

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ATIVIDADE INIBITÓRIA IN VITRO SOBRE A LIPASE
PANCREÁTICA DE BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS
AMAZÔNICAS

Bolsista: Thaires Suelen Silva Lino, CNPq

MANAUS
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0037/2009

ATIVIDADE INIBITÓRIA IN VITRO SOBRE A LIPASE
PANCREÁTICA DE BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS
AMAZÔNICAS

Bolsista: Thaires Suelen Silva Lino, CNPq
Orientador: Profº Drº Emerson Silva Lima

MANAUS

2010

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
1.INTRODUÇÃO	7
2.OBJETIVOS	8
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 Atividade de enzimas lipases	9
3.2 Inibição da lipase pancreática	12
3.3 Bioativos e novas pesquisas.....	15
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Obtenção dos Bioativos	17
4.2 Ensaio de Atividade Inibitória	17
5.RESULTADOS.....	19
6.DISSCUSSÃO DE RESULTADOS.....	29
7.CONCLUSÃO	31
8.REFERÊNCIA.....	33

RESUMO

As lípases pancreáticas são capazes de atacar lipídios em gotículas emulsificadas, clivando principalmente triglicerídeos com o fim de facilitar sua absorção. No mercado existem drogas inibidoras da lipase intestinal capazes de diminuir em 30% a absorção de gorduras. Com o uso destas substâncias, além da perda de peso, ocorre a melhora do perfil lipídico. Esse estudo teve por objetivo buscar por novas fontes de inibidores sobre a lipase pancreática a partir de bioativos sintéticos e derivados de plantas amazônicas, mais especificamente avaliar de forma qualitativa o efeito de bioativos sobre a inibição da enzima lipase pancreática e determinar a concentração inibitória 50% (CI₅₀) desses bioativos sobre a enzima. Ensaios de atividade inibitória foram realizados com extratos e derivados sintéticos. As espécies que apresentaram melhor atividade inibitória (CI₅₀ em µg/mL) foram: *Byrsonima japurensis* (26,55±1,5), *Passiflora nitida* (32,04±2,5), *Calycophyllum spruceanum* (49,02±2,0), *Pourouma sp.* (96,57±7,46), *Cecropia purpurascens* (141,75±3,2), *Vismia guianensis* (232,1±11), *Pourouma vilosa* (262,57±35) e *Coussapoa asperifolia magnifolia* (319,49±27). Os derivados sintéticos testados não apresentaram atividade inibitória significativa. A CI₅₀ da droga padrão Orlistat determinada para efeito comparativo foi de 0,0012 µg/mL. A busca por novas fontes naturais de atividade inibitória *in vitro* sobre a lipase pancreática pode representar um novo ponto de partida para uma investigação mais aprofundada no desenvolvimento medicamentos ou alimentos funcionais e isolamento de compostos ativos eficazes no tratamento ou prevenção de doenças metabólicas.

ABSTRAT

The pancreatic lipases are capable alone to attack the emulsified lipid droplets, breakdown triglycerides and increasing its absorption. In the market there are drugs that inhibit intestinal lipase able to decrease by 30% the absorption of fats. Besides weight loss, there is the improvement of lipid profile. This study aims at searching for new sources of inhibitors of pancreatic lipase from bioactive compounds extracted from Amazonian plants, specifically to evaluate qualitatively the effect of bioactive compounds on the inhibition of pancreatic lipase and determine 50% inhibitory concentration of bioactive extracted from Amazonian plants on the pancreatic enzyme lipase. Tests for inhibitory activity (CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$) were performed with extracts and semi-synthetic derivatives. The *Byrsonima japurensis* ($26,55\pm 1,5$), *Passiflora nitida* ($32,04\pm 2,5$), *Calycophyllum spruceanum* ($49,02\pm 2,0$), *Pourouma sp.* ($96,57\pm 7,46$), *Cecropia purpurascens* ($141,75\pm 3,2$), *Vismia guianensis* ($232,1\pm 11$), *Pourouma vilosa* ($262,57\pm 35$) and *Coussapoa asperifolia magnifolia* ($319,49\pm 27$) showed highest inhibitory activity. The synthetic derivatives did not show reproducibility for testing inhibitory activity. The 50% inhibitory concentration of standard drug Orlistat given for comparison was $0,0012 \mu\text{g/mL}$. The search for new natural sources of inhibitory activity in vitro on pancreatic lipase may represent a new starting point for further research in the development of medicines or functional foods and isolation of active compounds effective in treating and preventing of metabolic diseases.

1. INTRODUÇÃO

Lipase é uma enzima que, no organismo, degrada os triacilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol (BOREL et al, 1989). Devido ao excesso de lipases, refeições lipídicas normais são rapidamente digeridas, e um forte inibição de ambas as lipases gástricas e pancreáticas é necessárias para diminuir a absorção de lipídios. No mercado já existem medicamentos capazes de realizar essa função. O Orlistat, um derivado hidrogenado da lipstatina sintetizado quimicamente, age por inibição parcial da atividade das lipases gástrica, pancreática e carboxil-ester no trato gastro-intestinal, reduzindo a hidrólise dos triglicéridos ingeridos e impedindo a absorção de aproximadamente 30% da gordura dietária ingerida (ZHI et al, 1996).

Na atual sociedade as chamadas “doenças modernas”, como a obesidade, estão tornando-se corriqueiras e junto com seus efeitos desejados, os medicamentos também podem provocar algumas reações adversas. Propriedades inibitórias da atividade da lipase em polifenóis de chá (NAKAI et al. 2005), em plantas (BEN, 1999) já são descritas na literatura.

Diante de grandes propriedades farmacológicas presente nos bioativos da Amazônia, a busca por novas fontes naturais de atividade inibitória in vitro sobre a lipase pancreática pode representar um novo ponto de partida para uma investigação mais aprofundada no desenvolvimento de alimentos funcionais e isolamento de compostos ativos eficazes no tratamento e prevenção da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Buscar por novas fontes de inibidores sobre a lipase pancreática a partir de bioativos extraídos de plantas amazônicas.

