

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIDIABÉTICA E  
ANTIMICROBIANA DE *Senna rugosa* (G. Don) H.S. Irwin &  
Barneby (1982) E *Senna velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby  
(1982)**

**GLAUCIA NEVES EBERHARDT**

**DOURADOS, MS  
2012**

**GLAUCIA NEVES EBERHARDT**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIDIABÉTICA E  
ANTIMICROBIANA DE *Senna rugosa* (G. Don) H.S. Irwin  
& Barneby (1982) E *Senna velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby  
(1982)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. EDSON LUCAS  
DOS SANTOS

Co-orientadora: Profa. Dra. KELY DE  
PICOLI SOUZA

**DOURADOS, MS  
2012**

## **Dedicatória**

À Deus, meu protetor, meu guia, meu salvador.

Aos meus pais, Heitor e Eli,

Aos meus irmãos Gessika e Erich,

Ao meu grande amor Luiz Eduardo.

## **Agradecimentos**

À Deus pela força, proteção e por seu infinito amor e bondade em nos conceder o dom da sabedoria;

Aos meus pais Heitor e Eli que se fizeram presentes em cada momento da minha luta e da minha dedicação, que tiveram muita paciência comigo em meus momentos de ausência e de ansiedade; em vocês eu procurei colo quando aflita e encontrei o que mais precisava: amor e carinho!;

Aos meus irmãos Gessika e Erich, aos meus queridos tios, tias, primos e primas pelo apoio, conselhos e amizade sempre presente;

Ao meu namorado Luiz Eduardo pela paciência, por seu companheirismo, amor e estímulo;

Minha gratidão, reconhecimento e agradecimentos especiais ao Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos e à Profa. Dra. Kely de Picoli Souza, pela doação de si mesmos, pelo empenho incansável na orientação e co-orientação, pelo exemplo de profissionalismo e por terem acreditado em mim. Muito obrigada!

À Profa. Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo pela contribuição e parceria na realização das análises antimicrobianas;

À Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira e à Profa. Dra. Anelise Formagio por permitir a utilização dos aparelhos do laboratório de plantas medicinais;

Ao Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues e ao Prof. Dr. Andrelson Wellington Rinaldi por permitir a utilização dos aparelhos do laboratório de Materiais híbridos;

À Profa. Dra. Andréia Sangalli e à Profa. Dra. Zefa Valdivina Pereira pelo auxílio na coleta e identificação das espécies vegetais estudadas;

Aos colegas de laboratório do grupo GEBAM: Cleide, Kátia, Uilson, Luis Fernando, Júnior, Elaine, Débora, Jaqueline e Carolina, pelos momentos de descontração, companheirismo, amizade, paciência, incentivo nos momentos difíceis e principalmente pela colaboração na realização das análises;

Aos alunos de Iniciação científica: Gisele, Flávia, Paola e Salete, meus parceiros durante as longas jornadas de experimentos no laboratório e limpeza do biotério;

À Simone Dalbosco, minha amiga-irmã. O que seria de mim sem você? Obrigada por me ouvir e incentivar sempre;

À Maroly, minha mãe postiça, pelos conselhos, paciência e carinho;

À minha sogra Maria Joana (*in memoriam*) pelo incentivo e carinho nos momentos em que estivemos lado a lado;

Aos professores do Mestrado em Ciências da Saúde pelas contribuições para a melhoria do trabalho apresentado;

Às profas. Dras. Eliana Janet Sanjinez Argadoña e Elaine Guadalupe Rodrigues pelas informações, sugestões e por terem aceitado participar da banca examinadora;

Ao senhor Adonias e à Dona Juci pelo carinho, ajuda e simpatia em todos os momentos em que precisei coletar as plantas no assentamento. Não posso deixar de agradecer também por todos os lanchinhos maravilhosos!;

Aos técnicos da FCBA: Marquinhos, Jú, Tati, Fabi, Livia pela disposição em ajudar e contribuir;

Ao CNPq, CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Plantas medicinais e o desenvolvimento de novos medicamentos.....	4
2.2 Considerações gerais sobre o diabetes mellitus.....	7
2.3 Estresse oxidativo como mecanismo molecular para o diabetes tipo 2.....	11
2.4 Atividade antioxidante de extratos vegetais .....	18
2.5 Metabólitos secundários e plantas brasileiras hipoglicemiantes .....	19
2.6 Resistência microbiana.....	22
2.7 Os princípios ativos naturais antimicrobianos como uma alternativa para a resistência microbiana .....	24
2.8 O gênero <i>Senna</i> .....	27
2.8.1 <i>Senna rugosa</i> (G. Don) H.S. Irwin & Barneby (1982).....	29
2.8.2 <i>Senna velutina</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (1982).....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral .....	33
3.2 Específicos.....	33
4. REFERÊNCIAS .....	34
5. ANEXOS .....	47
5.1 Artigo científico.....	47
5.2 Declaração de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal .....	83

## Lista de Figuras

Figura 1. Via de produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (Droge, 2002). GSH= glutathiona, GSSG= glutathiona oxidada.....	13
Figura 2. Principais vias bioquímicas de produção de ROS, adaptado de Robertson (2004). .....	16
Figura 3. Representação esquemática da região promotora de insulina em ratos mostrando os elementos chave na transcrição de insulina (Poitout et al., 2006). .....	17
Figura 4. Estrutura química de reína e diacereína. ....	28
Figura 5. (A) Flores, folhas e (B) raízes de <i>Senna rugosa</i> . ....	29
Figura 6. Distribuição geográfica na América do Sul de <i>Senna rugosa</i> . Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Geospatial Consortium Services.....	30
Figura 7. (A) Flores, folhas e (B) raízes de <i>Senna velutina</i> .....	31
Figura 8. Distribuição geográfica na América do Sul de <i>Senna velutina</i> . Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Geospatial Consortium Services.....	32

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Situação atual em 2011 e estimativas para 2030 dos países com maior número de casos de diabetes mellitus, em adultos com idade entre 20-79 anos. ....	10
Tabela 2. Exemplos de estudos de plantas brasileiras amplamente utilizadas por seu potencial hipoglicemiante. ....	20



## Resumo

*S. rugosa* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby (1982) e *S. velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (1982) são plantas brasileiras utilizadas frequentemente na medicina popular no tratamento de infecções, inflamações e doenças ligadas ao estresse oxidativo, como diabetes e dislipidemias. No entanto, até o momento não existem dados científicos que validem essas informações.

**Objetivos:** (A) Quantificar o teor de fenóis e flavonóides totais, (B) determinar as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *S. rugosa* e *S. velutina* obtidos com diferentes solventes e métodos de extração e, (C) investigar os potenciais hipoglicemiantes, antihiperlipidêmicos e alterações nos parâmetros metabólicos promovidos pela administração do extrato etanólico das folhas de *S. rugosa* (SRF).

**Material e métodos:** Extratos das folhas e raízes de *S. rugosa* e *S. velutina* foram preparados por maceração ou decocção em água ou etanol. Ensaios *in vitro*: os teores de fenóis e flavonóides totais foram determinados espectrofotometricamente por método Folin – Ciocalteu e método do cloreto de alumínio, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada por ensaio de sequestro do radical 2,2 - diphenil- 1 - picrylhydrazil (DPPH<sup>•</sup>) e ensaio de inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos. Os extratos aquosos e etanólicos foram testados contra três espécies de microrganismos de relevância clínica em infecções humanas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*; utilizando ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício e método de microdiluição em caldo. Ensaios *in vivo*: testes de tolerância à glicose (TTG) foram realizados em ratos normoglicêmicos com doses orais únicas de 200 e 400 mg/kg de SRF para determinação da dose experimental. A atividade antihiperlipidêmica foi avaliada por TTG em ratos diabéticos induzidos por aloxano (120 mg/kg, ip.) tratados com SRF na concentração de 200 mg/kg. A atividade hipoglicemiante, massa corporal, ingestão alimentar e hídrica foram investigados durante 28 dias e a massa do fígado, dos tecidos musculares e adiposos foram analisados após 28 dias em ratos normoglicêmicos, tratados com SRF (200 mg/kg).

**Resultados:** Ensaios *in vitro*: O teor de fenóis e flavonóides totais diferiram entre os extratos de *S. rugosa* e *S. velutina*. O maior teor de fenóis,  $556,0 \pm 9,9$  mg de ácido gálico / 100 g de extrato seco, foi determinado no extrato etanólico das raízes de *Senna velutina* (SVRH) e o maior teor de flavonóides,  $86,8 \pm 10,7$  mg de quercetina / 100 g de extrato seco, no extrato aquoso por decocção das raízes de *Senna rugosa* (SRRD). Todos os extratos demonstraram atividade antioxidante de forma dose dependente. Os extratos etanólicos das raízes e folhas de *S. velutina* e etanólico das folhas de *S. rugosa* apresentaram maior atividade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> ( $IC_{50} = 6,9 \pm 0,6$  µg/mL,  $IC_{50} = 7,9 \pm 0,9$  µg/mL e  $IC_{50} = 10,5 \pm 2,6$  µg/mL, respectivamente) em comparação ao antioxidante padrão ácido ascórbico ( $IC_{50} = 2,5 \pm 0,2$  µg/mL). SRF protegeu eritrócitos humanos contra o dano oxidativo induzido por AAPH (dicloridrato de 2,2'- azobis (2-aminopropano)) em até 31 % (50 µg/mL em 120 minutos) comparado ao controle. *Staphylococcus aureus* foi sensível a todos os extratos, resultando em halos de inibição variando entre  $13,0 \pm 1,0$  a  $31,3 \pm 1,3$  mm e a concentração inibitória mínima (CIM) entre < 0,7 a 50 mg/mL. Nenhum extrato apresentou atividade contra *Escherichia coli* e apenas os extratos etanólicos das raízes de *S. rugosa* e *S. velutina* demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Ensaios *in vivo*: nenhuma diferença foi observada na glicemia dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com SRF em comparação ao controle nos ensaios de TTG. A administração de SRF (200 mg/kg) durante 28 dias não promoveu efeitos hipoglicemiantes e alterações nos parâmetros de massa corporal,

ingestão alimentar e hídrica, massa do fígado, dos tecidos musculares e adiposos nos ratos normoglicêmicos.

**Conclusão:** Este estudo demonstra pela primeira vez a quantificação de fenóis e flavonóides totais, além de potenciais atividades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos de *S. rugosa* e *S. velutina*. Os extratos das folhas e raízes inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* enquanto somente os extratos etanólicos das raízes foram ativos contra *Candida albicans*. Nossos resultados não confirmam o uso tradicional de SRF como antidiabético, considerando o desenho experimental utilizado. No entanto, reforçam a hipótese de utilização deste extrato na profilaxia de complicações resultantes do estresse oxidativo no diabetes mellitus. Em conjunto, esses resultados reforçam o uso popular destas plantas no tratamento de processos infecciosos e doenças associadas ao estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** diabetes, radicais livres, resistência microbiana, flavonóides, fenóis.

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica complexa de etiologia múltipla que pode ser caracterizada por hiperglicemia crônica, hipoinsulinemia e cetose (Wu et al., 2012). Para reduzir os níveis plasmáticos de glicose, os profissionais de saúde lançam mão de hipoglicemiantes orais e insulina, entretanto esses tratamentos podem ser ineficazes em casos avançados do diabetes ou ainda não serem suficientes para manter a glicemia em níveis normais. As plantas medicinais com propriedades hipoglicemiantes são alternativas utilizadas, não somente pela população leiga, mas também por profissionais da saúde e especialistas. Algumas delas já avaliadas cientificamente comprovam a presença de compostos com potencial antidiabético, como as folhas de *Cissus sicyoides*, as sementes de *Trigonella foenum-graecum L* entre outras (Beltrame et al., 2001; Bolsonni et al., 2008).

Entretanto muitas plantas ainda necessitam de investigação científica. Nesse sentido a Organização Mundial da Saúde apresenta uma relação de plantas medicinais a serem investigadas pelo seu efeito hipoglicemiante a fim de que possam fazer parte dos tratamentos antidiabéticos, uma vez que as estimativas preveem que as mortes por diabetes duplicarão entre 2005 e 2030 (Bolsonni et al., 2008; Borges et al., 2008; Pandikumar et al., 2009).

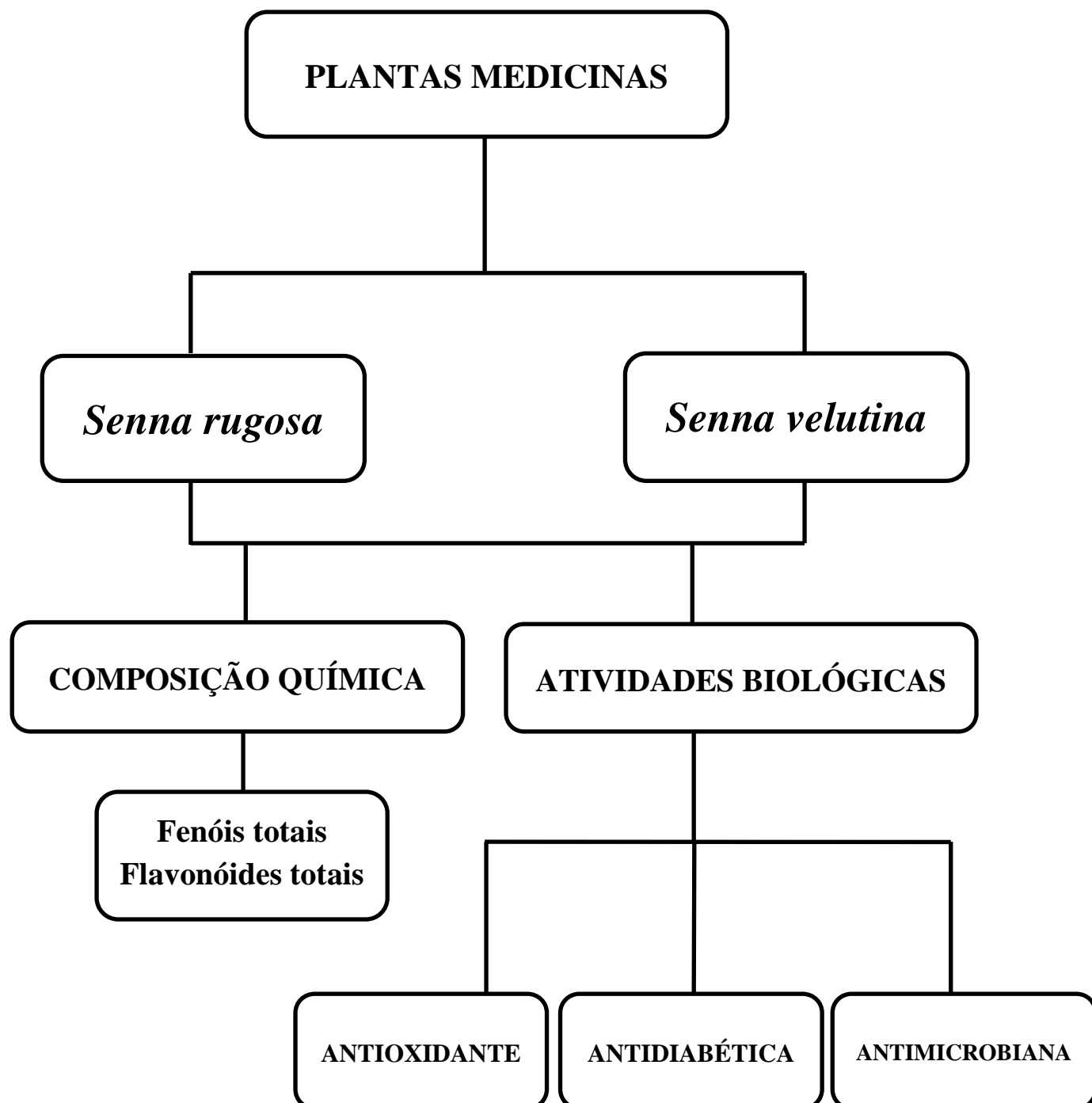
As plantas, assim como os animais e outros seres vivos, evoluíram frente às transformações do ambiente e desenvolveram mecanismos químicos de defesa, surgindo, então, uma mistura complexa de substâncias ativas. Muitas dessas são, hoje, alvos de pesquisas para a solução de diversas patologias (Micozzi, 2003). Segundo Garcia (1995) em cada quatro medicamentos comercializados, um é produzido a partir de substâncias extraídas de plantas ou, possui a estrutura química derivada de vegetais. Ainda, a incorporação das plantas medicinais e da fitoterapia nas práticas curativas representam, muitas vezes, o único recurso terapêutico de várias comunidades (Maciel et al., 2002).

A fitoterapia utiliza diversas partes e formas de preparo das plantas, entretanto, muitos dos “chás milagrosos” não apresentam comprovação científica (Rezende and Cocco, 2002) e algumas vezes, podem causar reações adversas importantes. Além disso, é necessário alertar à população acerca dos riscos do desenvolvimento de co-morbidades associadas ao uso inadequado das plantas medicinais. Desta forma, torna-se imprescindível

a investigação científica para assegurar a utilização correta e contribuir para a autonomia do indivíduo no cuidado à saúde dentre outros fins (Galletto et al., 2004; Torrico et al., 2007).

O Brasil possui cerca de 10 % de toda a flora mundial, no entanto, menos de 1 % das espécies vegetais brasileiras tiveram suas propriedades químicas e farmacológicas elucidadas (Cunha, 2005). Esses dados contribuem para demonstrar o quanto o país, apesar de possuir grandes potencialidades, necessita de pesquisas, patentes e novas descobertas de fitoterápicos em relação aos países desenvolvidos (Marques, 2000).

Neste contexto, diante da inexistência de estudos que comprovem os potenciais farmacológicos das plantas *Senna rugosa* e *Senna velutina* as quais são amplamente utilizadas pela população brasileira, este estudo tem por objetivo: (A) quantificar o teor de fenóis e flavonóides totais, (B) determinar as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* obtidos com diferentes solventes e métodos de extração e (C) investigar os potenciais hipoglicemiantes, antihiperglicêmicos e alterações nos parâmetros metabólicos promovidos pela administração do extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF).

**GRÁFICO RESUMO**

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais e o desenvolvimento de novos medicamentos

As buscas por alternativas medicinais crescem dia-a-dia e as plantas tornam-se alvo de pesquisas científicas focadas no desenvolvimento de novos fármacos menos agressivos e de reduzidos efeitos colaterais (Ali et al., 2011; Nahas and Moher, 2009; Qi et al., 2010).

Aproximadamente 25 % dos medicamentos comercializados derivam direta ou indiretamente de plantas medicinais, em alguns casos essa parcela é ainda maior, como entre os antimicrobianos e antitumorais em que mais da metade dos medicamentos (60 %) tem origem em compostos vegetais (WHO, 2011b). Com isso o mercado fitoterapêutico mundial cresce a uma taxa entre 5 e 18 % ao ano desde 1985 (Bent, 2008). No Brasil a receita anual do comércio de fitoterápicos em 2007 foi de 160 milhões de dólares, e enquanto na China e Europa os valores das vendas de produtos a partir de plantas medicinais já totalizavam 14 e 5 bilhões de dólares, respectivamente (WHO, 2011b). Alguns dos fatores que contribuíram para este crescimento envolvem: a preferência por terapias naturais, a crença de que os fitoterápicos não fazem mal ou produzem menos efeitos colaterais, a busca por medicinais alternativas, o alto custo dos medicamentos sintéticos e a facilidade de auto-medicação (Calixto, 2000).

Os investimentos na pesquisa de novas drogas já superam aqueles em produtos eletrônicos, computadores e nas áreas aeroespacial e de aviação (Pan et al., 2010). As taxas de crescimento atual mostram que somente nos Estados Unidos da América aproximadamente um em cada cinco adultos relatam fazer uso de produtos naturais (Bent, 2008). Na África, 80 % da população usam plantas medicinais para complementar as suas necessidades de saúde (WHO, 2002). Na Ásia o governo chinês investe bilhões de dólares na triagem de medicamentos tradicionais na expectativa de que os ensaios clínicos resultem em drogas lucrativas. Assim a medicina alternativa passou a ser encarada como um grande negócio (Tanaka et al., 2009).

Todavia o processo de seleção de espécies vegetais para a pesquisa científica não é algo simples de ser feito. Trata-se de um processo que pode ser determinado por meio de diversos tipos de abordagens, no entanto, três delas se destacam: a) abordagem randômica, b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética e c) abordagem etnofarmacológica. A

abordagem randômica é caracterizada pela escolha ao acaso de plantas medicinais para estudos farmacológicos. De acordo com Albuquerque and Hanazaki (2006) a aleatoriedade não implica em ausência de critérios e pode representar uma boa forma para selecionar espécies com necessidades de serem investigadas.

A abordagem quimiotaxonômica, por outro lado, baseia-se na seleção de uma família ou gênero pela presença de um ou mais compostos químicos conhecidos de ao menos uma espécie do grupo. É o caso das espécies do gênero *Vernonia*, ricas em algumas substâncias em comum como lactonas sesquiterpênicas, triterpenos, diterpenos, esteróides e flavonóides. As lactonas sesquiterpênicas constituem os marcadores para identificação do gênero e principal ativo responsável pelas atividades biológicas antimicrobianas, antineoplásicas e antimaláricas descritas (Aliyu et al., 2011; Chea et al., 2006; Pratheeshkumar and Kuttan, 2011).

O caminho apontado, entretanto, como o de maior probabilidade para a descoberta de novas substâncias bioativas envolve a seleção etnofarmacológica (Gyllenhaal et al., 2012). Neste caso a espécie é selecionada com base na indicação por grupos populacionais a partir do conhecimento terapêutico construído localmente. A economia de tempo e o baixo custo envolvido na coleta de informações contribuem para a escolha deste caminho (Maciel et al., 2002). Bussmann et al. (2010) desenvolveram um estudo com 141 espécies vegetais do norte do Peru utilizadas tradicionalmente por curandeiros da região, nos quais os resultados apresentados confirmaram o potencial antimicrobiano da maioria dos extratos alcoólicos e aquosos testados e direcionam para estudos mais aprofundados dos quais poderão surgir novas fontes de terapias antibacterianas.

Para Grover et al. (2002) dados etnobotânicos de mais de 800 plantas consideradas antidiabéticas foram confirmados a partir de resultados positivos em ensaios experimentais. Valor ainda pequeno quando comparado às aproximadamente 420 mil espécies de plantas presentes na natureza, a maior parte ainda carente de estudos científicos, o que representa um potencial econômico valioso inexplorado. Por outro lado, exemplos bem conhecidos de fármacos derivados de plantas medicinais incluem o antiinflamatório ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>) de *Salix alba*, os analgésicos morfina e codeína de *Papaver somniferum* L., os digitálicos de *Digitalis purpurea* L., o antimalárico quinina de *Chincona spp* e o antihipertensivo reserpina de *Rauwolfia serpentina* (Pan et al., 2010).

De fato o processo para desenvolvimento de um novo medicamento é demorado. Em média são gastos 10 anos para realizar todos os ensaios farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos, e o custo pode alcançar 800 milhões de dólares (Pan et al., 2010). A descoberta de uma nova molécula ativa com base em plantas medicinais inicia-se pelo processo de extração do material vegetal. Os componentes ativos conhecidos como metabólitos secundários são compostos químicos produzidos por vias bioquímicas secundárias das plantas para a sua proteção contra herbívoros, radicais livres, raios ultravioleta, atração de polinizadores, atuação contra ataque de patógenos como bactérias, fungos e vírus ou em situações de privação de nutrientes (Bent, 2008; Kennedy and Wightman, 2011).

