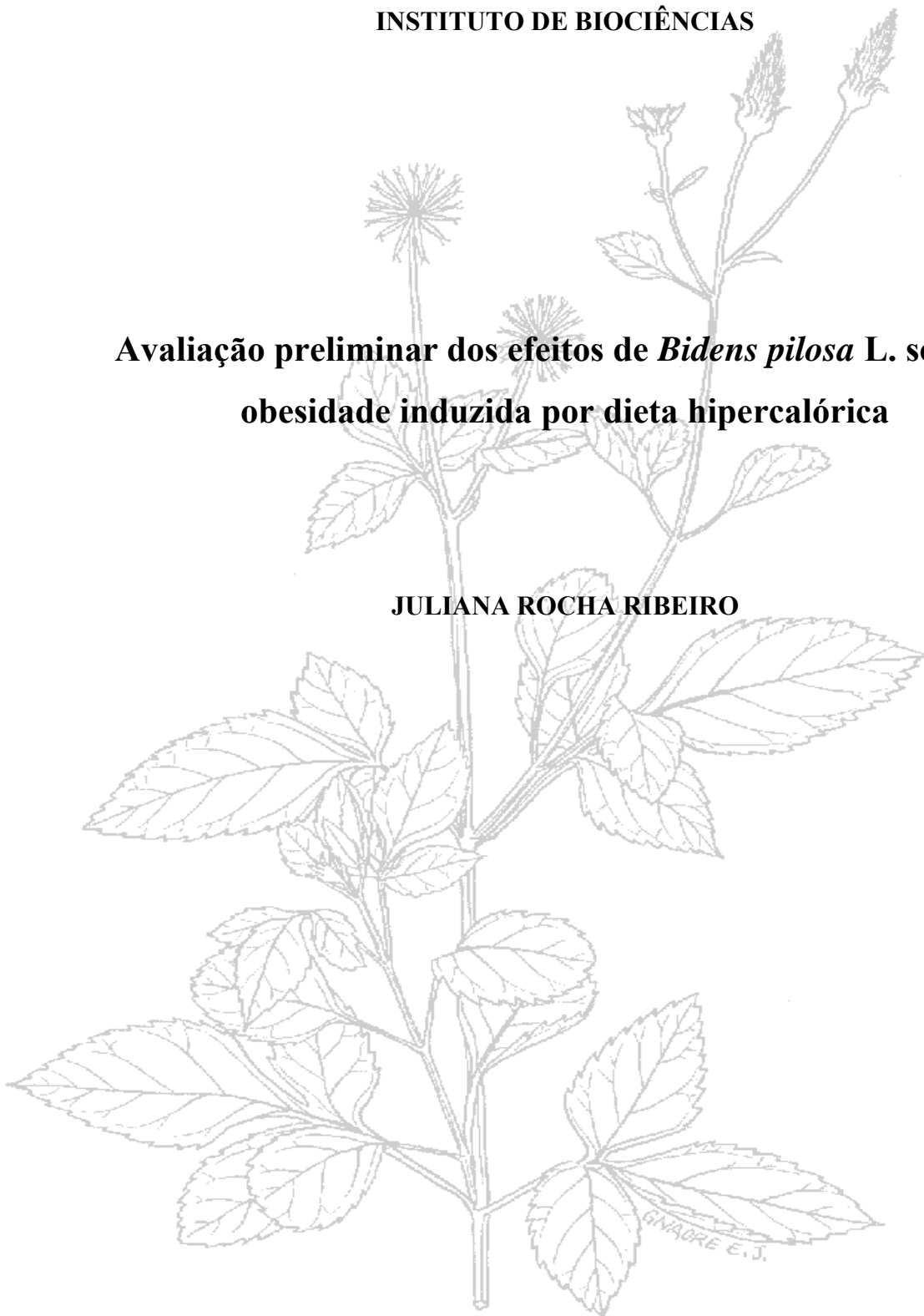


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
UNESP/ CAMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Avaliação preliminar dos efeitos de *Bidens pilosa* L. sobre a  
obesidade induzida por dieta hipercalórica**

**JULIANA ROCHA RIBEIRO**



**Botucatu - SP**

**2011**

**JULIANA ROCHA RIBEIRO**

**Avaliação preliminar dos efeitos de *Bidens pilosa* L. sobre a  
obesidade induzida por dieta hipercalórica**

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas

**ORIENTADOR:**

**PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI**

**Botucatu - SP**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Ribeiro, Juliana Rocha.

Avaliação preliminar dos efeitos de *Bidens pilosa* L. sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica / Juliana Rocha Ribeiro. – Botucatu: [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 2100000

1. Farmacologia. 2. Plantas medicinais. 3. Obesidade.

Palavras-chave: *Bidens pilosa* L.; Dieta hipercalórica; Obesidade; Plantas Mediciniais.

## **Dedicatória**

À Ciomara:

Minha mãe, amiga e conselheira, sem você nada disso seria possível. Por me mostrar o caminho do saber e pelo longo cuidado parental;

À Família:

Pelo amor e confiança. Por terem apoiado, encorajado e incentivado as minhas escolhas. Principalmente por me ensinarem que é necessário agir no presente para concretizar os sonhos no futuro;

Aos Amigos Distantes:

Vocês me apoiaram e me ajudaram a superar o vestibular e me ensinaram tantas outras coisas;

Aos Unespianos:

Que estiveram comigo durante a graduação. Em especial a Vanessa Suemi, Fabiana Masago, Natalia Kaori e Nathalia Miura, pois vocês se tornaram muito mais do que colegas de faculdade.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Luiz Claudio Di Stasi pela orientação e por ter me acolhido em seu laboratório;

À Chemyunion LTDA. pelo produto fornecido e pela oportunidade de testá-lo;

Aos colegas Lafitianos: Adriano, Alexandre Tanimoto, Alexandre Chags, Aline, Ana, Celso, Juliana Severi, Juliana Checon, Leonardo, Luiz, Patrícia e Tarina que me ajudaram e me ensinaram desde que eu entrei no laboratório.

À Mimbok(Fabiana),Pirlin ( Laura), Penumbra (Adriana) e Bronha (Aline) pela elaboração em conjunto nesse ano que possibilitou nossas monografias;

Aos funcionários e professores do Instituto de Biociências;

## Epígrafe

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

## PRÓLOGO

A presente monografia foi o início de uma nova linha de pesquisa que estão sendo conduzidas em parceria com a empresa Chemyunion LTDA. e o Lafit-Botu (Departamento de Farmacologia - IBB), além de ser parte de um projeto aprovado pela FAPESP ( n° 2009/52471-1), cuja temática refere-se ao impacto do estresse físico e psicogênico sobre a ingestão alimentar, ganho de peso e aparência geral da pele intitulado: modulação nutrigenômica, proteômica e metabolômica por extratos de plantas e alimentos funcionais. O efeito da *Bidens pilosa* L. foi avaliado sobre o consumo de ração e peso corpóreo; na resposta neuro-imuno-endócrina envolvida na regulação do peso corpóreo e do balanço energético através de análises de genes relacionados a obesidade; estrutura histológica da gordura visceral; mediadores de processos inflamatórios locais e sistêmicos.