2.2 Específicos:

2.2.1 Avaliar de forma qualitativa o efeito de bioativos sobre a inibição da enzima lípase pancreática.

2.2.2 Determinar a concentração inibitória 50% de bioativos extraídos de plantas amazônicas sobre a enzima lípase pancreática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Atividade de enzimas lipases

Lipases são enzimas hidrolíticas presente em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias que hidrolisam os glicerídeos (lipolíticas), secretadas pelo pâncreas sob forma fracamente ativa. Sua atividade é potencializada no duodeno por diversas substâncias entre elas os ácidos biliares, Ca^{++} e alguns aminoácidos e peptídeos. Seu pH ótimo varia (7 a 8,8), elevando-se em razão direta do comprimento de cadeia dos ácidos graxos do glicerídeos. A atividade da hidrolise de glicerídeos pela lípase pancreática aumenta com (1) o peso molecular dos ácidos graxos componentes, (2) grau de sua insaturação e (3) numero de ácidos graxos no glicerídeo. Assim, pois, os triglicerídeos de alguns ácidos, o oléico e o linoléico, por exemplo, sofrem hidrolise com maior rapidez que os diglicerídios e os triglicerídeos de ácidos de cadeia curta, tal como o butírico. Em geral, as gorduras são atacadas mais ativamente que outros ésteres de ácidos graxos (Figura 1) (CANTAROW A., 1968).

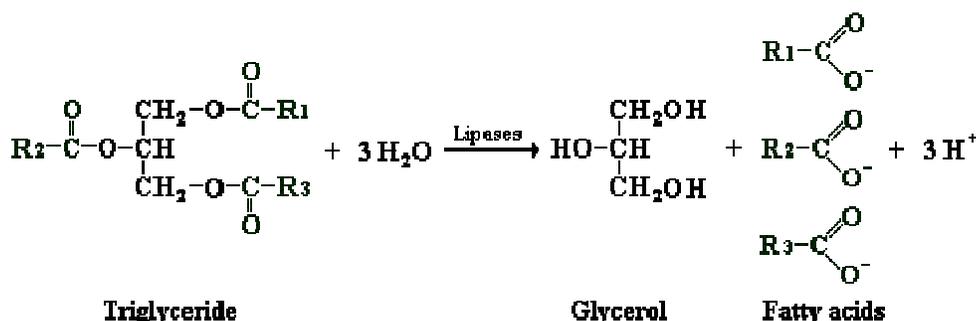


Figura 1: Hidrólise de triglicérides em glicerol e ácidos gordos por lipases (Adaptado de Stryer, Lubert;- Biochemistry - fourth edition; New York: W. H. Freeman and Company ,ISBN 0-7167-2009-4 ,1995).

As lipases também atuam "in vitro" como catalisadores em diversas reações (figura 2), com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (FORESTI E FERREIRA 2006; GHANEM e ABOUL-ENEIN, 2004; RASSY et al., 2004; GOTOR et al., 2002, KRISHNA E KARANTH 2001).

Reação de Hidrólise



Reação de Esterificação

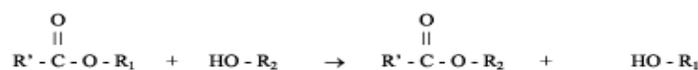


Reação de Interesterificação

Acidólise (reação de éster com ácido)



Alcoólise (reação de éster com álcool)



Transesterificação (reação de éster com éster)

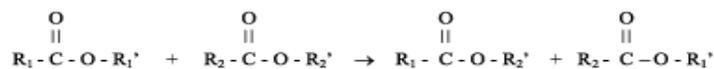


Figura 2: Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisada por lipases (Adaptado de Carvalho, P. Quím. Nova vol.26 nº.1 São Paulo Jan./Feb. 2003).

A cinética da reação catalisada por lipase lipolítica não pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten uma vez que só é válida para as reações que levam lugar na fase homogênea. O estudo cinético das reações lipolíticas relata um fenômeno de

"ativação interfacial", que descreve que a atividade de lipases é reforçada para a substratos insolúveis que forma uma emulsão (JAEGER et al., 1998). O 3-D estudos fornecem a estrutura explicação da ativação interfacial. O sitio ativo da lipase foi encontrada para ser coberto por uma superfície loop, conhecida como a tampa (ou aba). “Após a ligação da interface, essa tampa se afasta, tornando a forma “fechada” da enzima em forma “aberta” com o sítio ativo agora acessível ao substrato que está presente no solvente. (JAEGER et al. 1999).

A eficiência de absorção de triglicérides é um dos principais fatores que contribuem para os níveis plasmáticos de triglicerídeos, porém, os triglicerídeos da dieta não são absorvidos como tal até hidrolisado a ácidos graxos livres por lipases triacilglicerol (VERGER, 1997).

As funções fisiológicas da família das lipases gástricas e pancreáticas durante a lipólise in vivo têm sido estudadas (CARRIERE et al, 1993). A enzima que postulou ser o principal participante na digestão lipídica é a lipase pancreática gastrointestinal com a sua Colipase cofactor. A contribuição exata da lipólise com lipase carboxil éster e / ou fosfolipase até agora não foi determinada quantitativamente, mas foi demonstrado em estudos anteriores que a gástrica e enzimas pancreáticas têm uma ação concertada in vitro (CHEN et al, 1989 ; LINDSTROM et al, 1988).

3.2. Inibição da lipase pancreática

A lipase pancreática é uma enzima sintetizada pelas células pancreáticas. No duodeno esta enzima encontra-se inativa devido a presença de sais biliares, sendo necessária a presença de outra proteína pancreática, a colipase (11kDa), para exercer sua atividade hidrolítica dos ésteres de triacilgliceróis solubilizados nas micelas (RICKETTIS & BRANNON, 1994; BRODY, 1994; ROS, 2000). É uma enzima regulada pelos lipídios dietéticos, sendo já estabelecidos que os ácidos graxos poliinsaturados aumentam sua síntese e atividade (RICKETTIS & BRANNON, 1994).