Enquanto o metabolismo primário relaciona-se a uma série de processos fundamentais envolvidos na manutenção da sobrevivência e desenvolvimento do vegetal, o metabolismo secundário não é necessário para a manutenção imediata celular, mas proporciona o aumento da capacidade de sobrevivência e de superação dos desafios locais na interação da planta com o seu meio. Os compostos químicos originados pelo metabolismo secundário são específicos de determinados gêneros e espécies e em geral a energia gasta para sua síntese é muito maior do que a necessária para sintetizar metabólitos primários (Kennedy and Wightman, 2011).

Os extratos são os produtos de uma interação entre uma substância vegetal e um solvente apropriado, o qual é evaporado até que se obtenha a consistência desejada (Coutinho et al., 2004). É essencial que a polaridade do solvente utilizado seja compatível com a polaridade da substância que se pretende extrair. A exemplo disso Perez Gutierrez et al. (2001) testaram várias doses do extrato contendo substâncias apolares de *Cirsium pascuarens* (H.B.K.) Spreng (*Compositae*) e observaram atividade hipoglicemiante significativa, por outro lado, testes com os extratos ricos em substâncias polares não resultaram em alterações nos níveis de glicose no sangue.

Com uma extensa e diversificada flora, o Brasil é visto com um país privilegiado por deter cerca de 10 % da flora mundial (Cunha, 2005). Um grande número de grupos de pesquisa brasileiros com conhecimentos em farmacologia, quimiotaxonomia, química de produtos naturais e outras áreas relacionadas tem contribuído para o desenvolvimento de novos fitoterápicos a partir de plantas nativas do país (Yunes et al., 2001). Entre os exemplos de sucesso no mercado está o Acheflan<sup>®</sup>, primeiro antiinflamatório produzido a partir do extrato de uma planta da mata Atlântica brasileira, a *Cordia verbenaceae*. O



produto sob a forma farmacêutica de creme foi liberado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) sob a classificação de fitomedicamento por ser um fármaco que possui em sua composição somente substâncias ativas extraídas de plantas, ou seja, sem a mistura de princípios ativos sintéticos.

Além do Acheflan, outros 420 fitoterápicos de 60 plantas diferentes possuem registros na ANVISA. No entanto apenas dez tem origem em plantas nacionais e os medicamentos foram desenvolvidos totalmente fora do Brasil (Carvalho et al., 2008).

Embora as plantas medicinais brasileiras apresentem um grande potencial terapêutico o número de estudos científicos que comprovam estas propriedades é reduzido. Atualmente o consumo de fitoterápicos desenvolvidos na Europa e América do Norte, como hipérico, ginkgo, palmeto, crataego, equinácia, entre outros, tornaram-se familiares e preferidos pelos profissionais de saúde e pela população. Dessa forma é essencial dar continuidade ao processo de formação dos recursos humanos e buscar o estabelecimento de programas direcionados para a investigação científica e tecnológica, de modo a descobrir e desenvolver novas moléculas com atividade terapêutica e produzir fitoterápicos genuinamente nacionais tendo em vista a privilegiada biodiversidade brasileira (Simões and Schenkel, 2002).

## **2.2 Considerações gerais sobre o diabetes mellitus**

O diabetes mellitus é descrito como uma desordem metabólica de múltipla etiologia cujos efeitos incluem em longo prazo danos, disfunções e falhas em vários órgãos (WHO, 1999). Apresenta-se em 2 formas principais, o diabetes tipo 1 e tipo 2. O Diabetes tipo 1 é resultado de uma destruição auto-imune das células beta pancreáticas, em que a deficiência de insulina é absoluta (Zimmet et al., 2001). É caracterizada como uma patologia da infância e adolescência devido aos dois picos de manifestação, um entre 5 e 9 anos e outro entre 10 e 14 anos. Em geral pacientes com início tardio apresentam maior preservação da função das células beta pancreáticas, maior período sintomático anterior ao diagnóstico e menor frequência de auto-anticorpos de insulina quando comparados aos de início precoce, o que pode justificar a determinação de sinais leves de descompensação metabólica e níveis reduzidos de hemoglobina glicada no diagnóstico no início da fase adulta (Amador-Patarroyo et al., 2012).

O diabetes tipo 2, por outro lado, representa mais de 90 % dos casos e ocorre mais frequentemente após os 40 anos de idade. Caracteriza-se por uma doença crônica em que ocorre uma deficiência na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas ou, em casos avançados, a insulina encontra resistência em alguns órgãos como fígado, rins e coração e tecidos como músculo esquelético e tecido adiposo. A insulina é o principal hormônio responsável pela regulação da concentração de glicose e está presente normalmente em indivíduos saudáveis (Bolsonni et al., 2008; Dornas et al., 2009; Shu et al., 2009).

Algumas causas particulares também podem determinar quadros específicos de diabetes como, por exemplo, defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (como a fibrose cística) e indução por drogas químicas (como as presentes no tratamento de AIDS). Ocasionalmente determinados pacientes não podem ser classificados como portadores do diabetes tipo 1 ou tipo 2. Isso acontece quando pacientes caracterizados como tipo 2 desenvolvem cetoacidose ou pacientes tipo 1 apresentam um início tardio e uma progressão lenta com características da doença auto-imune. Nestes casos o acompanhamento clínico do paciente tornará o diagnóstico mais evidente ao longo do tempo (ADA, 2010).

Vários fatores contribuíram para o aumento da prevalência do diabetes mellitus nas últimas décadas, entre eles o crescimento da expectativa de vida da população associado ao consumo crescente de gordura saturada, a adoção de hábitos sedentários e obesidade. Somam-se ainda outros fatores como a urbanização progressiva determinante na mudança no estilo de vida e as constantes situações de estresse capazes de desencadear diabetes em indivíduos predispostos geneticamente (Oliveira et al., 2009).

Ainda não existe cura para o diabetes, dessa forma, para que se possa conviver com a doença faz-se necessário um rígido controle dos níveis glicêmicos, associado à prática de exercícios, dieta saudável, manutenção do peso corporal, além de evitar o consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, entre outros (Hamdy and Zwiefelhofer, 2010; Joosten et al., 2010; Kowall et al., 2010; Walker et al., 2010).

A hiperglicemia, ou elevação dos níveis de glicose sanguínea, é consequência do diabetes não controlado e representa sérios riscos para a saúde, especialmente para os vasos sanguíneos e nervos. Além disso, outras alterações podem acontecer principalmente no metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas, bem como nas concentrações de eletrólitos e de água. Algumas delas são facilmente caracterizadas por: perda de peso,

maior ingestão de líquidos (polidipsia) e do volume urinário (poliúria); outras são mais difíceis de serem observadas como: a eliminação de glicose na urina (glicosúria) e a elevação de uréia urinária (Souza et al., 2009).

A Organização Mundial de Saúde estima que existem mais de 346 milhões de diabéticos no mundo. Os dados ainda mostram que, somente em 2004, pouco mais de 3 milhões de pessoas morreram vítimas de diabetes, e que quase 80 % das mortes aconteceram em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Cerca de 55 % das vítimas fatais foram mulheres e mais da metade possuía idade inferior a 70 anos (WHO, 2011a).

Algumas doenças estão rotineiramente associadas ao diabetes e podem elevar as chances de morbidade e mortalidade prematura em até duas vezes mais do que em indivíduos sem diabetes. Entre elas as complicações renais, as doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (Collins et al., 2011).

O diabetes e suas complicações representam um impacto econômico tanto individual quanto familiar e ainda mais significativo para o sistema de saúde pública. Um exemplo disso é a previsão para os gastos da China, o país mais populoso do mundo, que deverá investir, em média, 558 bilhões de dólares entre 2006 e 2015 com os programas de tabagismo, doenças cardíacas e do diabetes (Negri, 2005; WHO, 2011a)

Os Estados Unidos gastaram em média, em 2007, mais de 174 bilhões de dólares com o tratamento de diabetes, sendo 116 bilhões em excesso de despesas médicas e 58 bilhões envolvidos em produtividade nacional reduzida. Para a Associação Americana de Diabetes (ADA) conhecer os custos do diabetes proporciona uma melhora na compreensão da importância em se abordar cuidados de saúde e na prevenção de problemas associados a esta doença (ADA, 2008).

No cenário mundial os países que lideram o ranking de maior prevalência de casos de diabetes são China, Índia e Estados Unidos (Tabela 1). A Federação Internacional de Diabetes estima que essa tendência irá manter-se nos próximos 20 anos (IDF, 2011). Segundo Wild et al. (2004) a doença atinge pessoas com idade entre 45 - 64 anos em países em desenvolvimento, por outro lado em países desenvolvidos a população tende a apresentar a doença a partir de 64 anos.

Tabela 1. Situação atual em 2011 e estimativas para 2030 dos países com maior número de casos de diabetes mellitus, em adultos com idade entre 20-79 anos.

Posição	2011		2030	
	País	Pessoas com diabetes (milhões)	País	Pessoas com diabetes (milhões)
1	China	90,0	China	129,6
2	Índia	61,2	Índia	101,2
3	Estados Unidos	23,7	Estados Unidos	29,6
4	Rússia	12,5	Brasil	19,6
5	Brasil	12,4	Bangladesh	16,8
6	Japão	10,6	México	16,4
7	México	10,2	Rússia	14,1
8	Bangladesh	8,4	Egito	12,3
9	Egito	7,3	Indonésia	11,8
10	Indonésia	7,2	Paquistão	11,4

Fonte: Adaptado de Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2011).

No Brasil os números apontavam para pouco mais de 12 milhões de diabéticos diagnosticados em 2011, o que corresponde a aproximadamente 10,4 % da população entre 20 e 79 anos (IDF, 2011). A fim de reduzir essa estatística o governo federal brasileiro investe anualmente em média até 15 % dos recursos destinados à saúde em um conjunto de ações de promoção, prevenção, diagnóstico, tratamento, capacitação de profissionais, vigilância e assistência farmacêutica voltadas para o cuidado ao diabetes (Toscano et al., 2008). É de se destacar também a criação da Farmácia Popular, programa do governo que amplia o acesso aos medicamentos pela população, distribuindo gratuitamente medicamentos para hipertensão e diabetes ou mesmo oferecendo preços até 90 % mais baixos do que os cobrados em estabelecimentos privados não conveniados (Brasil, 2012).

Diante do cenário desfavorável proporcionado pela alta prevalência de diabéticos não diagnosticados, expressivo crescimento de casos com evidências de complicações ao diagnóstico e elevada mortalidade atribuível às doenças não transmissíveis, o Ministério da Saúde desenvolveu, em 2001, um plano nacional para reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus. A partir de então foi realizada a primeira campanha nacional para triagem de pacientes diabéticos no país (Georg et al., 2005).

O diabetes representa um grande desafio para a saúde pública, com importante impacto econômico e social. Dessa forma cresce exponencialmente a necessidade de realização de pesquisas científicas e medidas para prevenção, controle e melhor compreensão dessa doença (Dias and Campos, 2012).

### 2.3 Estresse oxidativo como mecanismo molecular para o diabetes tipo 2

A oxidação é um processo fundamental da vida aeróbia por fazer parte da via de produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Assim são produzidos, naturalmente ou por alguma disfunção biológica, os radicais livres (Barreiros et al., 2006).

Radicais livres é um termo utilizado para descrever uma variedade de átomos, íons ou moléculas, centrado nos elementos oxigênio ou nitrogênio, que apresentam um elétron não emparelhado em sua órbita externa. Comportam-se como redutores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons nas ligações de seu elétron não pareado com outros elétrons presentes em estruturas próximas de sua formação (Reis et al., 2008; Turrens, 2003).

O organismo humano é constantemente atingido por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) gerados por processos inflamatórios, degenerativos ou provenientes de alimentos. As ERO estão distribuídas em dois grupos, as radicalares: hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\cdot$ ); e as não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já as principais ERN incluem: óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^\cdot$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) (Barreiros et al., 2006).

Os radicais livres também estão envolvidos em processos fisiológicos normais como manutenção do tônus vascular, adesão celular, respostas imunes, ação hormonal e regulação do crescimento celular, nesses casos a produção permanece cuidadosamente regulada e as modificações oxidativas são reversíveis (Pitocco et al., 2010). Por outro lado, a alta reatividade e a elevada instabilidade química das ERO torna-os capazes de causar danos irreversíveis aos componentes celulares como proteínas, lipídeos, lipoproteínas e DNA. Esses eventos resultam em morte celular com conseqüente dano tecidual, culminando no desenvolvimento de diversas patologias entre elas, artrite, inflamação, aterosclerose, diabetes mellitus, cirrose hepática alcoólica, enfisema e câncer (Bahramikia and Yazdanparast, 2010).

O excesso de radicais livres produzidos em organismos sadios é neutralizado por antioxidantes endógenos, produzidos pelo corpo, ou exógenos, adquiridos na dieta alimentar. As defesas endógenas incluem os antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (Mn-SOD, atua na mitocôndria e Cu/Zn-SOD está ativa no citosol), catalase

(CAT), glutathione peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas; e os não-enzimáticos glutathione (GSH), tioredoxina, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH<sub>2</sub>. Entre os antioxidantes provenientes da dieta destacam-se o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pró vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos principalmente flavonóides e poliflavonóides (Barreiros et al., 2006; Poljsak, 2011). O estresse oxidativo é caracterizado por um estado de desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade de defesa por antioxidantes endógenos ou exógenos (Reis et al., 2008).

Em síntese o processo de produção de ERO ocorre durante a redução do oxigênio (O<sub>2</sub>) a água (H<sub>2</sub>O) na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (figura 1). Durante este processo o ânion superóxido é formado pela redução univalente do oxigênio molecular mediado pelas enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase ou não enzimaticamente por componentes reativos redutores como o componente semi-ubiquinona da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Em seguida SOD converte enzimaticamente o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Em tecidos biológicos o superóxido pode ainda ser convertido em peróxido de hidrogênio não radicalar e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) por espécies não enzimáticas. No entanto na presença de metais de transição reduzidos (como íons ferroso e cuproso) o peróxido de hidrogênio é convertido em radicais hidroxila (OH<sup>•</sup>), a ERO mais reativa em sistemas biológicos. De outra forma o peróxido de hidrogênio é convertido em água pelas enzimas catalase ou glutathione peroxidase. Nesta etapa glutathione é oxidada à glutathione dissulfeto, e pode novamente retornar ao estado glutathione pela conversão enzimática de glutathione redutase e consumo de NADPH (Droge, 2002; Hur et al., 2010; Turrens, 2003).

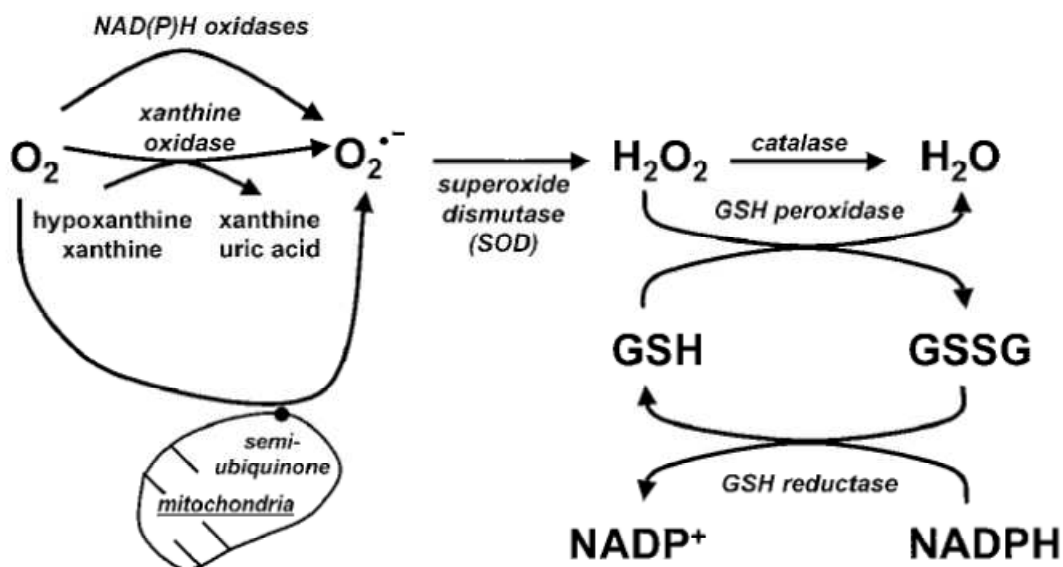


Figura 1. Via de produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (Droge, 2002). GSH= glutathiona, GSSG= glutathiona oxidada.

De um modo geral existem seis principais vias bioquímicas através das quais níveis elevados de glicose podem formar níveis excessivos de ERO (figura 2), responsáveis pelo estresse oxidativo e pela disfunção das células  $\beta$ , são elas: a) auto-oxidação da glicose, b) ativação da proteína quinase C (PKC), c) reações de glicosilação não enzimática (Reações de Schiff), d) aumento da ativação da via dos polióis, e) via hexosamina e f) cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa) (Kaneto et al., 2002; Robertson, 2004).

**Auto-oxidação da glicose (via 1):** Níveis elevados de glicose determinam por si só uma reação autoxidativa com produção aumentada de produtos  $\alpha$ -hidroxialdeídos de glicose, como o gliceraldeído, os quais são submetidos à um processo de enolização, na presença de metais pesados, para produzir um radical ânion enediol ( $\alpha$ -cetoaldeído). Na presença de oxigênio, esses ânions geram o radical superóxido e se combinam para formar peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por superóxido dismutase (SOD). Na presença de metais pesados, o peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila, altamente tóxico (Robertson et al., 2003).

**Ativação da proteína quinase C (PKC) (Via 2):** Dihidroxiacetona é reduzida à glicerol -3-fosfato, que por sua vez sofre acilação e, dá origem ao mediador de comunicação celular diacilglicerol (DAG) que ativa a proteína quinase C. A ativação da

PKC está relacionada a muitas conseqüências bioquímicas, principalmente as que referem-se a doença microvascular no diabetes. Além disso, a ativação da PKC é associada ao aumento da atividade de endotelina -1 e da enzima NADPH oxidase, modificações na expressão de fatores de crescimento tais como fator transformante de crescimento beta (TGF- $\beta$ 1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ativação de NF- $\kappa$ B e produção de ROS; assim como diminuição da produção de óxido nítrico (NO) (Lopes et al., 2008).

**Reações de glicosilação não enzimática (Reações de Schiff) (Via 3):** Na presença de altas concentrações de glicose o catabolismo de gliceraldeído-3-fosfato mediado por gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é prejudicado, com isso, acumulam-se os produtos gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona que favorecem a formação de metilglioxal. Essa e outras duas dicarbonilas reativas intracelulares, glioxal, e 3-deoxi-glucosona, reagem com grupos amino em proteínas intracelulares e extracelulares e formam produtos finais de glicação avançada (AGEs: *advanced glycation end products*). Os AGEs estão fortemente relacionados no desenvolvimento de complicações secundárias do diabetes, especialmente no que diz respeito a doença microvascular na retina, nervos e rins. Além disso, a reação de Maillard que ocorre entre carboidratos e proteínas também gera ROS. Assim, a hiperglicemia simultaneamente aumenta tanto glicação e estresse oxidativo os quais agem em sinergia para o desenvolvimento de complicações no diabetes (Edeas et al., 2010; Giacco and Brownlee, 2010).

**Aumento da ativação da via dos polióis (Via 4):** Na via poliól o excesso de glicose é reduzido a sorbitol pela ação enzimática da aldose-redutase, reação dependente de NADPH. Em seguida, sorbitol é oxidado por NAD<sup>+</sup> para formar frutose, como resultado a proporção citosólica de NADH: NAD<sup>+</sup> aumenta e tende a inibir a atividade da GAPDH. A ação enzimática reduzida de GAPDH leva a um aumento dos níveis de trioses fosfato, metilglioxal e diacilglicerol. Além disso, o excesso de consumo de NADPH pela reação de redução do sorbitol pode induzir ou exacerbar o estresse oxidativo intracelular uma vez que essa molécula é necessária para regeneração de glutatona reduzida pela enzima glutatona redutase (Giacco and Brownlee, 2010).

**Via hexosamina (via 5):** O excesso de glicose intracelular é desviado para a via da hexosamina. Inicialmente a glicose é convertida à frutose-6-fosfato e, em seguida, é transformada pela enzima GFAT (glutamina-frutose-6-fosfato transaminase) em N-acetilglicosamina-6-fosfato. Na etapa seguinte N-acetilglicosamina-6-fosfato converte-se



em UDP-N-acetilglicosamina. Este conjunto de mecanismos é responsável por alterações na expressão de proteínas que atuam como fatores de transcrição e que conseqüentemente modificam a expressão de outras proteínas, entre elas TGF- $\alpha$  , TGF- $\beta$ 1, PAI -1 e demais proteínas envolvidas na resistência à insulina (Kaneto et al., 2001).

**Cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa) (via 6):**

O gradiente de prótons mitocondrial torna-se aumentado em função das altas concentrações de glicose e, como resultado cresce a produção de doadores de elétrons por parte do ciclo do ácido tricarbóxico, reação que culmina com o aumento da produção de superóxido mitocondrial (Naudi et al., 2012).

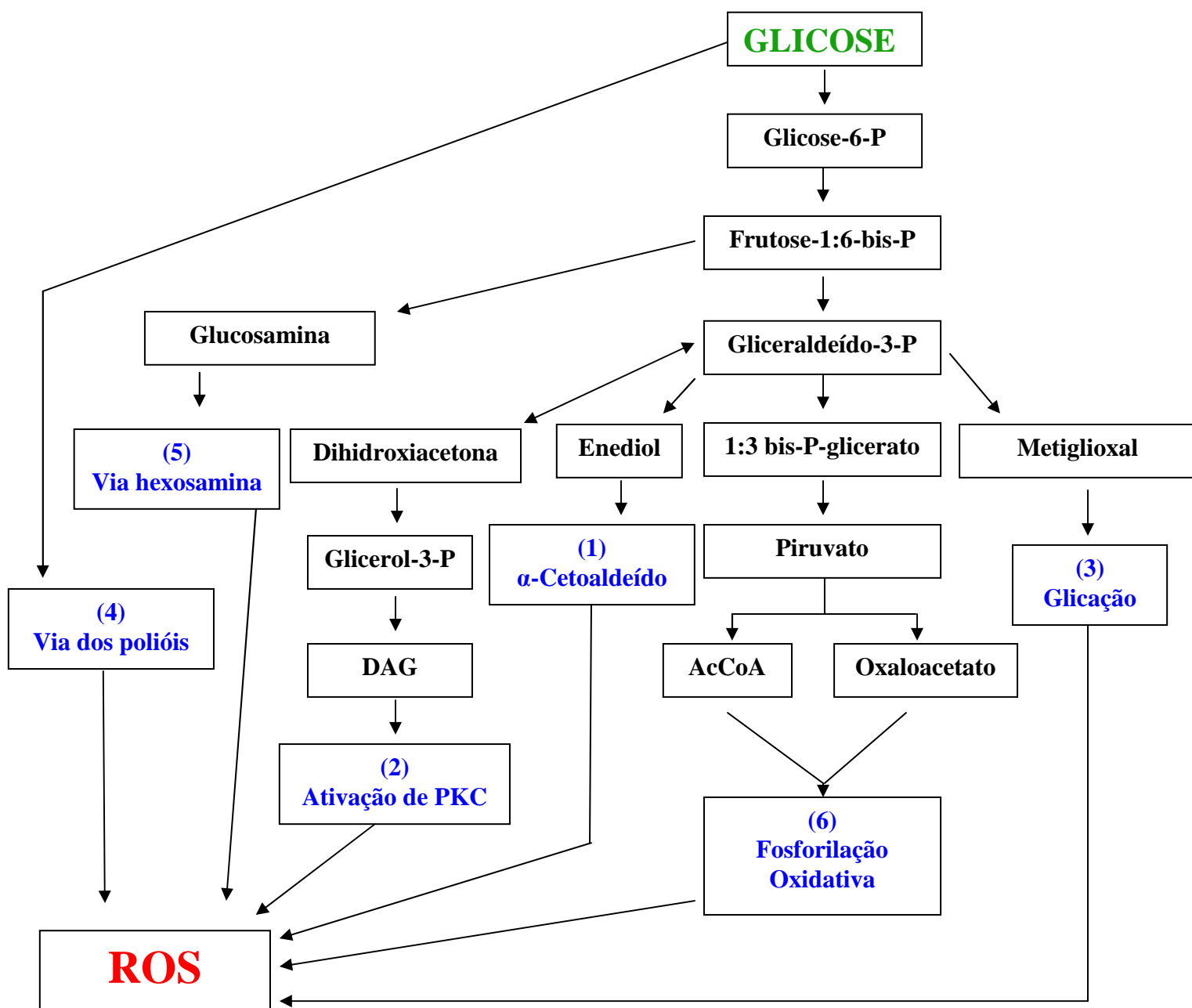


Figura 2. Principais vias bioquímicas de produção de ROS, adaptado de Robertson (2004).