O projeto original contava com a compra de animais obesos geneticamente modificados, (nocautes para leptina), porém não foi possível a compra destes animais por falta em número necessário para a execução do experimento. Já que alegaram ter número suficiente apenas para a demanda interna. Diante deste fato optamos por agregar um novo objetivo ao trabalho, a padronização de indução da obesidade por dieta hipercalórica para camundongos Swiss.

## RESUMO

A obesidade, juntamente com o sobrepeso, tem sido considerados um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, especialmente por serem os principais fatores de risco para inúmeras doenças crônicas, como a doença coronariana, diabetes mellitus, hipertensão e alguns tipos de tumores. O uso de alimentos funcionais e de dietas adequadas com apelo de promoção da saúde tem crescido como mecanismo de prevenção. Estudos anteriores sugerem a utilização de *Bidens pilosa* L. para o tratamento de distúrbios relacionados com a obesidade, com um importante atrativo de que este esquema terapêutico é entendido como mais seguro e eficaz para a saúde do que o tratamento com anorexígenos tradicionais. O objetivo deste projeto foi padronizar um novo modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica em camundongos Swiss e avaliar o efeito do extrato padronizado de *Bidens pilosa* L. na diminuição do peso, no controle da ingesta alimentar e a toxicidade do extrato. Após indução da obesidade, os animais foram tratados por 21 dias com o extrato supercrítico de *Bidens pilosa* por via oral. Após o tratamento os animais foram mortos e amostras foram coletadas para análises futuras. Preliminarmente, o efeito deste produto foi avaliado sobre o consumo diário de ração e sobre o peso corpóreo. Na dose de 100mg/kg, não houve alterações significativas no consumo de ração e nem no peso corpóreo dos grupos tratados em relação ao grupo controle obeso. Sendo assim, o extrato de *Bidens pilosa* não foi eficaz na redução do peso corporal dos animais obesos, assim como não reduziu a ingesta de ração.

Palavras-chave: Plantas Medicinais, Obesidade, *Bidens pilosa* L., Dieta hipercalórica

## ABSTRACT

The obesity along with overweight has been considered one of the most serious public health problems in the world, especially because they are the main risk factors for many chronic diseases such as coronary heart disease, diabetes mellitus, hypertension and some types of tumors, which are associated with high mortality rates. The use of functional foods and appropriate diets to promote health has grown as a prevention mechanism. Previous studies suggested *Bidens pilosa* L. for the treatment of disorders associated with obesity, with one important attraction of this regimen is perceived as safer and more effective health than the traditional anorexigen. The aim of this project is to standardize a new model of obesity induced by hypercaloric diet in Swiss mice, and also to evaluate the effect of *Bidens pilosa* L. extract in the reduction of food intake, weight and toxicity. After induction of obesity, the animals were treated for 21 days with the extract. Then the animals were killed and samples were collected for further analysis. Preliminary, the effect of this product has been evaluated on the daily food intake and body weight. In dose of 100mg/Kg, there were no significant changes in food intake and body weight. Thus, this concentration of *Bidens pilosa* was not effective in reducing body weight of obese animals, and did not reduce food intake.

Keywords: Medical plants, obesity, *Bidens pilosa* L. and hypercaloric diet

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Foto da espécie <i>Bidens pilosa</i> L .....	12
<b>Figura 2.</b> Delineamento experimental utilizado no presente estudo. ....	21
<b>Figura 4.</b> Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas. Dados expressos em média. ....	24
<b>Figura 5.</b> Média de consumo dos diferentes grupos experimentais de ração normocalórica durante 21 dias após a indução da obesidade. Dados expressos em média.....	25
<b>Figura 6.</b> Efeito do tratamento com extrato supercrítico de picão ( <i>Bidens pilosa</i> ) no peso dos animais Dados expressos em média. ....	26

## **Lista de Quadros**

<b>Quadro 1-</b> Macronutrientes e micronutrientes da ração hipercalórica para roedor, RC Focus 2415 Agroceres®.....	17
<b>Quadro 2.</b> Perfil de aminoácidos das rações.....	18
<b>Quadro 3.</b> Perfil de carboidratos das rações.....	19
<b>Quadro 4.</b> Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações.....	19

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Variação do peso corpóreo dos animais de diferentes grupos experimentais.....	24
<b>Tabela 2.</b> Variação do peso dos animais de diferentes grupos experimentais após 8 semanas de dieta a pós tratamento com os diferentes produtos-teste. ....	26
<b>Tabela 3.</b> Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	27

## SUMÁRIO

## DEDICATÓRIA

## AGRADECIMENTOS

## EPIGRAFE

## PRÓLOGO

## RESUMO

## ABSTRACT

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE QUADROS

## LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Importância do estudo de plantas .....	11
1.2. Planta de Estudo .....	12
1.3. Obesidade .....	13
2. OBJETIVO.....	15
3. MATERIAL E MÉTODO.....	16
3.1. Padronização do modelo de indução a obesidade para camundongo Swiss por dieta hipercalórica .....	16
3.2. Obtenção do extrato da <i>Bidens pilosa</i> L.....	20
3.3. Animais.....	20

3.4.	Delineamento Experimental Geral .....	20
3.5.	Tratamento dos animais obesos com o extrato da <i>Bidens pilosa L.</i> .....	21
3.6.	Avaliação Geral .....	22
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.	CONCLUSÃO .....	28
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	29
7.	REFERÊNCIAS .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Importância do estudo de plantas

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, com 55 mil espécies catalogadas, essa biodiversidade é resultado pela grande variedade e variabilidade nas espécies existentes, o que ocorre devido às complexidades ecológicas de nossos ecossistemas (Guerra e Nodari, 2000).