Enzimas pancreáticas têm sido estudadas como parte do tratamento para a doença celíaca. A doença celíaca é uma condição na qual o glúten da dieta provoca danos ao trato intestinal. Os sintomas incluem dores abdominais, inchaço, perda de peso e cansaço. Pessoas com doença celíaca devem seguir uma rigorosa dieta que não inclui glúten. Lipase, juntamente com outras enzimas pancreáticas, pode ajudar no tratamento dessa condição, reforçando os benefícios da dieta isenta de glúten. Em um estudo clínico de 40 crianças com doença celíaca, por exemplo, aqueles que receberam terapia enzima pancreática (incluindo lipase), demonstrou um ligeiro aumento de peso em comparação com aqueles que receberam placebo. A melhoria no peso ocorreu no primeiro mês de utilização. Tomando o suplemento de enzimas pancreáticas de forma suplementar por um mês não conduz a um ganho de peso maior. Num estudo que envolveu 18 pessoas, suplementos contendo Lipase e outras enzimas pancreáticas demonstraram a capacidade de reduzir timpanismo do estômago ou ceco (bloating), gases e sensação de desconforto após refeição rica em gorduras. Como alguns desses sintomas são associados à síndrome de intestino irritável, algumas pessoas com esta

condição podem experimentar melhoras com o uso de enzimas pancreáticas (CARROCCIO A; et al., 1995).

No mercado já existem formulações comerciais inibidoras da absorção intestinal de gorduras. O mais utilizado, Orlistat ou tetra-hidrolipstatina (cápsulas de 120mg), é um inibidor da lipase intestinal que diminui em 30% a absorção de gorduras (Figura 3). Além da perda de peso, ocorre melhora do perfil lipídico. Os estudos mais prolongados de uso desta droga têm mostrado manutenção da perda de peso em longo prazo. O Orlistat tem também boa tolerância e os efeitos colaterais mais frequentes são diarreia com fezes gordurosas e flatulência. Um estudo multicêntrico em 391 diabéticos tratados com Orlistat (360mg) por um ano, mostrou perda de peso duas vezes maior do que com placebo inicial após um ano, com significativa melhora do controle e do perfil lipídico e diminuição da dose de hipoglicemiante (WEINTRAUB, M. et al, 1991).

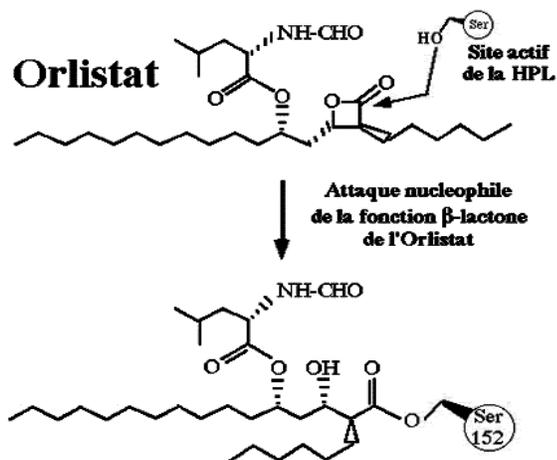


Figura 3: Mecanismo de inibição da lipase pancreática por OrlistatTM (tetrahydrolipstatin) (Adaptado de eipl.cnrs-mrs.fr.)

A inativação da atividade lipolítica para controlar a infecção de microrganismos, a inibição da lipase digestiva para controle da obesidade, a estimulação da lipase metabólica para diminuir a lipemia ou o uso de lipase pancreática suplementar para

controle da fibrose cística são exemplos de como a modulação destas enzimas têm interesse médico (MUKHERJEE, 2003).

É relatado como um potente inibidor gástrico e pancreático, lipase carboxilester (HADVAY et al., 1988), e mostrou-se eficaz para o tratamento da obesidade humana (HAUPTMAN et al., 1992; DRENT et al., 1995; SJOSTROM et al., 1998). Algumas proteínas hidrofóbicas como o soro albumina em concentrações mais micromolar são conhecidos por inibir a atividade da lipase (GARGOURI et al., 1984), interferindo com a absorção da lipase em uma interface óleo-água (BROCKERHOFF, 1974).

Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria do óleo e dos alimentos (HOSHINO et al., 1990), e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos (HANSON, 1990).

Um gene da lipase de *Staphylococcus epidermidis* sobre-expressos em *Escherichia coli* produziu um lipase com eficiência catalítica aumentada e alteraram a especificidade de substrato. Ele catalisou a esterificação em meio aquoso, que foi mais adequado no processamento de alimentos. Os produtos obtidos foram considerados naturais e diretamente empregadas na indústria de alimentos. Eles encontraram grande aplicação na síntese de sabor, os vinhos, cozido alimentos, emulsificante, produtos farmacêuticos e produtos lácteos produtos (SHAW, 2003).

3.3. Bioativos e Novas Pesquisas

A *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et MAXIM.) é uma planta arbustiva, pertencente à família Araliaceae, que é comumente distribuída no nordeste da Ásia. Diferentes partes da planta têm sido amplamente utilizadas como medicamentos chineses tradicionais para o tratamento de uma variedade de doenças humanas, tais como as doenças isquêmicas do coração, neurastenia, hipertensão, artrite, e tumores (Ben Cão. Z, 1999). Recentemente, temos relatado quinze triterpenóides saponinas das folhas de *A. senticosus* exibirem atividade inibitória sobre lipase pancreática *in vitro* (LI. J et al, 2007)

A inibição por polifenóis de lipases tem vindo a ser alvo de estudo dado o interesse existente na sociedade atual em métodos naturais e simples para controlo da obesidade e deslipidemias. De entre os efeitos geralmente atribuídos aos polifenóis de chá estão as propriedades antiobesidade e hipocolesterolemicas (KOO et al. 2004).

Num estudo extensivo das propriedades inibitórias de polifenóis de chá sobre a atividade de lipase pancreática foram estudados 54 polifenóis presentes em chá semi-fermentado (oolong). Foi comparada a concentração de composto que é necessária para a obtenção de uma redução de atividade de enzima de 50 %. Verificou-se que de entre os polifenóis mais abundantes em extratos de chá, os mais ativos na inibição de lipase são a epigallocatequina-galato (EGCG) e a galocatequina-galato (GCG) (NAKAI et al. 2005).

É sabido que a gordura proveniente da dieta não é absorvida pelo intestino, a menos que esta tenha sofrido a ação da lipase pancreática. Diante disso, um grupo de chineses confirmou a ação inibitória da quitosana sobre a atividade da lipase pancreática em camundongos. A inibição da hidrólise da gordura dietética pela quitosana pode causar diminuição da absorção intestinal de gordura e reduzir o volume de quilomícron

plasmático. Sabe-se que este, em excesso, pode induzir a hiperlipidemia, obesidade e esteatose (HAN et al., 1999; ZHANG et al., 2008).