Qualquer célula é vulnerável ao aumento de ERO, no entanto as células  $\beta$  pancreáticas apresentam uma particularidade que as torna especialmente vulneráveis à citotoxicidade das ERO, e que se deve a níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes (Zhang et al., 2010). As mudanças que ocorrem durante a progressão das células  $\beta$  do estágio normal ao diabetes envolvem 3 estágios (Kim and Yoon, 2011; Poitout et al., 2006):

Fase 1- Descompensação leve: Leve comprometimento da secreção de insulina estimulada pela glicose acompanhada de perda de diferenciação celular de células  $\beta$ . Os estoques de insulina permanecem preservados, pois os níveis de RNAm de insulina estão protegidos;

Fase 2- Descompensação grave: Desgranulação de células  $\beta$ , coincidindo com diminuição de RNAm de insulina, levando a uma redução na síntese de insulina. Mudanças na diferenciação celular de células  $\beta$  acontecem em paralelo com alterações dos genes e fatores de transcrição chave de insulina como PDX-1, BETA2 e MafA (figura 3). Aumento da expressão de genes importantes de estresse como A20 e heme-oxigenase 1;

Fase 3- Descompensação com danos estruturais e morte de células  $\beta$ : transição de ilhotas com estrutura normal e função anormal para células com acentuados danos estruturais e formação de fibrilas amilóides. Aparecimento de pontos de fibrose. Acúmulo de gotículas lipídicas (lipotoxicidade). Estímulo ao estresse oxidativo do retículo endoplasmático (RE) conduzindo à ativação de UPR (*Unfolded protein response*), mediado por quinases de estresse e fatores de transcrição tais como quinase Jun N-terminal (JNK) e proteína homóloga C/Ebp (CHOP) com consequente aumento da taxa de apoptose celular. Aumento do fluxo metabólico mitocondrial seguido de produção excessiva de ERO através da via hexosamina. Redução da expressão de PDX-1 e aumento da expressão de PGC-1 $\alpha$ , um co-ativador de transcrição que desempenha um papel chave na regulação da biogênese mitocondrial e no metabolismo energético em múltiplos tecidos.

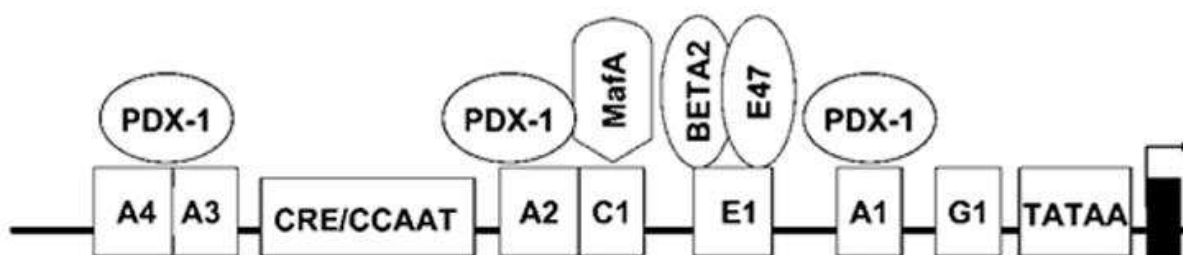


Figura 3. Representação esquemática da região promotora de insulina em ratos mostrando os elementos chave na transcrição de insulina (Poitout et al., 2006).

Os estudos atuais fornecem evidências consideráveis na confirmação de que a indução do estresse oxidativo é um processo fundamental no aparecimento do diabetes, no entanto os mecanismos precisos pelos quais o estresse oxidativo pode acelerar o desenvolvimento de complicações no diabetes são apenas parcialmente conhecidos (Matough et al., 2012). Dessa forma pesquisas *in vitro* e *in vivo* são essenciais na busca

por antioxidantes eficazes e no desenvolvimento de métodos precisos e sensíveis para a detecção precoce do dano oxidativo no diabetes (Jakus, 2000).

#### 2.4 Atividade antioxidante de extratos vegetais

Há um interesse crescente em produtos naturais com atividade antioxidante por seus benefícios à saúde associados à prevenção de danos por espécies reativas de oxigênio, como também pela proteção que oferecem à oxidação dos lipídeos dos alimentos. Muitos dos efeitos benéficos antioxidantes de plantas e seus frutos tem sido atribuídos aos componentes fenólicos, especialmente os flavonóides. Em geral esses componentes agem protegendo as biomoléculas contra o dano oxidativo por meio de reações mediadas por radicais livres. No sistema vascular os compostos fenólicos promovem seus efeitos protetores por um aumento da produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais ou mesmo pela prevenção da oxidação de NO (Bahramikia and Yazdanparast, 2010; Rattmann et al., 2011).

Devi et al. (2012) investigaram o potencial antioxidante em extratos de farelo do sorgo vermelho (*Sorghum bicolor*), um dos alimentos básicos mais consumido na África e Ásia. Os pesquisadores encontraram elevado conteúdo de antocianinas no material extraído com metanol acidificado e que, curiosamente, também demonstrou maior atividade antioxidante expressada de maneira dose dependente. As antocianinas são pigmentos pertencentes ao grupo dos flavonóides e neutralizam a ação de ERO devido a sua elevada reatividade como doadores de hidrogênio e à capacidade para quelar íon de metais de transição.

Sun et al. (2012) também chegaram à conclusão de que a atividade antioxidante dos extratos está associada ao conteúdo de fenóis. Para isso eles avaliaram extratos aquosos e etanólicos dos frutos de *Broussonetia papyrifera* provenientes de 4 regiões diferentes do Sul da China a fim de determinar suas capacidades em remover radicais livres DPPH<sup>•</sup>, inibir a peroxidação lipídica e quelar íons férricos. Os principais resultados demonstraram que o ambiente exerceu efeito sobre a atividade antioxidante, mas o impacto não foi grande. Além disso, o teor de fenólicos totais mostrou forte correlação com a atividade de inibição da peroxidação lipídica ( $r^2 = 0,96$ ).

Roy et al. (2011) investigaram o potencial antioxidante de *Pyrostegia venusta*, uma espécie de videira amplamente distribuída no sul do Brasil. As três metodologias

aplicadas (DPPH<sup>•</sup>, ABTS e FRAP) confirmaram a alta capacidade de captação de radicais livres de suas flores e raízes, comparável a dos compostos sintéticos ácido ascórbico e BHT.

## 2.5 Metabólitos secundários e plantas brasileiras hipoglicemiantes

Um grande número de plantas medicinais tem sido investigado experimentalmente para tratar os sintomas do diabetes (Torrico et al., 2007). Os pesquisadores buscam extrair e isolar os mais diversos constituintes químicos presentes na mistura complexa de substâncias que se encontram nos vegetais. Entre os principais metabólitos extraídos de plantas com potencial antidiabético estão alcalóides, flavonóides, triterpenos, óleos essenciais, glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, cumarinas, vitaminas, polissacarídeos, peptídeos, esteróides, saponinas e aminoácidos (Dornas et al., 2009; Micozzi, 2003; Negri, 2005).

Segundo Beltrame et al. (2001), os flavonóides constituem um dos principais metabólitos secundários responsáveis pelas propriedades antidiabéticas encontradas em extratos vegetais. Assim como os terpenóides, os flavonóides atuam estimulando as células beta pancreáticas e dessa forma proporcionam um aumento da liberação de insulina. Shu et al. (2009) extraíram os flavonóides de *Polygonatum odoratum* e descobriram um efeito potencial na regulação da glicose no sangue de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e aloxano.

Os metabólitos biologicamente ativos extraídos das plantas medicinais com propriedades hipoglicemiantes fazem uso de uma variedade de mecanismos de ação para reduzir a concentração de glicose no sangue. Em alguns casos, entretanto, a hipoglicemia pode ser consequência da toxicidade, ou melhor dizendo hepatotoxicidade, destas substâncias ou ainda por um bloqueio beta-adrenérgico (Dornas et al., 2009; Negri, 2005).

Em outros casos, a queda na taxa de glicose pode ser resultado do aumento do número e sensibilização dos receptores de insulina, inativação de radicais livres, redução no percentual de peroxidação lipídica, resistência aos principais hormônios contra-reguladores, maior consumo de glicose por órgãos e tecidos, redução das complicações diabéticas e aumento das reservas de glicogênio (Dornas et al., 2009; Negri, 2005).

O Brasil possui seis domínios ecológicos, são eles: floresta amazônica, caatinga, pampa, cerrado, mata atlântica e pantanal. Em paralelo às diferenças de vegetação, cada região abriga em seus territórios tipos particulares de comunidades tradicionais, ou seja, descendentes indígenas, africanos, europeus, que utilizam plantas medicinais para os cuidados básicos de saúde. A soma destes dois fatores: recursos naturais abundantes mais população rica em conhecimento empírico contribuem grandemente para que estas regiões se tornem importantes campos de estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos (Bieski et al., 2011).

A abordagem etnofarmacológica na busca de substâncias naturais com propriedades hipoglicemiantes é alvo constante de pesquisas científicas brasileiras, em sua grande maioria de caráter bioprospectivo, que tem como objetivo principal validar o conhecimento empírico de muitas comunidades. A tabela 2 apresenta alguns exemplos desses estudos.

Tabela 2. Exemplos de estudos de plantas brasileiras amplamente utilizadas por seu potencial hipoglicemiante.

Ano	Referência	Intervenção	Resultado do estudo
2010	(Rodrigues et al.)	Administração de extrato aquoso (5 %) da casca de <i>Croton cajucara</i> (popular “Sacaca”) durante 5 e 20 dias em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ).	-Redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos; -Não alterou os níveis de glicose e colesterol.
2011	(Leite et al.)	Administração de extrato hidroetanólico das partes aéreas de <i>Parkinsonia aculeata</i> (125 e 250 mg/kg) durante 16 dias em ratos diabéticos induzidos por aloxano (ALX)	-Diminuição de glicose, em até 51 % no plasma, e na urina; -Redução dos níveis de uréia urinária e triglicerídeos; -Melhora do conteúdo de glicogênio hepático; -Toxicologicamente seguro.
2008	(Honorio-Franca et al.)	Ratos diabéticos induzidos por ALX foram tratados oralmente durante 7 dias com extrato aquoso (100 mg/L) e topicamente por 14 dias com a microemulsão (2 %) da entrecasca de <i>Strychnos pseudoquina</i> (“Quina do Cerrado”)	-Redução dos níveis glicêmicos; - Sem efeito significativo na cicatrização de feridas.
2004	(Viana et al.)	Extrato aquoso de <i>Cissus sicyoides</i> (100 e 200 mg/kg) foi administrado diariamente durante 4 ou 7 dias em ratos diabéticos induzidos por	- Redução da glicemia; -Nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos.

2011	(Vasconcelos et al.)	ALX Administração durante 4 semanas do extrato aquoso das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> (300 e 400 mg/kg) em ratos induzidos por STZ	-Redução dos níveis glicêmicos associados à melhora do estado metabólico; -Elevação da expressão de AKT no músculo esquelético e fígado acompanhado da redução da expressão de AMPK no músculo esquelético.
2008	(Oliveira et al.)	Administração durante 22 dias do extrato hidroetanólico das cascas do caule de <i>Vatairea macrocarpa</i> nas doses de 250 e 500 mg/kg em ratos diabéticos por STZ	-Melhora no estado diabético proporcionado por redução de glicose sérica e urinária, uréia urinária, ingesta de alimento e líquidos, acompanhado de ganho de massa corporal; - Melhora na tolerância à glicose.
2010	(Aragão et al.)	Extrato metanólico das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> (80 mg/kg) foi administrado em ratos diabéticos por ALX	- Redução na glicose plasmática; - Atividade antioxidante potencial.
2008	(Cunha et al.)	Partes aéreas de <i>Leandra lacunosa</i> (“erva do jabuti”) foram extraídas em solução hidroetanólica e administradas em ratos normoglicêmicos e diabéticos induzidos por ALX	- Redução da glicose plasmática.
2007	(Zanatta et al.)	O extrato bruto e as frações acetato de etila e n-butanol das folhas de <i>Vitex megapotamica</i> foram administradas nas doses de 400 e 800 mg/kg em ratos diabéticos por ALX	- Redução da glicose plasmática proporcionado por efeito hipoglicemiante e antihiperlipidêmico;

Apesar de inúmeros estudos científicos comprovando a eficácia de diversas plantas com potencial hipoglicemiante, a metformina é o único medicamento desenvolvido a partir de plantas medicinais que foi aprovado como antidiabético oral pelos órgãos internacionais de regulação (Vuksan and Sievenpiper, 2005). Tem origem na planta *Galega officinalis* cujo principal metabólito responsável pelo efeito biológico de redução da glicemia é conhecido como galegina ou guanidina isoamilina. A guanidina e alguns derivados apresentavam-se muito tóxicos para o tratamento do diabetes mellitus, foi então que surgiram em 1950 as biguanidas, dois anéis ligados de guanidina. Três medicamentos estruturalmente biguanidas foram lançados no mercado: fenformina, buformina e metformina. Casos de acidose láctica frequentes e aumento da mortalidade cardíaca foram associados ao uso de fenformina e buformina fazendo com que estas drogas fossem retiradas do mercado. Metformina, no entanto, por ser menos lipofílico, se revelou um fármaco seguro estabelecendo-se no mercado farmacêutico mundial (Witters, 2001).

## 2.6 Resistência microbiana

Outro ponto importante e que vale a pena ser estudado é a busca por substâncias com propriedades antimicrobianas. A descoberta dos antibióticos foi um dos marcos mais relevantes na área médica e proporcionou a conservação de inúmeras vidas. No entanto, a utilização indiscriminada dessas drogas tem sido acompanhada por um rápido aparecimento de linhagens resistentes (Martinez, 2012).

*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um exemplo notório de microrganismo altamente resistente e que representa risco elevado no surgimento de infecções hospitalares. Apesar da nomenclatura referir-se somente à meticilina (antibiótico desenvolvido para inativar penicilinas produzidas por *S. aureus*), MRSA também não responde a tratamentos com aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol e lincosaminas (Nikaido, 2009).

Estudo realizado por Hanberger et al. (2011) em uma amostra de pacientes (n=13.796) provenientes de diferentes hospitais (n=1.265) e de diferentes países (n=75) avaliou características clínicas de infecções por MRSA e de MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina). As principais observações de Hanberger et al. (2011) demonstraram que infecções por MRSA acometem com maior frequência o trato respiratório. Além disso, o risco de mortalidade em pacientes infectados por MRSA em unidades de cuidados intensivos foi 50 % maior quando comparado aos infectados por MSSA. Dados como este confirmam que no caso de agentes utilizados no tratamento de infecções bacterianas, ou mesmo fúngicas, a complexidade dos processos que contribuem para a emergência e disseminação da resistência não pode ser subestimada (Davies and Davies, 2010).

Outro patógeno bacteriano que representa grave ameaça na resistência microbiana inclui as espécies do gênero *Enterococcus* resistente à vancomicina. No entanto, novos agentes ativos vem sendo descritos contra esses patógenos, entre eles os antibióticos linezolida e quinupristina-dalfopristina (Chong et al., 2010; McNeil et al., 2000; Rathe et al., 2010). Todavia a atividade de inibição microbiana observada acontece potencialmente *in vitro*, ao passo que a utilização em humanos permanece limitada a determinados cenários clínicos devido a taxas reduzidas de sucesso. Dessa forma, estudos científicos que avaliem novas terapias para o tratamento de infecções, especialmente por *Enterococcus*



resistentes à vancomicina, são urgentemente necessários (Arias et al., 2010; Nikaido, 2009).

As bactérias comensais são um importante reservatório de genes de resistência à antibióticos ao passo que facilitam a propagação de tais genes para estipes patogênicas de bactérias. O intestino é o local onde ocorre a maior população de bactérias comensais e, portanto, o local de maior risco à exposição de antibióticos por via oral e/ou preparações parenterais. *Escherichia coli*, um dos colonizadores onipresentes no trato gastrointestinal de crianças e adultos, têm sido frequentemente associado ao desenvolvimento de resistência em resposta ao uso de antibióticos. Isso acontece devido a sua capacidade de trocar genes de resistência a antibióticos com bactérias patogênicas (Dyar et al., 2012).

Em paralelo as infecções por bactérias gram-positivas, as infecções por bacilos gram-negativos multi-resistentes tornaram-se um problema crescente que exige a implementação de medidas de controle mais rigorosas em ambientes hospitalares e cautela na prescrição de antibioticoterapia de amplo espectro (Giske et al., 2008). Em pesquisa recente Baral et al. (2012) analisaram 710 amostras de urina de pacientes da UTI de um hospital em Kathmandu, no Nepal. Dos 219 isolados bacterianos obtidos, 41,1 % pertenciam a linhagens resistentes a múltiplas drogas, sendo *Escherichia coli* (81,3 %) e *Citrobacter spp.* (5 %) as mais prevalentes. De acordo com Pallet e Hand (2010) embora uma ampla gama de agentes patogênicos possam causar infecções do trato urinário, *Escherichia coli* continua a ser o mais comum deles.

Apesar de serem considerados por muitos como um patógeno inofensivo, os fungos representam risco como agentes infecciosos. Nos últimos anos o número de diagnósticos de infecções por fungos invasores tornou-se mais frequente, resultado do crescimento da morbidade e mortalidade em pacientes imunossuprimidos (portadores de HIV, neoplasias, transplantados) (Miceli et al., 2011; Miceli and Lee, 2011). Alguns dos fatores que contribuem para este cenário incluem a ausência de um diagnóstico precoce e preciso associado à falta de uma terapia antifúngica apropriada (Lai et al., 2008).

Em geral, as espécies de *Candida* e *Aspergillus* são as maiores causadoras de infecções fúngicas (Richardson and Lass-Flörl, 2008). Nos últimos dez anos a incidência global de infecções por *Candida spp.* tornou-se cinco vezes maior, contribuindo para que alcançasse a quarta e a sexta posição como principal isolado nosocomial em estudos americanos e europeus, respectivamente (Bassetti et al., 2011). A aspergilose invasiva aguda, por sua vez, afeta globalmente cerca de 300.000 a 500.000 pacientes, com risco de

mortalidade de 88 % para as afecções causadas por microrganismos resistentes a multiazóis (Denning and Perlin, 2011).

O reconhecimento da crescente resistência a antibióticos por agentes patogênicos causadores de graves infecções não pode ser ignorado. Embora o futuro não possa ser previsto com certa exatidão, é possível presumir que uma extensa epidemia de infecções bacterianas e fúngicas resistentes poderiam prejudicar milhões de pessoas. Enquanto um microrganismo adquire resistência em um curto espaço de tempo, são necessários aproximadamente 10 anos para estabelecer a eficácia e segurança de novos compostos antibióticos (Zinner, 2005).

É importante reconhecer a resistência aos antibióticos como um problema de saúde pública. Desta forma, devem ser encontradas soluções que reduzem a mortalidade, o tempo de internação e custos hospitalares ocasionados pelas infecções, assegurando a disponibilidade de antibióticos eficazes no futuro (Slama, 2008).

## **2.7 Os princípios ativos naturais antimicrobianos como uma alternativa para a resistência microbiana**

A maioria das plantas produz metabólitos secundários como parte de seu programa normal de crescimento e desenvolvimento. Em resposta ao ataque de diversos agentes patogênicos ou estresse ambiental esses compostos representam barreiras químicas protetoras (Morrissey and Osbourn, 1999).

Embora a principal função ecológica destes metabólitos secundários seja a auto-defesa, esses compostos bioativos têm sido utilizados na medicina tradicional ganhando o interesse da indústria farmacêutica e de pesquisas no mundo todo. De acordo com Fankam et al. (2011) o verdadeiro desafio para os cientistas é continuamente encontrar novos medicamentos para combater microrganismos resistentes e compostos capazes de inibir os mecanismos de resistência de agentes patogênicos, restaurando a atividade dos antibióticos.

Para Duraipandiyam et al. (2006) o valor medicinal de plantas que produzem uma ação fisiológica definitiva contra doenças infecciosas que acometem o corpo humano encontra-se em algumas substâncias químicas como alcalóides, flavonóides, taninos e demais compostos fenólicos.

Os alcalóides são compostos nitrogenados heterocíclicos. Quatro principais alcalóides derivados de plantas possuem notável potencial antimicrobiano, são eles: reserpina, quinina, harmalina e piperina (Na Phatthalung et al., 2012). A piperina é encontrada na família *Piperaceae* e ocorre em *Piper nigrum* (pimenta preta) e *Piper longum* (pimenta longa) (Jin et al., 2011). Khan et al. (2006) demonstraram o efeito de piperina como potencializador *in vitro* do antibiótico ciprofloxacino contra linhagens de *Staphylococcus aureus*. Já a reserpina é um alcalóide comumente isolado das plantas da família *Apocinaceae*, principalmente da espécie *Rauwolfia serpentina* (Srivastava et al., 2006). Garvey e Piddock (2008) comprovaram o efeito de reserpina como inibidor das bombas de efluxo de formas mutantes de *Streptococcus pneumoniae* resistente à múltiplas drogas.

Os flavonóides são substâncias fenólicas hidroxiladas com uma unidade  $C_6 - C_3$  ligada a um anel aromático. Agem como substâncias antimicrobianas devido à sua capacidade em complexar-se com proteínas solúveis extracelulares e paredes celulares bacterianas. Alguns flavonóides de características mais lipofílicas podem promover o rompimento de membranas microbianas (Cowan, 1999). Hendra et al. (2011) atribuíram a atividade antibacteriana dos extratos do fruto de *Phaleria macrocarpa* (popular “Coroa de Deus”) à presença de compostos flavonóides entre eles canferol, miricetina, naringina, quercetina e rutina, capazes de inibir a síntese de ácidos nucleicos, a função da membrana plasmática e o metabolismo de energia dos microrganismos patogênicos.

Os taninos são compostos polifenólicos solúveis em água frequentemente encontrados em células mortas de espécies vegetais, especialmente as das cascas do caule. O crescimento de fungos, leveduras, bactérias e vírus pode ser inibido por taninos devido ao efeito inibitório que exercem sobre muitas enzimas, proporcionado por sua atividade em precipitar proteínas (Singh et al., 2010). Ishida et al. (2006) investigaram a atividade antifúngica do extrato bruto, frações e subfrações de *Stryphnodendron adstringens*, conhecido popularmente como Barbatimão, contra 103 isolados de leveduras do fluido vaginal. Os resultados demonstraram inibição potencial do crescimento de *Candida albicans* proporcionado por uma das subfrações; e que foi atribuído ao seu elevado conteúdo de taninos condensados. Em outro estudo realizado por Ishida et al. (2009) a incubação com a mesma fração de *S. adstringens* também interferiu em importantes fatores de virulência de três linhagens da levedura *Cryptococcus neoformans*.