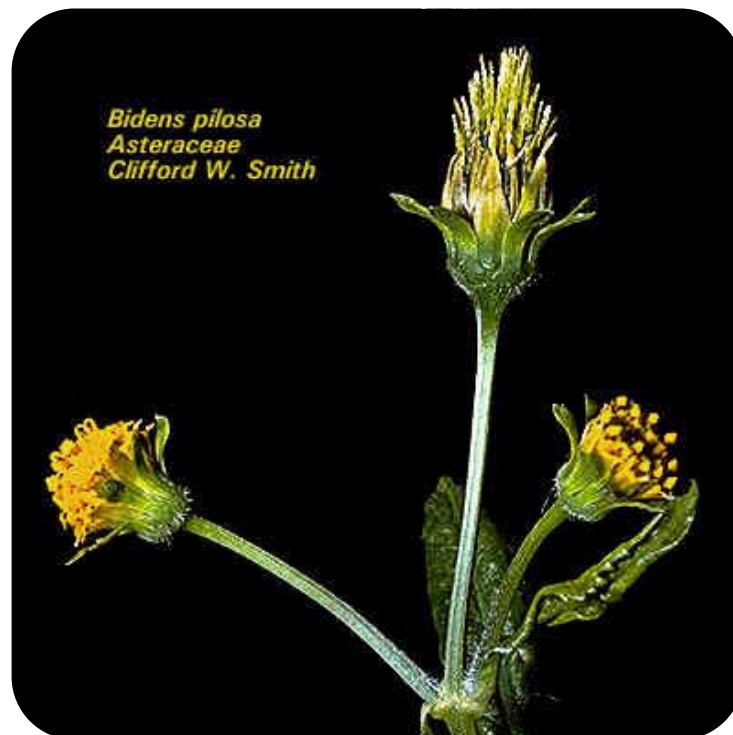
Já é de conhecimento popular que as plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Sabe-se também que as oportunidades para a identificação de produtos naturais biologicamente ativos, com possível utilização econômica, aumentam proporcionalmente com a diversidade das espécies. Por isso, a biodiversidade brasileira une-se de grande importância como: auxiliar no desenvolvimento tecnológico do país a partir de novos produtos nacionais, no desenvolvimento econômico de comunidades detentoras do conhecimento popular sobre a utilização das plantas e no desenvolvimento científico. Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soejarto, 1996), demonstrando o quanto pouco se sabe e o quanto ainda pode ser estudado. Além disso, deve-se levar em consideração o novo paradigma da farmacologia moderna que preconiza uma nova abordagem de que diferentes compostos presentes, especialmente em produtos de origem vegetal tenham a capacidade de alcançar e produzir ações farmacológicas em diferentes tecidos-alvo e/ou distintos receptores e desta forma produzir efeitos sinérgicos que efetivamente possam ser superiores àqueles induzidos por compostos isolados (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009). Com isso o estudo de plantas medicinais se torna ainda mais importante do ponto de vista farmacológico.

De modo geral, existe um grande interesse público no uso de compostos de origem natural, os quais atualmente caracterizam um mercado que movimenta bilhões de dólares anualmente. O uso de plantas medicinais é baseado na premissa de que em sua complexa constituição estão presentes ativos que promovem a saúde e aliviam diferentes sintomas associados às distintas doenças. Os suplementos a base de compostos vegetais frequentemente oferecem uma mistura fitoquímica com interação aditiva e/ou sinérgica. As plantas têm desempenhado um significativo papel na manutenção da saúde humana e melhora da qualidade de vida por milhares de anos, como uma fonte valiosa de componentes para

temperos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Vários estudos etnofarmacológicos indicam espécies vegetais para o tratamento de distúrbios relacionados com a obesidade com o principal atrativo de que este esquema terapêutico é entendido como mais seguros e eficazes para a saúde do que o tratamento com anorexígenos tradicionais (Heber, 2003).

### 1.2. Planta de Estudo

A planta utilizada neste experimento foi a *Bidens pilosa* L., popularmente conhecida por picão preto. Esta planta pertence à Família Asteraceae; de hábito cosmopolita, de ciclo perene, fatores facilitadores a um cultivo em larga escala para sua utilização com fins medicinais.



**Figura 1.** Foto da espécie *Bidens pilosa* L.

(Fonte: <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/picaopreto-pic.htm>, acessado em 10-11-11)

Dados etnofarmacológicos demonstram sua utilização popular como anti-inflamatória, o que representa um aspecto positivo, considerando a característica da obesidade como uma doença inflamatória crônica (Cottam, e cols., 2004). Na literatura ainda pode-se constatar sua atividade: antiinflamatória para bactérias e fungos, imunomoduladora e imunossupressora devido ao efeito redutor das citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF-  $\alpha$  (Pereira e cols., 1999 e Yoshida e cols.,2006).

Além disso, estudos preliminares realizados por nosso grupo (Pipe-Fapesp – dados não publicados) demonstram que este extrato foi capaz de reduzir o estresse oxidativo

aumentando a atividade da catalase e superóxido dismutase, diminuir o processo inflamatório na derme envolvido no envelhecimento precoce, especialmente por reduzir os níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF-  $\alpha$ , além de manter a integridade celular e aumentar a proteção do DNA frente em células expostas a foto degradação.

O extrato fornecido pela Chemyunion LTDA, foi padronizado das partes aéreas de *Bidens pilosa* L. sendo padronizado em ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido  $\alpha$  linolênico. (PIPE-Fapesp Fase I – processo 07/59310-8). Que são da família dos  $\omega$ -3, conhecida por possuir atividade antiinflamatória essencial para o presente estudo, que considera a obesidade uma doença inflamatória crônica (Faintuch e cols., 2007).

### 1.3. Obesidade

A obesidade é classificada como uma doença crônica não transmissível caracterizada por um distúrbio nutricional consequente do acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo. Atualmente, há um consenso na literatura a respeito da sua etiologia multifatorial, ou seja, suas causas abrangem tanto aspectos biológicos (genéticos e fisiológicos) quanto sociais e históricos (fatores culturais). Sendo a ingestão alimentar inadequada e a redução dos gastos calóricos diários, os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade (Wanderley e Ferreira, 2010).

A incidência da obesidade tem tomado proporções alarmantes no mundo, inclusive nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo uma doença negligenciada pelas políticas públicas de saúde e pelos setores responsáveis pelo desenvolvimento de pesquisas orientadas à busca de novos procedimentos e produtos de valor terapêutico para seu controle e tratamento.

A obesidade, juntamente com o sobrepeso, tem sido considerada um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, especialmente por serem os principais fatores de risco para inúmeras doenças crônicas, como a doença coronariana, *diabetes mellitus*, hipertensão e alguns tipos de tumores (Repetto e cols., 2003), as quais estão associadas à altas taxas de mortalidade. Dados epidemiológicos mostram que, nos EUA, 50% dos adultos possuem sobrepeso, enquanto que 22% são considerados obesos, dados que se repetem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, inclusive no Brasil. Uma recente revisão revela que aqui existem 31,2% de indivíduos do sexo masculino com sobrepeso e 10,7% considerados obesos, e entre as mulheres, 29,2% apresentam sobrepeso e 13,8% são obesas

(Ford e Mokdad, 2008). Em adição, a prevalência da obesidade cresceu 2,7% durante 1974-1975 e 8,8% durante 2002-2003 entre os homens e, 7,4% para 13,0% entre as mulheres (Monteiro e cols., 2007).

