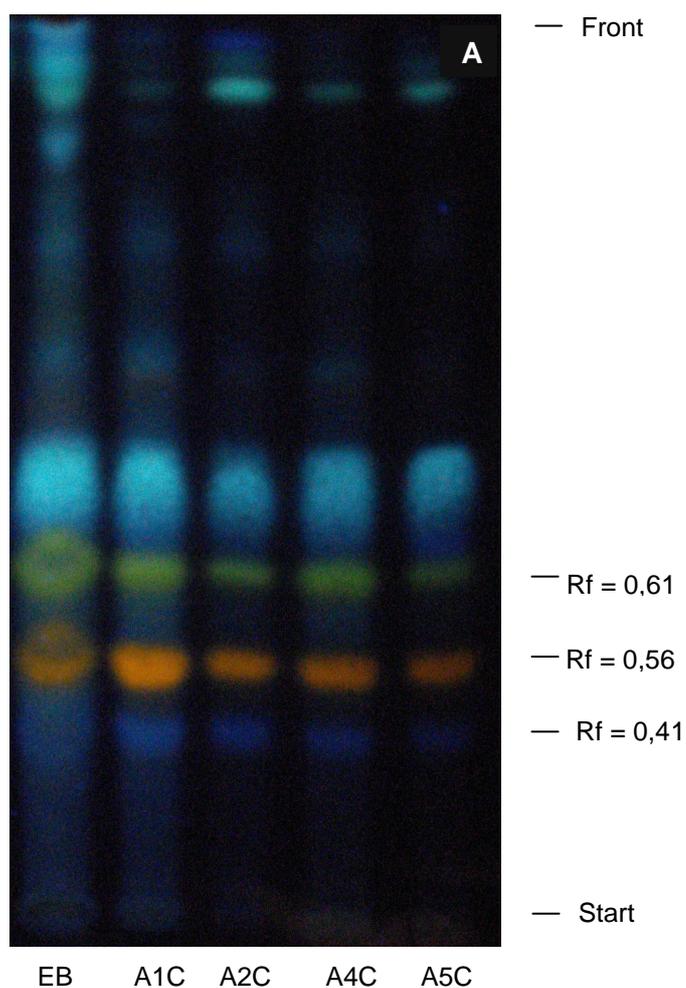


Figura 27 A. Cromatografia em camada delgada para identificação flavonoides nas amostras comerciais. EB, extrato bruto das folhas de *R. viburnoides*; **A1C**; **A2C**; **A4C** e **A5C**. *Eluente*, acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26); *revelador*, difenilboratoetilamina a 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 a 1% em etanol (PEG); *visualização*, luz ultravioleta a 365 nm.

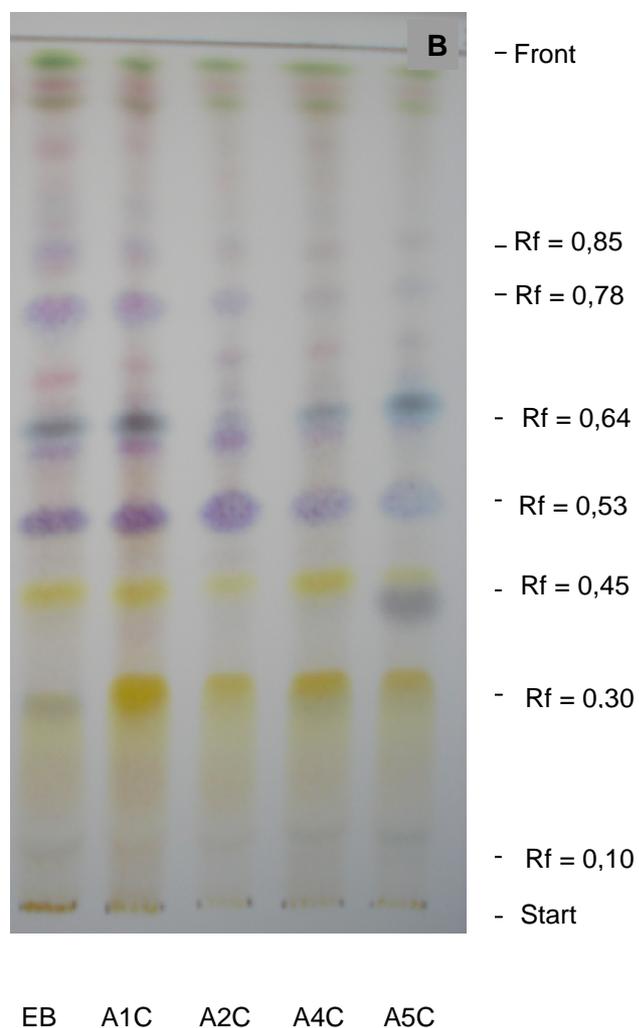


Figura 27 B. Cromatografia em camada delgada para identificação saponinas nas amostras comerciais. EB, extrato bruto das folhas de *R. viburnoides*; **A1C**; **A2C**; **A4C** e **A5C**. *Eluente*, clorofórmio, metanol e água (70:30:04); *Revelador*, anisaldeído sulfúrico; *visualização*, luz visível.

5. DISCUSSÃO

É consenso na literatura que a obesidade é uma doença crônica inflamatória de baixa intensidade. Esta condição é sustentada pelas evidências de que em obesos há um aumento sistêmico de marcadores inflamatórios e da infiltração de macrófagos e outras células do sistema imune no tecido adiposo (CANCELLO & CLÉMENT, 2006; BACH-NGOHOU et al., 2002; BULLO et al., 2003; WAJCHENBERG, 2000; HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993). De fato, o aumento da adiposidade contribui para uma maior produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, CCL2 e outras) e, conseqüentemente, para o desencadeamento das alterações metabólicas (TRAYHURN & WOOD, 2004; WELLEN, 2003; BACH-NGOHOU et al., 2002). Considera-se que os principais locais de produção de mediadores inflamatórios na obesidade são o fígado, o tecido linfóide e o tecido adiposo (TRAYHURN & WOOD, 2004).

O diabetes, a hipertensão e a dislipidemia são as doenças metabólicas mais comuns na obesidade (McTIGUE, LARSON & VALOSKI, 2006; FONTAINE et al., 2003; GORAN & GOWER, 1999). O diabetes é uma enfermidade crônica decorrente de uma progressiva insuficiência na secreção e ação da insulina, com origem na resistência à insulina (ADA, 2010). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) (SBC, 2010). Já a dislipidemia são alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que alteram os níveis séricos de lipoproteínas (AACE, 2000). Todas essas alterações, isoladas ou em associação, contribuem com o aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais recorrentes na obesidade (MALTA et al., 2009; WILLIAMS, 2010).

O tratamento da obesidade envolve mudanças no estilo de vida, modificações na dieta e atividade física, e terapias farmacológicas (JEFFREYS et al, 2003; HARDEMAN et al., 2000; WING & HILL, 2001). Entretanto, os fármacos utilizados, apesar dos benefícios a curto-prazo, estão sempre associados a ganho de peso após tempo de uso, efeitos colaterais indesejados, além de serem substâncias com alto potencial de abuso (YANO et al., 2008; ABDOLLAHI & AFSHAR-IMANI, 2003). Dessa forma, o potencial dos produtos naturais derivados de plantas vem sendo avaliado para o tratamento das enfermidades crônicas, inclusive a obesidade (YUN, 2010; IYER et al.,

2010; HASANI-RANJBAR et al., 2009; CEFALU et al., 2008; LIU, ZHANG & WANG, 2004; MAYER et al., 2009; NAKAYAMA et al., 2007; PARK et al., 2005).

Muitos extratos de plantas já foram testados e tiveram seus efeitos comprovados como hipoglicemiantes, sensibilizadores de insulina, redutores das concentrações de colesterol plasmático, antiinflamatórios e antioxidantes (HIRAI et al., 2010; ALARCON-AGUILAR et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; MORO & BASILE, 2000). Esses efeitos foram atribuídos às substâncias químicas presentes nesses produtos naturais, dentre elas, principalmente, os flavonoides e as saponinas (YUN, 2010; YANG et al., 2010; KANG et al., 2009; PAE et al., 2008; DEMBINSKA-KIEC et al., 2008; CEFALU et al., 2008; OKOLI & AKAH, 2004).

A flora medicinal brasileira, devido à sua vasta diversidade, representa uma das mais ricas fontes de substâncias químicas bioativas, que podem ser utilizadas para o tratamento de diversas patologias (BRANDÃO et al., 2009; BROOKS et al., 2006). Além da biodiversidade, a medicina popular brasileira, baseada em diferentes culturas, enriquece o uso das plantas, tanto aquelas de origem nativa quanto as exóticas, ou seja, espécies introduzidas desde a descoberta do país pelos portugueses (CABALLERO, 1979; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Levantamento em bibliografia antiga revelou que algumas plantas nativas já foram utilizadas pela população brasileira na obesidade e doenças relacionadas. Entre elas estão àquelas conhecidas como congonha, congonha-de-bugre, bugre e porangaba. As principais espécies conhecidas por esses nomes são a *Villaresia congonha* Miers (Cardiopteridaceae) (CRUZ, 1982; FREISE, 1933, HOEHNE, 1920), *Luxemburgia polyandria*, A. St.-Hil. (Ochnaceae) (CRUZ, 1982; PENNA, 1941), *Palicourea densifolia* J. A. Schultes (Rubiaceae) (BALBACH, 1980; PENNA, 1941), *Cordia salicifolia* Cham. (sinonímia de *C. ecalyculata*) e *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae) (BALBACH, 1980; PENNA, 1941; CORRÊA, 1909). A indicação específica para utilização na obesidade é relatada para as espécies *Villaresia congonha* (CRUZ, 1982; FREISE, 1933) e *Cordia salicifolia* (HOEHNE, 1920).

Estudos recentes sobre o comércio popular de plantas medicinais no Brasil mostraram que, atualmente, as espécies *C. ecalyculata* e *R. viburnoides* são indicadas, especificamente, para o tratamento da obesidade (FARIAS et al., 2010; NUNES et al.,

2003). A *C. ecalyculata* já foi submetida a vários estudos que mostraram efeito hipolipidêmico (CARDOZO et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2009; HAYASHI et al., 1990). Entretanto, as alegações populares de propriedades emagrecedoras e supressora de apetite, não foram comprovadas em estudos que avaliaram a massa corporal, a ingestão alimentar e o consumo de água, após administração do extrato desta espécie (SIQUEIRA et al., 2006; CAPARROZ-ASSEF et al., 2005). Tendo em vista os poucos estudos sobre *R. viburnoides* (LIUBA, 2009; MONTEIRO et al., 2009) e que esta vem sendo utilizada na medicina popular corrente como auxiliar nos “regimes de emagrecimento”, o presente estudo avaliou o potencial do extrato bruto obtido de suas folhas no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas. Para isto, foi utilizado modelo animal no qual a obesidade é induzida por dieta rica em carboidrato (HC) por 12 semanas, sendo esta suplementada, a partir da 8ª semana, com EB de *R.viburnoides*.