Os terpenos ou terpenóides são uma classe diversificada de substâncias naturais altamente enriquecida em compostos com base em uma estrutura isopreno. Alguns exemplos comuns incluem a cânfora (monoterpeno) e a artemisina (sesquiterpeno) (Cowan, 1999). Duraipandiyani et al. (2012) isolaram duas lactonas sesquiterpênicas, costunolida e eremantina, do extrato hexânico dos rizomas de *Costus speciosus*. Os compostos isolados inibiram os fungos testados, mas não as bactérias. Já Kubo et al. (1992) testaram a atividade antimicrobiana de seis diterpenóides isolados da casca de *Podocarpus nagi* contra doze diferentes microrganismos. O composto mais abundante entre os seis, o totarol, exibiu potencial atividade bactericida contra bactérias gram-positivas, entre as quais *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes* e *Staphylococcus aureus*.

Alguns metabólitos secundários tais como, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos e saponinas foram relatados por Morrissey e Osbourn (1999) como precursores inativos de compostos antimicrobianos. Em resposta ao ataque de patógenos esses compostos, que se encontram armazenados em células vegetais, são prontamente convertidos em antibióticos biologicamente ativos por ação enzimática.

Apesar da grande diversidade de compostos bioativos nas plantas medicinais, para que os metabólitos secundários sejam compreendidos por completo, suas ações não podem ser analisadas separadamente. Em algumas espécies medicinais as propriedades antimicrobianas ocorrem entre os múltiplos constituintes, conhecido como sinergia química. Isso acontece quando a ação dos compostos juntos é maior do que a soma aritmética da ação individual dos componentes (Cseke et al., 2006; Wink, 2008).

Além disso, é importante observar características chave na busca por compostos com propriedades antimicrobianas, principalmente as que estão focadas na ocorrência de certos grupos de metabólitos secundários em famílias botânicas ou subfamílias. Trata-se de uma ferramenta que pode ser usada com sucesso na descoberta de espécies vegetais para a atividade biológica de triagem (Basso et al., 2005).

Um exemplo disso pode ser encontrado nas espécies do gênero *Cassia*, conhecidas por exercer atividade na inibição de bactérias e fungos. Em estudo realizado por Duraipandiyani et al. (2006) o extrato metanólico das folhas de *Cassia auriculata* (5 mg / disco) foi eficaz na inibição do crescimento das bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. Outra espécie, *Cassia fistula*, em pesquisa realizada por Bhalodia e Shukla (2011), demonstrou atividade antifúngica

contra linhagens de *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* e *Candida albicans* em dosagens entre 5 e 250 µg / mL utilizando a griseofulvina e nistatina como padrões positivos. Atividades antibacterianas potenciais também foram encontradas contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), utilizando como referência os antibióticos padrões ampicilina, ciprofloxacino, norfloxacino e cloranfenicol.

De acordo com Viegas Junior et al. (2006) as espécies de *Cassia* são ricas em derivados fenólicos, antracênicos e antraquinônicos descritos como as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos utilizados na Índia, Paquistão, Egito e vários outros países. Já Fernand et al. (2008) descrevem as antraquinonas reína, aloe-emodina, crisofanol, emodina e fiscion e o flavonóide canferol como os principais compostos encontrados em *Cassia alata*.

Ainda que disponíveis em grande diversidade, as plantas medicinais e seus compostos bioativos necessitam aliar aos conhecimentos tradicionais e crenças milenares a realização de estudos científicos que comprovem suas propriedades farmacológicas e avaliem possíveis efeitos toxicológicos (Cowan, 1999; Firenzuoli and Gori, 2007).

## 2.8 O gênero *Senna*

A família Fabaceae ocorre, no Brasil, em 200 gêneros e cerca de 1.500 espécies. O gênero *Senna* juntamente com o gênero *Cassia* constituem importantes fontes de substâncias de imensa diversidade química da família Fabaceae (Oliveira Silva et al., 2010). Recentemente o gênero *Senna* teve a sua taxonomia revisada. Algumas espécies de *Cassia*, tidas como sinonímias de *Senna*, foram reclassificadas e passaram a pertencer ao gênero *Senna*. Alguns exemplos incluem *Senna alata*, *Senna alexandrina* e *Senna angustifolia* (Silva et al., 2010).

Com mais de 350 espécies, o gênero *Senna* distribuí-se ao longo das Américas com uma ampla variedade vegetal. No Brasil, as espécies, aproximadamente 60 delas, concentram-se mais especificamente no cerrado e nos campos abertos do Centro-Oeste, bem como no Sudeste e Amazônia. Bolívia, Paraguai e Peru formam os outros países da América do Sul em que também podem ser encontradas as espécies do gênero *Senna* (Araújo and Souza, 2007; Carvalho and Oliveira, 2003).

Algumas espécies do gênero *Senna* são tradicionalmente conhecidas por suas propriedades terapêuticas laxativas e purgativas (*Senna macranthera*), antimicrobianas (*Senna alata*), antiinflamatórias e analgésicas (*Senna spectabilis*), antioxidantes (*Senna italica*) e antiparasitárias (*Senna occidentalis*) (da Silva et al., 2012; Ibrahim et al., 2010; Idu et al., 2007; Masoko et al., 2010).

Guarize et al. (2012) investigaram os efeitos laxativos, antiinflamatórios e sobre a motilidade intestinal do extrato das folhas de *Senna macranthera* em ratos. Atividade antiinflamatória semelhante ao diclofenaco e laxativa comparável à droga padrão bisacodil foram observados. Já Idu et al. (2007) examinaram as propriedades antimicrobianas de extratos das flores de *Senna alata*. Os extratos inibiram o crescimento dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, de forma eficaz ao antibiótico controle gentamicina. A análise fitoquímica revelou a presença de fenóis, taninos, antraquinonas, flavonóides e saponinas.

Rodrigues et al. (2009) em seus estudos sobre a diversidade de substâncias químicas encontradas no gênero *Senna* relataram que os compostos que estão presentes em maior concentração são os flavonóides, polissacarídeos e também as antraquinonas. Outras substâncias presentes, porém em menor quantidade, são os alcalóides piperidínicos, esteróides, lactonas, triterpenos, isoquinolinas, cromonas e estilbenos.

A reína (figura 4) é um glicosídeo antraquinônico frequentemente encontrado nas folhas e vagens de *Senna angustifolia*. Além de propriedades antioxidantes, antitumorais e antivirais este composto também atua como substância de partida na síntese de diacereína, droga antiinflamatória utilizada no tratamento da osteoartrite (Mehta and Laddha, 2009).

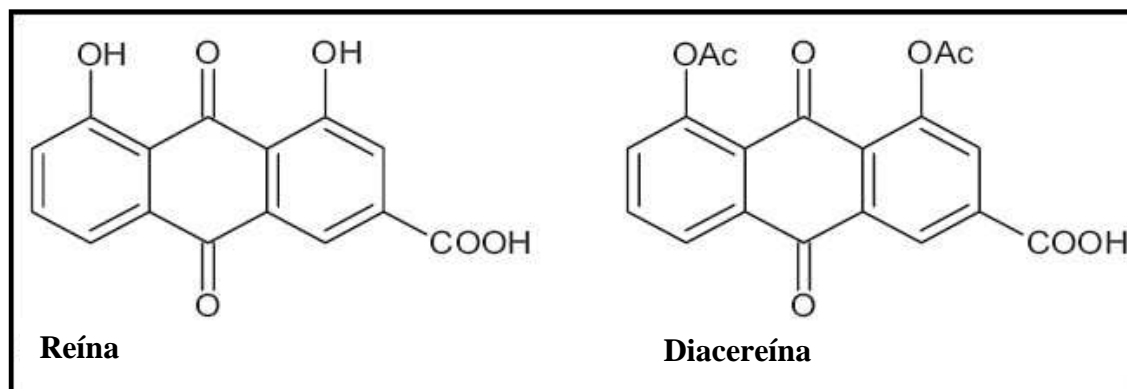


Figura 4. Estrutura química de reína e diacereína.

### 2.8.1 *Senna rugosa* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby (1982)

Conhecida popularmente como amarelinho, acacu, raiz-preta ou unha-de-boi, a planta *Senna rugosa* pertence à família Fabaceae (Leguminosae) e subfamília Caesalpinioideae. Apresenta-se como um arbusto de grande porte, com folhas dispostas de forma alternada, flores vistosas e de um amarelo ouro intenso, arranjadas, normalmente, em panículas axilares e terminais e que surgem entre os meses de abril e junho (figura 5). A frutificação acontece entre maio e julho, os frutos são secos do tipo vagem e se tornam pretos quando maduros (Maroni et al., 2006).



Glaucia N. Eberhardt

Figura 5. (A) Flores, folhas e (B) raízes de *Senna rugosa*.

No Brasil, as espécies de *Senna rugosa* podem ser encontradas em vários estados (figura 6): região Norte (Pará, Tocantins e Rondônia), região Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco e Bahia), região Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul), região Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), região Sul (Paraná) (Souza and Bortoluzzi, 2010).



Figura 6. Distribuição geográfica na América do Sul de *Senna rugosa*. Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Geospatial Consortium Services.

Entre os usos populares de *Senna rugosa*, Rodrigues e Carvalho (2001) citam que o chá por decocção ou infusão de suas raízes é usado como vermífugo e antídoto em casos de mordeduras de cobras. Em Minas Gerais, existem relatos do seu uso no tratamento de gripes e resfriados (Naves et al., 2009). Em levantamento realizado por Vila Verde et al. (2003), em Goiás foi descrita a utilização da decocção das folhas e raízes de *S. rugosa* como vermífugo e para tratar a rouquidão. Já para Borges et al. (2008) os integrantes pertencentes à família das Fabaceas possuem potenciais propriedades hipoglicemiantes.

As propriedades larvicidas de *Senna rugosa* contra *Aedes aegypti* foram avaliadas por Farias et al. (2010). O extrato aquoso das sementes apresentou baixa taxa de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* comparado aos demais extratos de diversas espécies vegetais da família Fabaceae. Outra atividade biológica de *Senna rugosa* testada foi o potencial moluscicida dos extratos hexânico e etanólico da casca do caule sobre caramujos adultos e desovas de *Biomphalaria glabrata*. O extrato hexânico foi ativo contra caramujos adultos na concentração de 100 ppm e parcialmente ativo contra as desovas nesta mesma concentração. Já o extrato etanólico não demonstrou atividade moluscicida em nenhuma das concentrações testadas sobre caramujos adultos, mas foi potencialmente ativo contra as desovas na concentração de 100 ppm (Mendes et al., 1984).



De acordo com Alemayehu e Abegaz et al. (1998) o gênero *Senna* é rico em propriedades biológicas e farmacológicas as quais devem-se principalmente à presença de compostos de natureza antraquinônica.

São escassos os estudos sobre *Senna rugosa*, pouco se sabe em relação aos seus potenciais efeitos farmacológicos, e ainda carecem maiores esclarecimentos e registros científicos dos constituintes resultantes do metabolismo secundário deste vegetal.

### 2.8.2 *Senna velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (1982)

*Senna velutina* é uma planta de porte arbustivo que pertence à família Fabacea. Apresenta inflorescências terminais com flores pentâmeras e hermafroditas. Suas pétalas possuem coloração amarela e os frutos são do tipo deiscente (abrem-se quando maduros) (figura 7) (Saiki et al., 2008).



Glaucia N. Eberhardt

Figura 7. (A) Flores, folhas e (B) raízes de *Senna velutina*.

Popularmente é conhecida como são João, fedegosão e vermelhinho (Loverde-Oliveira et al., 2010). Na região Nordeste do Brasil a decocção de suas cascas é utilizada externamente para tratar dermatites (Agra et al., 2007). Na região Sul do estado do Mato

Grosso do Sul a população local utiliza a planta no tratamento de hipercolesterolemias, problemas hepáticos e infecciosos.

*Senna velutina* distribui-se geograficamente nas regiões Norte (Tocantins), Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) do Brasil (Souza and Bortoluzzi, 2010). Marazzi et al. (2006) relataram a ocorrência de *Senna velutina* e outras diversas espécies de *Senna* também no Paraguai e Bolívia (figura 8).



Figura 8. Distribuição geográfica na América do Sul de *Senna velutina*. Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Geospatial Consortium Services.

*Senna velutina* é uma planta nativa de vasta distribuição na vegetação do cerrado e pantanal sul matogrossense. Apesar de ser amplamente utilizada pelas populações locais não existem estudos de caráter científico que comprovem suas propriedades. Além disso, o risco imposto pela crescente devastação desses biomas brasileiros promove ano a ano a extinção de espécies vegetais ainda não estudadas. Diante do apresentado, estudos etnofarmacológicos em plantas medicinais encontradas no pantanal e cerrado brasileiro são extremamente necessários.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Avaliar os potenciais antioxidante e antimicrobiano dos extratos de duas espécies do gênero *Senna*: *Senna rugosa* e *Senna velutina*;
- Investigar a atividade antihiperlipidêmica e hipoglicemiante de *Senna rugosa*;

#### 3.2 Específicos

- Analisar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos aquosos e etanólicos das folhas e raízes de *Senna rugosa* e *Senna velutina*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos e etanólicos das folhas e raízes de *Senna rugosa* e *Senna velutina* em bactéria gram-positiva, gram-negativa e levedura;
- Investigar a atividade antihiperlipidêmica do extrato etanólico de *S. rugosa* em ratos normoglicêmicos e diabéticos;
- Estudar a atividade hipoglicemiante do extrato etanólico de *S. rugosa* em ratos *Wistar* normoglicêmicos;
- Verificar o efeito do extrato etanólico de *S. rugosa* sobre a ingestão calórica, massa corporal e órgãos específicos, bem como dos tecidos musculares e adiposos de ratos *Wistar*;

#### 4. REFERÊNCIAS

- ADA, 2008. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care* 31, 596-615.
- ADA, 2010. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care* 33 Suppl 1, S11-61.
- Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 114-140.
- Albuquerque, U.P., Hanazaki, N., 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 678-689.
- Alemayehu, G., Abegaz, B.M., 1998. 1-4, anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera*. *Phytochemistry* 48, 699-702.
- Ali, K.M., Chatterjee, K., De, D., Jana, K., Bera, T.K., Ghosh, D., 2011. Inhibitory effect of hydro-methanolic extract of seed of *Holarrhena antidysenterica* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose level in normoglycemic rat. *Journal of Ethnopharmacology* 135, 194-196.
- Aliyu, A.B., Musa, A.M., Abdullahi, M.S., Ibrahim, H., Oyewale, A.O., 2011. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (Asteraceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica* 68, 67-73.
- Amador-Patarroyo, M.J., Rodriguez-Rodriguez, A., Montoya-Ortiz, G., 2012. How does age at onset influence the outcome of autoimmune diseases?. *Autoimmune Disease* 2012, 251730.
- Aragão, D.M., Guarize, L., Lanini, J., da Costa, J.C., Garcia, R.M., Scio, E., 2010. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 629-633.
- Araújo, A.O., Souza, V.C., 2007. Uma nova espécie de *Senna* Mill. (Leguminosae – Caesalpinoideae) do Brasil. *Rodriguésia* 58, 359-362.
- Arias, C.A., Contreras, G.A., Murray, B.E., 2010. Management of Multi-Drug Resistant Enterococcal Infections. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 555-562.
- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., 2010. Antioxidant efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various in vitro assay systems. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 3, 283-290.

Baral, P., Neupane, S., Marasini, B.P., Ghimire, K.R., Lekhak, B., Shrestha, B., 2012. High prevalence of multidrug resistance in bacterial uropathogens from Kathmandu, Nepal. *BMC Research Notes* 5, 38.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Oxidative Stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova* 29, 113-123.

Bassetti, M., Taramasso, L., Nicco, E., Molinari, M.P., Mussap, M., Viscoli, C., 2011. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 6, e24198.

Basso, L.A., da Silva, L.H., Fett-Neto, A.G., de Azevedo, W.F., Jr., Moreira Ide, S., Palma, M.S., Calixto, J.B., Astolfi Filho, S., dos Santos, R.R., Soares, M.B., Santos, D.S., 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 475-506.

Beltrame, F.L., Sartoretto, J.L., Bazotte, R.B., Cuman, R.N., Cortez, D.A., 2001. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova* 24, 783-785.

Bent, S., 2008. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation: grand rounds at University of California, San Francisco Medical Center. *Journal of General Internal Medicine* 23, 854-859.

Bhalodia, N.R., Shukla, V.J., 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2, 104-109.

Bieski, I.G.C., Santos, F.R., Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O., 2011. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Envidende-Based Complementary and Alternative Medicine* In press.

Bolsonni, A.K.H., Demoner, K., Vulpi, T.S., Silva, A.G., 2008. O uso de espécies vegetais como fitoterápicos hipoglicemiantes. *Natureza Online* 6, 19-23.

Borges, K.B., Bautista, H.B., Guilera, S., 2008. Diabetes: utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista Eletrônica de Farmácia* 5, 12-20.

Brasil, M.d.S., 2012. Portaria nº 971. Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.

Bussmann, R.W., Malca-Garcia, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Diaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frias-Fernandez, F., Benito, M., 2010. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 132, 101-108.

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

Carvalho, A.B.C., Balbino, E.E., Maciel, A., Perfeito, J.P.S., 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 314-319.

Carvalho, D.A., Oliveira, P.E., 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 26, 319-328.

Chea, A., Hout, S., Long, C., Marcourt, L., Faure, R., Azas, N., Elias, R., 2006. Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 54, 1437-1439.

Chong, Y.P., Lee, S.O., Song, E.H., Lee, E.J., Jang, E.Y., Kim, S.H., Choi, S.H., Kim, M.N., Jeong, J.Y., Woo, J.H., Kim, Y.S., 2010. Quinupristin-dalfopristin versus linezolid for the treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteraemia: efficacy and development of resistance. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 42, 491-499.

Collins, G.S., Mallett, S., Omar, O., Yu, L.M., 2011. Developing risk prediction models for type 2 diabetes: a systematic review of methodology and reporting. *BMC Medicine* 9, 103.

Coutinho, H.D.M., Bezerra, D.A.C., Lobo, K., Barbosa, I.J.F., 2004. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos* 6, 77-85.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.

Cseke, L., Kirakosian, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., Briemann, H.L., 2006. Natural products from plants. CRC Press.

Cunha, A., 2005. Aspectos Históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia., 1 ed. Siesalq, São Paulo.

Cunha, W.R., Arantes, G.M., Ferreira, D.S., Lucarini, R., Silva, M.L., Furtado, N.A., da Silva Filho, A.A., Crotti, A.E., Araujo, A.R., 2008. Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 79, 356-360.

da Silva, K.A., Manjavachi, M.N., Paszcuk, A.F., Pivatto, M., Viegas, C., Jr., Bolzani, V.S., Calixto, J.B., 2012. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology* 62, 967-977.

Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, 417-433.

Denning, D.W., Perlin, D.S., 2011. Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiology* 6, 1229-1232.

Devi, P.S., Kumar, M.S., Das, S.M., 2012. DNA Damage Protecting Activity and Free Radical Scavenging Activity of Anthocyanins from Red Sorghum (*Sorghum bicolor*) Bran. *Biotechnology Research International* 2012, 258787.

Dias, J.C., Campos, J.A., 2012. Diabetes mellitus: reasons for prevalence in different geographic regions of Brazil, 2002-2007. *Ciência & Saúde Coletiva* 17, 239-244.

Dornas, W.C., Oliveira, T.T., Dores, R.G.R., Fabres, M.H.A., Nagem, T.J., 2009. Efeitos anti-diabéticos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 488-500.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.

Duraipandiyan, V., Abdullah Al-Harbi, N., Ignacimuthu, S., Muthukumar, C., 2012. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12, 13.

Duraipandiyan, V., Ayyanar, M., Ignacimuthu, S., 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, 35.

Dyar, O.J., Hoa, N.Q., Trung, N.V., Phuc, H.D., Larsson, M., Chuc, N.T., Stalsby Lundborg, C., 2012. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among children in rural Vietnam. *BMC Infectious Diseases* 12, 92.

Edeas, M., Attaf, D., Mailfert, A.S., Nasu, M., Joubet, R., 2010. Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie* 58, 220-225.

Fankam, A.G., Kuete, V., Voukeng, I.K., Kuate, J.R., Pages, J.M., 2011. Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11, 104.

Farias, D.F., Cavaleiro, M.G., Viana, M.P., Queiroz, V.A., Rocha-Bezerra, L.C., Vasconcelos, I.M., Morais, S.M., Carvalho, A.F., 2010. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82, 585-594.

Fernand, V.E., Dinh, D.T., Washington, S.J., Fakayode, S.O., Losso, J.N., van Ravenswaay, R.O., Warner, I.M., 2008. Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of high performance liquid chromatography. *Talanta* 74, 896-902.

Firenzuoli, F., Gori, L., 2007. Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 4, 37-40.

Galletto, R., Siqueira, V.L.D., Ferreira, E.B., Oliveira, A.J.B., Bazotte, R.B., 2004. Absence of antidiabetic and hypolipidemic effect of *Gymnema sylvestre* in non-diabetic and alloxan-diabetic rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47, 545-551.

Garcia, E.S., 1995. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. *Cadernos de Saúde Pública* 11, 495-500.

Garvey, M.I., Piddock, L.J., 2008. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 1677-1685.

Georg, A.E., Duncan, B.B., Toscano, C.M., Schmidt, M.I., Mengue, S., Duarte, C., Polanczyk, C.A., 2005. Economic analysis of a screening program for diabetes mellitus in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 39, 452-460.

Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 107, 1058-1070.

Giske, C.G., Monnet, D.L., Cars, O., Carmeli, Y., 2008. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 813-821.

Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V., 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 81-100.

Guarize, L., Costa, J.C., Dutra, L.B., Mendes, R.F., Lima, I.V., Scio, E., 2012. Anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of *Senna macranthera* leaves. *Natural Product Research* 26, 331-343.

Gyllenhaal, C., Kadushin, M.R., Southavong, B., Sydara, K., Bouamanivong, S., Xaiveu, M., Xuan, L.T., Hiep, N.T., Hung, N.V., Loc, P.K., Dac, L.X., Bich, T.Q., Cuong, N.M., Ly, H.M., Zhang, H.J., Franzblau, S.G., Xie, H., Riley, M.C., Elkington, B.G., Nguyen, H.T., Waller, D.P., Ma, C.Y., Tamez, P., Tan, G.T., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., 2012. Ethnobotanical approach versus random approach in the search for new bioactive compounds: Support of a hypothesis. *Pharmaceutical Biology* 50, 30-41.

Hamdy, O., Zwiefelhofer, D., 2010. Weight management using a meal replacement strategy in type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports* 10, 159-164.

Hanberger, H., Walther, S., Leone, M., Barie, P.S., Rello, J., Lipman, J., Marshall, J.C., Anzueto, A., Sakr, Y., Pickkers, P., Felleiter, P., Engoren, M., Vincent, J.L., 2011. Increased mortality associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the intensive care unit: results from the EPIC II study. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 331-335.

Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Shukor, M.Y., Oskoueian, E., 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 3422-3431.



Honorio-Franca, A.C., Marins, C.M., Boldrini, F., Franca, E.L., 2008. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). *Acta Cirúrgica Brasileira* 23, 504-510.

Hur, J., Sullivan, K.A., Schuyler, A.D., Hong, Y., Pande, M., States, D.J., Jagadish, H.V., Feldman, E.L., 2010. Literature-based discovery of diabetes- and ROS-related targets. *BMC Medical Genomics* 3, 49.

Ibrahim, M.A., Aliyu, A.B., Sallau, A.B., Bashir, M., Yunusa, I., Umar, T.S., 2010. *Senna occidentalis* leaf extract possesses antitrypanosomal activity and ameliorates the trypanosome-induced anemia and organ damage. *Pharmacognosy Research* 2, 175-180.