Índices de prevalência entre crianças e adolescentes também têm crescido no Brasil, sendo que entre 1975 a 1997 este índice variou de 2,9% para 13,1% entre os homens e de 5,3% a 14,8% entre as mulheres (Wang e cols., 2002). Os custos diretos e indiretos da obesidade nos EUA foram estimados em 117 bilhões de dólares no ano de 2000 (Ford e Mokdad, 2008). No Canadá, os custos diretos de tratamento foram da ordem de 1,6 bilhões de dólares e os indiretos de 2,7 bilhões de dólares, representando cerca de 2,2% do total de gastos em saúde no país (Katmarzyk e Janssen, 2004). Embora no Brasil os custos da obesidade não sejam conhecidos, se estimou em 2001 que estes custos representaram 1,08% do total das hospitalizações entre homens e 3,07% entre as mulheres (Sichieri e cols., 2007).

Devido ao aumento da incidência da obesidade na população e diante do fato dos anorexígenos tradicionais apresentarem efeitos colaterais indesejados (Thurairajah e cols., 2005; De Simone & D'Addeo, 2008; Slovacek e cols., 2008; Karamadoukis e cols., 2009). É necessário investigar novos produtos que visam o tratamento e/ou prevenção da mesma.

## 2. OBJETIVO

Padronizar o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Estudar os efeitos do tratamento com o produto proposto:

- avaliando-se a influência do tratamento sobre o aumento ou redução da ingesta;
- avaliando-se a influência do tratamento sobre o aumento ou redução do peso corpóreo;
- determinando-se os efeitos tóxicos do extrato padronizado.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1. Padronização do modelo de indução a obesidade para camundongo Swiss por dieta hipercalórica

Na literatura não consta nenhum modelo de indução a obesidade com dieta hipercalórica enriquecida com lipídios para camundongo Swiss, por isso foi necessário a padronização um novo modelo.

Com base em artigos de revisão sobre indução a obesidade e existe uma relação direta entre a ingestão de alimentos com alto teor lipídico e o ganho de peso, nesse caso específico a obesidade. No geral dietas que contenham mais de 30% do seu valor energético proveniente de lipídios, geram uma propensão ao desenvolvimento de obesidade (Harari e Thibault, 2010 ).

Conhecendo a porcentagem calórica proveniente dos lipídios presente na ração hipercalórica para roedores presente no mercado (Quadro 1) e comparando com dados da literatura apresentados acima. Pudemos selecionar com convecção a ração hipercalórica sabor chocolate RC Focus 2415 da marca Agrocere<sup>®</sup>, para a indução a obesidade nos animais.

A ração hipercalórica RC Focus 2415 é constituída de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplementos mineral e vitamínico. A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hipercalórica, mensurada pela empresa Agrocere<sup>®</sup>, está apresentada no Quadro 1. Os perfis de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, estão apresentados nos Quadros 2, 3 e 4, respectivamente.

**Quadro 1-** Macronutrientes e micronutrientes da ração hipercalórica para roedor, RC Focus 2415 Agrocere<sup>®</sup>.

Componentes	Rações %	
	Padrão	Hipercalórica*
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias de lipídio	12,3	49,2

Fonte: Dados mensurados pela empresa Agrocere<sup>®</sup>.

**Quadro 2.** Perfil de aminoácidos das rações.

Aminoácidos	Rações (%)	
	Padrão	Hiperclórica*
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,39	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

**Quadro 3.** Perfil de carboidratos das rações.

Carboidratos	Rações (%)	
	Padrão	Hiperclórica*
Rafinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Ramnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

**Quadro 4.** Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações.

Ácidos Graxos	Rações (%)	
	Padrão	Hiperclórica*
Capróico (C6:0)	0,00	0,02
Caprílico (C8:0)	0,03	0,03
Cáprico (C10:0)	0,02	0,05
Láurico (C12:0)	0,33	0,25
Mirístico (C14:0)	0,30	0,33
Palmítico (C16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (C17:0)	0,02	0,08
Estearico (C18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (C16:1)	0,06	0,15
Oléico (C18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (C18:2n6c)	47,10	40,83
$\alpha$ -Linolênico (C18:3n3)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

A padronização do novo modelo de obesidade ocorreu em conjunto com outras três alunas de Iniciação Científica por isso utilizamos 216 animais sendo: 196 tratados com a ração hipercalórica e 20 tratados com ração normocalórica.

### 3.2. Obtenção do extrato da *Bidens pilosa* L.

As amostras de *Bidens pilosa* L. foram oriundas de cultivo sob regime de agricultura orgânica certificada pela ECOCERT Brasil (Santa Rosa de Lima / Santa Catarina / BR), cuja identificação taxonômica foi certificada por pesquisadores do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu (Prof. Dr. Roberto Rodella e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia S. Maiomoni-Rodella), cuja exsicata foi depositada no Herbário da mesma instituição (Herbário BOtu). Após a colheita, as partes aéreas da espécie foram desidratadas e trituradas. O extrato foi obtido utilizando o sistema de extração supercrítica marca Autoclave Engineers à 300 bar, 40°C e vazão de CO<sub>2</sub> de 5 LPM. O extrato assim produzido foi padronizado (p/p) em fitol (0,139%) e ácidos graxos (palmítico 30%, oléico 27%, linoléico 24,3%, linolênico 3,8%, entre outros) através de técnica da cromatografia gasosa. O extrato foi produzido e fornecido pela empresa Chemyunion Química Ltda (Sorocaba-SP), que já possui o mesmo padronizado para uso comercial com o nome de “Revinage<sup>®</sup>”. O extrato foi administrado na dose de 100mg/Kg por via oral utilizando-se Tween 80 a 8% em metilcelulose a 1%. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo por gavagem.