As análises químicas das folhas de *R.viburnoides* evidenciaram a presença tanto de flavonoides como de saponinas. Os resultados da análise mostram que o EB e suas frações são ricos em flavonoides do tipo quercetina. A CCD para flavonoides revelou a presença de rutina e esta substância foi também confirmada por CLAE. Neste, os espectros no UV apresentaram também absorção característica de outras substâncias fenólicas do tipo chalconas, precursores na via biossintética de flavonoides. Os perfis cromatográficos em CCD para saponinas evidenciaram a presença de várias bandas características para essas substâncias. Os resultados obtidos por CLAE também indicaram a presença de saponinas, tanto no extrato bruto, quanto nas facet e fabut. O pico 9 em TR 17,91 min nas frações, observado somente em 205 nm, foi atribuído à essas substâncias. De fato, saponinas são misturas muito complexas, com estruturas químicas bastante semelhantes. É possível que o único pico observado seja, na realidade, decorrente de várias substâncias conjuntas. Outro fator que indica que este pico seja para saponinas é o fato de que o mesmo não foi detectado em 254 nm. Isso acontece porque as saponinas não apresentam grupos cromóforos, possíveis de detecção nesse comprimento de onda (GUTERRES, 2005; OLESZEK, 2002).

Outros picos (10, 11 e 12) que apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, foram detectadas em 205nm e não em 254nm, podem ser atribuídos à triterpenos livres. Além disto, esses picos não foram detectados na fabut, nas quais as saponinas se

solubilizam no solvente empregado. Saponinas e triterpenos já haviam sido relatados para extrato das cascas dos frutos maduros de *R. viburnoides* (YOUNG et al., 1998).

As análises químicas realizadas por CCD e CLAE para a detecção de flavonoides indicam a presença do flavonóide rutina, no EB e suas frações, contrariando os resultados obtidos por ALVES e colaboradores (2004) que indicaram ausência desta substância na planta. É possível que esta variação seja decorrente da época de coleta da planta, tendo em vista que as folhas usadas por esses autores foram provenientes de vegetal adulto, enquanto as amostras usadas neste estudo foram obtidas de indivíduo jovem. De fato, sabe-se que variações decorrentes da época de coleta, local e condições de cultivo, idade da planta, entre outros fatores contribuem para a formação ou não de determinados metabólitos (SCHUBERT et. al., 2006; SIMÕES et. al., 1999).

Dietas HC, assim como dietas ricas em gorduras (HFD), têm o potencial de aumentar a adiposidade (FERREIRA et al., 2011; LINDQVIST et al., 2005). A extensão da obesidade induzida por dieta depende da duração do período de alimentação, da qualidade e/ou da quantidade de macronutrientes da dieta (HEREDIA et. al., 2009). Dietas ricas em carboidratos, como a HC, aumentam a adiposidade quando comparadas a dietas com menor percentual desse macronutriente, independente do valor calórico total consumido. Esse aumento de adiposidade corporal é associado com transtornos metabólicos semelhantes aos modelos animais alimentados com dieta HFD indutoras de obesidade (FERREIRA et al., 2011).

O extrato bruto *R. viburnoides* foi suplementado à dieta HC para avaliar seu potencial sobre os parâmetros metabólicos característicos do aumento da adiposidade. A suplementação dietética com o extrato bruto mimetiza o efeito da ingestão do alimento e sua atuação como nutracêutico. Os extratos brutos caracterizam-se por uma mistura de várias substâncias bioativas, em baixas concentrações. Dessa forma, tem-se estabelecido que uma mistura complexa de substâncias químicas bioativas, como em frutas e vegetais, pode promover benefícios a saúde através de uma combinação de efeitos aditivos e sinérgicos. As substâncias químicas bioativas em frutas e vegetais podem ter complementaridade e ultrapassar o efeito das substâncias isoladas, exercendo diversas ações benéficas à saúde como a diminuição do estresse oxidativo, a atuação no sistema imune, na expressão gênica da proliferação de células e da

apoptose, no metabolismo hormonal e exercendo atividades antibacteriana e antiviral (LIU, 2002; SEERAM et al., 2004).

No presente estudo, o aumento da adiposidade visceral induzido por dieta HC associou-se às diversas alterações metabólicas como intolerância oral à glicose e insensibilidade à insulina, alteração dos lipídios plasmáticos, diminuição de adiponectina e aumento de resistina, maior número de células imunes circulantes assim como maior concentração das citocinas IL-6, TNF- α e quimiocina CCL2 nos tecidos hepático e adiposo. Diversos trabalhos têm demonstrado que o aumento da adiposidade induzido por dieta desencadeia alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos (WAKI & TONONZO, 2007; COENEN & HASTY, 2007) associadas a um perfil pró-inflamatório sistêmico e em sítios metabólicos importantes como o fígado e tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 2003; FERREIRA et al., 2011; SPEAKMAN et al., 2007). Desta forma, o desenvolvimento da obesidade nestes animais constituiu um bom modelo para o estudo da expansão do tecido adiposo, que se associou à diminuição periférica da tolerância à glicose e aumento de mediadores pró-inflamatórios.

Os animais alimentados com dieta HC, apesar de não apresentarem alterações no ganho de peso e ingestão alimentar, apresentaram expansão do tecido adiposo do tipo hipertrófico, evidenciado pelo aumento da área e diâmetro dos adipócitos. Estudos prévios de nosso grupo mostram que a dieta HC oferecida aos animais é normocalórica em relação à dieta controle, sendo diferente no que se refere à quantidade de carboidratos simples. Confirma-se assim, que o tipo de nutriente da dieta, independente do valor calórico, é capaz de estimular mudanças na composição corporal, favorecendo o aumento da adiposidade e a hipertrofia dos adipócitos (FERREIRA et al., 2011).

Os animais alimentados com dieta HC suplementada com o extrato bruto de *R. viburnoides* nas diferentes doses (40, 80 e 160 mg/Kg), durante quatro semanas, apresentaram ganho de peso, ingestão alimentar e adiposidade semelhante aos animais HC. Entretanto, somente os animais tratados com a menor dose do extrato apresentaram adipócitos menores, característicos da ocorrência da hiperplasia celular. A hipertrofia dos adipócitos foi originariamente considerada como a única via de expansão deste tecido (BAHCECI et al., 2007; DeFRONZO, 2004; JENSEN, 1997).

Entretanto, sabe-se que a hiperplasia dos adipócitos contribui também com esta expansão (BAHCECI et al., 2007; AVRAM, AVRAM & JAMES, 2007). O adipócito ao atingir sua capacidade máxima de armazenamento de gordura estimula o recrutamento de novas células – pré-adipócitos. A diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros é denominada adipogênese (DICKER, 2005). A adipogênese pode favorecer a substituição das células hipertróficas por adipócitos jovens e menores. Estes apresentam maior sensibilidade à insulina e, quando maduros, produzem mais citocinas anti-inflamatórias, em detrimento das citocinas pró-inflamatórias (OKUNO et al., 1998). De fato, indivíduos obesos com poucos adipócitos hipertrofiados são menos tolerantes à glicose e sensíveis à insulina que indivíduos de mesma adiposidade com muitos adipócitos hiperplasiados (ARNER et al., 2010; BAYS et al., 2008; LUNDGREN et al., 2007).

Deve-se ainda considerar que, os relatos de uso popular que atribuem à *R. viburnoides* o potencial “emagrecedor” (DICKEL, RATES & RITTER, 2007; ALVES et al., 2004; NUNES et. al., 2003) não foram observados neste estudo. Frequentemente, o uso popular indica para emagrecimento plantas com potencial diurético e ou laxante (SANTOS et al., 2007; NUNES, et. al., 2003). Mesmo diante do potencial diurético atribuído à *R. viburnoides* (LIUBA, 2009), o PC dos animais suplementados não foi diferentes dos demais grupos de animais. Ademais, o efeito antiobesogênico também não pode ser considerado para *R. viburnoides*. Entende-se que este só poderia ser aplicado se fosse observada diminuição do tecido adiposo (adiposidade) nos animais suplementados como sugerido por outros autores (AKASE et al., 2011; ARÇARI et. al., 2009).

Os animais alimentados com HC apresentaram na 8ª e 12ª semana de experimento menor tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina. A suplementação com 80 e 160 mg/Kg do extrato não alterou esses parâmetros. Entretanto, animais suplementados com 40 mg/kg apresentaram melhora tanto da tolerância à glicose como da sensibilidade à insulina. Estes resultados são condizentes com outros estudos que suplementaram suas dietas com extratos de plantas ricos em substâncias polifenólicas e flavonoides (CLAUSSNITZER et al., 2011; STEFEK, 2011; ZYGMUNT et al., 2010; MACHADO et al., 2008; TALPUR et al., 2005). Nesses, os efeitos benéficos observados são atribuídos a essas substâncias químicas, em especial, às do tipo quercetina, como a rutina (FERNANDES et al., 2010; RAZAVI et al., 2009; ZHENG et

al., 2005; ZHU et al., 2004). Estudos recentes demonstraram que animais alimentados com dietas HC suplementadas com chá verde (RICKMAN et al., 2010) ou rutina (ZHENG et al., 2005) apresentaram redução da glicemia, melhora da sensibilidade à insulina e regulação dos lipídios séricos. A melhora dos parâmetros metabólicos induzida pela suplementação com esses nutracêuticos foi atribuída a prevenção ou reversão do estresse oxidativo crônico gerado pela dieta HC (RICKMAN et al., 2010; ZHENG et al., 2005).

A maior tolerância e sensibilidade à insulina nos animais tratados com HC40 pode ser atribuída, pelo menos em parte, a modulação da expansão do tecido adiposo por meio da hiperplasia dos adipócitos. Outros estudos mostram que animais obesos suplementados com extrato de ginseng (KIM et al., 2011), capsaicina (KANG et al., 2010), extrato de *Sophora japonica* (PARK, LEE & PARK, 2009) e antocianinas (TSUDA, 2008) apresentaram também uma resposta metabólica diferenciada decorrentes das modificações na morfologia do tecido adiposo, indicativa de modulação hipertrófica e/ou de estímulo hiperplásico (RAYALAM, DELLA-FERA & BAILE, 2008).

De fato, animais tratados com as demais doses não apresentaram melhora da tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina. Isto é consistente com os resultados de diâmetro e a área dos adipócitos para esses grupos, uma vez que estes se apresentaram similares ao grupo não suplementado (HC). Confirma-se assim que, os adipócitos hipertrofiados apresentam-se menos sensíveis à ação da insulina, prejudicando a captação de glicose e favorecendo a resistência à insulina (POWELL, 2007; KAMEI, 2006; FLIER, 2004; STEARS & BYRNE, 2001). Uma hipótese a ser considerada, que justificaria os resultados encontrados nestas doses, estaria relacionada à concentração de substâncias químicas presentes no extrato. Essas substâncias em maiores concentrações poderiam exibir comportamento pró-oxidativo, não permitindo a modulação da plasticidade dos adipócitos e, conseqüentemente, a melhora do metabolismo da glicose e de outros parâmetros (DECKER, 1997; KESSLER, UBEAUD & JUNG, 2003).