IDF, 2011. World diabetes atlas, Diabetes estimates. International Diabetes Federation, Brussels.

Idu, M., Omonigho, S.E., Igeleke, C.L., 2007. Preliminary investigation on the phytochemistry and antimicrobial activity of *Senna alata* L. flower. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 806-809.

Ishida, K., de Mello, J.C., Cortez, D.A., Filho, B.P., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 942-949.

Ishida, K., Rozental, S., de Mello, J.C., Nakamura, C.V., 2009. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8, 29.

Jakus, V., 2000. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratislava Medical Journal* 101, 541-551.

Jin, J., Zhang, J., Guo, N., Feng, H., Li, L., Liang, J., Sun, K., Wu, X., Wang, X., Liu, M., Deng, X., Yu, L., 2011. The plant alkaloid piperine as a potential inhibitor of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Medical Microbiology* 60, 223-229.

Joosten, M.M., Grobbee, D.E., van der, A.D., Verschuren, W.M., Hendriks, H.F., Beulens, J.W., 2010. Combined effect of alcohol consumption and lifestyle behaviors on risk of type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition* 91, 1777-1783.

Kaneto, H., Xu, G., Fujii, N., Kim, S., Bonner-Weir, S., Weir, G.C., 2002. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 277, 30010-30018.

Kaneto, H., Xu, G., Song, K.H., Suzuma, K., Bonner-Weir, S., Sharma, A., Weir, G.C., 2001. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31099-31104.

Kennedy, D.O., Wightman, E.L., 2011. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition* 2, 32-50.

Khan, I.A., Mirza, Z.M., Kumar, A., Verma, V., Qazi, G.N., 2006. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 810-812.

Kim, J.W., Yoon, K.H., 2011. Glucolipotoxicity in Pancreatic beta-Cells. *Journal of Diabetes & Metabolism* 35, 444-450.

Kowall, B., Rathmann, W., Strassburger, K., Heier, M., Holle, R., Thorand, B., Giani, G., Peters, A., Meisinger, C., 2010. Association of passive and active smoking with incident type 2 diabetes mellitus in the elderly population: the KORA S4/F4 cohort study. *European Journal of Epidemiology* 25, 393-402.

Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M., 1992. Antibacterial activity of totarol and its potentiation. *Journal of Natural Products* 55, 1436-1440.

Lai, C.C., Tan, C.K., Huang, Y.T., Shao, P.L., Hsueh, P.R., 2008. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy* 14, 77-85.

Leite, A.C., Araujo, T.G., de Melo Carvalho, B., Maia, M.B., de Menezes Lima, V.L., 2011. Characterization of the Antidiabetic Role of *Parkinsonia aculeata* (Caesalpinaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011.

Lopes, J.P., Oliveira, S.M., Soares Fortunato, J., 2008. Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications. *Acta Médica Portuguesa* 21, 293-302.

Loverde-Oliveira, S.M., Freitas, M.N., Araújo, P.K.B., Costa, I.B.C., 2010. Fragmento de Cerrado urbano da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Mato Grosso. *Revista Biodiversidade* 9, 74-90.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr., V.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A., 2002. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25, 429-438.

Marazzi, B., Fortunato, R.H., Endress, P.K., Spichiger, R., 2006. *Senna* (Cassiinae, Leguminosae) in Paraguay: synopsis, occurrence, ecological role and ethnobotany. *Candollea* 61, 315-329.

Maroni, B.C., Di Stasi, L.C., Machado, S.R., 2006. Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado., 1 ed. UNESP, São Paulo.

Marques, M.B., 2000. Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil. *História, Ciências e Saúde* 7, 7-21.

Martinez, J.L., 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* 3, 1.

Masoko, P., Gololo, S.S., Mokgotho, M.P., Eloff, J.N., Howard, R.I., Mampuru, L.J., 2010. Evaluation of the antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of the acetone extract of the roots of *Senna italica* (Fabaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 7, 138-148.

Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., Mohamed, J., 2012. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 12, 5-18.

McNeil, S.A., Clark, N.M., Chandrasekar, P.H., Kauffman, C.A., 2000. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid after failure of treatment with synergid (quinupristin/dalfopristin). *Clinical Infectious Diseases* 30, 403-404.

Mehta, N., Laddha, K.S., 2009. A modified method for isolation of rhein from *Senna*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71, 128-129.

Mendes, N.M., Pereira, J.P., de Souza, C.P., de Oliveira Mde, L., 1984. Preliminary assay in the laboratory to verify the molluscicidal effect of various species of Brazilian flora. *Revista de Saúde Pública* 18, 348-354.

Miceli, M.H., Diaz, J.A., Lee, S.A., 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infectious Diseases* 11, 142-151.

Miceli, M.H., Lee, S.A., 2011. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. *Mycoses* 54, 666-678.

Micozzi, M.S., 2003. Alternative or complementary medicine: opportunities for integration. *Skinmed* 2, 154-155.

Morrissey, J.P., Osbourn, A.E., 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 708-724.

Na Phatthalung, P., Chusri, S., Voravuthikunchai, S.P., 2012. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii* infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12, 56.

Nahas, R., Moher, M., 2009. Complementary and alternative medicine for the treatment of type 2 diabetes. *Canadian Family Physician* 55, 591-596.

Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Cassanye, A., Serrano, J., Gonzalo, H., Boada, J., Prat, J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., 2012. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Experimental Diabetes Research* 2012, 696215.

Naves, R.P., Stockman, R., Apgaua, D.M.G., Rodrigues, V.E.G., 2009. Experiências Com Plantas Medicinais Nativas e Exóticas dos Moradores do Entorno de Um Parque Florestal em Varginha, Minas Gerais. UFLA, Lavras.

Negri, G., 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 41, 121-142.

Nikaido, H., 2009. Multidrug resistance in bacteria. Annual Review of Biochemistry 78, 119-146.

Oliveira, A.F., Valente, J.G., Leite Ida, C., Schramm, J.M., Azevedo, A.S., Gadelha, A.M., 2009. Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil. Cadernos de Saúde Pública 25, 1234-1244.

Oliveira, H.C., dos Santos, M.P., Grigulo, R., Lima, L.L., Martins, D.T., Lima, J.C., Stoppiglia, L.F., Lopes, C.F., Kawashita, N.H., 2008. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. Journal of Ethnopharmacology 115, 515-519.

Oliveira Silva, F., Oliveira, I.R., Vasconcelos Silva, M.G., Braz-Filho, R., 2010. Chemical compounds of leaves from *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. Química Nova 33, 1874-1876.

Pallett, A., Hand, K., 2010. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65 Suppl 3, 25-33.

Pan, S.Y., Pan, S., Yu, Z.L., Ma, D.L., Chen, S.B., Fong, W.F., Han, Y.F., Ko, K.M., 2010. New perspectives on innovative drug discovery: an overview. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 13, 450-471.

Pandikumar, P., Babu, N.P., Ignacimuthu, S., 2009. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 124, 111-115.

Perez Gutierrez, R.M., Ramirez, E., Vargas, R., 2001. Effect of *Cirsium pascuarensense* on blood glucose levels of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice. Phytotherapy Research 15, 552-554.

Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S.A., Zuppi, C., Ghirlanda, G., 2010. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. Review of Diabetic Studies 7, 15-25.

Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P., Harmon, J.S., 2006. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. Journal of Nutrition 136, 873-876.

Poljsak, B., 2011. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2011, 194586.

Pratheeshkumar, P., Kuttan, G., 2011. Effect of vernolide-A, a sesquiterpene lactone from *Vernonia cinerea* L., on cell-mediated immune response in B16F-10 metastatic melanoma-bearing mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 33, 533-538.

Qi, L.W., Liu, E.H., Chu, C., Peng, Y.B., Cai, H.X., Li, P., 2010. Anti-diabetic agents from natural products--an update from 2004 to 2009. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10, 434-457.

Rathe, M., Kristensen, L., Ellermann-Eriksen, S., Thomsen, M.K., Schumacher, H., 2010. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 118, 66-73.

Rattmann, Y.D., Mendez-Sanchez, S.C., Furian, A.F., Paludo, K.S., de Souza, L.M., Dartora, N., Oliveira, M.S., Costa, E.M., Miguel, O.G., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Mello, C.F., Franco, C.R., da Silva-Santos, J.E., Cadena, S.M., Marques, M.C., Santos, A.R., 2011. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 999-1007.

Reis, J.S., Veloso, C.A., Mattos, R.T., Purish, S., Nogueira-Machado, J.A., 2008. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 52, 1096-1105.

Rezende, H.A., Cocco, M.I.M., 2002. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* 36, 282-288.

Richardson, M., Lass-Flörl, C., 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection* 14 Suppl 4, 5-24.

Robertson, R.P., 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 42351-42354.

Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y., Takahashi, H., 2003. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52, 581-587.

Rodrigues, G., Marcolin, E., Bona, S., Porawski, M., Lehmann, M., Marroni, N.P., 2010. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetic rats. *Arquivos de Gastroenterologia* 47, 301-305.

Rodrigues, I.M.C., Souza Filho, A.P.S., Ferreira, F.A., 2009. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha* 27, 507-513.

Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A., 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 21, 102-113.

Roy, P., Amdekar, S., Kumar, A., Singh, V., 2011. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. BMC Complementary and Alternative Medicine 11, 69.

Saiki, P.T.O., Silva, B., Lomônaco, C., 2008. Expressão de caracteres reprodutivos e vegetativos de *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) em dois ambientes distintos de cerrado. Revista Brasileira de Botânica 31, 363-369.

Shu, X.S., Lv, J.H., Tao, J., Li, G.M., Li, H.D., Ma, N., 2009. Antihyperglycemic effects of total flavonoids from *Polygonatum odoratum* in STZ and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 124, 539-543.

Silva, D.H.S., Viegas Junior, C., Santos, L.A., Castro-Gamboa, I., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Castro, N.G., Pivatto, M., Young, M.C.M., Rocha, M.S., Fraga, C.A.M., Barreiro, E.J., 2010. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. Revista Virtual de Química 2, 38-46.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., 2002. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. Revista Brasileira de Farmacognosia 12, 35-40.

Singh, M., Khatoon, S., Singh, S., Kumar, V., Rawat, A.K., Mehrotra, S., 2010. Antimicrobial screening of ethnobotanically important stem bark of medicinal plants. Pharmacognosy Research 2, 254-257.

Slama, T.G., 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Critical Care 12 Suppl 4, S4.

Souza, A., Vendramini, R.C., Brunetti, I.L., Regasini, L.O., Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., Pepato, M.T., 2009. Tratamento crônico com extrato alcoólico de *Pterogyne nitens* não melhora parâmetros clássicos do diabetes experimental. Revista Brasileira de Farmacognosia 19, 412-417.

Souza, V.C., Bortoluzzi, R.L.C., 2010. *Senna* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Srivastava, A., Tripathi, A.K., Pandey, R., Verma, R.K., Gupta, M.M., 2006. Quantitative determination of reserpine, ajmaline, and ajmalicine in *Rauwolfia serpentina* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatographic Science 44, 557-560.

Sun, J., Liu, S.F., Zhang, C.S., Yu, L.N., Bi, J., Zhu, F., Yang, Q.L., 2012. Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Broussonetia papyrifera* Fruits. PLoS One 7, e32021.

Tanaka, M.M., Kendal, J.R., Laland, K.N., 2009. From traditional medicine to witchcraft: why medical treatments are not always efficacious. PLoS One 4, e5192.

Torrice, F., Cepeda, M., Guerrero, G., Melendez, F., Blanco, Z., Canelón, D.J., Diaz, B., Compagnone, R.S., Suárez, A.I., 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 166-169.

Toscano, C.M., Duncan, B.B., Mengue, S.S., Polanczyk, C.A., Nucci, L.B., Costa e Forti, A., Fonseca, C.D., Schmidt, M.I., 2008. Initial impact and cost of a nationwide population screening campaign for diabetes in Brazil: a follow up study. *BMC Health Services Research* 8, 189.

Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552, 335-344.

Vasconcelos, C.F., Maranhao, H.M., Batista, T.M., Carneiro, E.M., Ferreira, F., Costa, J., Soares, L.A., Sa, M.D., Souza, T.P., Wanderley, A.G., 2011. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in *Wistar* rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1533-1541.

Viana, G.S., Medeiros, A.C., Lacerda, A.M., Leal, L.K., Vale, T.G., Matos, F.J., 2004. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology* 4, 9.

Viegas Junior, C., Rezende, A., Silva, D.H.S., Castro-Gambôa, I., Bolzani, V.S., 2006. Ethnopharmacological, Biological and Chemical aspects of the *Cassia* Genus. *Química Nova* 29, 1279-1286.

Vila Verde, G.M., Paula, J.R., Caneiro, D.M., 2003. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 64-66.

Vuksan, V., Sievenpiper, J.L., 2005. Herbal remedies in the management of diabetes: lessons learned from the study of ginseng. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 15, 149-160.

Walker, K.Z., O'Dea, K., Gomez, M., Girgis, S., Colagiuri, R., 2010. Diet and exercise in the prevention of diabetes. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 23, 344-352.

WHO, 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. World Health Organization Geneva.

WHO, 2002. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization Geneva.

WHO, 2011a. Fact Sheet N° 312, p. 2.

WHO, 2011b. The World Medicines Situation 2011 - Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. World Health Organization Geneva.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.

Wink, M., 2008. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism* 9, 996-1009.

Witters, L.A., 2001. The blooming of the French lilac. *Journal of Clinical Investigation* 108, 1105-1107.

Wu, T., Yang, M., Wei, H.F., He, S.H., Wang, S.C., Ji, G., 2012. Application of Metabolomics in Traditional Chinese Medicine Differentiation of Deficiency and Excess Syndromes in Patients with Diabetes Mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 968083.

Yunes, R.A., Pedrosa, R.C., Cechinel Filho, V., 2001. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova* 24, 147-152.

Zanatta, L., de Sousa, E., Cazarolli, L.H., Junior, A.C., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Silva, F.R., 2007. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 151-155.

Zhang, Z., Liew, C.W., Handy, D.E., Zhang, Y., Leopold, J.A., Hu, J., Guo, L., Kulkarni, R.N., Loscalzo, J., Stanton, R.C., 2010. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *FASEB Journal* 24, 1497-1505.

Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

Zinner, S.H., 2005. The search for new antimicrobials: why we need new options. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 3, 907-913.



## 5. ANEXOS

### 5.1 Artigo científico

O artigo científico descrito neste item será submetido à revista *Journal of Ethnopharmacology* e as normas para submissão neste periódico encontram-se disponíveis no endereço eletrônico: [http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/506035/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506035/authorinstructions).

Escopo da revista: A revista de etnofarmacologia publica artigos originais de descrição e investigação experimental dos ativos biológicos de substâncias vegetais e animais utilizados na medicina tradicional das culturas passadas e presentes. Na revista serão publicados artigos interdisciplinares com uma abordagem etnofarmacológica, etnobotânica ou etnoquímica no estudo de plantas medicinais. Relatórios de estudos de campo antropológicos e etnobotânicos estão dentro do escopo da revista. Estudos envolvendo mecanismos de ação farmacológicos e toxicológicos terão prioridade. Estudos clínicos sobre a eficácia serão aceitos se contribuírem para a compreensão de problemas etnofarmacológicos específicos. A revista aceita artigos de revisão nas áreas acima mencionadas especialmente aqueles que destacam a natureza multidisciplinar da etnofarmacologia. Artigos de opinião são aceitos apenas por convite.

Fator de impacto: 3,014 Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

Qualis-Capes: Estrato B1 (área de avaliação Medicina II)

**Título: Atividade antioxidante, antidiabética e antimicrobiana de *Senna rugosa* (G. DON) H.S. Irwin & Barneby (1982) e *Senna velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (1982)**

Glaucia Neves Eberhardt<sup>a</sup>, Uilson Pereira dos Santos<sup>a</sup>, Gisele Langwinski Colombelli<sup>b</sup>, Luis Fernando Benites<sup>a</sup>, Zefa Valdivina Pereira<sup>b</sup>, Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo<sup>c</sup>, Kely de Picoli Souza<sup>ab</sup>, Edson Lucas dos Santos<sup>ab,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências da Saúde - FCS, Universidade Federal da Grande Dourados, CEP 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA, Universidade Federal da Grande Dourados, CEP 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>c</sup> Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário da Grande Dourados, Jardim Universitário, CEP 79824-900, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

\* Autor correspondente. Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itaum, km 12, Dourados, Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970, Brasil. Telefone: 55 67 3410-2210. Fax: 55 67 3410-2192. E-mail: [edsonsantos@ufgd.edu.br](mailto:edsonsantos@ufgd.edu.br) (E. Santos).

## Resumo

**Relevância etnofarmacológica:** *S. rugosa* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby (1982) e *S. velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (1982) são plantas brasileiras importantes na medicina popular utilizadas no tratamento de infecções, inflamações e doenças ligadas ao estresse oxidativo, como diabetes e dislipidemias.

**Objetivos:** (A) Quantificar o teor de fenóis e flavonóides totais, (B) determinar as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *S. rugosa* e *S. velutina* obtidos com diferentes solventes e métodos de extração e, (C) investigar os potenciais hipoglicemiantes, antihiperlipidêmicos e alterações nos parâmetros metabólicos promovidos pela administração do extrato etanólico das folhas de *S. rugosa* (SRF).

**Material e métodos:** Extratos das folhas e raízes de *S. rugosa* e *S. velutina* foram preparados por maceração ou decocção em água ou etanol. Ensaios *in vitro*: os teores de fenóis e flavonóides totais foram determinados espectrofotometricamente por método Folin – Ciocalteu e método do cloreto de alumínio, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada por ensaio de sequestro do radical 2,2 – diphenil – 1 – picrylhydrazil (DPPH<sup>•</sup>) e ensaio de inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos. Os extratos aquosos e etanólicos foram testados contra três espécies de microrganismos de relevância clínica em

infecções: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*; utilizando ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício e método de microdiluição em caldo. Ensaio *in vivo*: testes de tolerância à glicose (TTG) foram realizados em ratos normoglicêmicos com doses orais únicas de 200 e 400 mg/kg de SRF para determinação da dose experimental. A atividade antihiperlipidêmica foi avaliada por TTG em ratos diabéticos induzidos por aloxano (120 mg/kg, ip.) tratados com SRF na concentração de 200 mg/kg. A atividade hipoglicemiante, massa corporal, ingestão alimentar e hídrica foram investigados durante 28 dias e a massa do fígado, dos tecidos musculares e adiposos foram analisados após 28 dias em ratos normoglicêmicos, tratados com SRF (200 mg/kg).

**Resultados:** Ensaio *in vitro*: O teor de fenóis e flavonóides totais diferiram entre os extratos de *S. rugosa* e *S. velutina*. O maior teor de fenóis,  $556,0 \pm 9,9$  mg de ácido gálico / 100 g de extrato seco, foi determinado no extrato etanólico das raízes de *Senna velutina* (SVRH) e o maior teor de flavonóides,  $86,8 \pm 10,7$  mg de quercetina / 100 g de extrato seco, no extrato aquoso por decocção das raízes de *Senna rugosa* (SRRD). Todos os extratos demonstraram atividade antioxidante de forma dose dependente. Os extratos etanólicos das raízes e folhas de *S. velutina* e etanólico das folhas de *S. rugosa* apresentaram maior atividade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> ( $IC_{50} = 6,9 \pm 0,6$  µg/mL,  $IC_{50} = 7,9 \pm 0,9$  µg/mL e  $IC_{50} = 10,5 \pm 2,6$  µg/mL, respectivamente) em comparação ao antioxidante padrão ácido ascórbico ( $IC_{50} = 2,5 \pm 0,2$  µg/mL). SRF protegeu eritrócitos humanos contra o dano oxidativo induzido por AAPH (dicloridrato de 2,2'- azobis (2-aminopropano) em até 31 % (50 µg/mL em 120 minutos) comparado ao controle. *Staphylococcus aureus* foi sensível a todos os extratos, resultando em halos de inibição variando entre  $13,0 \pm 1,0$  a  $31,3 \pm 1,3$  mm e a concentração inibitória mínima (CIM) entre < 0,7 a 50 mg/mL. Nenhum extrato apresentou atividade contra *Escherichia coli* e apenas os extratos etanólicos das raízes de *S. rugosa* e *S. velutina* demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Ensaio *in vivo*: nenhuma diferença foi observada na glicemia dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com SRF em comparação ao controle nos ensaios de TTG. A administração de SRF (200 mg/kg) durante 28 dias não promoveu efeitos hipoglicemiantes e alterações nos parâmetros de massa corporal, ingestão alimentar e hídrica, massa do fígado, dos tecidos musculares e adiposos nos ratos normoglicêmicos.

**Conclusão:** Este estudo demonstra pela primeira vez a quantificação de fenóis e flavonóides totais, além de potenciais atividades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos de *S. rugosa* e *S. velutina*. Os extratos das folhas e raízes inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* enquanto somente os extratos etanólicos das raízes foram ativos contra *Candida albicans*. Nossos resultados não confirmam o uso tradicional de SRF como antidiabético, considerando o desenho experimental utilizado. No entanto, reforçam a hipótese de utilização deste extrato na profilaxia de complicações resultantes do estresse oxidativo no diabetes mellitus. Em conjunto, esses resultados reforçam o uso popular destas plantas no tratamento de processos infecciosos e doenças associadas ao estresse oxidativo.

## 1.Introdução

A oxidação é um processo fundamental da vida aeróbia em que são produzidos, naturalmente ou por algumas disfunções biológicas, os radicais livres (Barreiros et al., 2006). A alta reatividade e a elevada instabilidade química dos radicais livres torna-os capazes de causar danos irreversíveis aos componentes celulares como proteínas, lipídeos, lipoproteínas e DNA que resultam em morte celular com consequente dano tecidual, culminando no desenvolvimento de diversas patologias, entre elas, o diabetes mellitus (Bahramikia and Yazdanparast, 2010). Há um interesse crescente em compostos de plantas medicinais com atividade antioxidante, tais como flavonóides, taninos e outras substâncias fenólicas. Seus benefícios à saúde estão associados à prevenção de danos por espécies reativas de oxigênio, como também pela proteção que oferecem à oxidação dos lipídeos dos alimentos (Bahramikia and Yazdanparast, 2010; Rattmann et al., 2011).

Em paralelo, pesquisas com substâncias extraídas das plantas medicinais também demonstraram sua importância contra doenças infecciosas (Hendra et al., 2011; Na Phatthalung et al., 2012). A ocorrência de certos grupos de metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides, taninos e terpenos tem sido frequentemente associada às propriedades antimicrobianas e são considerados compostos potenciais na inibição do crescimento de linhagens resistentes aos antibióticos comumente utilizados (Cowan, 1999; Duraipandiyar et al., 2006).

A abordagem etnofarmacológica na busca de substâncias naturais com propriedades medicinais é alvo constante de estudos bioprospectivos que tem como objetivo principal validar o conhecimento empírico de muitas comunidades. Com uma extensa e diversificada flora, o Brasil é visto como um país privilegiado por deter cerca de 10 % da flora mundial. Embora altamente promissoras as plantas medicinais brasileiras possuem pouca ou nenhuma comprovação científica de suas propriedades farmacológicas. Além disso, o risco imposto pela crescente devastação dos biomas brasileiros promove ano a ano a extinção de milhares de espécies vegetais ainda não estudadas (Simões and Schenkel, 2002).