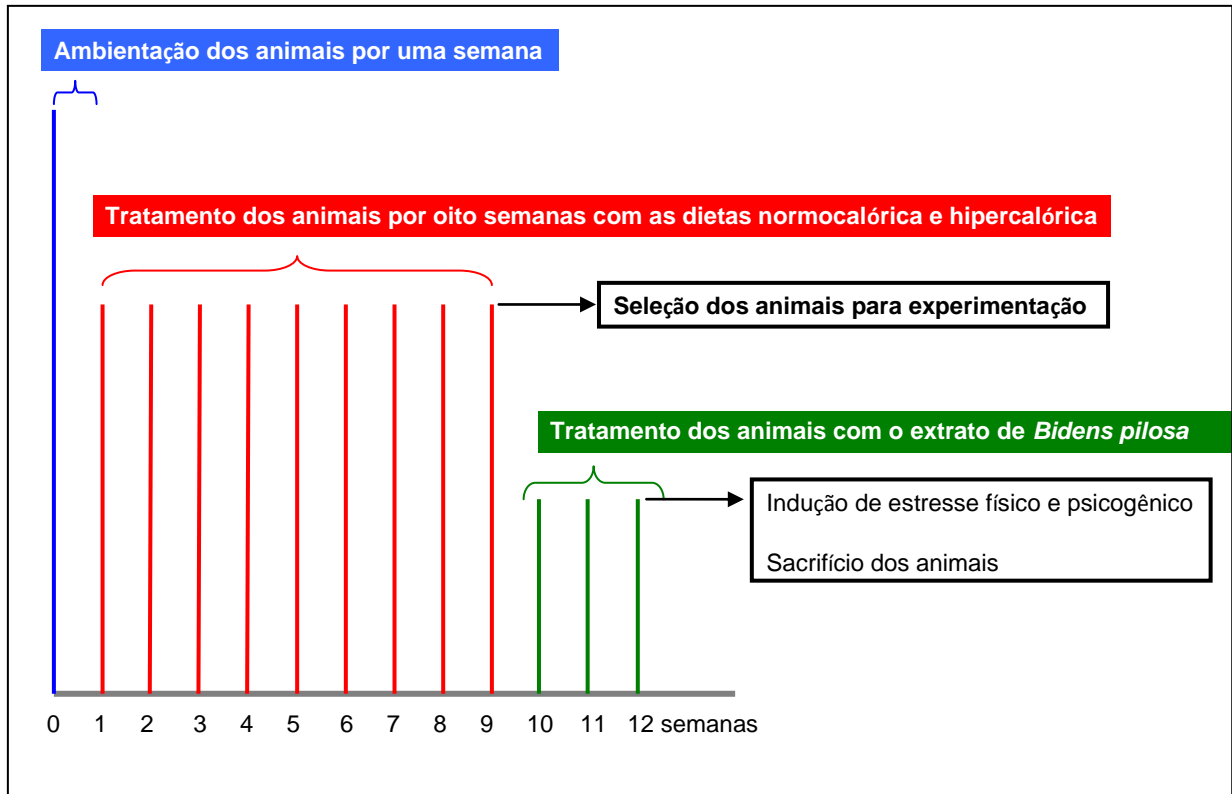
### 3.3. Animais

Utilizamos camundongos albinos machos da linhagem Swiss. Todos os animais com 25 dias de vida, recém desmamados, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, *Campus* Botucatu. Os animais foram distribuídos em caixas de policarbonato cristal, na rack ventilada ALESCO<sup>®</sup>. Cada caixa conteve quatro animais e possuiu substrato de Pinnus autoclavado. Durante a fase experimental os animais foram mantidos em sala climatizada sob temperatura constante 21° C +/- 2°C, com ciclo 12h claro/escuro.

### 3.4. Delineamento Experimental Geral

Para a indução a obesidade os animais foram subdivididos em dois grupos: o grupo com dieta hipercalórica e o grupo com dieta normocalórica;

Para o tratamento com o extrato de Picão Preto foram selecionados os animais que obtiveram um delta peso  $\geq 13g$  do tratamento de indução a obesidade. Dessa maneira o delineamento geral do experimento está descrito na Figura 2.



**Figura 2.** Delineamento experimental utilizado no presente estudo.

Do delineamento durante o tratamento com *Bidens pilosa* L. utilizamos 3 grupos: Animais normais (n=10), Animais obesos (n=22) Pair feeding (n= 24) e Grupo tratado com Bidens (n=21).

O protocolo experimental, foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Protocolo 147-CEEA

### 3.5. Tratamento dos animais obesos com o extrato da *Bidens pilosa* L.

Os animais obesos selecionados para o tratamento, com o extrato supercrítico da *Bidens pilosa* L., foram os animais que obtiveram o delta peso maior ou igual a 13g durante a indução a obesidade com a ração hipercalórica. Sendo administração do extrato por via oral e gavagem, tendo duração de 21 dias ininterruptos.

A troca da ração hipercalórica sabor chocolate, dada aos animais obesos, à ração padrão ocorreu um dia antes do início do tratamento. Durante o tratamento os animais dos grupos: Bidens, Animais obesos e Animais normais (Branco) receberam ração e água *ad libitum*. Somente os animais dos grupos Pair Feeding, sofreram restrição alimentar de 30% e água *ad libitum*. O cálculo à restrição alimentar de 30% dos Grupos pair-feeding foi embasado no consumo de ração do dia anterior do Grupo Controle.

As doses do extrato utilizadas na gavagem, para o Grupo Tratado, obedeceram a concentração de 100 mg/ Kg. Por isso foi necessário a obtenção do peso diário de todos os camundongos para o calculo da dose diária individual, já que essa variou diretamente de acordo com o peso.

O Grupo animais normais, animais obesos e pair feeding receberam gavagem somente com metilcelulose e Tween 80 a 8% para mimetizar o agente estressor - gavagem, do grupo Bidens.

### 3.6. Avaliação Geral

O peso dos animais e o consumo de ração padrão Agroceres® foram mensurados durante todo o período de indução a obesidade e durante o tratamento com a planta até o 22º dia antes da morte dos animais.

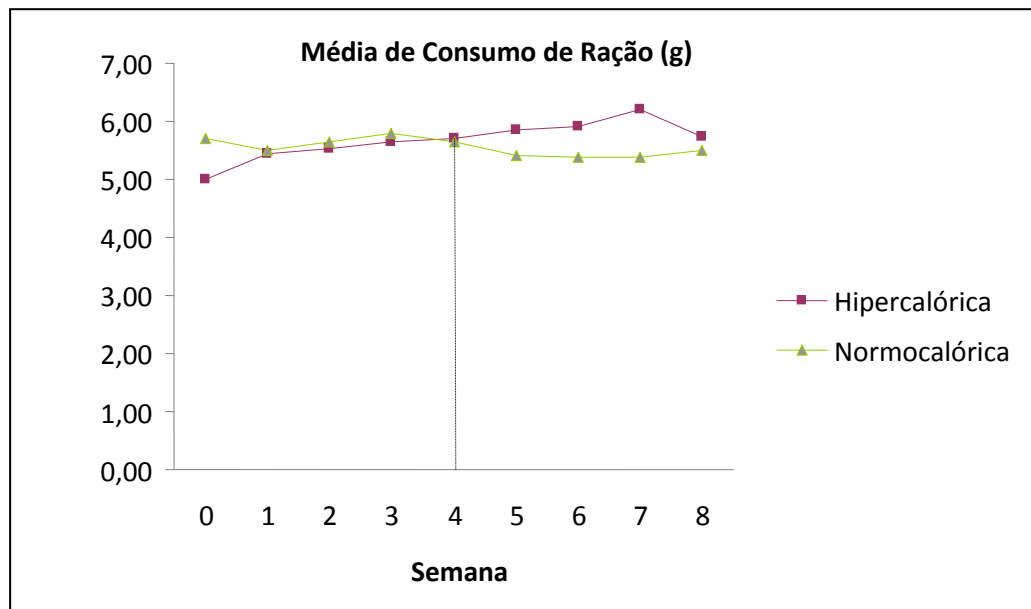
Os órgãos (coração, cérebro, pulmão, rim, baço, fígado e testículos) foram mensurados e analisados macroscopicamente para verificar se houve alterações no peso e/ou na coloração do mesmo, podendo ser um indicativo de toxicidade do extrato teste.