A melhora do metabolismo da glicose nos animais suplementados com HC40 ficou também evidenciada pelos índices HOMA-IR e HOMA- β . A resistência à insulina e a disfunção progressiva do pâncreas (células β) têm sido associadas à patogênese do

diabetes tipo II (SONG et al., 2007). O índice HOMA é derivado de uma avaliação matemática do equilíbrio entre a saída de glicose hepática e secreção de insulina, a partir das concentrações de glicose e insulina de jejum (WALLACE, LEVY & MATTHEWS, 2004; MATTHEWS, 1985). O HOMA-IR avalia a resistência à insulina e o HOMA- β avalia a função das células- β pancreáticas (WALLACE, LEVY & MATTHEWS, 2004). HOMA-IR elevado e HOMA- β baixo são, de forma independente e consistente, associados a um maior risco de diabetes (SONG et al., 2007). Os animais HC apresentaram maior HOMA-IR e menor HOMA- β que os animais C. Em contrapartida, os animais HC40 apresentaram menor HOMA-IR e maior HOMA- β . É importante observar que estes índices correlacionam glicose e insulina de jejum, e que os resultados de concentração basal de insulina foram similares entre os grupos (C, HC e HC40). Diante disso, sugere-se que os animais alimentados com dieta HC40 apresentam menor resistência a ação da insulina e células β pancreáticas mais funcionantes que o controle (HC). Em outro estudo, modelos animais de obesidade suplementados com extrato de *Panax ginseng* apresentaram insulina de jejum similar a dos animais que não receberam extrato e, também, menores valores de HOMA-IR (LIM et al., 2009).

É de fundamental importância, identificar quais as possíveis substâncias químicas presentes nos extratos de plantas que são responsáveis pelos efeitos benéficos observados nos estudos. Muitos estudos relatam o potencial de extratos ricos em polifenóis e flavonoides no tratamento das alterações do metabolismo de glicose. Nesses, vários mecanismos de ação são propostos para essas substâncias. Sugere-se que esses componentes têm o potencial de modificar a atividade de enzimas intracelulares, incluindo tirosina quinase, proteína quinase C, fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase regulada pelo extracelular (MAPK), resultando em aumento do transporte de glicose estimulada por insulina no músculo e tecido adiposo (NOMURA et al., 2008; BAZUINE, VAN DEN BROEK & MAASSEN, 2005; STROBEL et al., 2005). Outro mecanismo de ação proposto seria a capacidade de indução da expressão de PPAR γ por tais substâncias (DING, JIN & CHEN, 2010; GOTO et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2003). Ao induzir a expressão de PPAR γ , os flavonoides indiretamente aumentariam a captação de glicose, inibiriam a inflamação associada à obesidade e, conseqüentemente, melhorariam a sensibilidade à insulina (KARSTEN, 2008; RICOTE & GLASS, 2007; SPIEGELMAN, 1997).

Outra classe de substâncias químicas que demonstraram os mesmos efeitos benéficos que foram atribuídos aos flavonoides no tratamento da obesidade e suas alterações são as saponinas (DING, JIN & CHEN, 2010; ZHAO, et. al., 2008; SPARG et. al., 2004). Há relatos de que estas substâncias podem ser responsáveis pela melhora da sensibilidade à insulina, por mecanismos ainda não bem definidos (YANG et al., 2010; BHAVSAR et al., 2009). Um estudo avaliou os efeitos da administração de extrato metanólico rico em saponinas de *Helicteres isora* Linn. (Sterculiaceae) na melhora da tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina. O tratamento com o extrato reduziu significativamente a expressão do gene que codifica a enzima reguladora da gliconeogênese e glicogenólise, a glicose-6-fosfatase (G6Pase) no fígado de camundongos db/db. A enzima G6Pase catalisa a produção de glicose a partir de precursores gliconeogênicos. Sendo assim, pequenas alterações na expressão deste gene podem alterar a glicemia (BHAVSAR et.al., 2009). Esse mesmo estudo mostrou que a suplementação com saponinas também induziu a expressão PPAR γ no tecido adiposo de animais db/db (BHAVSAR et.al., 2009).

Diante desta correlação, apontada pela literatura, entre os flavonoides e saponinas, e seus potenciais de ação no tratamento da obesidade e suas alterações, sugere-se que os mesmos efeitos observados neste estudo devem-se à presença dessas substâncias no EB de *R. viburnoides*. Sugere-se ainda que, um possível mecanismo de ação dessas substâncias químicas seria via ativação ou ligação de PPAR γ , uma vez que foi evidenciada modulação da hipertrofia dos adipócitos dos animais suplementados na menor dose. A modulação do adipócito via PPAR γ contribuiria, pelo menos em parte, com a melhora da sensibilidade à insulina observada neste estudo e também com a sinalização anti-inflamatória sistêmica e nos tecidos adiposo e hepático, conforme será relatado posteriormente.

Outras alterações comuns na obesidade são as relacionadas ao metabolismo de lipídios. Neste estudo os animais alimentados com dieta HC apresentaram valores séricos de triacilglicerol e colesterol total elevados em relação aos alimentados com dieta C. A dislipidemia é um achado comum em indivíduos com sobrepeso e obesos e está intimamente relacionada ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares, como aterosclerose (KLEEMANN et al., 2010; NGUYEN et al, 2008). A obesidade visceral aumenta a quantidade de AGLs circulantes, uma vez que os adipócitos localizados nesta região possuem alta atividade lipolítica, maior do que em outros sítios

(GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; KANDA et al., 2006; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005; SALTIEL & KAHN, 2001). Somam-se a isso os níveis séricos elevados de glicose nesses indivíduos. Ambos, em associação, agravam a resistência e a secreção de insulina, contribuindo para a manutenção do quadro de hiperinsulinemia sistêmica (O'ROURKE et al., 2002; FESTA et al., 2000). Os AGLs em excesso podem também contribuir para a resistência à insulina via ativação de TLRs no tecido adiposo e macrófagos contribuindo com o quadro de inflamação (GUILHERME et. al., 2008). Além disso, aumentam a liberação hepática de lipoproteínas ricas em triglicérides, colesterol de baixíssima densidade (VLDL-c) e apolipoproteína B na circulação (XIONG & ZHIPING, 2006).

Apesar dos animais suplementados com HC40 apresentarem valores de triacilgliceróis similar aos animais HC, a concentração de colesterol apresentou-se inferior aos daqueles que não foram suplementados. Esta modulação do metabolismo de lipídios pode ser atribuída, pelo menos em parte, às saponinas que possuem um efeito clássico na redução dos níveis plasmáticos de colesterol tanto em modelos animais como em humanos (GNOATTO, SCHENKEL & BASSANI, 2005; SOUTHON et al., 1988). Acredita-se que essa atividade moduladora esteja relacionada com a inibição da ação da enzima colesterol aciltransferase (ACAT) (ZHAO et. al., 2008). Esta inibição favoreceria a formação de micelas pela interação das saponinas com os ácidos biliares, resultando em elevação do colesterol excretado e diminuição do colesterol absorvido (complexação das saponinas com o colesterol adquirido na dieta) (SOUTHON et al., 1988; SPARG et al., 2004). Um efeito esfoliante (irritante) resultante da formação de complexos com o colesterol das membranas das células intestinais também tem sido levado em consideração para explicar a perda de função e redução da área de absorção intestinal (SIMÕES et al., 1999).

O potencial de alterar as concentrações de colesterol total pode ser também atribuído à presença de flavonoides no extrato bruto da planta, como já descrito por outros autores (YUGARANI et al., 1992; BORRADAILE, CARROLL & KUROWSKA, 1999; KUROWSKA et al., 2000). Diversos mecanismos de ação têm sido atribuídos aos flavonoides para explicar seus efeitos no metabolismo lipídico. Um destes envolve ações no aumento da excreção de sais biliares nas fezes, e outro abrange a capacidade de elevar a atividade do sistema microsomal hepático, conseqüentemente, aumentando o metabolismo lipídico (WILCOX et al., 2001).

Sugere-se ainda que o aumento da atividade dos receptores de LDL e também a inibição da síntese de apolipoproteína B (ROZA, XIAN-LIU & GUTHRIE, 2007) induzidos pelos flavonoides, seja um dos responsáveis pela redução da concentração de colesterol. A melhora do metabolismo de lipídios pode estar associada à melhora do metabolismo de glicose e à melhora da inflamação sistêmica. Estas poderiam contribuir para a atenuação do estado de resistência à insulina observada neste estudo e também sugerida por outros (WOOTEN et al., 2008; VAN GAAL, MERTENS & DE BLOCK, 2006; NIELSEN, 1997).

No presente estudo os animais alimentados com dieta HC apresentaram inflamação sistêmica e nos tecidos hepático e adiposo epididimal. A inflamação sistêmica foi evidenciada na contagem total de leucócitos e contagem diferencial de células mononucleares que se apresentaram maiores que nos animais controle. A inflamação local foi demonstrada pelo aumento da concentração de citocinas (TNF- α , IL-6) e quimiocina (CCL2) pró-inflamatórias no fígado e tecido adiposo epididimal.

A inflamação crônica de baixa intensidade característica na obesidade pode ser evidenciada por um maior número de células imunes circulantes (PEARSON et al., 2003) e nos tecidos (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011). A contagem total de leucócitos é considerada um dos marcadores mais estáveis de inflamação (BICKEL et al., 2002; DANESH et al., 1998). A inflamação no tecido adiposo contribui com o quadro de inflamação sistêmica, assim como a inflamação observada em outros sítios inflamatórios como o fígado (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; FERREIRA et al., 2011; CAI et al., 2005; TRAYHURN & WOOD, 2004).

Neste estudo, a contagem diferencial de leucócitos evidenciou maior número de células mononucleares para o grupo de animais tratados com dieta HC. Considera-se que o número total de leucócitos correlaciona-se positivamente com o de células mononucleares, como os monócitos circulantes (MANICONE & MCGUIRE, 2008). Os monócitos nos tecidos diferenciam-se em macrófagos e nestes são responsáveis por grande parte da produção de TNF- α . Nos tecidos, o aumento da produção de TNF- α pelos macrófagos induz maior expressão de IL-6 e CCL2 pelas células destes tecidos (MADJID et al., 2004; WEISBERG et al., 2003; SWEETNAM et al., 1997). Estes resultados correlacionam-se ainda com os de hipertrofia dos adipócitos, uma vez que estes, nesta condição, mostram-se importantes produtores de citocinas pró-

inflamatórias como TNF α , IL6 e CCL2 e, ainda, IL1 β , resistina. Os adipócitos hipertrofiados, em adição, apresentam capacidade limitada de síntese e liberação adiponectina, contribuindo assim com o desequilíbrio anti e pró-inflamatório comum na obesidade (GOOSSENS et al., 2008; SELL et al., 2006; YANG et al., 2005).

Os animais suplementados com HC40 apresentaram menor inflamação sistêmica e local que seu controle (HC). Estes animais apresentaram redução da contagem total de leucócitos e contagem diferencial de células mononucleares, assim como diminuição das citocinas pró-inflamatórias no fígado e tecido adiposo. Os resultados sugerem que o EB de *R. viburnoides* apresentou potencial para diminuir a inflamação sistêmica e local, e conseqüentemente, a infiltração de monócitos nos tecidos que poderiam contribuir com a inflamação local. Um estudo de fagocitose *in vitro* que avaliou ação do extrato de *Melilotus officinalis*, mostrou efeito inibidor sobre a produção de leucócitos (LUMINIT et al., 2002). Nesse estudo, o efeito sobre a produção de leucócitos foi atribuído ao conteúdo de polifenóis do extrato, assim como em outros estudo com *Eriobotrya japonica* (TAKUMA et al., 2008) e *Theobroma cacao* (SELM I et al., 2006). Outros estudos demonstraram diminuição das citocinas TNF- α , IL-6 e quimiocina CCL2 no tecido adiposo de animais obesos após suplementação com Radix Asrtagali (HOO et al., 2010), com extrato de *Undaria pinnatifida* (MAEDA et. al., 2009) e com antocianinas (SEYMOUR et al., 2009). Outro estudo mostrou a diminuição da expressão dessas citocinas no tecido adiposo e hepático de animais obesos após suplementação com capsaicina (KANG et al., 2010). De fato, a diminuição dessas citocinas nos tecidos contribui com a regulação da inflamação local e sistêmica.

Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior concentração sérica de resistina e menor concentração sérica de adiponectina em relação ao controle (C). Esses resultados são condizentes com os apresentados na literatura, uma vez que na obesidade é observada correlação significativamente inversa entre essas adipocitocinas (TILG & MOSCHEN, 2008; BULLO et al., 2007; LEHRKE et al., 2004). Estes resultados correlacionam-se ainda com o maior índice de adiposidade e hipertrofia dos adipócitos apresentado pelos animais alimentados com HC em relação ao controle. Esta por sua vez, evidencia que a menor concentração de adiponectina associada à maior concentração de resistina contribui com a resistência à insulina (BERG & SCHERER, 2005; XU et al., 2003; PRINS, 2002) e para um estado mais pró-inflamatório (BEKRIS et al., 2006). Deste modo, as concentrações séricas dessas

adipocitocinas contribuíram com as alterações metabólicas e, também, com a inflamação sistêmica observadas.

Os animais suplementados com HC40 apresentaram concentração plasmática de resistina menores que os animais HC. Este mesmo padrão de diminuição de resistina foi também observado quando o extrato de *Eucommia ulmoides* Oliver (Eucommiaceae) foi suplementado à dieta rica em gorduras (HFD) (FUJIKAWA et al., 2010). Outro estudo avaliou o efeito do extrato de *Lysimachia foenum-graecum* administrado por gavagem em animais que se alimentavam com HFD. Neste também foi observado valores de resistina significativamente menores no grupo suplementado em relação ao controle (SEO et al, 2011). É importante considerar que, em ambos os estudos, o padrão de diminuição de resistina pode ser associado à diminuição da adiposidade observada nos animais que receberam os extratos. Entretanto, um estudo em vitro evidenciou-se que substâncias químicas polifenólicas podem diminuir a secreção de resistina pelos adipócitos (3T3-L1) e favorecer sua diferenciação (MIYATA et al., 2011). É importante ainda considerar que, a expressão de resistina pode ser alterada pela ativação de PPAR γ , uma vez que este fator de transcrição liga-se à região promotora de genes-alvo e inibem a produção da resistina (PATEL et al., 2003). De fato, a modulação da hipertrofia dos adipócitos e da inflamação sistêmica contribuiu com a menor concentração de resistina nos animais HC40, independentemente da adiposidade.

As concentrações plasmáticas de adiponectina nos animais suplementados com HC40 foram similares aos dos animais HC. Este resultado é condizente com outro estudo que avaliou a expressão de adiponectina em animais obesos após suplementação com extrato de *Helicteres isora* (BHAVSAR et al., 2009). Nesse estudo os efeitos sobre a melhora da hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia foram atribuídos, em parte, ao aumento da expressão de PPAR γ no tecido adiposo, não associado à adiponectina.

Reafirma-se, assim, a possível ação do EB em ativar PPAR γ , uma vez que esta ativação poderia estar envolvida em todo o processo antiinflamatório observado neste estudo. Portanto, a diminuição da inflamação sistêmica e local, contribuíram também com a melhora das alterações metabólicas características na obesidade, em especial, a sensibilidade à insulina conforme observado também em outros estudos (KANG et al., 2010; HOO et al., 2010; MAEDA et. al., 2009; SEYMOUR et al., 2009).

De modo geral, as substâncias químicas presentes no EB são as possíveis responsáveis pelos efeitos observados neste estudo. Acredita-se que a correlação existente entre as atividades antioxidante e anti-inflamatória atribuídas a essas substâncias explicariam tais efeitos. Uma vez que alguns extratos vegetais reduzem a inflamação por eliminar superóxidos conhecidos por participarem do recrutamento de células inflamatórias presentes nos tecidos (THAMBI et al., 2009; RÓDENAS et al., 2000). Diante disso, sugere-se que as substâncias químicas presentes no EB de *R. viburnoides*, devido ao seu potencial antiinflamatório, são capazes de modular as alterações metabólicas na obesidade induzidas por dieta.

Nosso grupo de pesquisas tem uma intensa interação com a comunidade e a verificação da qualidade dos produtos disponibilizados para a população é uma das nossas linhas de atuação. Tendo em vista que as folhas de plantas conhecidas como congonha, congonha-de-bugre e porangaba vêm sendo comercializadas em mercados populares para uso em “regimes de emagrecimento” foi realizado um breve estudo em amostras comercializadas no Mercado Central de Belo Horizonte. O estudo mostrou que de um total de 11 amostras para uso como chá, cinco se tratavam de folhas secas de *R. viburnoides*.

A análise macroscópica revelou a presença de contaminação por fungos em uma das amostras. Este tipo de contaminação já foi descrita em outros estudos que analisaram amostras de plantas (AQUINO et al., 2010; TRESVENZOL et al., 2006; NUNES et al., 2003). O desenvolvimento de fungos e/ou bactérias tem origem em circunstâncias relacionadas com a coleta, processamento e/ou armazenamento inadequados (NUNES et al., 2003; MENGUE, MENTZ & SCHENKEL, 2001). Outro tipo de contaminação descrita na literatura é a por metais pesados e microelementos. Esta também estaria relacionada às condições de sanitárias inadequadas, comprometendo a qualidade do produto comercializado (STREET et al, 2008).

As análises químicas evidenciaram que todas as amostras apresentaram perfil em CCD semelhante ao padrão estudado. Este resultado mostra que as amostras comercializadas como congonha, congonha-de-bugre e/ou bugre corresponderam à *R. viburnoides*, indicando que a espécie vem sendo usada pela população. Esta constatação revela uma condição preocupante, uma vez que a planta não conta ainda com resultados de estudos conclusivos, que poderiam justificar o seu emprego no

tratamento da obesidade. Além disto, ficou demonstrado neste estudo que, somente em pequenas doses, seria possível alcançar algum benefício com o uso da planta. Outro fator preocupante são as condições sanitárias impróprias nas quais as plantas são armazenadas e comercializadas.

6. CONCLUSÃO

As substâncias químicas presentes no extrato bruto de *R. viburnoides*, na menor dose estudada (40 mg/kg) podem ser eficazes no tratamento das alterações metabólicas induzidas pelo aumento da adiposidade. Esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a modulação da resposta inflamatória sistêmica e localizada nos tecidos hepáticos e adiposos assim como a expansão do tecido adiposo direcionada a ocorrência da hiperplasia em detrimento da hipertrofia. Os resultados confirmam o potencial dessa planta como possível agente nutracêutico para o tratamento de alterações metabólicas associadas à obesidade.

Esta espécie vem sendo comercializada em mercados populares, entretanto a indicação de uso para o tratamento das alterações metabólicas associadas à obesidade não pode ser ainda atribuída. Uma vez que, este estudo evidenciou informações preliminares sobre a atividade farmacológica da planta. É importante considerar que o uso indiscriminado pode ter efeitos contrários ao esperado, como foi observado no tratamento com as maiores doses.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACE (The American Association of Clinical Endocrinologists). Lipid Guidelines, *Endocr. Pract.*, v.6, n.2, p.1-52, 2000.

ABDOLLAHI, M.; AFSHAR-IMANI, B. A review on obesity and weight loss measures. *Middl. Eas. Pharm.*, v.11, p. 6-10, 2003.

ADA (American Diabetes Association). Standards of Medical Care in Diabetes - 2010. *Diabet. Care*, v.33, p.S11-S61, 2010.

AGUILAR J.L.; ROJAS, P.; MARCELO, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C. A.; MERFORT, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.81, p. 271- 276, 2002.

AHIMA, R. S. Obesity epidemic in need of answers. *J. Gastroenterol.*, v.131, p.991, 2006.

AHN, A.C.; EISENBERG, D.M.; GARDINER, P.; GRAHAM, R.; LEGEDZA, A.T.R.; PHILLIPS, R.S. Factors Associated With Herbal Therapy Use by Adults in the United States. *Altern Ther Health Med.*, v.13, n.2, 2007.

AKASE, T.; SHIMADA, T.; HARASAWA, Y.; AKASE, T.; IKEYA, T.; NAGAI, E.; IIZUKA, S.; NAKAGAMI, G.; IIZAKA, S.; SANADA, H.; ABURADA, M. Preventive Effects of *Salacia reticulata* on Obesity and Metabolic Disorders in TSODMice. *Evidence-Based Complem. and Altern. Med.*, v.2011, Article ID 484590, p.1-10, 2011.

ALARCON-AGUILAR, F.J.; ZAMILPA, A.; PEREZ-GARCIA, M.D.; ALMANZA-PEREZ, J.C.; ROMERO- NUÑEZ, E.; CAMPOS-SEPULVEDA, E.A.; VAZQUEZ-CARRILLO, L.I.; ROMAN-RAMOS, R. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J. Ethnopharmacol.*, v.114, p.66–71, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e pespectivas. *Rev Bras Farmacogn.*, v. 16, p.S678-S689, 2006.

ALONSO, J. *Curso anual de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos*. Asoc. Argentina de Fitomedicina. Bs. Aires, Argentina, 2009.

ALVES, R.M.S.; STEHMANN, J.R.; ISAIAS, R.M.S.; BRANDÃO, M.G.L. Caracterização botânica e química de *R.viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.14, n.1, p. 49-56, 2004.

AQUINO, S.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H.; NOGUEIRA, J.H.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Evolution of fungal burden and aflatoxin presence in packed medicinal plants treated by gamma radiation. *J. Food. Prot.*, v.73, n.5, p.932-937, 2010.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; SOUZA, M. F. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H. M.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity Effects of *yerba maté* Extract (*Ilex*

paraguariensis) in High-fat Diet–induced Obese Mice. *Obes.*, v.17, n.12, p.2127–2133, 2009.

ARNER, E.; WESTERMARK, P.O.; SPALDING, K.L.; BRITTON, T.; RYDE´N, M.; FRISE´N, J.; BERNARD, S.; ARNER, P. Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabet.*, v. 59, p.105-109, 2010.

ATTELE, A.S.; ZHOU, Y.P.; XIE, J.T.; WU, J.A.; ZHANG, L. Antidiabetic Effects of *Panax ginseng* Berry Extract and the Identification of an Effective Component. *Diabet.*, v.51, n.6, p.1851-1858, 2002.

AVRAM, M.M.; AVRAM, A.S.; JAMES, W.D. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.56, p.472–92, 2007.

BAHCECI, M.; GOKALP, D.; BAHCECI, S.; TUZCU, A.; ATMACA, S.; ARIKAN, S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J. Endocrinol. Invest.*, v.30, p.210-4, 2007.

BACH-NGOHO, K.; OUGUERRAM, K.; NAZIH, H.; MAUGÉRE, P.; RIPOLLÉS-PIQUER, B.; ZAIR, Y.; FRÉNAIS, R.; KREMPF, M.; BARD, J.M. Apolipoprotein E kinetics: influence of insulin resistance and type 2 diabetes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v.26, p.1451-1458, 2002.

BADIMON, L.; VILAHUR, G.; PADRO, T. Nutraceuticals and Atherosclerosis: Human Trials. *Cardiovascul. Therapeut.*, v.28, p.202-215, 2010.