Neste estudo serão investigadas duas espécies do gênero *Senna*, *rugosa* e *velutina*. *Senna rugosa* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby e *Senna velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby são espécies brasileiras que pertencem à família Fabaceae (Leguminosae) e

subfamília Caesalpinioideae. *Senna rugosa* é conhecida como amarelinho, acacu, raiz-preta ou unha-de-boi. Apresenta-se como um arbusto de grande porte, com folhas dispostas de forma alternada, flores vistosas e de um amarelo ouro intenso que surgem entre os meses de abril e junho (Maroni et al., 2006). Popularmente o chá por decocção ou infusão, ou mesmo a maceração das raízes ou folhas de *Senna rugosa* é utilizado como antidiabético, antídoto em casos de mordeduras de cobras, antihelmíntico e para o tratamento de gripes, resfriados e rouquidão (Naves et al., 2009; Rodrigues and Carvalho, 2001; Vila Verde et al., 2003).

*Senna velutina* é popularmente conhecida como são João, fedegão e vermelhinho (Loverde-Oliveira et al., 2010). Trata-se de uma planta de porte arbustivo de inflorescências terminais com flores pentâmeras e hermafroditas. Suas pétalas possuem coloração amarela e os frutos são do tipo deiscente (Saiki et al., 2008). No Brasil a maceração das raízes ou folhas de *Senna velutina* é utilizada no tratamento de hipercolesterolemias, problemas hepáticos, infecciosos e a decocção de suas cascas é utilizada externamente no tratamento dermatites (Agra et al., 2007).

Neste estudo nossos objetivos foram: 1) avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos das espécies *Senna rugosa* e *Senna velutina* preparados com diferentes solventes e métodos de extração, e 2) estudar o potencial antihiper-glicêmico, hipoglicemiante e alterações nos parâmetros metabólicos promovidos pela administração do extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF).

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Reagentes

Foram utilizados neste estudo aloxano monohidratado, dicloridrato de 2,2'- azobis (2- aminopropano) (AAPH) e 2,2- diphenil-1- picrylhydrazil (DPPH<sup>\*</sup>) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo, SP); ácido ascórbico (Proquímios<sup>®</sup>); butil hidroxil tolueno (BHT) (Via farma<sup>®</sup>); glicose (Vetec<sup>®</sup>); etanol PA (Dinâmica Química<sup>®</sup>); metformina (Pharma Nostra<sup>®</sup>); ágar Mueller Hinton e caldo Mueller Hinton (Merck Brasil<sup>®</sup>).

## 2.2 Material vegetal

Folhas e raízes de *Senna rugosa* e *Senna velutina* foram coletadas em março de 2010 no município de Dourados/MS. O material botânico foi identificado pela botânica profa. Dra Zefa Valdivina Pereira, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). As exsiccatas encontram-se depositadas no herbário da UFGD: *Senna rugosa* (n° 4664), *Senna velutina* (n° 4665).

### 2.2.1 Preparação dos extratos

As folhas e raízes de *Senna rugosa* e *Senna velutina* foram secas separadamente à temperatura ambiente em local arejado, longe de exposição direta ao sol, durante 5 - 10 dias e, em seguida, triturados em partes menores em moinho de facas. Os extratos foram preparados seguindo as metodologias descritas pela população usuária a partir de abordagem etnofarmacológica e por método padrão de extração estabelecido por Adetutu et al. (2011) para comparação dos resultados, como detalhado na tabela 1. Cada extrato foi filtrado em gaze e algodão. Os extratos etanólicos foram concentrados sob pressão reduzida em rotoevaporador até se obter consistência firme e, em seguida, congelados em freezer a - 20 °C. Os extratos aquosos foram diretamente congelados após a filtração. Todos os extratos foram liofilizados para eliminação do solvente residual. O rendimento (em porcentagem) dos extratos foi calculado pela expressão:  $R (\%) = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal seco}) \times 100$

Tabela 1. Parte vegetal utilizada, método de extração, solvente de extração, proporção material vegetal: solvente e rendimento (R) de cada espécie vegetal estudada.

Espécie vegetal	Extrato	Parte vegetal utilizada	Método de extração	Solvente de extração	Proporção material vegetal: solvente	R
<i>Senna rugosa</i>	SRF <sup>1</sup>	Folhas	Maceração (7 dias)	Etanol 95%	1:7	16,61%
<i>Senna rugosa</i>	SRRD <sup>2</sup>	Raízes	Decocção à 80°C (15 minutos)	Água destilada	1:4	14,70%
<i>Senna rugosa</i>	SRRM <sup>2</sup>	Raízes	Maceração (3 dias)	Água destilada	1:10	1,5%
<i>Senna rugosa</i>	SRRH <sup>1</sup>	Raízes	Maceração (7 dias)	Etanol 95%	1:8	1%
<i>Senna velutina</i>	SVF <sup>1</sup>	Folhas	Maceração (7 dias)	Etanol 95%	1:7	29,91%
<i>Senna velutina</i>	SVRM <sup>2</sup>	Raízes	Maceração (3 dias)	Água destilada	1:10	1,5%
<i>Senna velutina</i>	SVRH <sup>1</sup>	Raízes	Maceração (7 dias)	Etanol 95%	1:8	32,05%

**SRF:** extrato etanólico macerado das folhas de *Senna rugosa*, **SRRH:** extrato etanólico macerado das raízes de *Senna rugosa*, **SRRM:** extrato aquoso macerado das raízes de *Senna rugosa*, **SRRD:** extrato aquoso por decocção das raízes de *Senna rugosa*, **SVF:** extrato etanólico macerado das folhas de *Senna velutina*, **SVRH:** extrato etanólico macerado das raízes de *Senna velutina*, **SVRM:** extrato aquoso macerado das raízes de *Senna velutina*. <sup>1</sup> extrato preparado por metodologia descrita por Adetutu et al. (2011) e <sup>2</sup> extrato preparado por metodologia descrita pela população usuária.

### 2.3 Determinação de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado com reagente Folin – Ciocalteu de acordo com o método estabelecido por Meda et al. (2005) com algumas modificações. Ácido gálico foi utilizado como padrão. Alíquotas de 500 µL de cada extrato (100 µg/mL em etanol 80%), em duplicata, foram adicionadas à 2,5 mL do reagente Folin – Ciocalteu (previamente diluído com água destilada 1:10 v/v) e após 5 minutos, 2 mL da solução aquosa recém preparada de carbonato de sódio (14 %, p/v) foram adicionados. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada em temperatura ambiente por 2 horas. A leitura das absorbâncias de todas as amostras foi realizada em 760 nm usando um espectrofotômetro (T 70 UV/VIS spectrometer PG Instruments®). O teor de fenóis totais

foi expresso como equivalente de ácido gálico (GAE) em miligrama por 100 g de peso seco de extrato.

#### 2.4 Determinação de flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais foi determinado pelo método de Ahn et al. (2007), com algumas modificações. Quercetina foi utilizada como padrão. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de cada extrato (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em metanol 50%), em duplicata, foram adicionadas à 4,5 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio à 2 %. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (T 70 UV/VIS spectrometer PG Instruments<sup>®</sup>) no comprimento de onda de 415 nm, após 30 minutos de incubação das soluções, utilizando metanol 50 % como branco. Os resultados foram expressos como equivalente de quercetina (QE) em miligrama por 100 g de peso seco de extrato.

#### 2.5 Ensaios para quantificação da atividade antioxidante *in vitro*

##### 2.5.1 Atividade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>

DPPH<sup>•</sup> é um radical livre que aceita um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável. A solução de DPPH<sup>•</sup> apresenta coloração violeta com absorção máxima em 517 nm (Suganthi et al., 2010). Na presença de antioxidante DPPH<sup>•</sup> se reduz e, conseqüentemente a coloração e a absorção UV diminuem. Assim a atividade de sequestro do radical livre pelo extrato é proporcional à redução de DPPH<sup>•</sup> (Rattmann et al., 2011). O ensaio de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> foi realizado de acordo com o método descrito por Gupta e Gupta (2011) com pequenas modificações. Brevemente, soluções dos extratos, dos padrões ácido ascórbico e BHT (20 mg/mL em etanol 80 %) foram diluídos em etanol 80% nas concentrações finais de 0,1 – 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  das soluções foi misturada com 1800  $\mu\text{L}$  de DPPH<sup>•</sup> 0,1 mM em etanol 80 %. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de etanol 80%. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente no escuro, as absorvâncias foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro (T 70 UV/VIS spectrometer PG Instruments<sup>®</sup>). Foram realizados



três ensaios independentes em duplicata. A porcentagem de inibição foi calculada a partir do controle usando a seguinte equação:  $\text{Inibição (\%)} = (1 - \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$ .  $\text{Abs}_{\text{amostra}}$  é a absorbância da amostra e  $\text{Abs}_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle (ausência de antioxidante). A  $\text{IC}_{50}$ , concentração capaz de reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH<sup>\*</sup> foi calculada através de regressão linear, após a determinação da curva de atividade antioxidante.

### 2.5.2 Ensaio de inibição de hemólise oxidativa

Ensaio de inibição de hemólise oxidativa foi realizado conforme descrito por Santos et al. (2011). Sangue venoso humano de doador saudável e não fumante foi coletado em tubo com citrato de sódio após consentimento informado. O sangue total foi centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos para obter o concentrado de eritrócitos. Foram aspirados e descartados o plasma e a fina camada de leucócitos e plaquetas. Para lavar os eritrócitos, o volume foi preenchido com solução fisiológica 0,9 %, seguido de homogeneização e centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. Este procedimento foi realizado 3 vezes. Uma suspensão de eritrócitos à 2,5 % (concentração final) em solução fisiológica foi pré-incubada por 30 minutos à 37 °C com diferentes concentrações do extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (12,5 – 75 µg/mL concentrações finais, dissolvidas em etanol 80 %). Em seguida ao período de pré-incubação os tubos receberam ou não a solução indutora de hemólise com AAPH (concentração final de 50 mM em solução fisiológica 0,9 %). Todos os tubos foram incubados em banho Maria a 37 °C, durante 4 horas, com agitação suave e constante. Em todos os experimentos foram incluídos: controle negativo (eritrócitos em solução fisiológica 0,9 % apenas), controle dos extratos (eritrócitos em solução fisiológica 0,9 % com o extrato nas diferentes concentrações, sem a adição de solução indutora de hemólise AAPH) e controle do solvente (eritrócitos em solução fisiológica 0,9 % com solvente etanol 80%). Ácido ascórbico foi utilizado como droga padrão antioxidante.

Durante as 4 horas de incubação, a cada intervalo de 1 hora, uma alíquota de 200 µL da mistura reacional de cada tubo foi retirada e transferida para um novo tubo contendo solução fisiológica 0,9 % (1800 µL), com exceção do tubo de hemólise total cuja alíquota foi depositada em tubo contendo água destilada. Todos os tubos foram centrifugados a 3600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido para cubetas e a leitura das

absorbâncias procedeu-se em espectrofotômetro (T 70 UV/VIS spectrometer PG Instruments®) em 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada a partir da seguinte equação: Hemólise (%) = (A/B) x 100. Onde A= absorbância da alíquota com solução fisiológica 0,9 % e B = absorbância da alíquota água destilada (hemólise total). Foram realizados três ensaios independentes em duplicata.

## 2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

### 2.6.1 Microrganismos

Todas as linhagens foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). A atividade antimicrobiana dos extratos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* foi avaliada frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, à bactéria gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 8739 e ao fungo leveduriforme *Candida albicans* ATCC 10231. A identificação dos microrganismos foi confirmada pelo laboratório de micologia do Departamento de Microbiologia do Centro Universitário UNIGRAN, Dourados-MS, Brasil.

### 2.6.2 Ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício

O perfil antimicrobiano dos extratos vegetais foi investigado, inicialmente, por teste de difusão em meio sólido a partir de orifício como descrito por Mokale Kognou et al. (2011), com algumas modificações e observando as recomendações da norma M2-A8 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS/CLSI) (2005). Inóculos foram preparados em solução fisiológica 0,9 % e tiveram sua densidade ajustada conforme escala padrão de turbidez McFarland 0,5 ( $5 \times 10^5$  UFC/mL). As suspensões bacteriana e fúngica foram homogeneizadas e semeadas com swab estéril na superfície de placas de petri contendo o meio de cultura ágar Mueller Hinton (AMH). Poços com 6 mm de diâmetro foram confeccionados com cânula de material metálico esterilizado. Cada poço foi preenchido com 100 µL dos diferentes extratos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* na concentração de 200 mg/mL (maior concentração solúvel em etanol 80 %). As placas foram mantidas por 1 h em temperatura ambiente para difusão dos extratos. Em seguida as

placas foram incubadas em estufa mantida a 37 °C por 24 e 48 h. O antibiótico tetraciclina e o antifúngico cetoconazol foram utilizados como controles positivos (4 mg/mL); já a solução etanólica 80 % foi usada como controle negativo. Os resultados foram avaliados pela medida dos halos de inibição (mm) ao redor de cada poço após 24 e 48 h de incubação e classificados de acordo com Mokale Kognou et al. (2011) que estabelecem que extratos são considerados ativos quando o diâmetro de inibição (ID) é superior a 20 mm (o microrganismo é classificado como sensível); moderadamente ativo quando o ID está entre 10 e 20 mm (o microrganismo é classificado como moderado); e ainda pouco ou não ativo quando o ID está entre 0 e 10 mm (o microrganismo é classificado como pouco sensível ou resistente).

### 2.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Os extratos vegetais que apresentaram atividade antimicrobiana para as linhagens testadas com diâmetros de halo de inibição maiores que 10 mm foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida/fungicida mínima de acordo com Bussmann et al. (2010), com algumas modificações e observando as recomendações da norma M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI)* (2003). O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Cada poço da microplaca foi preenchido com 100 µL de caldo Mueller Hinton estéril. Soluções de partida em etanol 80 % foram preparadas para os extratos (200 mg/mL) e controles positivos (4 mg/mL), tetraciclina para bactérias ou cetoconazol para o fungo. Os poços iniciais da microplaca receberam uma alíquota de 100 µL dos extratos ou controles. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada que resultou nas concentrações de 100 a 0,78 mg/mL. Ao final 100 µL do inóculo microbiano na concentração  $5 \times 10^5$  UFC/mL (escala de McFarland 0,5) foram adicionados em todos os poços, exceto aos de controle de esterilidade do meio. Em cada microplaca poços foram utilizados para verificar a interferência do controle negativo (etanol 80 %) e o controle de crescimento bacteriano. As microplacas foram cobertas com parafilme e incubadas em estufa a 37 °C durante 24 h. Decorrido este intervalo de tempo a turbidez resultante foi avaliada em leitor de

microplacas (TP Reader NM, Thermo Plate<sup>®</sup>) em 620 nm. A CIM<sub>100%</sub> foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Para determinar a CBM ou CFM, uma alíquota de 20 µL foi retirada dos poços da concentração determinada como CIM e ao menos duas concentrações superiores a ela, e transferida para placas de Petri com meio ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. CBM ou CFM foi definida como a menor concentração que produziu subcultura negativa.

## 2.7 Ensaios *in vivo*

### 2.7.1 Animais

Trinta e oito ratos *Wistar*, saudáveis e adultos (8 meses de vida), pesando entre 325 g e 400 g, foram utilizados no experimento. Os ratos foram obtidos do biotério da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O estudo foi realizado de acordo com a lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, criada pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 2008). Os experimentos também foram autorizados pelo comitê de ética no uso animal da Universidade Federal de Brasília – UnB (protocolo nº 47924/2010). Todos os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (4 ratos em cada caixa), sob condições laboratoriais padrões de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), umidade relativa (55 - 65 %) e ciclo de luminosidade (12 / 12 horas claro/escuro); foi permitido livre acesso à comida (ração comercial padrão Labina, Purina<sup>®</sup>) e água.

### 2.7.2 Indução experimental do diabetes

Ratos submetidos ao jejum noturno (8 h) foram induzidos ao diabetes por uma única injeção intraperitoneal de 120 mg/kg de massa corporal de aloxano monoidratado, imediatamente dissolvido antes do uso em solução salina estéril. Após 7 dias de indução, os níveis de glicose plasmática de jejum foram determinados por glicosímetro (Accu-Check Active, Roche<sup>®</sup>). Foram considerados diabéticos os ratos que apresentaram concentrações de glicose no sangue superior a 250 mg/dl (Ong et al., 2011).

### 2.7.3 Determinação de dose experimental do extrato etanólico de *Senna rugosa* (SRF)

Para determinar a dose de extrato (200 mg/kg ou 400 mg/kg) a ser utilizada no estudo crônico foi realizado inicialmente um teste oral de tolerância à glicose em ratos normoglicêmicos (Aragão et al., 2010). Os ratos foram randomicamente divididos em 3 grupos (n=5): Grupo 1, ratos normoglicêmicos tratados com veículo (solução de Tween 20% em água destilada); Grupo 2, ratos normoglicêmicos tratados com extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* 200 mg/kg e Grupo 3, ratos normoglicêmicos tratados com extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* 400 mg/kg. Amostras de sangue da veia caudal dos ratos submetidos ao jejum noturno (8 h) foram coletadas para quantificação da glicemia basal utilizando glicosímetro (Accu-Check Active, Roche®). Em seguida foi administrado oralmente 2 g/kg de glicose em todos os ratos. Após trinta minutos os ratos receberam os tratamentos dos extratos e veículo. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos após sobrecarga de glicose para quantificação da glicemia.

### 2.7.4 Avaliação da atividade antihiper-glicêmica por teste oral de tolerância a glicose (TTG) em ratos diabéticos

A dose do extrato que obteve melhor efeito na regularização da glicemia no teste com os ratos normoglicêmicos foi selecionada para avaliar a atividade antihiper-glicêmica em ratos diabéticos por meio de um novo teste oral de tolerância à glicose. Para isso, quatorze ratos diabéticos foram randomicamente divididos em 3 grupos: Grupo 1 (n=5), ratos diabéticos tratados com veículo (solução de Tween 20%); Grupo 2 (n=4), ratos diabéticos tratados com metformina 120 mg/kg e Grupo 3 (n=5), ratos diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (200 mg/kg). Amostras de sangue da veia caudal dos ratos submetidos ao jejum noturno (8 h) foram coletadas para quantificação da glicemia basal utilizando glicosímetro (Accu-Check Active, Roche®). Em seguida foi administrado oralmente 2 g/kg de glicose em todos os ratos. Após trinta minutos os ratos receberam os tratamentos dos extratos e veículo. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos após sobrecarga de glicose para quantificação da glicemia.

### 2.7.5 Estudo crônico (28 dias)

Para investigação da ação hipoglicemiante, duas semanas após o estudo para determinar a dose de SRF a ser utilizada no tratamento crônico, os ratos normoglicêmicos foram reagrupados randomicamente em três grupos experimentais. O primeiro grupo (n=8) recebeu solução de Tween 20 %, o segundo grupo (n=7) recebeu a droga antidiabética de referência metformina (500 mg/kg) como controle positivo e o terceiro grupo (n=8) recebeu extrato etanólico de *Senna rugosa* (200 mg/kg). Todos os tratamentos foram realizados oralmente, por gavagem, uma vez ao dia, durante 28 dias. A massa corporal, o consumo hídrico e alimentar foram monitorados diariamente. As concentrações de glicose sanguínea dos ratos foram mensuradas no início do estudo e as medidas foram repetidas no 14º, 21º e 28º dias. Ao final do estudo amostras de fígado, músculo soleus e extensor digital longo, depósito de tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico, subcutâneo e epididimal foram retirados, pesados e estocados em freezer a – 80 °C para uso posterior.

### 2.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Teste *t Student* (programa *GraphPad Prism* versão 3.0) foi utilizado para análise dos resultados nos ensaios *in vitro*: determinação de fenóis e flavonóides totais, atividade de sequestro do radical DPPH\*, ensaio de inibição de hemólise oxidativa e avaliação da atividade antimicrobiana, e *in vivo*: avaliação dos parâmetros metabólicos no estudo crônico em ratos. Análise de variância (ANOVA) não paramétrico seguido de pós teste Newman – Kews (programa *GraphPad Prism* versão 3.0) foi utilizado na comparação das áreas sobre a curva dos testes de tolerância à glicose. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados e discussão

O uso de plantas medicinais na medicina popular vem se tornando atrativo por sua eficácia, baixa incidência de efeitos colaterais e custo reduzido (Leite et al., 2011). Muito

do que se conhece hoje sobre a cura de doenças por meio de substâncias naturais biologicamente ativas tem origem, principalmente, em conhecimentos etnofarmacológicos (Gyllenhaal et al., 2012). O Brasil possui 82 % da população usuária de plantas medicinais, no entanto menos de 1 % das espécies vegetais brasileira tiveram as suas propriedades químicas e farmacológicas elucidadas (Cunha, 2005). A *Senna rugosa* e *Senna velutina* são duas espécies amplamente distribuídas no país e utilizadas no tratamento de processos infecciosos, doenças crônicas e outras afecções, sem qualquer estudo científico que comprovem suas propriedades terapêuticas.

Diferentes extratos foram preparados empregando-se os solventes água ou etanol e os métodos de extração por maceração ou decocção. Os rendimentos mais elevados em termos de massa de extrato seco foram observados com o emprego dos solventes extratores etanol e água destilada aquecida. Dados da literatura indicam que ao se elevar a temperatura da água ocorre uma redução em sua polaridade, proporcionando aumento na eficiência de extração e a capacidade em solubilizar compostos menos polares (Chan et al., 2011). A extração etanólica, por outro lado, é considerada uma das principais metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais principalmente por aproximar-se às tinturas utilizadas na cultura popular (Cechinel Filho and Yunes, 1998).

O teor de fenóis e flavonóides totais foram avaliados nos extratos aquosos e etanólicos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* (tabela 2). Os resultados mostraram que quantidades diferentes de fenóis e flavonóides estão presentes nos extratos. Os valores do conteúdo de fenóis totais variaram de  $27,5 \pm 1,9$  (SRRM) a  $556,0 \pm 9,9$  (SVRH) mg de ácido gálico/100 g de extrato seco enquanto os valores de flavonóides totais variaram de  $27,0 \pm 5,2$  (SVRM) a  $86,8 \pm 10,7$  (SRRD) mg de quercetina/ 100 g de extrato seco. Estes valores observados demonstram-se relativamente elevados quando comparados, por exemplo, aos encontrados por Olajuyigbe e Afolayan (2011) em extratos de *Ziziphus mucronata*, uma planta tradicionalmente utilizada na África do Sul por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes; e semelhante aos quantificados por Ben Mansour et al. (2011) em *Ormenis africana*, planta hipoglicemiante e analgésica.

Os extratos de *Senna velutina* apresentaram maior teor de fenóis totais comparado aos extratos de *Senna rugosa*, sendo que em *Senna velutina* a quantidade de fenóis totais foi maior nos extratos das raízes e em *Senna rugosa*, nos extratos das folhas. De acordo com Santos-Buelga et al. (2012) os compostos fenólicos não são uniformemente distribuídos nas plantas e sua estabilidade varia significativamente por isso processos de

isolamento e extração desses compostos são complexos. Os extratos etanólicos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* exibiram teores de fenóis totais superiores aos extratos aquosos. Esses resultados estão de acordo com outros autores que sugerem que solventes de alta polaridade, como a água, e solventes apolares, ou de muito baixa polaridade, não são bons extratores de compostos fenólicos (Liu et al., 2000).

O teor de flavonóides totais quantificado nas folhas de *Senna velutina* foi maior que os encontrados nos extratos das raízes. Os flavonóides são frequentemente encontrados nas partes aéreas das plantas, no entanto, sua distribuição depende de diversos fatores relacionados ao filo, ordem, família e espécie de cada planta. Diversos estudos demonstram que partes vegetais expostas à luz possuem um aumento quantitativo de flavonóides em comparação aos que estão à sombra (dos Santos and Blatt, 1998; Machado et al., 2008). A utilização de diferentes solventes (água ou etanol) na maceração das raízes de *Senna velutina* e de *Senna rugosa* não determinou diferenças no teor de flavonóides, por outro lado o processo de extração por decocção das raízes de *Senna rugosa* proporcionou maior teor de flavonóides comparado aos extratos macerados das raízes. A extração de compostos bioativos não depende exclusivamente da polaridade do solvente utilizado, e está associada à composição química das plantas, características físicas do material vegetal e metodologia de extração (Bae et al., 2012; Predes et al., 2011; Zhao et al., 2006).