A presença de inibidores da lipase também foram relatados em algumas fontes naturais, como o marinho algas (BITOU et al., 1999), soja (GARGOURI et al. 1984; SATOUCHI et al., 1998), trigo (BOREL ET al., 1989; TANI et al., 1995), citros (KAWAGUCHI et al., 1997), Chá de Oolong (HAN et al., 2001) e extrato aquoso de alguns medicamentos ervas (SHIMURA et al., 1992). No entanto, há uma exigência da busca constante por melhores fontes natural inibidores da lípase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos Bioativos

Os bioativos utilizados no presente trabalho foram pelo menos 30 diferentes extratos brutos, frações e substâncias isoladas do banco de extratos do Grupo de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Também foram testados pelo menos 20 derivados sintéticos, os quais foram sintetizados e fornecidos pelo professor Francisco Vitor ferreira da Universidade Federal Fluminense, incluindo triazóis e quinonas.

4.2. Ensaio de atividade inibitória

Para a determinação da atividade lipásica foi utilizado o procedimento de Lee (LEE al et., 1993) com modificações. Foi preparada uma solução (1mg/mL) de lipase pancreática de suíno cru tipo II (Sigma, Steinheim, a Alemanha). Uma solução 10mM de p-nitrofenilpalmitato (PNP) (Sigma, Steinheim, a Alemanha), em acetonitrila foi preparada e somada com etanol para alcançar a concentração final 3.33 mM de PNP. A composição da mistura da reação foi: 20 µL de PNP 3,3 mM, 200µL de Tris-HCl 75mM (pH=7,4) (Sigma, Steinheim, a Alemanha), 20 µL de extrato e 80µL de solução de enzima. A mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos antes do substrato ser somado. No controle positivo foi substituído o bioativo com o mesmo volume a mistura de água: metanol (1:1). A reação foi realizada em microplacas e a absorbância medida a 405nm. Todos os testes foram realizados em triplicatas e amostras em branco sem a enzima serão medidas para cada extrato. A inibição dos bioativos será calcula pela seguinte fórmula: $\text{Inibição} = 100 - (\text{Abs. Extrato} / \text{Abs. Controle}) * 100$.

A partir dos resultados de inibição foram calculados a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática utilizando um teste de regressão linear. Para efeito de comparação, o orlistat foi testado e determinado a CI50.

5. RESULTADOS

Ensaio de atividade inibitória

Para avaliação inicial da atividade inibitória sobre a lipase pancreática, os extratos brutos, frações, substâncias isoladas (tabela 1) e derivados semi-sintéticos (tabela 2) foram testados, onde alguns extratos e substâncias isoladas apresentaram inibição maior que 50%, o que permitiu determinar a CI50, posteriormente.

Extratos Brutos, Frações e Substâncias Isoladas	Média de Inibição (%)	Desvio Padrão
<i>Maytenus guianensis</i>	21,7	10,8
<i>Vismia guianensis</i>	58,5	5,5
<i>Arrabidaea chica</i>	19,2	3,5
<i>Byrsonima japurensis</i> (extrato Etanólico)	71,5	0,8
<i>Byrsonima japurensis</i> (extrato Aquoso)	83,99	1,0
<i>Byrsonima japurensis</i> (extrato Aquoso)	85,56	0,0
<i>Petiveria Aliace</i>	16,99	7,4
<i>Calycophyllum spruceanum</i> (extrato aquoso)	41,42	0,7
<i>Caesalpinia ferrea</i> - Vargem (extrato aquoso)	43,56	0,6
<i>Caesalpinia ferrea</i> - Casca (extrato aquoso)	22,78	26,5
<i>Smilax japecanga</i>	27,38	0,6
<i>Calycophyllum spruceanum</i> (extrato Etanólico)	62,89	0,8
<i>Coussapoa asperifolia magnifolia</i> (extrato metanólico)	48,52	1,32
<i>Coussapoa asperifolia magnifolia</i> (extrato diclorometanico)	61,77	0,37
<i>Pourouma vilosa</i> (extrato aquoso)	50,00	1,25
<i>Pourouma vilosa</i> (extrato metanólico)	48,81	2,36
<i>Pourouma vilosa</i> (extrato diclorometanico)	52,42	0,10
<i>Pourouma sp.</i> (extrato diclorometanico)	63,27	0,42
<i>Cecropia purpurascens</i> (extrato diclorometanico)	55,15	0,19
sap DII MeOH	17,53	12,1
sap II DI	3,56	9,1
sap II DII	16,94	15,3
sap II D IV	-19,75	10,0
sap II D V	9,68	11,6
<i>Passiflora nitida</i> - (Macerado)	62,76	9,5
<i>Passiflora nitida</i> - (Infusão)	52,6	2,3
<i>Passiflora nitida</i> - (Extrato Etanólico)	87,51	2,1
<i>Passiflora nitida</i> - (Extrato Hidroetanólico)	68,12	1,7
CPF 014	1,3	0,2

CPF 015	21,2	1,2
Extrato INPA	0,41	1,3
Maracujá	1,42	1,1
EMF	21,3	2,2
ICP – 1	-3,35	1,9

Tabela 1: Porcentagem de inibição dos extratos no ensaio de atividade inibitória sobre a lipase pancreática. Os extratos foram testados em triplica na concentração de 1 mg/mL.

Derivados Sintéticos	Média de Inibição (%)	Desvio Padrão
BRU 58	23,59	3,10
BRU 62	9,56	5,06
BRU 63	9,54	1,17
BRU 68	16,92	0,67
BRU 69	1,03	2,98
BRU 71	18,04	0,59
BRU 97	25,78	11,80
BRU96	25,91	10,18
BRU95	36,99	9,55
BRU 94	30,65	1,81
BRU 92	32,68	0,95
BRU 91	32,16	14,48
BRU 89	52,13	0,90
BRU 88	46,01	1,17
BRU 76	55,02	9,50
BRU 72	58,89	2,15
PM 01	-7,83	6,87
PM 02	13,61	1,29
PM 03	1,22	6,28
PM 04	22,03	7,06
PM 06	1,21	8,46
PM 10	-4,17	3,94
PM 13	1,28	17,22
PM 22	-7,73	24,67
PM 23	-28,00	7,41
PM 24	4,39	0,30
PM 28	23,19	1,69
PM 31	23,07	9,03
PM 32	-11,26	14,11

Tabela 2: Porcentagem de inibição dos derivados sintéticos no ensaio de atividade inibitória sobre a lipase pancreática. As substâncias foram testadas em triplica na concentração de 0,2 mg/mL.