BAHIA, L.; AGUIAR, L.G.K.; VILLELA, N.L.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.50, n.2, p.291-303, 2006.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects os essential oils – a review. *F. Chemic. Toxicol.*, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BALBACH, A. *A flora nacional na medicina doméstica*. 17. ed. São Paulo: EDEL, 1980. v.2.

BARNES, S. Nutritional genomics, polyphenols, diets and their impact on dietetics. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.108, n.11, p.1888-1895, 2008.

BARROS, M.P.; SANTIN, S.M.O.; COSTA, W.F.; VIDOTTI, G.J.; SARRAGIOTTO, M.H. Constituintes químicos e avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante de extratos das folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). *Quim. Nov.*, v.31, n.8, p.1987-1989, 2008.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, 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.46-56, 2009.

BAYS, H.E.; GONZA´LEZ-CAMPOY, J.M.; BRAY, G.A.; KITABCHI, A.E.; BERGMAN, D.A.; SCHORR, A.B.; RODBARD, H.W.; HENRY, R.R. Pathogenic potential of adipose

tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.*, v.6, p.343–368, 2008.

BAZUINE, M.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; MAASSEN, J.A. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Bioch. Biophys. Resear. Communicat.*, v.326, n.2, p.511-514, 2005.

BEKRI, S.; GUAL, P.; ANTY, R.; LUCIANI, N.; DAHMAN, M. Increased Adipose Tissue Expression of Hepcidin in Severe Obesity Is Independent From Diabetes and NASH. *Gastroenterol.*, v.131, n.3, p.788-796, 2006.

BERG, A.H.; SCHERER, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, v.96, n.9, p.939-949, 2005.

BERRY, M.A.; HARGADON, B.; SHELLEY, M.; PARKER, D.; SHAW, D.E.; SHAW, D.E.; GREEN, R.H. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N. Engl. J. Med.*, v.354, p.697-708, 2006.

BHAVSAR, S.K.; SINGH, S.; GIRI, S.; JAIN, M.R.; SANTANI, D.D. Effect of saponins from *Helicteres isora* on lipid and glucose metabolism regulating genes expression. *J. Ethnopharmacol.*, v.124, p.426–433, 2009.

BICKEL, C.; RUPPRECHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; ESPINIOLA-KLEIN, C.; SCHLITT, A.; RIPPIN, G.; HAFNER, G.; TREUDE, R.; OTHMAN, H.; HOFMANN, K-P.; MEYER, J. Relation of markers of inflammation (C-reactive protein, fibrinogen, von Willebrand factor, and leukocyte count) and statin therapy to long-term mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, v.89, p.901–908, 2002.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BANADONNA, R.C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M.B.; MONAUNI, T.; MUGGEO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabet. Care*, v.23, p.57-63, 2000.

BORRADAILE, N.M.; CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipid.*, v.34, p.591-598, 1999.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; GRAEL, C.F.F.; NETTO-JR, N.L.; MONTE-MÓR, R.L.M. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, n.2A, p.478-487, 2009.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F.; SANTOS, A.C.P.; MONTE-MÓR, R.L.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol.*, v.120, p.141–148, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 19*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999.

BRASIL. Lei nº 9.933, de 20 de dez. 1999 do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Dispõe sobre as competências do Conmetro e do Inmetro. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 dez. 1999a.

BRASIL. Portaria nº 96, de 07 de abr. 2000 do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Aprova o Regulamento Técnico Metrológico estabelecendo critérios sobre o controle de Produtos Pré-Medidos comercializados em unidade de massa e volume de conteúdo nominal igual, de lotes de 5 a 49 unidades no ponto de venda. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 abr. 2000.

BROOKS, T.M.; MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; GERLACH, J.; HAFFMANN, M.; LAMOREUX, J.F.; MITTERMEIER, C.G.; PILGRIM, J.D.; RODRIGUES, A.S.L. Global Biodiversity Conservation Priorities. *Sci.*, 7, v.313, n.5783, p.58-61, 2006.

BULLO, M.; GARCIA-LORDA, P.; MEGIAS, I.; SALAS-SALVADO, J. Systemic Inflammation, Adipose Tissue Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. *Obes. Res.*, v.11, n.4, p.525-531, 2003.

BULLO, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; AMIGO-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADO, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Pub. Health Nutr.*, v.10, n.10A, p.1164–1172, 2006.

BULLO M.; PEERAULLY M. R.; TRAYHURN P.; FOLCH J.; SALAS-SALVADO J. Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur. J. Endocrinol.*, V.157, p.303-310, 2007.

CABALLERO, A.E. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes. Res.*, v.11, p.1278-1289, 2003.

CABALLERO, J. La etnobotânica. *INREB*, p. 27-30, 1979.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D.F.; MELENDEZ, P.A.; HANSEN, L. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat. Med.*, v.11, p.183-190, 2005.

CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? *Brit. J. Nutr.*, v.88, p.S165–S176, 2002.

CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*, v.113, n.10, p.1141-1147, 2006.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v.29, n.2, p.193- 203, 2005.

CAPARROZ-ASSEF, S.M.; GRESPAN, R.; BATISTA, R.C.F.; BERSANI-AMADO, F.A.; BARONI, S.; DANTAS, J.A.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. *Acta Sci. Health Sci.*, v.27, n.1, p.41-44, 2005.

CARDOZO, S.; BONA, R.L.; BARBOZA, L.T.; ANDREOLLA, H.F.; BOECK, R.; VIEIRA, V.; FRANTZ, M.A.; MORISSO, F.D.P.; COITINHO, A.S.; TAVARES, R.G. Atividade

hipolipidêmica do extrato de *Cordia salicifolia* em camundongos submetidos a dieta hiperlipidêmica. *Rev. AMRIGS*, v.52, n.3, p.182-186, 2008.

CARRATU, E.; SANZINI, E. "Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable". *Ann. Ist. Super Sanità*, v.41, n.1, p.7-16, 2005.

CARRIL, E.P.U.; GARCÍA, A. A. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.50, n.2, p.304-312, 2006.

CARVALHO, A.R. Popular use, chemical composition and trade of cerrado's medicinal plants (Goia's, Brazil). *Environ. Develop. Sustainability*, v.6, p.307–316, 2004.

CEFALU, W.T.; YE, J.; WANG, Z. Efficacy of Dietary Supplementation with Botanicals on Carbohydrate Metabolism in Humans. *Endoc. Metabol. & Imm. Disorders - Drug Targets*, v.8, p.78-81, 2008.

CLAUSSNITZER, M.; THOMAS SKURK, T.; HAUNER, H.; DANIEL, H.; RIST, M. J. Effect of flavonoids on basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in adipocytes. *Mol. Nutr. Food. Res.*, v.55, p.1–9, 2011.

COENEN, K.R.; HASTY, A.H. Obesity potentiates development of fatty liver and insulin resistance, but not atherosclerosis, in high-fat diet-fed agouti LDLR-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.293, p.E492–E499, 2007.

COOK, J.R.; SEMPLE, R.K. Hypoadiponectinemia—Cause or Consequence of Human "Insulin Resistance"? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.95, p.1544–1554, 2010.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. sp.

CORRÊA, M.P. *Flora do Brasil: algumas plantas úteis, suas aplicações e distribuição geográfica*. Rio de Janeiro, 1909. 103 p.

COSTA, J.V.; DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. *Act. Med. Port.*, v.19, n.3, p.251-256, 2006.

CRUZ, G.L. 1982. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 2.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; CHAUDHURI, A.; MOHANTY, P.; GARG, R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation. *Circulation*, v.111, p.1448-1454, 2005.

DANESH, J.; COLLINS, R.; APPLEBY, P.; PETO, R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*, v.279, p.1477–1482, 1998.

DEMBINSKA-KIEC, A.; MYKKANEN, O.; KIEC-WILK, B.; MYKKANEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Brit. J. Nutr.*, v.99, p.ES109-ES117, 2008.

- DECKER, E. A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? *Nutrit. Rev.*, v.55, n.11, p.396-407, 1997.
- DEFRONZO, R.A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, v.143, p.9-21, 2004.
- DICKER, A.; LE BLANC, K.; ASTRÖM, G.; VAN HARMELEN, V.; GÖTHERSTRÖM, C.; BLOMQVIST, L. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell. Res.*, v.308, n.2, p.283-290, 2005.
- DICKEL, M.L.; RATES, S.M.K.; RITTER, M.R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v.109, p.60–71, 2007.
- DILLARD, C. J., GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.*, v.80, p.1744-1756, 2000.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; MOHANTA, B.C.; HARIGAYA, S. Naturally Occurring Triterpenoid Saponins. *Chem. & Biodiv.*, v.7, p.2327-2580, 2010.
- DING, L.; JIN, D.; CHEN, X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR γ transcriptional activity in adipocytes. *J. Nutr. Biochem.*, v.21, n.10, p.941-947, 2010.
- DONGMO, A.B.; KAMANYI, A.; DZIKOUK, G.; NKEH, B. C.A.; TAN, P.V.; NGUELEFACK, T.; NOLE, T.; BOPELET, M.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) Aubrév. & Pellegr. *J. Ethnopharmacol.*, v.84, n.1, p.17-21, 2003.
- DULAK, J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *J. Physio. Pharmacol.*, v.56, p.S51-S69, 2005.
- ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet*, v.365, p.1415-1428, 2005.
- ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DÂMASO, A.R.; RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, O. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrit.*, v.20, p.218-224, 2004.
- FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.115, n.5, p.911-919, 2005.
- FARIAS, M.C.; FRANÇA, L.C.; GALVÃO, S.M.R.; FREITAS, I.M.S.; BARROS, C.N.; MENDES, E.S. Catalogação de ervas medicinal comercializadas no Mercado Público de São José, Recife/PE, associado a sua utilização. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010. Recife: UFRPE, 2010.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, Brasil - volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 546p., 1v/il., 2010.
- FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M.P.O.; MUZIO, B.P.D.; GUIMARÃES, J.F.C.; JUNIOR, A.F.J. Influence of rutin treatment on

biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed. & Pharmacother.*, v.64, p.214–219, 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- α Production in Mice Liver. *Inflammation*, v. 34, p. 139-145, 2011.

FERRANTE, A.W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J. Internal Med.*, v.262, p.408–414, 2007.

FESTA, A.; D'AGOSTINO, R.; HOWARD, G.; MYKKÄNEN, L.; TRACY, R.P.; HAFFNER, S.M. Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance Syndrome. *Circulation.*, v.102, n.1, p.42-72, 2000.

FILHO, R.B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quim. Nova*, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

FLIER, J. S. Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic. *Cell*, v.116, p.337–350, 2004.

FONSECA, E.T. *Plantas medicinales brasileñas*. Rio de Janeiro, GB. 1940. P.102.

FONTAINE, K.R.; REDDEN, D.T.; WANG, C.; WESTFALL, A.O.; ALLISON, D.B. Years of life lost due extremely obesity. *JAMA*, v.289, p.187-93, 2003.

FREISE, F.W. Plantas medicinaes brasileiras. *Boletim de Agricultura*, v. 34, p.252-494, 1933.

FRIED, S.K.; RAO, S.P. Sugar, hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.78, p.S873-S880, 2003.

FU, W.J. Dietary L-arginine supplementation reduce fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.*, v.135, n.4, p.714-721, 2005.