O potencial antioxidante de *Senna rugosa* e *Senna velutina* foi analisado em ensaios de captura do radical DPPH<sup>•</sup>. Este ensaio tem sido frequentemente empregado como um método químico para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais, especialmente de extratos de plantas medicinais, por fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis de uma forma rápida e fácil (Adetutu et al., 2011; Hazra et al., 2010). Neste estudo todos os extratos aquosos e etanólicos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* demonstraram atividade antioxidante de forma dose dependente. Os resultados revelam que SRF, SVRH e SVF exibiram atividade antioxidante máxima comparável ao padrão ácido ascórbico na concentração de 25 µg/mL. Enquanto os demais extratos apresentaram perfil antioxidante comparável ao BHT com atividades máximas alcançadas em 500 µg/mL (SRRH, SRRD e SVRM) e em 1000 µg/mL (SRRM) (tabela 2). Esses resultados podem estar associados à cinética diferenciada que algumas substâncias antioxidantes apresentam quando reagem de forma particular com o DPPH<sup>•</sup>. Existem compostos que reagem lentamente, como o BHT e BHA, por outro lado os compostos de cinética rápida, como o ácido ascórbico e isogenol, reagem em poucos segundos (Brand-Williams et al., 1995).



Os diferentes métodos de extração (decoção ou maceração) e utilização de solventes (água ou etanol) para o preparo dos extratos das raízes de *Senna rugosa* não exerceram variação na captura de radicais DPPH<sup>•</sup>. Por outro lado, o extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF) apresentou menor IC<sub>50</sub> (10,5 ± 2,6 µg/mL) e, portanto maior atividade antioxidante comparado aos extratos das raízes (IC<sub>50</sub> de 73,0 ± 8,0 a 142,9 ± 17,0 µg/mL) da mesma planta. Esse fato pode estar relacionado ao maior teor de fenóis totais quantificado nos extratos das folhas de *Senna rugosa*. Os compostos fenólicos são os principais constituintes na maioria das plantas relatados em possuir propriedades antioxidantes (Olajuyigbe and Afolayan, 2011). Devido à presença de grupos hidroxila os fenóis atuam como doadores de hidrogênio (Wintola and Afolayan, 2011). Esses compostos também são eficientes agentes redutores, sequestradores de radicais livres, supressores de oxigênio singleto e quelantes de metais por sua capacidade redox (Predes et al., 2011). Além disso, as diferenças na polaridade dos componentes antioxidantes podem ser a razão pela qual os compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos diferem (Igbinsola et al., 2011). De maneira contrária ao observado entre os extratos de *Senna rugosa*, não foram apresentadas diferenças na atividade antioxidante entre o extrato das folhas (IC<sub>50</sub> 7,9 ± 0,9 µg/mL) e raízes (IC<sub>50</sub> de 6,9 ± 0,6 e 9,9 ± 4,0 µg/mL para SVRH e SVRM, respectivamente) de *Senna velutina*. Ao mesmo tempo, a maceração das raízes de *Senna velutina* em água ou etanol não exerceu variação na captura de radicais DPPH<sup>•</sup>.

**Tabela 2. Teor de fenóis totais, flavonóides totais e potencial antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* em ensaio de captura do radical DPPH<sup>\*</sup>.**

Extratos	Teor de fenóis totais	Teor de flavonóides totais	% de inibição do radical DPPH <sup>*</sup>										
			0,1	1	5	10	25	50	100	500	1000	IC <sub>50</sub>	
Ácido ascórbico	-	-	5,2±0,8	18,0±1,4	69,0±2,9	95,1±1,3	96,7±1,4	96,3±1,2	96,5±1,5	96,7±1,0	96,8±1,1	2,5±0,2	
BHT	-	-	2,2±0,9	7,1±1,3	20,9±1,7	35,1±3,1	56,0±4,5	73,7±3,9	87,6±2,7	94,9±1,4	94,3±1,1	20,1±3,0	
<i>S. rugosa</i>	SRF	495,0±5,5	83,0±2,9	9,2±3,6	10,4±2,2	26,1±3,3	44,8±5,5	82,0±5,0	92,1±0,8	93,8±0,7	93,4±0,4	95,7±0,3	10,5±2,6
	SRRD	37,9±0,5	86,8±10,7	5,5±4,1	9,0±3,2	9,1±4,0	11,8±2,7	22,0±2,1	26,0±0,9	41,8±2,4	83,5±6,0	95,9±3,3	142,9±17,0
	SRRM	27,5±1,9	63,5±4,9	1,0±3,1	6,5±2,4	5,8±2,9	11,0±1,8	19,9±3,3	31,5±2,5	49,3±3,2	90,1±0,7	98,4±1,6	126,2±30,0
	SRRH	371,0±7,1	51,0±2,9	0,7±0,4	10,6±7,6	6,7±2,3	13,3±1,3	27,7±1,8	43,5±1,4	63,3±1,6	98,5±0,9	99,4±0,5	73,0±8,0
<i>S. velutina</i>	SVF	519,0±2,3	62,0±4,6	3,2±1,1	9,4±0,8	32,8±1,4	49,5±6,1	91,6±1,2	94,2±0,5	94,0±0,5	92,9±0,3	93,8±0,6	7,9±0,9
	SVRM	349,7±3,3	27,0±5,2	4,7±3,2	11,9±5,3	25,3±7,0	38,9±9,1	61,9±10,2	76,6±11,5	81,1±8,8	91,3±0,6	91,2±0,7	9,9±4,0
	SVRH	556,0±9,9	34,0±6,0	1,2±0,4	8,9±1,6	34,7±1,3	56,6±4,0	96,4±0,4	93,4±0,9	94,3±0,7	93,6±0,9	95,3±1,4	6,9±0,6

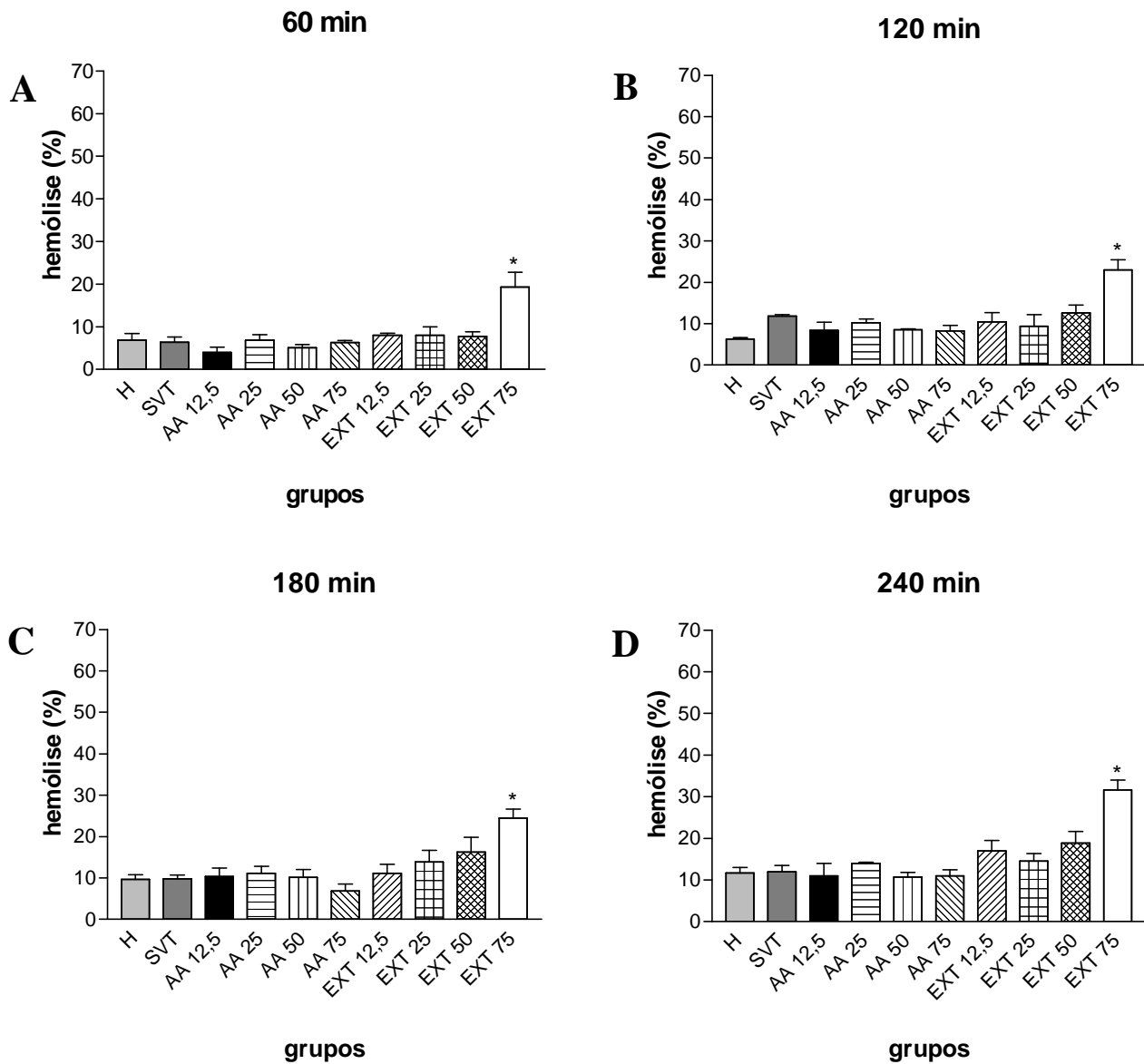
Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM). Os experimentos de captura do radical DPPH<sup>\*</sup> foram realizados em duplicata e foram expressos como % de inibição de DPPH<sup>\*</sup> ± EPM de diferentes concentrações dos extratos (em µg/mL), sendo n= 2 para os ensaios com SRRH, n= 3 para SRF, SRRD, SRRM, SVF, SVRM e SVRH; e n= 12 para Ácido ascórbico e butil hidroxi tolueno (BHT). O teor de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico / 100 g de extrato seco. O teor de flavonóides totais foi expresso em mg de quercetina / 100 g de extrato seco.

A hemólise oxidativa de eritrócitos humanos *in vitro* foi utilizada como desenho experimental para estudar as propriedades antioxidantes do extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF) contra o dano induzido por radicais livres em membranas biológicas. A presença de altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas associada à função como transportadores de oxigênio tornam os eritrócitos o principal alvo para o ataque de radicais livres (Ajila and Prasada Rao, 2008). O AAPH, um gerador de radicais livres do tipo peroxil, foi utilizado para mimetizar as condições *in vivo* do estresse oxidativo. A decomposição térmica, em temperatura fisiológica, de um azo componente em oxigênio geram os radicais peroxil que iniciam o processo de peroxidação lipídica e proteica que culminam em hemólise (Pannangpetch et al., 2007).

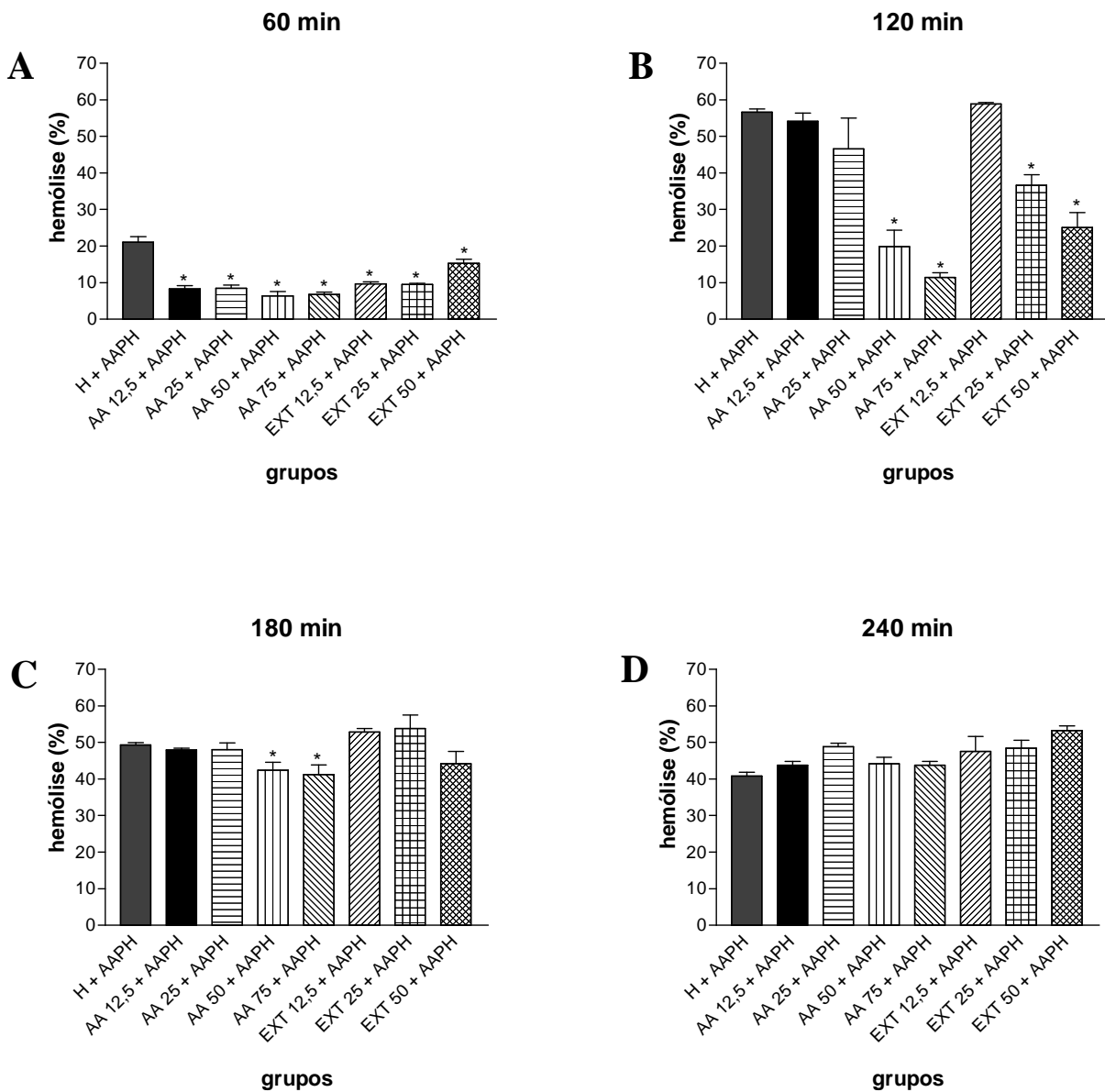
As figuras 1 e 2 mostram o efeito de SRF em eritrócitos humanos expostos ou não à solução indutora de radicais AAPH. Os eritrócitos incubados à 37 °C em solução fisiológica 0,9 % (amostra controle) mostraram-se estáveis, com hemólise reduzida (10%) observada durante as 4 horas de incubação. O solvente não exerceu influência sobre a taxa de hemólise, apresentando valores semelhantes ao da amostra controle em solução fisiológica. Além disso, as células incubadas com o extrato de SRF apenas, sem a presença de AAPH, apresentaram hemólise somente na maior concentração testada (75 µg/mL). Quando os eritrócitos foram tratados com AAPH a porcentagem de hemólise encontrada foi significativamente maior (21% de hemólise). No entanto o tratamento com o extrato nas células expostas ao AAPH inibiu a hemólise até a segunda hora de exposição, sendo em 20 % na concentração de 25 µg/mL e 31 % em 50 µg/mL. Assim a concentração de 50 µg/mL demonstrou ser a melhor concentração antioxidante sem a influência dos efeitos hemolíticos inerentes do extrato. Nenhum efeito protetor contra hemólise pelo extrato foi encontrado na terceira e quarta hora de exposição. Os resultados mostraram que o extrato apresentou efeito antioxidante menos potente que o ácido ascórbico, utilizado como padrão por sua reconhecida atividade antioxidante na comparação do efeito anti-hemolítico de SRF em eritrócitos humanos.

A proteção contra hemólise apresentada pelo extrato SRF pode estar relacionada à atividade sequestradora de radicais livres de seus componentes bioativos, principalmente os fenóis. Diversos estudos científicos já demonstraram que os fenóis são capazes de aumentar a resistência dos eritrócitos ao estresse oxidativo (Aldini et al., 2006; Hapner et al., 2010; Shia et al., 2011). Semelhante à Silva et al. (2011) nós acreditamos que os componentes bioativos de SRF presentes na reação eliminam os radicais peroxil da solução

antes que eles ataquem as moléculas lipídicas da membrana dos eritrócitos, quebrando a cadeia de reação dos radicais livres e inibindo a hemólise oxidativa.



**Figura 1.** Efeito hemolítico do extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF) em eritrócitos humanos. Os valores foram expressos em porcentagem de hemólise de 2 experimentos realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$ , diferenças significativas em relação ao controle solvente no respectivo tempo. H= eritrócitos controle tratados com solução fisiológica 0,9 %; SVT= eritrócitos tratados com solvente, AA= ácido ascórbico (concentração 12,5, 25, 50 ou 75  $\mu\text{g/mL}$ ), EXT= extrato (concentração 12,5, 25, 50 ou 75  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 2.** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF) sobre a hemólise induzida por AAPH em eritrócitos humanos. Os valores foram expressos em porcentagem de hemólise de 2 experimentos realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$ , diferenças significativas em relação ao controle AAPH no respectivo tempo. H= eritrócitos controle tratados com solução fisiológica 0,9 %; AA= ácido ascórbico (concentração 12,5, 25 ou 50  $\mu\text{g/mL}$ ), EXT= extrato (concentração 12,5, 25 ou 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

A maceração e a decocção das folhas ou raízes de *Senna rugosa* e *Senna velutina* são utilizadas no tratamento de infecções em várias comunidades brasileiras, no entanto evidências científicas que comprovem tal eficácia permanecem escassas. A fim de investigar as propriedades antimicrobianas de *Senna rugosa* e *Senna velutina* foram analisados os efeitos de diferentes extratos sobre o crescimento de três microrganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (tabela 3). O ensaio de difusão em meio sólido foi utilizado como método de triagem para seleção dos extratos com potencial efeito antimicrobiano.

Os extratos apresentaram intervalos variáveis de atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Todos os extratos exibiram moderada a alta atividade inibitória contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. SVF foi o mais ativo com halo de inibição de 31,3 mm, superior ao exibido pelo antibiótico padrão tetraciclina ( $p = 0,002$ ) considerando as concentrações analisadas. Entre os extratos de *Senna rugosa*, o macerado das folhas (SRF) apresentou halo de inibição (29,0 mm) consideravelmente superior aqueles obtidos com os extratos das raízes. O mesmo não foi observado entre os extratos de *Senna velutina*. *Escherichia coli* mostrou-se resistente a todos os extratos testados. Estudos anteriores já demonstraram uma maior resistência das bactérias gram-negativas aos extratos de plantas medicinais (Engels et al., 2011; Modarresi Chahardehi et al., 2010). Tais observações estão provavelmente associadas às diferenças na estrutura da parede celular entre bactérias gram-negativas e gram-positivas. As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que age como uma barreira limitando o acesso para muitas substâncias, incluindo os antibióticos (Hendra et al., 2011). Por outro lado, é possível que determinadas substâncias antimicrobianas não tenham sido extraídas pelo método ou solvente utilizado no processo de extração o que justifica a baixa atividade antimicrobiana de alguns extratos.

Em contraste com a atividade antibacteriana eficaz contra *Staphylococcus aureus* a maioria dos extratos não demonstrou atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Somente SRRH e SVRH foram capazes de inibir o crescimento da levedura, exibindo halos de inibição de 12,7 e 21,7 mm respectivamente. A inibição proporcionada por SVRH foi semelhante ao antifúngico padrão cetoconazol. Os resultados observados na inibição de *C. albicans* podem estar associados a diferenças na composição fitoquímica dos extratos das raízes, já que apenas aqueles preparados com etanol mostram-se eficazes. Estudos anteriores relataram que o etanol é um solvente mais eficiente para extrair substâncias

antimicrobianas comparado com outros solventes como a água (Adetutu et al., 2011; Chavez-Quintal et al., 2011).

A partir dos resultados obtidos pelo ensaio de difusão em meio sólido, foram estabelecidos por método quantitativo os valores de CIM, CBM e CFM dos extratos de *Senna rugosa* e *Senna velutina* que apresentaram atividade inibitória (tabela 3). Os extratos apresentaram valores de CIM variando entre  $< 0,7$  a 50 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* e entre 1,5 a 3,1 mg/mL contra *Candida albicans*. Os padrões tetraciclina e cetoconazol exibiram CIMs de  $< 0,7$  mg/mL. De acordo com Fabry et al. (1998) para que extratos de plantas sejam considerados como potencialmente úteis na terapêutica o valor de CIM deve ser  $< 8$  mg/mL, o que não foi observado apenas em SRF (CIM = 50 mg/mL).

Outro aspecto importante a ser analisado diz respeito à natureza do efeito antimicrobiano do extrato, ou seja, a sua capacidade em inibir o crescimento ou causar a morte do microrganismo testado. Nossos resultados mostraram que exceto SRF que apresentou ação bacteriostática, todos os demais extratos apresentaram ação bactericida contra *S. aureus*, com valores de CBM estabelecidos em até três concentrações superiores ao CIM. Os extratos SRRH e SVRH foram também capazes de inibir por completo o crescimento da levedura.

Neste estudo foi possível observar que os halos de inibição não representam a ação efetiva dos extratos contra os microorganismos avaliados. A exemplo disso, o extrato SVF apresentou o maior halo de inibição contra *S. aureus*, no entanto sua CIM foi superior as obtidas com os demais extratos. De fato, um extrato menos ativo, mas facilmente difusível poderá fornecer um diâmetro maior de inibição do que um extrato menos difusível e mais ativo (Agyare et al., 2012). Por isso ensaios quantitativos, como o de microdiluição em caldo, foram empregados. Além disso, a diferença no tamanho dos halos de inibição pode estar associada com a polaridade das substâncias que compõem o extrato, um mecanismo de ação bacteriostático ou a composição da parede celular dos microrganismos testados (Kaneria et al., 2009).