Para efeito de comparação foi realizado o ensaio da atividade inibitória da enzima com a droga padrão Orlistat, seguindo com calculo da concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática, sendo esta 0,0012 μ g/mL.

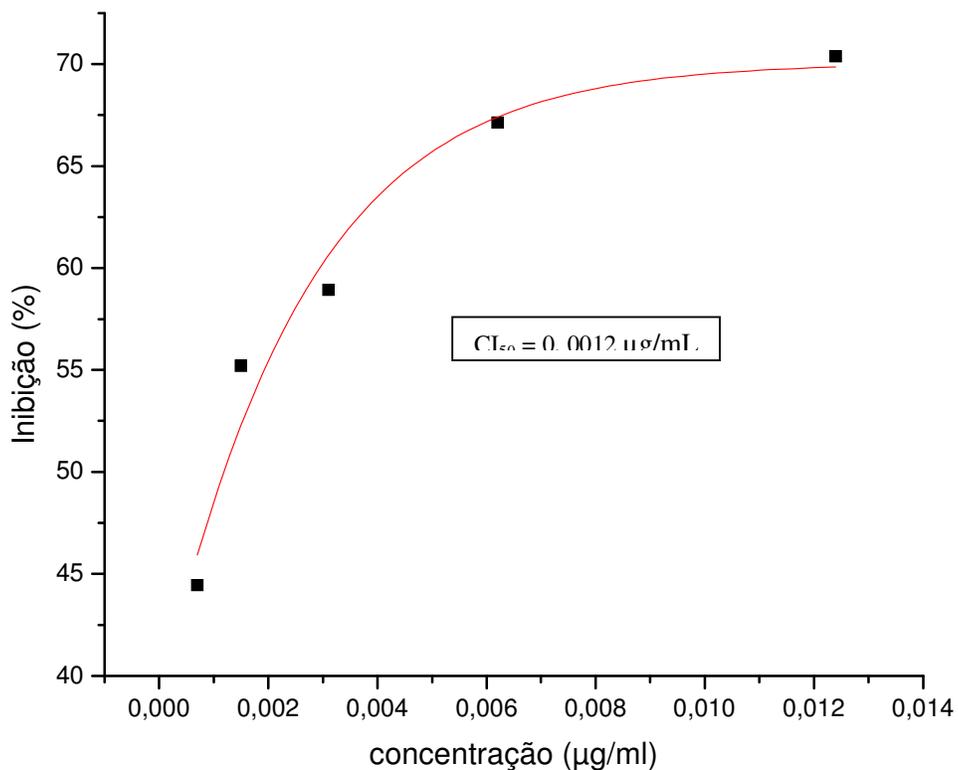


Figura 4: Curva da porcentagem de inibição da droga padrão Orlistat.

Determinação da Concentração Inibitória 50%

Para a determinação da concentração capaz de inibir 50%, o ensaio de atividade inibitória da enzima foi realizado para os extratos descritos e novos extratos que apresentaram inibição maior que 50% na concentração utilizada, através de diluições sucessivas.

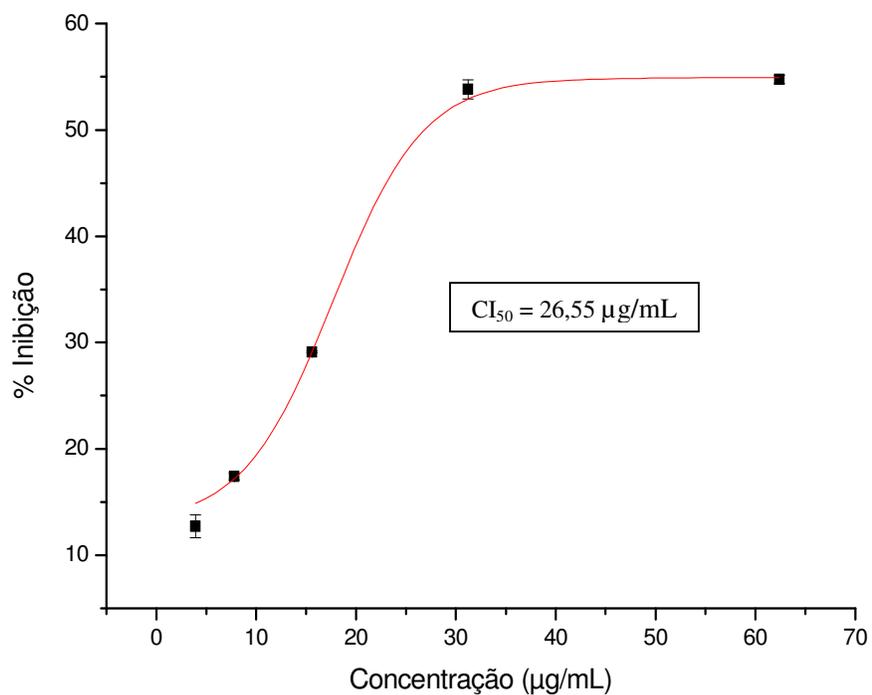


Figura 5: Curva da porcentagem de inibição da *Byrsonima japurensis* (extrato aquoso) com desvio padrão e CI_{50} .