FUJIKAWA, T.; HIRATA, T.; WADA, A.; KAWAMURA, N.; YAMAGUCHI, Y.; FUJIMURA, K.; UEDA, T.; YURUGI, Y.; SOYA, H.; NISHIBE, S. Chronic administration of Eucommia leaf stimulates metabolic function of rats across several organs. *British J. Nutr.*, v.104, p.1868–1877, 2010.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M. G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil. *Conservat. Biol.*, v.19, n.3, p.632–639, 2005.

GNOATTO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.E.; BASSANI, V.L. HPLC Method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *J. Brazil. Chem. Soc.*, v.16, p.723-726, 2005.

GOJI, A.D.T.; MOHAMMED, A. ; TANKO, Y.; EZEKIEL, I.; OKPANCHI, A.O.; DIKKO, A.U.U. A Study of the Anti-Inflammator Y and Analgesic Activities of Aqueous Extract of *Nauclea latifolia* Leaves in Rodents. *Asian J. Medical Sci.*, v.2, n.6, p.244-247, 2010.

- GOOSSENS, G.H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol. Behav.*, v.94, n.2, p.206-218, 2008.
- GORAN, M.I.; GOWER, B.A. Relation between visceral fat and disease risk in children and adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.70, p.S149-S156, 1999.
- GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; HIRAI, S.; KAWADA, T. Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate Carbohydrate and Lipid Metabolism. *PPAR Res.*, v.2010, Article ID 483958, p.1-9, 2010.
- GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPARalpha-expressing HepG2 hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.337, p.440-445, 2005.
- GREENBERG, A.S.; OBIN, M. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.83, P.S461-S465, 2006.
- GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.*, v.29, p.415-445, 2011.
- GUILHERME, A.; VIRBASISUS, J.V.; PURI, V.; CZECH, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.9, n.5, p.367-377, 2008.
- GUTERRES, S.B. *Estudos dos extratos dos frutos de Sapindus saponaria enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese*. São Paulo: Instituto de Química de SP. 2005. 90 p. (Dissertação, Instituto de Química de São Carlos).
- HACKAM, G.D.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*, v.290, p.932-940, 2003.
- HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). *Quím. Nova*, v.28, n.4, p.601-604, 2005.
- HARDEMAN, W.; GRIFFIN, S.; JOHNSTON, M.; KINMONTH, A.L.; WAREHAM, N.J. Interventions to prevent weight gain: a systematic review of psychological models and behaviour change methods. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v.24, p.131-143, 2000.
- HASANI-RANJBAR, S.; NAYEBI, N.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World. J. Gastroenterol.*, v.15, n.25, p.3073-3085, 2009.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; NIWAYAMA, S. Antiviral activity of an extract of *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. *Planta Med.*, v.56, p.439-443, 1990.
- HEREDIA, F.P.; LARQUE, E.; ZAMORA, S.; GARAULET, M. Dehydroepiandrosterone modifies rat fatty acid composition of serum and different adipose tissue depots and lowers serum insulin levels. *J. Endocrinol.*, v.201, p.67-74, 2009.

HIRAI, S.; TAKAHASHI, N.; TSUYOSHI, G.; LIN, S.; UEMURA, T.; YU, R.; KAWADA, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of Inflamm.*, v.2010, Article ID 367838, p. 1-8, 2010.

HOEHNE, F.C. *O que vendem os herbanários da cidade de São Paulo*. São Paulo: Serviço Sanitário do Estado de São Paulo. 1920. p.248.

HOO, R.L.C.; WONG, J.Y.L.; QIAO, C.F.; XU, A.; XU, H.X.; LAM, K.S.L. The effective fraction isolated from Radix Astragali alleviates glucose intolerance, insulin resistance and hypertriglyceridemia in db/db diabetic mice through its anti-inflammatory activity. *Nutr. & Metabol.*, v.7, n.67, p.1-12, 2010.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Sci.*, v.259, p.87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. of Obes*, v.27, p.S53–S55, 2003.

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, v.13, p.497-507, 2002.

IVY, J.L. Role of exercise training in prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med.*, v.24, p.321-336, 1997.

IYER, A.; FAIRLIE, D.P.; PRINS, J. B.; HAMMOCK, B. D.; BROWN, L. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v.6, p.71-82, 2010.

JEFFREYS, M.; McCARRON, P.; GUNNELL, D.; McEWEN, J.; SMITH, G.D. Body mass index in early and mid-adulthood, and subsequent mortality: a historical cohort study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v.27, p.1391-1397, 2003.

JENSEN, M.D. Health consequences of fat distribution. *Horm. Res.*, v.48, n.5, p.88-92, 1997.

JOYAL, S.V. A Perspective on the Current Strategies for the Treatment of Obesity. *Curr. Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, v.3, p.341-356, 2004.

KAMBOJ, V.P. Herbal Medicine. *Curr. Sci.*, v.78, n.1, p.1-10, 2000.

KAMEI, N.; TOBE, K.; SUZUKI, R.; OHSUGI, M. Overexpression of Monocyte chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.*, v.281, n.36, p.26602–26614, 2006.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KOTANI, C.; HIASA, K-I.; KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDA, S.; EGASHIRA, K.; KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.*, v.116, n.6, p.1494–1505, 2006.

KANG, J-H.; TSUYOSHI, G.; HAN, I-S.; KAWADA, T.; KIM, Y.M.; YU, R. Dietary Capsaicin Reduces Obesity-induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Obese Mice Fed a High-fat Diet. *Obes.*, v.18, p.780–787, 2010.

KANG, L.; WANG, J.; ZHANG, Y.; KOU, Z.; GAO, S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem. Cell.*, v.5, p.135-138, 2009.

KANG, M.S.; HIRAI, S.; GOTO, T.; KUROYANAGI, K.; LEE, J-Y.; UEMURA, T.; EZAKI, Y.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Dehydroabiatic acid, a phytochemical, acts as ligand for PPARs in macrophages and adipocytes to regulate inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.369, p.333–338, 2008.

KARSTEN, S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.*, v.2008, article ID132960, p.1-11, 2008.

KENNEDY, D.C.; LYN, R.K.; PEZACKI, J.P. Cellular lipid metabolism is influenced by the coordination environment of copper. *J. Am. Chem. Soc.*, v.131, n.7, p.2444–2445, 2009.

KESSLER, M.; UBEAUD, G., JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.55, n.1, p.131–142, 2003.

KIM, C.S.; KAWADA, T.; KIM, B.S. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibits I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cel. Signal.*, v.15, n.3, p.299-306, 2003.

KIM, H.J.; KANG, H.J.; SEO, J.Y.; LEE, C.H.; KIM, Y-S.; KIM, J-S. Antiobesity Effect of Oil Extract of Ginseng. *J. Med. Food*, v.14, n.6, p.573–583, 2011.

KIM, S.Y.; KIM, H.I.; PARK, S.K.; IM, S.S.; LI, T.; CHEON, H.G. Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferators-activated receptor. *Diabetes*, v.53, p.S66–S70. 2004.

KLEEMANN, R.; VAN ERK, M.; VERSCHUREN, L.; VAN DEN HOEK, A.M.; KOEK, M.; WIELINGA, P.Y.; JIE, A.; PELLIS, L.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; KELDER, T.; TOET, K.; WOPEREIS, S.; CNUBBEN, N.; EVELO, C.; VAN OMMEN, B.; KOOISTRA, T. Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance. *PLoS One.*, v.5, n.1, p.e8817, 2010.

KUMAR, D.S.; BANJI, D.; HARANI, A. A medicinal plants survey for treatment of obesity. *J. Pharm. Res.*, v.4, n.3, p.597-600, 2011.

KUROWSKA, E.M.; SPENCE, J.D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D.J.; PICHE, L.; SERRATORE, P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.72, n.5, p.1095-1100, 2000.

KWAK, N.S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1. The development of regulatory concept. *Food Cont.*, v.12, p.99-107, 2001.

LEFEBVRE, P.J.; SCHEEN, A.J. Obesity: causes and new treatments. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, v.109, p.S215-S224, 2001.

- LEHRKE, M.; REILLY, M.P.; MILLINGTON, S.C.; IQBAL, N.; RADER, D.J.; LAZAR, M.A. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *Pub. Libr. Sci. Med.*, v.1,n.2, p.161-168, 2004.
- LIM, S.; YOON, J.W.; CHOI, S.H.; CHO, B.J.; KIM, J.T.; CHANG, H.S.; PARK, H.S.; PARK, K.S.; LEE, H.K.; KIM, Y-B.; JANG, H.C. Effect of ginsam, a vinegar extract from *Panax ginseng*, on body weight and glucose homeostasis in an obese insulin-resistant rat model. *Metabolism Clinical and Experimental*, v.58, p.8-15, 2009.
- LIN, J.K.; LIN-SHIAU, S.Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol. Nutrition Food Res.*, v.50, n.2, p. 211-217, 2006.
- LINDQVIST, A.; DE LA COUR, C.D.; STEGMARK, A.; HÅKANSON, R.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regul. Pept.*, v.130, n.3, p.123-32, 2005.
- LING, P-R.; BISTRIAN, B.R. Comparison of the effects of food versus protein restriction on selected nutritional and inflammatory markers in rats. *Metabol. Clin. Experimental*, v.58, p.835–842, 2009.
- LIU, R. H. Supplement quick fix fails to deliver. *Food Technol. Int.*, v.1, p.71-72, 2002.
- LIU, J.P.; ZHANG, M.; WANG, W.Y.; GRIMSGAARD, S. Chinese herbal medicines for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev.*, v.3, n.CD003642, 2004.
- LIUBA, L.P. Avaliação da atividade oral aguda e das atividades antidiurética e antioxidante da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Goiânia: Faculdade de Farmácia da UFG. 2009. 87 p. (Dissertação, Mestrado Ciências Farmacêuticas).
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v.2, p.373.
- LUMENG, C.N.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.*, v.117, p.175–184, 2007.
- LUMINITĂ, P.; PÂRVU, A.E.; PÂRVU, M.; TAAMAS, M.; BUIA, R.; PUJA, M. Effects of *Melilotus officinalis* on Acute Inflammation. *Phytother. Res.* v.16, p.316–319, 2002.
- LUNDGREN, M.; SVENSSON, M.; LINDMARK, S.; RENSTRÖM, F.; RUGE, T.; ERIKSSON, J.W. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia.' *Diabetol.*, v.50, p.625-633, 2007.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids* (Berlin: Springer-Verlag), 1970. 164p.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Bol. Centro Biol. Reprodução*, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.
- MADJID, M.; AWAN, I.; WILLERSON, J.T.; CASSCELLS, S.W. Leukocyte Count and Coronary Heart Disease. *J. Am. Col. Cardiol.*, v.44, n.10, 2004.

- MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T.; MURAKAMI-FUNAYAMA, K.; MIYASHITA, K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol. Med.*, v.2, p.897-902, 2009.
- MALTA, D.C.; MOURA, L.; SOUZA, F.M.; ROCHA, F.M.; FERNANDES, F.M. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006 in *Saúde Brasil 2008*. Ministério da Saúde, Brasília, 2009. p.337–362.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.79, n.5, p.727-747, 2004.
- MANETTI, L.M.; DELAPORTE, R.H.; LAVERDE, J.R.A. Metabólitos secundários da família bromeliaceae. *Quím. Nova*, v.32, n.7, p.1885-1897, 2009.
- MANICONE, A.M.; MCGUIRE, J.J. Matrix metaloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell & Develop. Biol.*, v.19, p.34-41, 2008.
- MANTOVANI, A.; GOMES, M.; GOMES, D.M.S.; VIEIRA, R.C. Anatomia foliar de *Rudgea decipiens* Müell. Arg. e *R. macrophylla* Benth. (Rubiaceae). *Acta Bot. Brasilica*, v.9, n.2, p.247-261, 1995.
- MARKOVIC, T.P.; NATOLI, S.J. “Paradoxal nutritional deficiency in overweight and obesity: the importance of nutrient density”. *Med. J. Australia*, v.190, n.3, p.149-151, 2009.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, v.27, p.451-83, 2009.
- MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetol.*, v.28, p. 412-419, 1985.
- MAYER, M.A.; HOCHT, C.; PUYO, A.; TAIRA, C.A. Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Curr. Clin. Pharmacol.*, v.4, p.53–61, 2009.
- MAYER-DAVIS, E.J.; D'AGOSTINO RD, J.R.; KARTER, A.J. Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Study. *JAMA*, v.279, p.669-674, 1998.
- McTIGUE, K.; LARSON, J.C.; VALOSKI, A. Mortality and cardiac and vascular outcomes in extremely obese women. *JAMA*, v.296, p.79-86, 2006.
- MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.11, p.21-35, 2001.
- MIDDLETON, E. The flavonoids. *Trends Pharmacol Sci.*, v.5, p.335-338, 1984.
- MITCHELL, M.; ARMSTRONG, D.T.; ROBKER, R.L.; NORMAN, R.J. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduct.*, v.130, n.5, p.583-597, 2005.

MIYATA, TANAKA, H.; SHIMADA, A.; ITO, A.; YAMANOUCHI, T. KOSANO, H. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. *Life Sci.*, v.88, p. 613-618, 2011.

MOK, T. S. K.; YEO, W.; JOHNSON, P. J.; HUI, P.; HO, W. M.; LAM, K. C.; XU, M.; CHAK, K.; CHAN, A.; WONG, H.; MO, F.; ZEE, B. A double-blind placebo-controlled randomized study of Chinese herbal medicine as complementary therapy for reduction of chemotherapy-induced toxicity. *Ann. Oncol.*, v.18, p.768–774, 2007.

MORO, C.O.; BASILE, G. Obesity and medicinal plants. *Phyto.*, v.71, p.S73– S82, 2000.

MONTEIRO, J.C.; MATTA, S.L.P.; PREDES, F.S.; OLIVEIRA, T.T. Liver Morphology and Morphometry and Plasma Biochemical Parameters of Wistar Rats that Received Leaf Infusion of *Rudgea viburnoides* Benth. (Rubiaceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, n.2, p.407-412, 2009.

NAKAYAMA, T.; SUZUKI, S.; KUDO, H.; SASSA, S.; NOMURA, M.; SAKAMOTO, S. Effects of three Chinese herbal medicines on plasma and liver lipids in mice fed a highfat diet. *J. Ethnopharmacol.*, v.109, p.236–240, 2007.

NAVARRO-MOLL, M. C. Uso racional de las plantas medicinales. *Pharma. Care Espan.*, v.2, p.9-19, 2000.

NGUYEN, N. T.; MAGNO, C. P.; LANE, K.T.; HINOJOSA, M. W.; LANE, J.S. Association of Hypertension, Diabetes, Dyslipidemia, and Metabolic Syndrome with Obesity: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J. Am. Coll. Surgeons*, v.207, n.6, p.928-934, 2008.

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JÚNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSI, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Infarma*, v.19, n.1/2, 2007.

NIELSEN, S.; JENSEN, M.D. Obesity and cardiovascular disease: is body structure a factor? *Curr. Opin. Lipidol.*, v.8, n.4, p.2004, 1997.

NOMURA, D.K.; BLANKMAN, J.L.; SIMON, G.M.; FUJIOKA, K.; ISSA, R.S.; WARD, A.M.; CRAVATT, B.F.; AND CASIDA, J.E. Activation of the endocannabinoid system by organophosphorus nerve agents. *Nat. Chem. Biol.*, v.4, p.373–378, 2008.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. *Toxicol. Letters*, v.150, p.19-24, 2004.

NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U.M.; SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.13, n.2, p.83-92, 2003.

OLESZEK, W.A. Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatography A*, v.967, p.147–162, 2002.

- O'ROURKE, L.; GRONNING, L. M.; YEAMAN, S. J.; SHEPHERD, P. R. Glucose-dependent Regulation of Cholesterol Ester Metabolism in Macrophages by Insulin and Leptin. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 45, p. 42557–42562, 2002.
- OGDEN, C.L.; CARROLL, M.D.; CURTIN, L.R.; McDOWELL, M.A.; TABAK, C.J.; FLEGAL, K.M. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*, v.295, n.13, 2006.
- OKOLI, C.O.; AKAH, P.A. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae). *Pharm. Biochem. Behavior*, v.79, p.473–481, 2004.
- OKUNO, A.; TAMEMOTO, H.; TOBE, K. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.*, v.101, p.1354–1361, 1998.
- OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. DA S. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.8, n.3, p.257-259, 1997.
- PAE, H. O.; JEONG, S. O., KIM, H. S., KIM, S. H., SONG, Y. S., KIM, S. K., et al. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue with higher metabolic stability, inhibits NO production, inducible NO synthase expression and NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophages activated with LPS. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.52, n.9, p.1082-91, 2008.
- PARK, K.W.; LEE, J-E.; PARK, K-M. Diets containing *Sophora japonica* L. prevent weight gain in high-fat diet-induced obese mice. *Nutr. Res.*, v.29, p.819–824, 2009.
- PARK, M.Y.; LEE, K.S.; SUNG, M.K. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- α , PPAR- γ , and LPL mRNA expressions. *Life Sci.*, v.77, p.3344–3354, 2005.
- PATEL, L.; BUCKELS, A.C.; KINGHORN, I.J.; MURDOCK, P.R.; HOLBROOK, J.D.; PLUMPTON, C.; MACPHEE, C.H.; SMITH, S.A. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR γ activators. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.300, n.2, p.472 - , 2003.
- PEARSON, T.A.; MENSAH, G.A.; ALEXANDER, R.W.; ANDERSON, J.L.; CANNON, R.O.; CRIQUI, M. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice. *Circulation.*, v.107, p.499-511, 2003.
- PENNA, M. *Dicionário Brasileiro de plantas medicinais*. Oficinas Gráficas de A Noite: Rio de Janeiro. 1941. P.302.
- PITTAS, A.G.; JOSEPH, N.A.; GREENBERG, A.S. Adipocytokines and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v.89, p.447-452, 2004.
- POF (Pesquisa de Orçamento Familiar- 2008-2009). Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_enc_aa/pof_20082009_encaa.pdf . Acessado em 30 de abr. 2011.

- POWELL, K. Obesity: the two faces of fat. *Nature*, v.447, p.525-527, 2007.
- PRINS, J.B. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.16, n.4, p.639-651, 2002.
- QUEIROZ, J.C.F.; ALONSO-VALE, M.I.C.; CURI, R.; LIMA, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.53, n.5, p.582-594, 2009.
- RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M.A.; BAILE, C.A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J. Nutr. Biochem.*, 19, 717–726, 2008.
- RAZAVI, S.M.; ZAHRI, S.; ZARRINI, G.; NAZEMIYEH, H.; MOHAMMADI, S. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, v.35, p.376-378, 2009.
- REILLY, J.; METHVEN, E.; MCDOWELL, Z. HACKING, B.; ALEXANDER, D.; STEWART, L.; KELNAR, S.C.J. Health consequences of obesity. *Arch. Dis. Child.*, v.88, p.749-753, 2003.
- RICCARDI, G.; CAPALDO, B. ;VACCARO, O. Functional foods in the management of obesity and type 2 diabetes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabolic. Care*, v.8, p.630–635, 2005.
- RICKMAN, C.; IYER, A.; CHAN, V.; BROWN, L. Green Tea Attenuates Cardiovascular Remodeling and Metabolic Symptoms in High Carbohydrate-Fed Rats. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.11, n. 8, p.881-886, 2010.
- RICOTE, M.; GLASS, C.K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1771, p.926–935, 2007.
- RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; KELLY, C.J.; GLASS, C.K. “The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation,” *Nature*, v.391, n.6662, p.79–82, 1998.
- RÓDENAS, J.; CARBONELL, T.; MITJAVILA, M.T. Diferent roles for nitrogen monoxide and peroxy nitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radical Bio. Med.*, v.28, p. 374-380, 2000.
- RODRIGUEZ, E.B.; FLAVIER, M.E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; AMAYA-FARFÁN, J. Phytochemicals and functional foods. Current situation and prospect for developing countries. *Seg. Alim. Nutri.*, v.13, n.1, p.1-22, 2006.
- RONNEMAA, T.; MATTILA, K.; LEHTONEN, A. A controlled randomized study on the effect of long-term physical exercise on the metabolic control in type 2 diabetic patients. *Acta Med. Scand.*, v.220, p.219-224, 1986.
- ROSA, E.A.; SILVA, B.C.; SILVA, F.M.; TANAKA, C.M.A.; PERALTA, R.M.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; FERREIRA, H.D.; SILVA, C.C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.20, n.4, pp.484-488, 2010.

ROZA, J. M.; ZHENG XIAN-LIU, Z.; GUTHRIE, N. Effect of citrus flavonoids and tocotrienols on serum cholesterol levels in hypercholesterolemic subjects. *Alternat. Therap.*, v.13, n.6, p.44-48, 2007.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v.414, p.799-806, 2001.

SANTOS, A.S.; ALVEREZ, M.S.; BRANDÃO, P.B.; SILVA, A.G. *Garcinia cambogia* – uma espécie vegetal como recurso terapêutico contra a obesidade? *Nat.on line*, v.5, n.1, p.37-43, 2007.

SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia). VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.95, p.S1-S51, 2010.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.*, v.118, n.9, p.2992–3002, 2008.

SCHERER, P.E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G.; LODISH, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.26746–26749, 2005.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* a. St. - Hil. (ervamate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Quim. Nova*, v.29, n.6, p.1233-1236, 2006.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; HARDY, M.L.; HEBER, D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.2512-2517, 2004.

SELL, H.; DIETZE-SCHROEDER, D.; KAISER, U.; ECKEL, J. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinol.*, v.147, p.2458-67, 2006.

SELMI, C.; MAO, T.K.; KEEN, K.L.; SCHMITZ, H.H.; GERSHWIN, M.E. The Anti-inflammatory properties of Cocoa Flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.47, n.2, p.S163-S171, 2006.

SEO, J.B.; CHOE, S.S.; JEONG, H.W.; PARK, S.W.; SHIN, H.J.; CHOI, S.M.; PARK, J.Y.; CHOI, E.W.; KIM, J.B.; SEEN, D.S.; JEONG, J-Y.; LEE, T.G. Anti-obesity effects of *Lysimachia foenum-graecum* characterized by decreased adipogenesis and regulated lipid metabolism. *Exp. Mol. Med.*, v.43, n.4, p.205-215, 2011.

SEYMOUR, E.M.; LEWIS, S.K.; URCUYO-LLANES, D.E.; TANONE, I.I.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.B.; BOLLING, S.F. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet. *J. Med. Food.*, v.12, n.5, p.935-942, 2009.

SHAH, N.A.; ANTOINE, H.J.; PALL, M.; TAYLOR, K.D.; AZZIZ, R.; GOODARZI, M.O. Association of androgen receptor CAG repeat polymorphism and polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.93, p.1939-1945, 2008.