### 3.7. Análise Estatística

No tratamento com *Bidens pilosa* L., os dados são paramétricos e contínuos, sendo variação amostral independente. Para as amostras dependentes a utilização de ANOVA seguida por teste *a posteriori* por Dunnet é indicada e teste T. Significância estatística sempre considerando o  $P \geq 0.05$  na análise realizada no programa estatístico Instat®.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a aclimação dos animais nas condições laboratoriais descritas, os animais passaram a receber as diferentes dietas, normocalórica e hipercalórica, esta segunda com o objetivo de promover obesidade nos animais. O consumo de ambas as dietas pelos animais não diferiu significativamente ao longo das oito semanas de acompanhamento. Curiosamente, se verificou que a partir da quarta semana houve aumento do consumo de dieta hipercalórica em relação ao consumo de dieta normocalórica (Figura 3), porém o esperado, devido ao alto teor de calorias, seria um menor consumo de dieta hipercalórica.

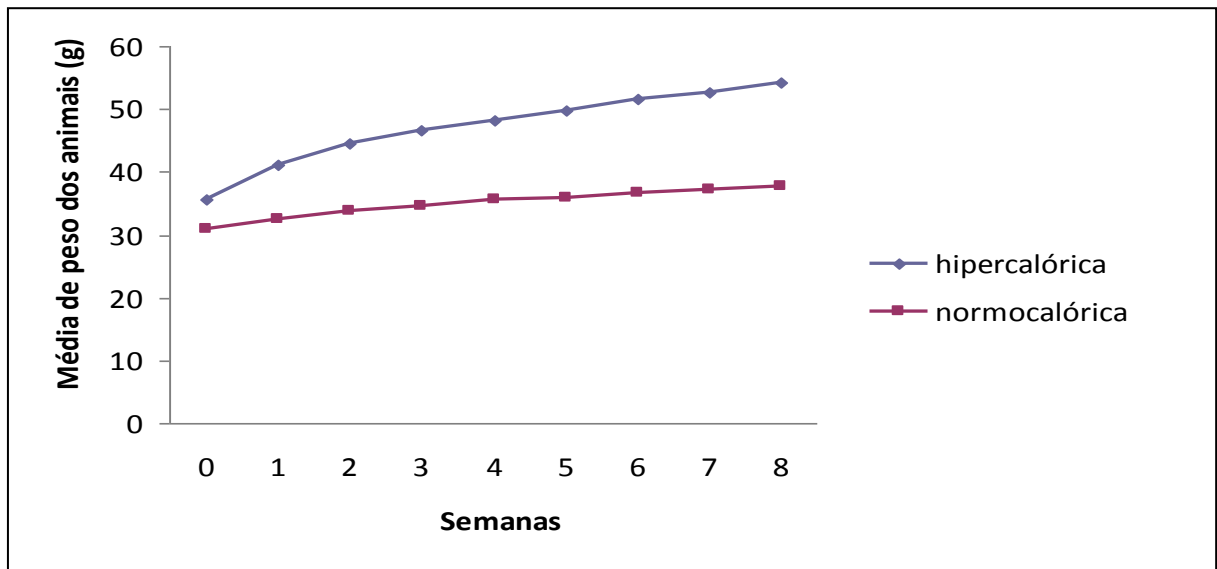


**Figura 3.** Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento. Valores expressos em média.

Esse aumento no consumo pode ser compreendido devido a boa palatabilidade da ração hipercalórica, de sabor chocolate.

O consumo da ração hipercalórica induziu um maior ganho de peso nos animais, como era esperado, a partir da terceira semana de dieta (Figura 4). Na oitava semana, a diferença de peso médio dos animais tratados com dieta hipercalórica em relação aos animais tratados com dieta normocalórica foi de 16,79 g, ou seja, os animais estavam 44% acima do peso dos animais normais. Conforme relatado por Hariri e Thibault, (2010) em uma elegante revisão sobre modelos experimentais de obesidade induzida por dieta, há um consenso entre os pesquisadores de que diferenças de 10-25% de peso corporal maior que os animais normais é considerada uma obesidade moderada, enquanto que um ganho de peso maior que 40% é

considerada obesidade severa. Com base nesta revisão, assim como em outros estudos recentes (He e cols., 2010; Dean e cols., 2009; Araújo e cols., 2007; Pitombo e cols., 2006; Klaus e cols., 2005; Harris e cols., 2003; Van Heek e cols., 1997), podemos considerar que a metodologia utilizada citados acima, que normalmente necessitam de 10-12 semanas para atingir uma diferença de ganho de peso superior a 40%.



**Figura 4.** Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas. Dados expressos em média.

Considerando-se valores absolutos, os animais que receberam dieta normocalórica apresentaram uma média de peso corpóreo no primeiro dia de fornecimento da dieta de  $30.8 \pm 1.0$  e após 8 semanas de dieta normocalórica atingiram o peso médio final de  $37.6 \pm 1.4$ g, com uma variação total de peso de 6.8 ( $\Delta$  peso). No grupo dos animais que receberam dieta hipercalórica, o peso médio inicial foi de  $34.2 \pm 1.0$ g, enquanto que o peso médio final foi de  $52.3 \pm 1.4$ g, com um  $\Delta$  peso de 18.1 (Tabela 1), confirmando a indução de obesidade com o uso da dieta padronizada e utilizada no presente projeto.

**Tabela 1.** Variação do peso corpóreo dos animais de diferentes grupos experimentais.

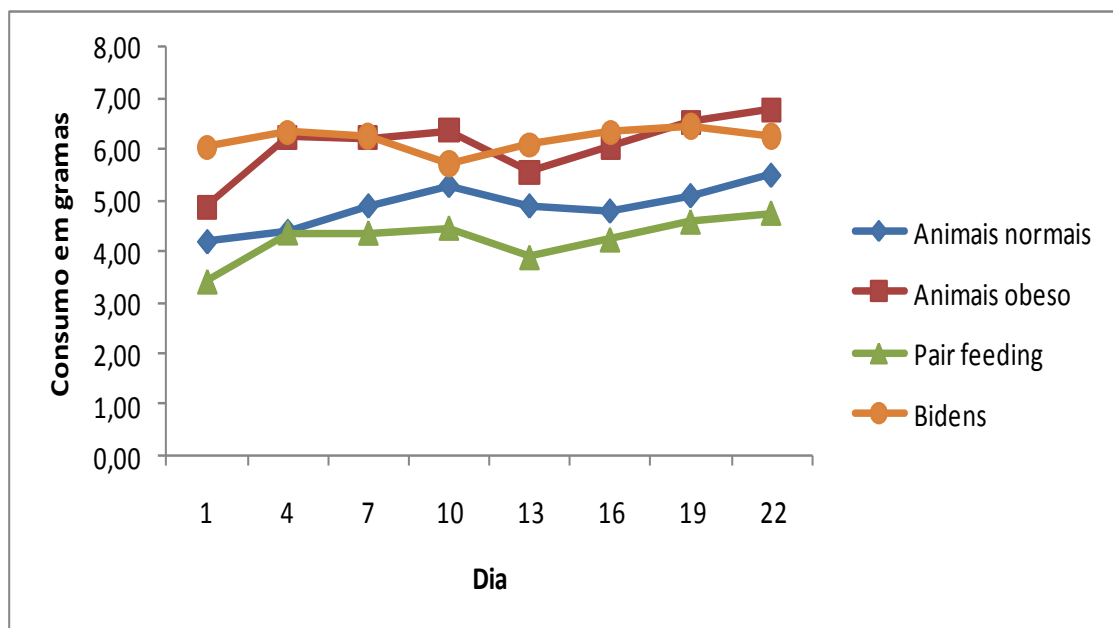
Grupos experimentais	Peso inicial	Após 8 semanas	$\Delta$ peso
Animais normais (dieta normocalórica)	$30.8 \pm 1.0$	$37.6 \pm 1.4$	6,8
Animais obesos (dieta hipercalórica)	$34.2 \pm 1.0$	$52.3 \pm 1.4$ **	18,1

Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\* diferença significativa em relação ao grupo de animais com dieta normocalórica,  $p < 0.05$

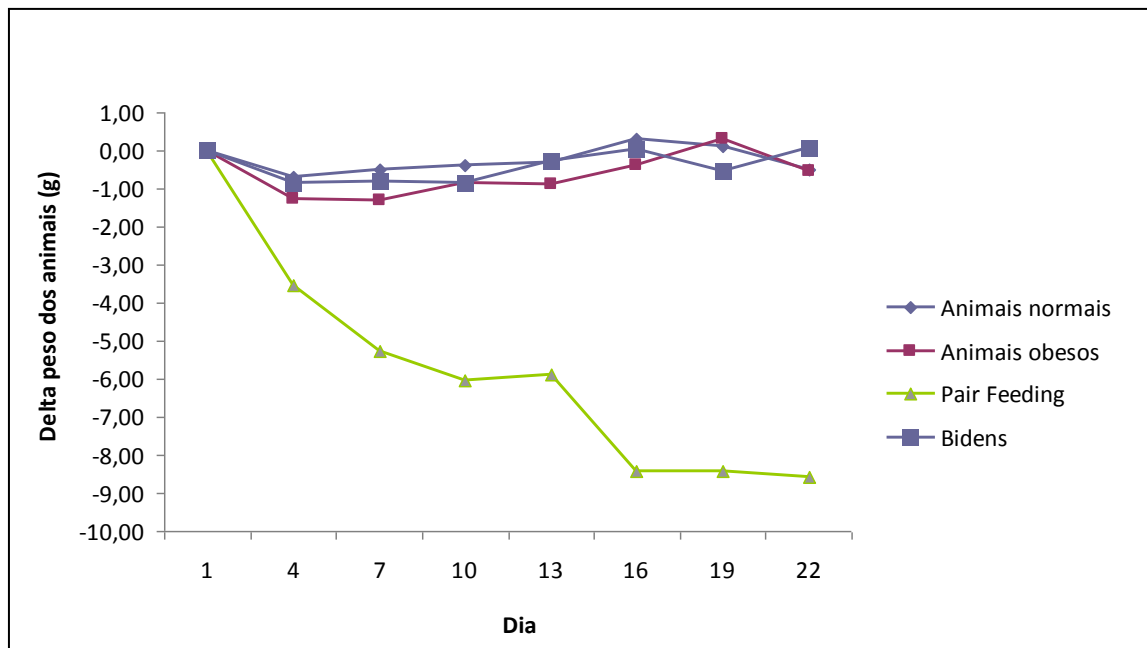
Após as oito semanas de tratamento dos animais com as duas diferentes dietas (normocalórica e hipercalórica), esses foram divididos nos diferentes grupos descritos

(normais e obesos) e foram tratados durante 21 dias com o extrato de *Bidens pilosa* L. Neste período, todos os animais de todos os grupos receberam a mesma dieta normocalórica. Foi verificado que o consumo da ração não difere significativamente ao longo dos 21 dias, apenas se detectando que o consumo de ração pelos animais dos grupos normais e *pair feeding* sempre é inferior ao consumo dos animais obesos sem tratamento e com os diferentes tratamentos (Figura 5).

Na figura 6 pode ser verificada a variação do peso corpóreo dos animais tratados com o extrato. Nesta figura pode-se ainda observar que o grupo *pair feeding* apresenta um peso corporal inferior a todos os grupos devido à restrição de dieta, conforme descrito.



**Figura 5.** Média de consumo dos diferentes grupos experimentais de ração normocalórica durante 21 dias após a indução da obesidade. Dados expressos em média.



**Figura 6.** Efeito do tratamento com extrato supercrítico de picão (*Bidens pilosa*) no peso dos animais. Dados expressos em média.

Na tabela 2 pode-se verificar a variação do peso dos animais durante todo o procedimento experimental. Todos os grupos de animais obesos apresentaram ganho de peso similar aos animais do grupo obeso não tratado. Dessa forma, verifica-se claramente que não ocorreu redução no ganho de peso dos animais tratados com a *Bidens pilosa* (Figura 6).

**Tabela 2.** Variação do peso dos animais de diferentes grupos experimentais após 8 semanas de dieta a pós tratamento com os diferentes produtos-teste.

Grupos experimentais	Peso inicial	Após 8 semanas	$\Delta$ peso <sup>1</sup>	Após tratamento	$\Delta$ peso <sup>2</sup>
Animais normais	30,8 $\pm$ 1,0	37,6 $\pm$ 1,4	6,8	36,8 $\pm$ 1,6	-0,8
Animais obesos	34,2 $\pm$ 1,0	52,3 $\pm$ 1,4 **	18,1	51,5 $\pm$ 1,4	-0,8
Pair-feeding	35,1 $\pm$ 1,3	54,0 $\pm$ 1,3 **	18,9	43,0 $\pm$ 1,5 *	-11,0
Animais obesos tratados com a <i>Bidens</i>	35,7 $\pm$ 0,7	54,7 $\pm$ 1,1 **	19,0	54,0 $\pm$ 1,4	-0,7

<sup>1</sup> variação do peso após 8 semanas de fornecimento de dieta, <sup>2</sup> variação do peso após tratamento com os diferentes produtos teste, calculado em comparação ao último dia de fornecimento de dieta hipercalórica. Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M.\* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

Após os 21 dias de tratamento, todos os animais foram mortos e seus principais órgãos retirados e pesados, para avaliar a indicação de estudos de toxicidade ou não do extrato conforme apresentado na Tabela 3. Como pode ser observado, não se encontrou diferença significativa no peso dos órgãos que justifique alguma alteração ou toxicidade por parte do extrato testado.