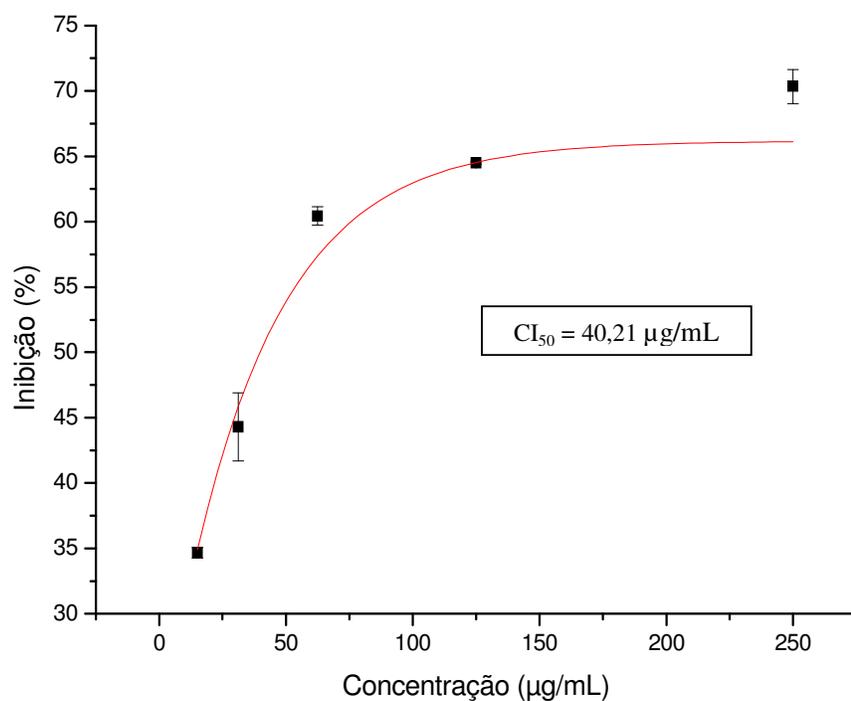


Figura 6: Curva da porcentagem de inibição da *Byrsonima japurensis* (extrato etanólico) com desvio padrão e CI_{50} .

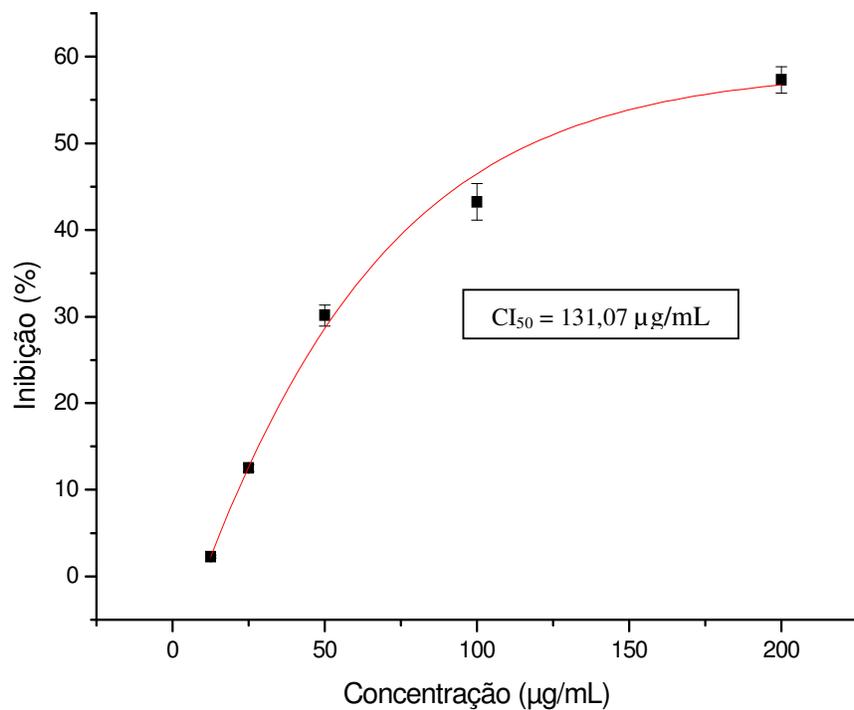


Figura 7: Curva da porcentagem de inibição da *Passiflora nitida* (extrato aquoso - infusão) com desvio padrão e CI_{50} .

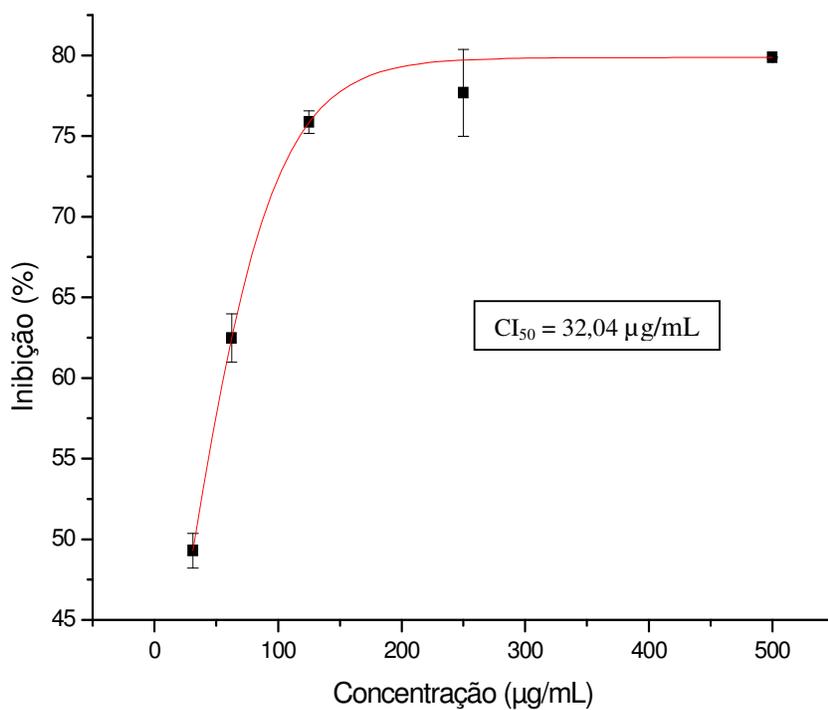


Figura 8: Curva da porcentagem de inibição da *Passiflora nitida* (extrato hidroetanólico) com desvio padrão e CI_{50} .