**Tabela 3. Diâmetro dos halos de inibição (ID em mm), concentração inibitória mínima (CIM em mg/mL), bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) dos extratos aquosos e etanólicos de *Senna rugosa* e *Senna velutina*.**

Extratos		Gram positivo				Gram negativo				Levedura			
		<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>				<i>Candida albicans</i>			
		ID	CIM	CBM	MODO DE AÇÃO	ID	CIM	CBM	MODO DE AÇÃO	ID	CIM	CFM	MODO DE AÇÃO
Tetraciclina ou Cetoconazol	-----	20,7±0,7	<0,7	<0,7	bactericida	30,0±1,2	<0,7	<0,7	bactericida	19,3±0,7	<0,7	<0,7	fungicida
<i>Senna rugosa</i>	SRF	29,0±1,0	50	100	bacteriostático	0	-	-	-	0	-	-	-
	SRRD	18,3±0,9	6,2	12,5	bactericida	0	-	-	-	0	-	-	-
	SRRM	13,0±1,0	3,1	3,1	bactericida	0	-	-	-	0	-	-	-
	SRRH	10,7±0,7	3,1	12,5	bactericida	0	-	-	-	12,7±0,3	3,1	25	fungicida
<i>Senna velutina</i>	SVF	31,3±1,3	1,5	12,5	bactericida	0	-	-	-	0	-	-	-
	SVRM	28,7±0,7	<0,7	6,2	bactericida	0	-	-	-	0	-	-	-
	SVRH	24,0±0,6	<0,7	12,5	bactericida	0	-	-	-	21,7±0,3	1,5	6,2	fungicida

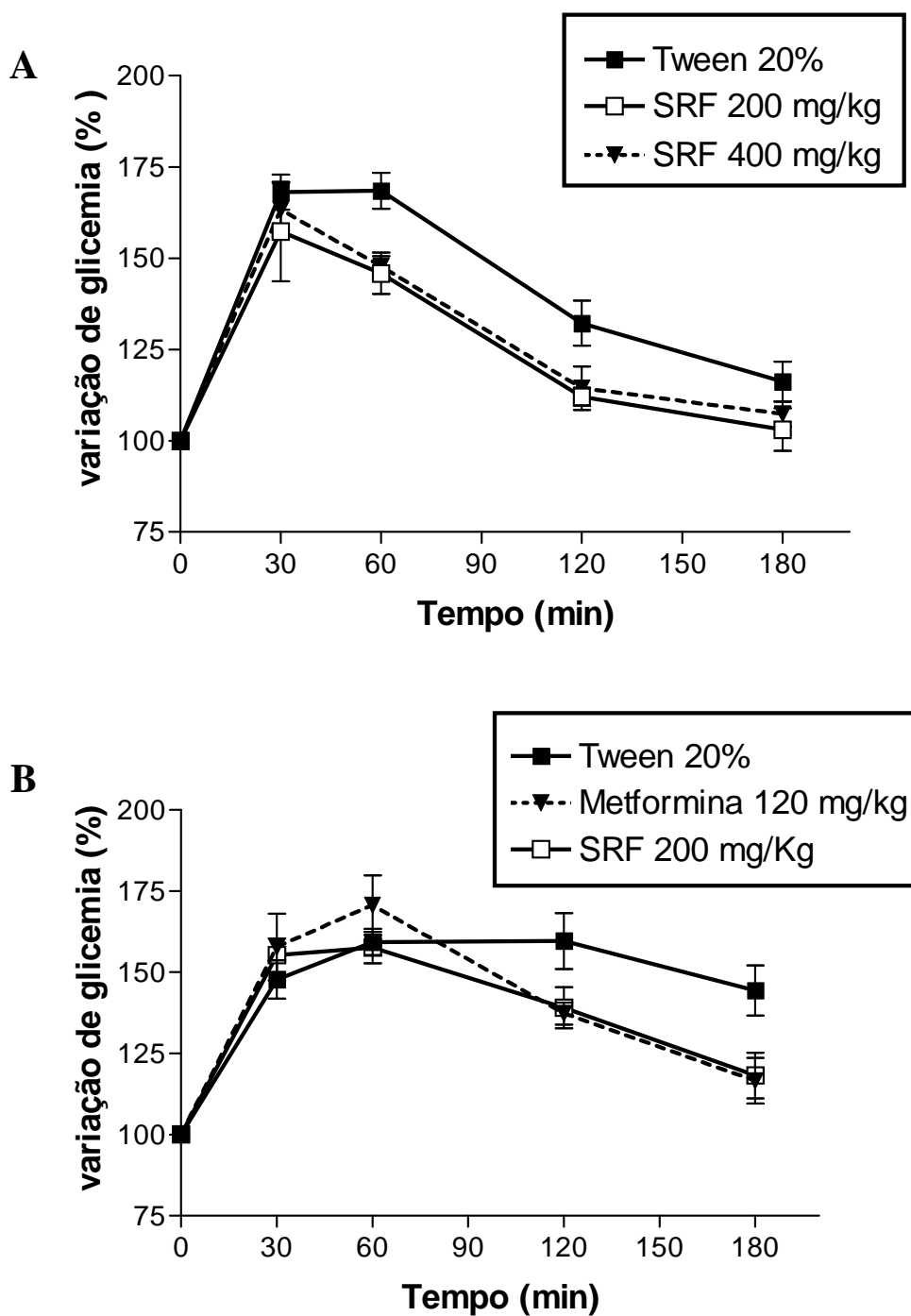
Tetraciclina e Cetoconazol foram usados como drogas de referência para as espécies de bactérias e linhagens de levedura respectivamente. ID: diâmetro dos halos de inibição do crescimento em mm (média do experimento em triplicata ± erro padrão da média); - : não testado. Os extratos e as drogas de referência foram testados na concentração de 200 mg/mL e 4 mg/mL respectivamente para a determinação dos ID`s.

No presente estudo o potencial hipoglicemiante e antihiper-glicêmico de *Senna rugosa* folha foi avaliado através da área sob a curva traçada a partir das glicemias obtidas pelos ensaios experimentais em ratos normoglicêmicos e diabéticos induzidos por aloxano. A escolha deste extrato foi determinada considerando os elevados teores de flavonóides e fenóis totais quantificados, sua potencial atividade antioxidante e o uso etnofarmacológico no diabetes. O ensaio de determinação de dose experimental do SRF não demonstrou diferença no teste de tolerância à glicose ( $p = 0,53$ ) realizado com as duas concentrações do extrato (200 e 400 mg/kg) (figura 3A). A menor concentração foi, portanto selecionada para avaliar a atividade antihiper-glicêmica em ratos diabéticos e para o estudo crônico em ratos normoglicêmicos.

O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais utilizados para induzir diabetes experimental em ratos em vista da produção de características semelhantes às encontradas no estado diabético em humanos, tais como: glicosúria, polifagia, polidipsia entre outras (Szkudelski, 2001). Essa droga é capaz de destruir as células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans que conduz a uma enorme redução na liberação de insulina, induzindo hiper-glicemia (Aragão et al., 2010). Seu mecanismo de ação é mediado por espécies reativas de oxigênio que encontram no pâncreas maior susceptibilidade (Maithili et al., 2011). O extrato de *Senna rugosa* folha (200 mg/kg) não promoveu efeito antihiper-glicêmico nos ratos diabéticos ( $p = 0,39$ ) (figura 3B). Apesar deste extrato ser utilizado tradicionalmente como antidiabético, no desenho experimental utilizado, nossos resultados não demonstraram este potencial, considerando as condições analisadas. Novos estudos são necessários para investigar se este extrato promove seus efeitos antihiper-glicêmicos em diferentes doses, vias de administração ou severidade do diabetes induzido. Além disso, é possível que a atividade antioxidante apresentada por SRF possa contribuir para seus efeitos antihiper-glicêmicos na população usuária. Estudos anteriores determinam que embora não seja possível reverter completamente as complicações diabéticas, os compostos antioxidantes podem ser úteis em prevenir ou atenuar os efeitos adversos da hiper-glicemia (Dias et al., 2005).

Os flavonóides constituem um dos principais metabólitos secundários responsáveis pelas propriedades antidiabéticas encontradas em extratos vegetais (Beltrame et al., 2001). Apesar dos ensaios confirmarem a presença de flavonóides no extrato SRF, efeitos antihiper-glicêmicos não foram observados. Esses resultados diferem de outros estudos que identificaram a presença de flavonóides e de atividade antidiabética em

extratos vegetais (Abd El-Mawla et al., 2011; Rodrigues et al., 2012). Shu et al. (2009) extraíram os flavonóides de *Polygonatum odoratum* e descobriram um efeito potencial na regulação da glicose no sangue de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e aloxano. Assim como os terpenóides, os flavonóides atuam estimulando as células beta pancreáticas e dessa forma proporcionam um aumento da liberação de insulina.



**Figura 3.** Administração de etanólico das folhas de *Senna rugosa* (SRF) (200 e 400 mg/kg) em normoglicêmicos e diabéticos. (A) Porcentagem de redução da glicose plasmática induzida por SRF em diferentes doses após administração oral de sobrecarga de glicose em ratos normoglicêmicos (n= 5). (B) Porcentagem de redução da glicose plasmática induzida por SRF (200 mg/kg) e metformina (120 mg/kg) após administração oral de sobrecarga de glicose em ratos diabéticos induzidos por aloxano (n= 5 em tween e SRF, n= 4 em metformina).

A administração do extrato de *Senna rugosa* folha durante 28 dias não reduziu a glicemia dos ratos normoglicêmicos, como também não promoveu alteração nos parâmetros de massa corporal, ingestão alimentar e hídrica, massa do fígado, dos tecidos musculares e adiposos quando comparado ao grupo controle (tabela 4). Por outro lado, o grupo de ratos tratado com metformina (500 mg/kg) apresentou massa do fígado significativamente maior e massa do tecido adiposo branco epididimal menor que as apresentadas pelo grupo controle. No tecido adiposo (TA), a metformina estimula vias catabólicas por meio da ativação da via AMPK, com isso o triglicérides armazenado reduz refletindo em menor tamanho dos adipócitos. O aumento da lipólise, no entanto, não é acompanhado da liberação de ácidos graxos já que eles são oxidados no interior do adipócito (Anedda et al., 2008). Possivelmente os valores aumentados da massa do fígado dos ratos tratados com metformina sejam resultado de uma manifestação hepatotóxica. Apesar de não ser considerado intrinsecamente hepatotóxico e do fato que existem poucos estudos que relatam a hepatotoxicidade por este fármaco é importante alertar para a ocorrência desses efeitos colaterais (Miralles-Linares et al., 2012; Olivera-Gonzalez et al., 2010).

**Tabela 4. Efeitos do tratamento crônico com extrato etanólico das folhas de *S. rugosa* sobre a massa corporal, glicose plasmática, ingestão hídrica e alimentar e massa (tecidos/órgão (mg) por g de massa corporal) do fígado, *soleus*, extensor digital longo (EDL), tecido adiposo renal, epididimal, mesentérico e subcutâneo em ratos normoglicêmicos.**

Parâmetros metabólicos	TW 20%	MET500	SR200
Massa corporal (g)	397,5±9,5	383,7±15,4	394,2±7,4
Glicose plasmática (mg / dL)	83,5 ± 1,6	89,4 ± 2,4	89,3 ± 3,0
Ingestão hídrica (mL /24 h)	55,0 ± 20,0	40,7 ± 17,5	45,0 ± 20,0
Ingestão alimentar (g / 24 h)	17,8 ± 1,7	20,0 ± 10,4	19,2 ± 5,8
Fígado	28,43 ± 0,57	31,11 ± 0,85*	27,97 ± 1,56
<i>Soleus</i>	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,02
EDL	0,40 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,02
TA renal	9,02 ± 0,37	6,90 ± 1,36	8,37 ± 1,34
TA epididimal	10,35 ± 0,87	7,66 ± 0,94*	9,35 ± 1,36
TA mesentérico	4,60 ± 0,38	4,11 ± 0,59	5,24 ± 0,44
TA subcutâneo	0,60 ± 0,08	0,63 ± 0,09	0,62 ± 0,10

Os dados representam o final dos tratamentos (dia 28). TW 20%: ratos tratados com o veículo (solução de Tween 20%); MET500: ratos tratados com metformina (500 mg/kg); SR200: ratos tratados com extrato etanólico das folhas de *S. rugosa* (200 mg/kg); TA: tecido adiposo. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8 em Controle e SR200, em MET500 n=7). Resultados significativos são expressos por \* p<0,05 empregando o test *t* de Student.

#### 4. Conclusões

Em conclusão, o presente estudo demonstrou os potenciais antioxidantes e antimicrobianos de *Senna rugosa* e *Senna velutina*. Os extratos das folhas e raízes inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* enquanto somente os extratos etanólicos das raízes foram ativos contra *Candida albicans*. Os componentes fenólicos foram detectados nos diferentes extratos analisados e podem estar associados aos potenciais biológicos antioxidantes apresentados. Apesar da descrição popular nossos resultados não confirmam o uso tradicional do extrato das folhas de *Senna rugosa* como antidiabético no desenho experimental utilizado, mas reforçam a hipótese de sua utilização na profilaxia de complicações resultantes do estresse oxidativo no diabetes mellitus. Novos estudos devem ser realizados para confirmar a atividade antidiabética, determinar sua toxicidade, os mecanismos de ação e a fitoquímica.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem aos membros do GEBAM pelo apoio na realização dos experimentos, à UNIGRAN por ceder seus laboratórios para os ensaios microbiológicos e ao CNPq, CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

#### Referências

Abd El-Mawla, A.M., Mohamed, K.M., Mostafa, A.M., 2011. Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of *Morus nigra* and Testing their Hypoglycemic Efficacy. *Scientia Pharmaceutica* 79, 951-961.

Adetutu, A., Morgan, W.A., Corcoran, O., 2011. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 116-119.

Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 114-140.

Agyare, C., Koffuor, G.A., Boamah, V.E., Adu, F., Mensah, K.B., Adu-Amoah, L., 2012. Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities of *Pterygota macrocarpa* and *Cola*

*gigantea* (Sterculiaceae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012, 902394.

Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T., 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various area of China. Food Chemistry 101, 1383-1392.

Ajila, C.M., Prasada Rao, U.J., 2008. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. Food and Chemical Toxicology 46, 303-309.

Aldini, G., Piccoli, A., Beretta, G., Morazzoni, P., Riva, A., Marinello, C., Maffei Facino, R., 2006. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. Fitoterapia 77, 121-128.

Anedda, A., Rial, E., Gonzalez-Barroso, M.M., 2008. Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. Journal of Endocrinology 199, 33-40.

Aragão, D.M., Guarize, L., Lanini, J., da Costa, J.C., Garcia, R.M., Scio, E., 2010. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 128, 629-633.

Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Crosby, K., Jifon, J.L., Patil, B.S., 2012. Influence of Extraction Solvents on Antioxidant Activity and the Content of Bioactive Compounds in Non-pungent Peppers. Plant Foods for Human Nutrition 67, 120-128.

Bahramikia, S., Yazdanparast, R., 2010. Antioxidant efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various in vitro assay systems. Journal of Acupuncture and Meridian Studies 3, 283-290.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Oxidative Stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. Química Nova 29, 113-123.

Beltrame, F.L., Sartoretto, J.L., Bazotte, R.B., Cuman, R.N., Cortez, D.A., 2001. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Química Nova 24, 783-785.

Ben Mansour, R., Gargouri, B., Bouaziz, M., Elloumi, N., Belhadj Jilani, I., Ghrabi, Z., Lassoued, S., 2011. Antioxidant activity of ethanolic extract of inflorescence of *Ormenis Africana* in vitro and in cell cultures. Lipids in Health and Disease 10, 78.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology 28, 25-30.

Bussmann, R.W., Malca-Garcia, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Diaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frias-Fernandez, F., Benito, M., 2010. Minimum

inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 132, 101-108.

Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21, 99-105.

Chan, E.W., Soh, E.Y., Tie, P.P., Law, Y.P., 2011. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research* 3, 266-272.

Chavez-Quintal, P., Gonzalez-Flores, T., Rodriguez-Buenfil, I., Gallegos-Tintore, S., 2011. Antifungal Activity in Ethanolic Extracts of *Carica papaya* L. cv. Maradol Leaves and Seeds. *Indian Journal of Microbiology* 51, 54-60.

CONCEA, 2008. Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008  
[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm), Brasília.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.

Cunha, A., 2005. Aspectos Históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia., 1 ed. Siesalq, São Paulo.

Dias, A.S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P.S., Gonzalez-Gallego, J., 2005. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutrition* 135, 2299-2304.

dos Santos, M.D., Blatt, C.T.T., 1998. A quantitative analysis of foliar flavonoids and total phenolics of *Pyrostegia venusta* Miers. from both the forest and cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 21, 135-140.

Duraipandiyan, V., Ayyanar, M., Ignacimuthu, S., 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, 35.

Engels, C., Schieber, A., Ganzle, M.G., 2011. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2215-2223.

Fabry, W., Okemo, P.O., Ansorg, R., 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 79-84.

Gupta, D., Gupta, R.K., 2011. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11, 13.

Gyllenhaal, C., Kadushin, M.R., Southavong, B., Sydara, K., Bouamanivong, S., Xaiveu, M., Xuan, L.T., Hiep, N.T., Hung, N.V., Loc, P.K., Dac, L.X., Bich, T.Q., Cuong, N.M.,



Ly, H.M., Zhang, H.J., Franzblau, S.G., Xie, H., Riley, M.C., Elkington, B.G., Nguyen, H.T., Waller, D.P., Ma, C.Y., Tamez, P., Tan, G.T., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., 2012. Ethnobotanical approach versus random approach in the search for new bioactive compounds: Support of a hypothesis. *Pharmaceutical Biology* 50, 30-41.

Hapner, C.D., Deuster, P., Chen, Y., 2010. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. *Chemico-Biological Interactions* 186, 275-279.

Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., Mandal, N., 2010. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Embolica officinalis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10, 20.

Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Shukor, M.Y., Oskoueian, E., 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 3422-3431.

Igbinosa, O.O., Igbinosa, I.H., Chigor, V.N., Uzunugbe, O.E., Oyedemi, S.O., Odjadjare, E.E., Okoh, A.I., Igbinosa, E.O., 2011. Polyphenolic Contents and Antioxidant Potential of Stem Bark Extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *International Journal of Molecular Sciences* 12, 2958-2971.

Kaneria, M., Baravalia, Y., Vaghasiya, Y., Chanda, S., 2009. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from saurashtra region, India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71, 406-412.

Leite, A.C., Araujo, T.G., de Melo Carvalho, B., Maia, M.B., de Menezes Lima, V.L., 2011. Characterization of the Antidiabetic Role of *Parkinsonia aculeata* (Caesalpineaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011.

Liu, F.F., Ang, C.Y., Springer, D., 2000. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3364-3371.

Loverde-Oliveira, S.M., Freitas, M.N., Araújo, P.K.B., Costa, I.B.C., 2010. Fragmento de Cerrado urbano da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Mato Grosso. *Revista Biodiversidade* 9, 74-90.

Machado, H., Nagem, T.J., Peters, V.M., Fonseca, C.S., Oliveira, T.T., 2008. Flavonoids and potential therapeutic. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* 27, 33-39.

Maithili, V., Dhanabal, S.P., Mahendran, S., Vadivelan, R., 2011. Antidiabetic activity of ethanolic extract of tubers of *Dioscorea alata* in alloxan induced diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology* 43, 455-459.

Maroni, B.C., Di Stasi, L.C., Machado, S.R., 2006. Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado., 1 ed. UNESP, São Paulo.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 91, 571-577.

Miralles-Linares, F., Puerta-Fernandez, S., Bernal-Lopez, M.R., Tinahones, F.J., Andrade, R.J., Gomez-Huelgas, R., 2012. Metformin-induced hepatotoxicity. *Diabetes Care* 35, e21.

Modarresi Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza Sulaiman, S., 2010. Antioxidant, Antimicrobial Activity and Toxicity Test of *Pilea microphylla*. *International Journal of Microbiology* 2010, 826830.

Mokale Kognou, A.L., Ngonon Ngane, R.A., Kuate, J.R., Koanga Mogtomo, M.L., Tchinda Tiabou, A., Mouokeu, R.S., Biyiti, L., Amvam Zollo, P.H., 2011. Antibacterial and Antioxidant Properties of the Methanolic Extract of the Stem Bark of *Pteleopsis hylodendron* (Combretaceae). *Chemotherapy Research and Practice* 2011, 218750.

Na Phatthalung, P., Chusri, S., Voravuthikunchai, S.P., 2012. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii* infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12, 56.

Naves, R.P., Stockman, R., Apgaua, D.M.G., Rodrigues, V.E.G., 2009. Experiências Com Plantas Mediciniais Nativas e Exóticas dos Moradores do Entorno de Um Parque Florestal em Varginha, Minas Gerais. UFLA, Lavras.

NCCLS, 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard, 6 ed., Wayne.

NCCLS, 2005. Performance standards for antimicrobial disk susceptible test: Approved standard M2-A8, 8 ed., Wayne.

Olajuyigbe, O.O., Afolayan, A.J., 2011. Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11, 130.

Olivera-Gonzalez, S., de Escalante-Yanguela, B., Velilla-Soriano, C., Amores-Arriaga, B., Martin-Forteza, P., Navarro-Aguilar, M.E., 2010. Metformin-associated hepatotoxicity. *Medicina Intensiva* 34, 483-487.

Ong, K.W., Hsu, A., Song, L., Huang, D., Tan, B.K., 2011. Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 598-607.

Pannangpetch, P., Laupattarakasem, P., Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Kongyingyoes, B., Aromdee, C., 2007. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 29, 1-9.

Predes, F.S., Ruiz, A.L., Carvalho, J.E., Foglio, M.A., Dolder, H., 2011. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. BMC Complementary and Alternative Medicine 11, 25.

Rattmann, Y.D., Mendez-Sanchez, S.C., Furian, A.F., Paludo, K.S., de Souza, L.M., Dartora, N., Oliveira, M.S., Costa, E.M., Miguel, O.G., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Mello, C.F., Franco, C.R., da Silva-Santos, J.E., Cadena, S.M., Marques, M.C., Santos, A.R., 2011. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. Journal of Ethnopharmacology 133, 999-1007.

Rodrigues, G.R., Di Naso, F.C., Porawski, M., Marcolin, E., Kretzmann, N.A., Ferraz Ade, B., Richter, M.F., Marroni, C.A., Marroni, N.P., 2012. Treatment with Aqueous Extract from *Croton cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. Journal of Biomedicine & Biotechnology 2012, 902351.

Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A., 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia 21, 102-113.

Saiki, P.T.O., Silva, B., Lomônaco, C., 2008. Expressão de caracteres reprodutivos e vegetativos de *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) em dois ambientes distintos de cerrado. Revista Brasileira de Botânica 31, 363-369.

Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Gonzalez-Paramas, A.M., 2012. Extraction and isolation of phenolic compounds. Methods in Molecular Biology 864, 427-464.

Santos, R.P., Mendes, L.S., Silva, B.M., de Pinho, P.G., Valentão, P., Andrade, P.B., Pereira, J.A., Carvalho, M., 2011. Phytochemical profiles and inhibitory effect on free radical-induced human erythrocyte damage of *Dracaena draco* leaf: A potential novel antioxidant agent. Food Chemistry 124, 927-934.

Shia, C.S., Hou, Y.C., Juang, S.H., Tsai, S.Y., Hsieh, P.H., Ho, L.C., Chao, P.D., 2011. Metabolism and pharmacokinetics of san-huang-xie-xin-tang, a polyphenol-rich chinese medicine formula, in rats and ex-vivo antioxidant activity. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011, 721293.

Shu, X.S., Lv, J.H., Tao, J., Li, G.M., Li, H.D., Ma, N., 2009. Antihyperglycemic effects of total flavonoids from *Polygonatum odoratum* in STZ and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 124, 539-543.

Silva, B.M., Santos, R.P., Mendes, L.S., de Pinho, P.G., Valentão, P., Andrade, P.B., Pereira, J.A., Carvalho, M., 2011. *Dracaena draco* L. fruit: Phytochemical and antioxidant activity assessment. Food Research International 44, 2182-2189.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., 2002. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12, 35-40.

Suganthy, N., Nisha, S.A., Pandian, S.K., Devi, K.P., 2010. Antioxidant and metal chelating potential of the solvent fractions of *Gelidiella acerosa*, the red algae inhabiting South Indian coastal area. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.



Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50, 537-546.

Vila Verde, G.M., Paula, J.R., Caneiro, D.M., 2003. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 64-66.

Wintola, O.A., Afolayan, A.J., 2011. Phytochemical constituents and antioxidant activities of the whole leaf extract of *Aloe ferox* Mill. *Pharmacognosy Magazine* 7, 325-333.

Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G., 2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7277-7286.

## 5.2 Declaração de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

 <b>Universidade de Brasília</b> Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 30 de junho de 2010.
<b>DECLARAÇÃO</b>
Declaramos que o projeto intitulado “ <b>Análise e Caracterização Farmacológica do Potencial Antidiabetogênico de Senna Rugosa</b> ”, UnBDOC n.º. 47924/2010, sob responsabilidade do Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.
 Prof. Antonio Sebben Coordenador do CEUA