- SHORE, S.S.; JOHNSTON, R.A. Obesity and asthma. *Pharmacol. Ther.*, v.110, p.83-102, 2006.
- SHULMAN, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v.106, n.2, p.171-6, 2000.
- SILVA, C.J.; BASTOS, J.K.; TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. *J. Ethnopharmacol.*, v.127, p.445-450, 2009.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed. da Universidade, 1999.
- SIQUEIRA, J.C. *Utilização popular das plantas do Cerrado*. São Paulo: Loyola, 1981.
- SIQUEIRA, V.L.D.; CORTEZ, D.A.G.; OLIVEIRA, C.E.; NAKAMURA, C.V.; BAZOTTE, R.B. Pharmacological Studies of *Cordia salicifolia* Cham in Normal and Diabetic Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.49, n.2, p.215-218, 2006.
- SONG, Y.; MANSON, J.E.; TINKER, L.; HOWARD, B.V.; KULLER, L.H.; NATHAN, L.; RIFAI, N.; LIU, S. Insulin Sensitivity and Insulin Secretion Determined by Homeostasis Model Assessment (HOMA) and Risk of Diabetes in a Multiethnic Cohort of Women: The Women's Health Initiative Observational Study. *Diabet. Care.*, v.30, n.7, p.1747–1752, 2007.
- SOUSA, O.V.; VIEIRA, D-V.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FILGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVÉRIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.51-56, 2007.
- SOUTHON, S.; JOHNSON, I.T.; GEE, J.M.; PRICE, K.R. The Effect of Gypsophylla Saponins in the Diet On Mineral Status And Plasma Cholesterol Concentration in the Rat. *Brit. J. Nutr.*, v.59, p.1900-1905, 1988.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. *Bol. SBCTA*, v. 37, n.2, p.127-135, 2003.
- SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J.V. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.*, v.94, n.2-3, p.219-243, 2004.
- SPEAKMAN, J.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S.; KRÓL, E. Animal models of obesity. *Obes. Rev.*, v.8, suppl. 1, p.55–61, 2007.
- SPIEGELMAN, B.M. "Peroxisome proliferator-activated receptor γ : a key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity," *Euro. J. Med. Res.*, v. 2, n.11, p.457–464, 1997.
- STEARNS, A.J.; BYRNE, C.D.. Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome. *Diabet. Obes. Metabolism*, v.3, p.129-142, 2001.

- STEFEEK, M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdiscip. Toxicol.*, v.4, n.2, p.69–77, 2011.
- STREET, R.A.; KULKARNI, M.G.; STIRK, W.A.; SOUTHWAY, C.; VAN STADEN, J. Variation in heavy metals and microelements in South African medicinal plants obtained from street markets. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, v.25, n.8, p.953-960, 2008.
- STROBEL, P.; ALLARD, C.; PEREZ-ACLE, T.; CALDERON, R.; ALDUNATE, R.; LEIGHTON, F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J.*, v.386, p.471–478, 2005.
- SWEETNAM, P.M.; THOMAS, H.F.; YARNELL, J.W.; BAKER, I.A.; ELWOOD, P.C. Total and differential leukocyte counts as predictors of ischemic heartdisease: the Caerphilly and Speedwell studies. *Am. J. Epidemiol.*,v.145, p.416 –21, 1997.
- TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical J. Pharm. Res.*, v. 7, n.3, p. 1089-1099, 2008.
- TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; KIM, C.S.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K. Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. *FEBS Lett.*, v.550, p.190–4, 2003.
- TAKUMA, D.; GUANGCHEN, S.; YOKOTA, J.; HAMADA, A.; ONOGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Effect of *Eriobotrya japonica* Seed Extract on 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Hamsters. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.2, p.250-254, 2008.
- TALPUR, N.; ECHARD, B.; INGRAM, C.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. Effects of novel formulation os essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. *Diabet. Obes. Metabol.*, v.7, p.193-199, 2005.
- THAMBI, P.T.; KUZHIVELIL ,B.; SABU, M.C.; JOLLY, C.I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. *Indian J. Pharm. Sci.*, v.68, p. 352-355, 2009.
- TILG, H.; MOSCHEN, R.A. Role of adiponectin and PBEF/vasfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated deseases. *Clin. Sci.*, v.114, p.275-288, 2008.
- TILG, H.; MOSCHEN, R.A. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature*, v.6, p.772-783, 2006.
- TINDLE, H.A.; DAVIS, R.B.; PHILLIPS, R.S.; EISENBERG, D.M. Trends in use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997-2002. *Altern. Ther. Health Med.*, v.11, n.1, p.42-49, 2005.
- TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.*, v.92, p.347–55, 2004.
- TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T.

- Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. *Rev. Eletrônica Farm.*, v.3, n.1, p.23-28, 2006.
- TSUDA, T. Regulation of Adipocyte Function by Anthocyanins: Possibility of Preventing the Metabolic Syndrome. *J. Agric. Food Chem.*, v.56, p.642–646, 2008.
- VAN GAAL, L.; MERTENS, I. L.; DE BLOCK, C.E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, v.444, p.875-880, 2006.
- VERMA, S.; LI, S.H.; WANG, C.H.; FEDAK, P.W.; LI, R.K.; WEISEL, R.D. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine endothelial interaction. *Circulation.*, v.108, p.736-740, 2003.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer, 1996.
- WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.*, v.21, n.6, p.697-738, 2000.
- WAKI, H.; TONTONOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol.*, v.2, p.31-56, 2007.
- WALLACE, T.M.; LEVY, J.C.; MATTHEWS, D.R. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabet. Care*, v.27, p1487–1495, 2004.
- WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; ROSENBAUM, D.; FERRANTEAW, L. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v.112, p.1796-1808, 2003.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress and diabetes. *J. Clin. Invest.*, v.115, p.1111-1119, 2005.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v.112, p.1785-1788, 2003.
- WESTERTERP PLANTENGA, M.S.; LEJEUNE, M.P.G.M.; KOVACS, M.R. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. *Obes. Res.*, v.13, n.7, 2007.
- WHO (World Health Organization). Special issue - Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: scientific background papers of the joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, 2002. *Pub. Health Nutr.*, v.7, n. 1, p.S1001, 2004.
- WHO (World Health Organization). Global Infobase 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/infobase/>. Acessado em 30 de abr. 2011.
- WHO (World Health Organization). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: World Health Organization, 1998.
- WILCOX, L.J.; BORRADAILE, N.M.; DE DREU, L.E.; HUFF, M.W. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.*, v.42, n.5, p.725-43, 2001.

- WILLIAMS, B. The year in hypertension. *JACC*, v.55, n.1, p.66–73, 2010.
- WING, R.R.; HILL, J.O. Successful weight loss maintenance. *Annu. Rev. Nutr.*, v.21, p.323-41, 2001.
- WOO, H.M.; KANG, J.H.; KAWADA, T.; YOO, H.; SUNG, K.; YU, R. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life Sci.*, v.80, n.10, p.926-931, 2007.
- WOO, M.N.; BOK, S.H.; LEE, M.K.; KIM, H.J.; JEON, S.M.; DO, G.M.; SHIN, S.K.; HA, T.Y. CHOI, M.S. Anti-obesity and hypolipideamic effects of a proprietary herb and fiber combination in rats feed high-fat diets. *J. Med. Food*, v.11, p.169-178, 2008.
- WOOTEN, N.; BAKALOV, V.L.; HILL, S.; BONDY, C.A. Reduced Abdominal Adiposity and Improved Glucose Tolerance in Growth Hormone-Treated Girls with Turner Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.93, p.2109-2114, 2008.
- XI, J.; ZHAO, S.; LU, B.; ZHANG, R.; LI, Y.; SHEN, D.; ZHOU, G. Separation of major catechins from green tea by ultrahigh pressure extraction. *Int. J. Pharm.*, v.386, p.229-231, 2010.
- XIA, X.; WENG, J. Targeting metabolic syndrome: Candidate natural agents. *J. Diabetes*, v.2, p.243–249, 2010.
- XIONG, M. A.; ZHIPING, L. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Chin. J. Dig.*, v.7, p.7-11, 2006.
- XU, A.; WANG, H.; HOO, R.L.C.; SWEENEY, G.; VANHOUTTE, P.M.; WANG, Y.; WU, D. CHU, W.; QIN, G.; LAM, K.S.L. Selective Elevation of Adiponectin Production by the Natural Compounds Derived from a Medicinal Herb Alleviates Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Obese Mice. *Endocrinol.*, v.150, n.2, p.625–633, 2009.
- XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; YANG, D.; CHOU, C.J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v.112, n.12, p.1821-30, 2003.
- YANG, C-Y.; WANG, J.; ZHAO, Y.; SHEN, L.; JIANG, X.; XIE, Z-G.; LIANG, N.; ZHANG, L.; CHEN, Z-H. Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components. *J. Ethnopharmacol.*, v.130, p.231-236, 2010.
- YANG, Q.; GRAHAM, T.E.; MODY, N.; PREITNER, F.; PERONI, O.D. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, v.436:356-62, 2005.
- YANO, H.M.; SANTOS, A.P.; BUGNO, A.; AURICCHIO, M.T. Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.67, n.1, p.78-82, 2008.

- YIN, J.; XING, H.; YE, J. Efficacy of berberine in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, v.57, p.712–717, 2008.
- YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H. Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. *BioFactors*, v.13, n.1-4, p.231–237, 2000.
- YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R.; DA SILVA, C. A.; LOPES, M. N.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. DA S. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnioides*. *J. Nat. Prod.*, v.61, n.7, p.936-938, 1998.
- YUGARANI, T.; TAN, B.K.H.; TEH, M.; DAS, N.P. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids*, v.27, n.3, p.265-290, 1992.
- YUN, J.W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochem.*, v.71, p.1625–1641, 2010.
- ZHAO, H.F.; FAN, W.; DONG, J.J.; LU, J.; CHEN, J.; SHAN, L.J. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, v.107, n.1, p.296–304, 2008
- ZHENG, X.; SHAO, C.; JIANG, L.; OUYANG, K.; CAI, S. The effects of rutin on blood sugar and lipid metabolism disorders in diet-induced obese rats. *West China Journal of Pharm. Sci.*, v.2, 2005.
- ZHU, J. X.; WANG, Y.; KONG, L.D.; YANG, C.; ZHANG, X. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *J. Ethnopharmacol.*, v.93, n.1, p.133-140, 2004.
- ZUANAZZI, J.A.S. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROCIVK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p.489-516.
- ZYGMUNT, K.; FAUBERT, B.; MacNEIL, J.; TSIANI, E. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, v.398, p.178–183, 2010.

8. ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 159/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação do potencial de *Rudgea Viburnoides (CHAM.) Benth. (Congonha-de-bugre) no tratamento da obesidade induzida por dieta em camundongos Balb/c***", que tem como responsável(is) **Maria das Graças Lins Brandão**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/ 09/ 2010**.

Este certificado expira-se em **8/ 09/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 159/2010**, related to the project entitled "**Assessment of potential *rudgea viburnoides (CHAM.) Benth. (Congonha-de-bugre) in the treatment of diet-induced obesity in mice Balb/c***", under the supervisors of **Maria das Graças Lins Brandão**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 8, 2010**.

This certificate expires in **September 8, 2015**.

Belo Horizonte, 10 de Setembro de 2010.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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 - cetea@prpg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)