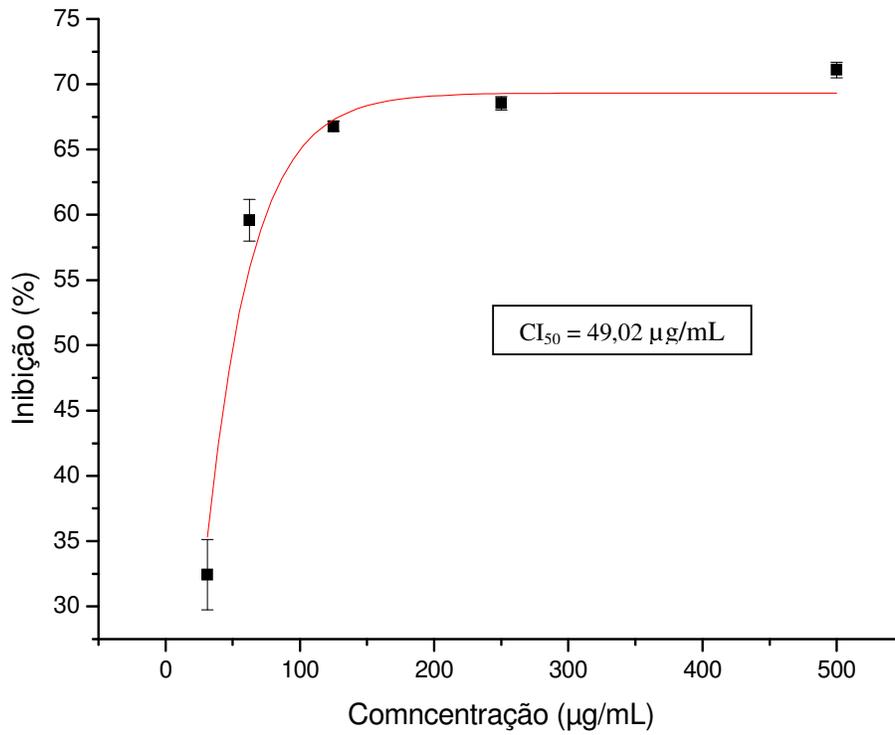


Figura 9: Curva da porcentagem de inibição da *Calycophyllum spruceanum* (extrato etanólico) com desvio padrão e CI_{50} .

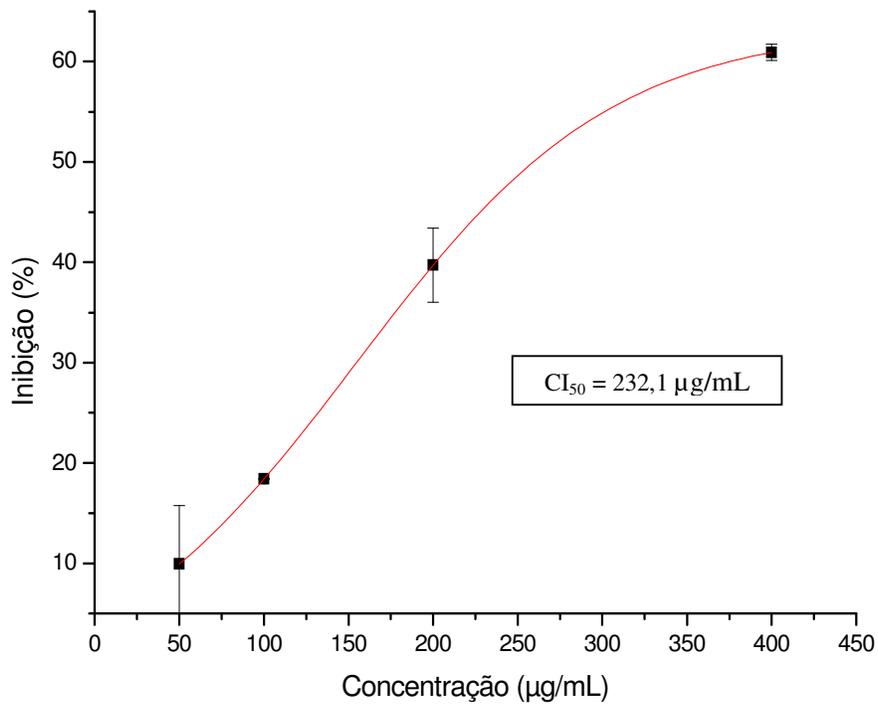


Figura 10: Curva da porcentagem de inibição da *Vismia guianensis* (extrato aquoso) com desvio padrão e CI_{50} .

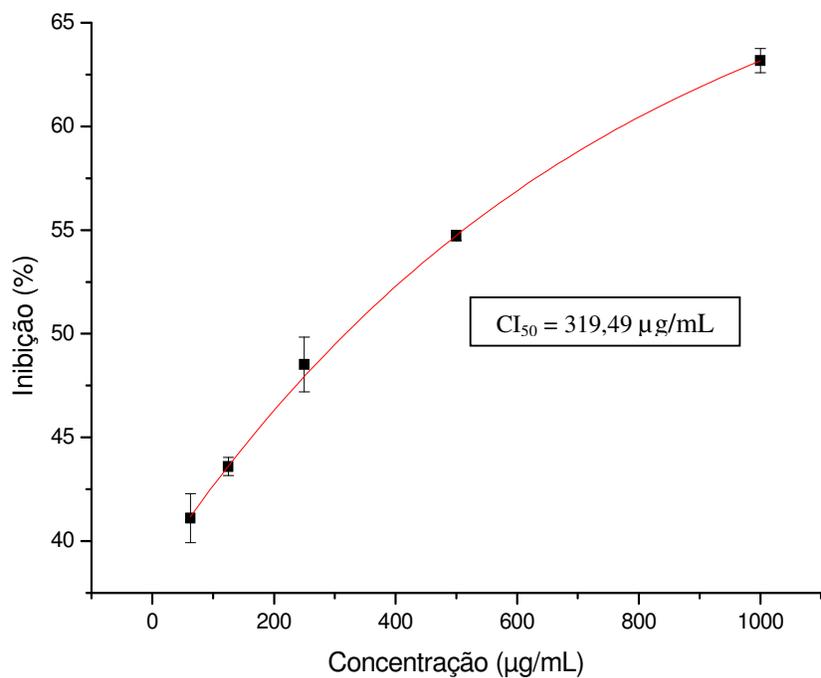


Figura 11: Curva da porcentagem de inibição da *Coussapoa asperifolia magnifolia* (extrato metanólico) com desvio padrão e CI₅₀.