**Tabela 3.** Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Rins</b>	<b>Coração</b>	<b>Pulmão</b>	<b>Testículo</b>	<b>Cérebro</b>	<b>Hipotálamo</b>
<b>Animais normais</b>	12,92 ± 0,09	3,48 ± 0,13	7,11 ± 0,46	3,87 ± 0,19	4,95 ± 0,38	4,35 ± 0,11	6,00 ± 0,11	1,10 ± 0,04
<b>Animais obesos</b>	12,36 ± 0,12	3,12 ± 0,12	6,00 ± 0,08	3,60 ± 0,07	4,83 ± 0,28	4,20 ± 0,08	5,21 ± 0,11	0,93 ± 0,03
<b>Pair-feeding</b>	11,60 ± 0,09	2,80 ± 0,11	5,97 ± 0,06	3,85 ± 0,08	5,28 ± 0,18	4,44 ± 0,09	5,67 ± 0,09	0,94 ± 0,04
<b>Obesos + Bidens</b>	12,62 ± 0,10	3,23 ± 0,07	5,95 ± 0,05	3,61 ± 0,05	4,81 ± 0,17	4,15 ± 0,06	5,12 ± 0,06	0,85 ± 0,05

Dados expressos em média ± E.P.M.

Devido a não toxicidade do extrato nessa dose, pode-se sugerir estudos em doses mais elevadas, para a averiguação da possível perda de peso corpóreo.

## **5. CONCLUSÃO**

Na dose administrada aos animais experimentais de 100mg/Kg do extrato do picão, não foi obtido nenhum resultado na redução de peso corpóreo, na redução da ingesta alimentar e não foi observado toxicidade.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além desses resultados apresentados, também executamos a padronização de um modelo de indução ao estresse físico e psicogênico. Que será importante para as próximas etapas como, a quantificação das interleucinas e hormônios, a avaliação histológica da pele e a expressão gênica como proposto no o projeto aprovado pela FAPESP mencionado no prólogo Por isso durante a matança dos animais, executamos a seguinte etapa de coleta de amostras. Sendo os animais mortos por decapitação em guilhotina após a sessão de estresse, no 22º dia, após o termino do tratamento. Sendo coletadas amostras de sangue que foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 mim, para separar o plasma sanguíneo e esse foi armazenado em Freezer -80°C.

As amostras coletadas de tecido epitelial do dorso foram armazenadas em cassetes histológicos esses alocados em ALFAC (18: 2: 1) até a realização de laminas histológica para avaliação dos tecidos constituintes da pele.

As amostras coletadas de tecido adiposo peritoneal. Uma pequena amostra deste tecido foi armazenada em cassete histológico alocados em ALFAC (18: 2: 1) para realização de laminas histológica. Também colocamos amostras em Critubos livres de RNase e DNase, para análise de expressão gênica, armazenadas em Freezer -80°C e 300 µl de trizol.

As amostras de hipotálamos coletadas foram essas armazenadas em cassetes histológicos e Critubos. Sendo os cassetes alocados em ALFAC (18: 2: 1) e os Criotubos em Freezer – 80°C e 200µl de trizol.

## 7.REFERÊNCIAS

- Araújo, E.P., Souza, C.T., Ueno, M., Cintra, D.E., Bertolo, M.B., Carvalheira, J.B., Saad, M.J., Velloso, L.A. Influximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinol.* 148(12):5991-5997, 2007.
- Celia Abajo, María Ángeles Boffill, Jaime del Campo, María Alexandra Méndez, Yisel González, Montserrat Mitjans, María Pilar Vinardell. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 319–323, 2004.
- Daniel R. Cottam; Samer G. Mattar; George Eid.; Lewis Kuller; David E. Kelley; Philip R. Schauer. The Chronic Inflammatory Hypothesis for the Morbidity Associated with Morbid Obesity: Implications and Effects of Weight Loss; *Obesity Surgery*, 14, 589-600
- De Simone G, D'Addeo G. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:337–341, 2008.
- Dean, J.T., Tran, L., Beaven, S., Tontonoz, P., Reue, K., Dipple, K.M., Liao, J.C. Resistance to diet-induced obesity in mice with synthetic glyoxylate shunt. *Cell Metabol.* 9:525-536, 2009.
- Ford ES, Mokdad AH. Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):S1-S8, 2008.
- Farmacognosia: da planta ao medicamento/ organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al.-2ª edição rev.- Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 200. Capítulos 1 e 8.
- Hariri, N., Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* 23:270-299, 2010.
- Harris, R.B.S., Bowen, H.M., Mitchell, T.D. Leptin resistance in mice is determined by gender and duration of exposure to high-fat diet. *Physiol. Behav.* 78:543-555, 2003.
- He, M., Su, H., Gao, W., Johansson, S.M., Liu, Q., Wu, X., Liao, J., Young, A.A., Bartfai, T., Wang, M.W. Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. *PLoS One* 5(12):e14205, 2010.
- Heber D. Herbal preparations for obesity: are they useful? *Prim Care* 30: 441-463, 2003.
- Joel Faintuch; Lilian M. Horie; Hermes V. Barbeiro; Denise F. Barbeiro; Francisco G. Soriano; Robson K. Ishida; Ivan Ceconello. Systemic Inflammation in Morbidly Obese Subjects: Response to Oral Supplementation with Alpha-Linolenic Acid. *Ob. Surgery*, 17, 341-347, 2007.
- Karamadoukis L, Shivashankar GH, Ludeman L, Williams AJ. An unusual complication of treatment with orlistat. *Clin Nephrol* 71:430–432, 2009
- Klaus, S., Pültz, C., Thöne-Reineke, C., Wolfram, S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obesity* 29:615-623, 2005.
- Nobuyo Yoshida, Takuro Kanekura, Yuko Higashi, Tamotsu Kanzaki. *Bidens pilosa* suppresses interleukin-1  $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of mitogen activated protein kinases phosphorylation in normal human. *J. of Dermatology.* 33, 676–683.2006

- Rachel L.C. Pereira , Tereza Ibrahim, Leonardo Lucchetti, Antonio Jorge R. da Silva , Vera Lucia Gonc,alves de Moraes. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. *Immunopharmacology* 43, 31–37. 1999.
- Repetto G, Rizzoli J, Bonatto C. Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: here, there and everywhere. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(6):633-635, 2003.
- Sichieri R, do Nascimento S, Coutinho W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad Saude Publica* 23:1721–1727, 2007.
- Slovacek L, Pavlik V, Slovackova B. The effect of sibutramine therapy on occurrence of depression symptoms among obese patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:43–44, 2008.
- Thurairajah PH, Syn WK, Neil DA, Stell D, Haydon G. Orlistat (xenical)- induced subacute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17:1437–1438, 2005.
- Van Heek, M., Comptom, D.S., France, C.F., Tedesco, R.P., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Sybertz, E.J., Stradeer, C.D., Davis Jr, H.R. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J. Clin. Invest.* 99:385-390, 1997.
- Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in United States, Brazil, China and Russia. *Am J Clin Nutr* 75:971-977, 2002.
- Wanderley NE, Ferreira VA. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010; 15(1):185-194