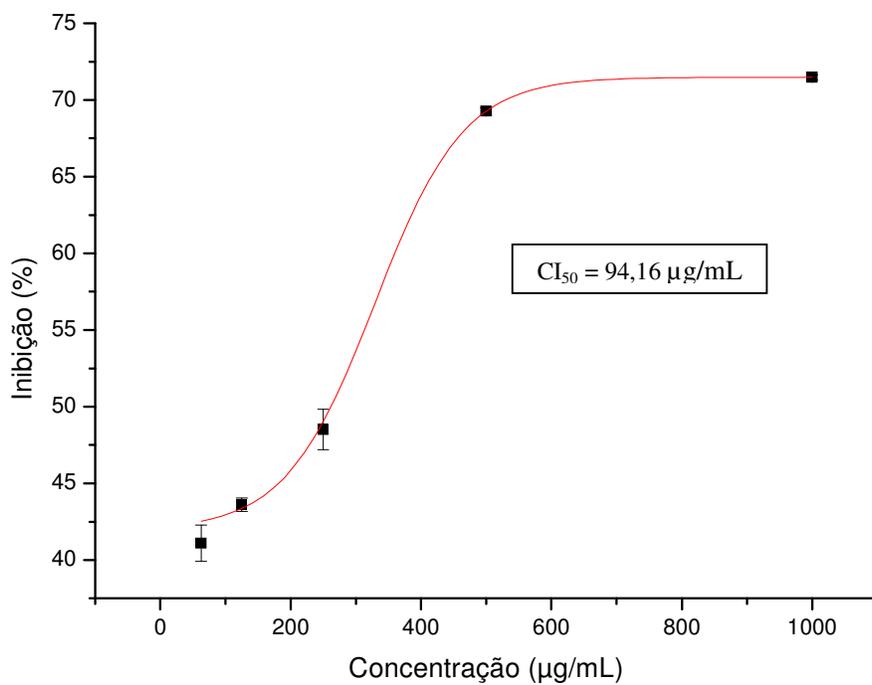


Figura 12: Curva da porcentagem de inibição da *Coussapoa asperifolia magnifolia* (extrato diclorometanico) com desvio padrão e CI₅₀.

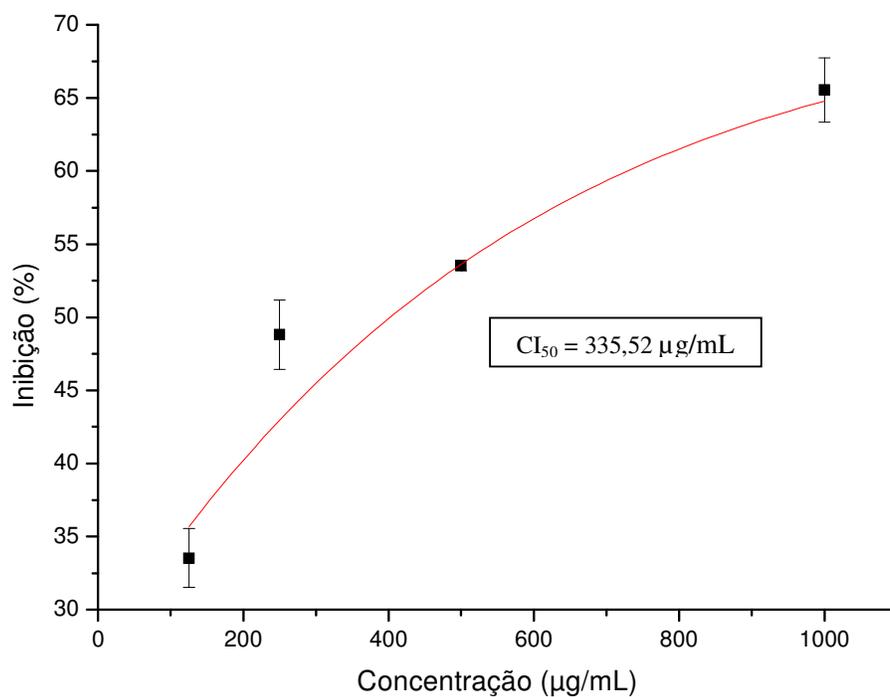


Figura 13: Curva da porcentagem de inibição *Pourouma vilosa* (extrato metanólico) com desvio padrão e CI_{50} .

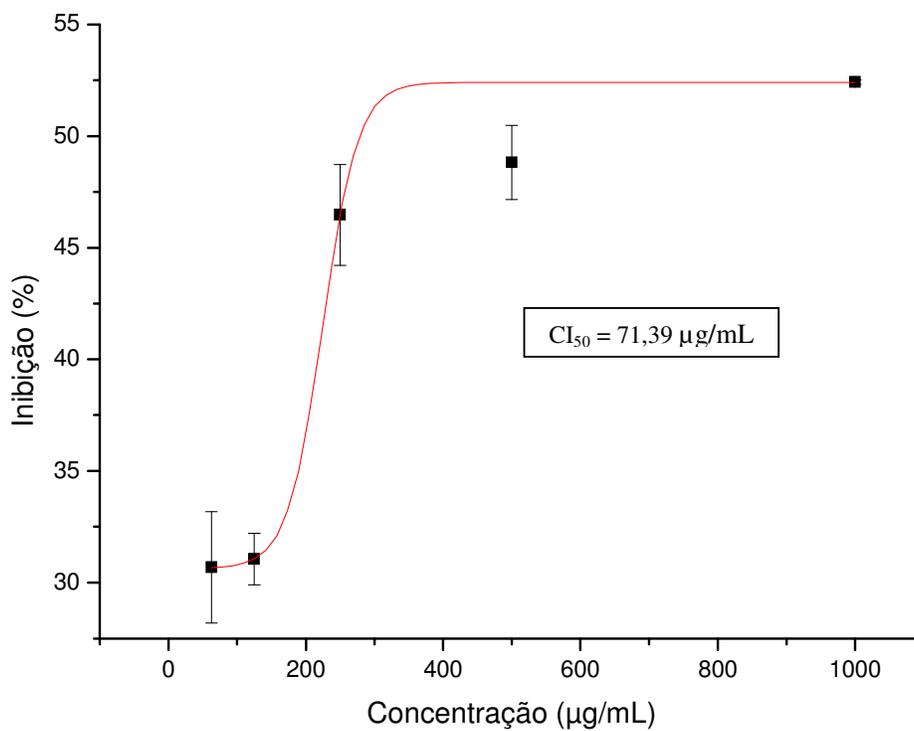


Figura 14: Curva da porcentagem de inibição da *Pourouma vilosa* (extrato diclorometanico) com desvio padrão e CI_{50} .

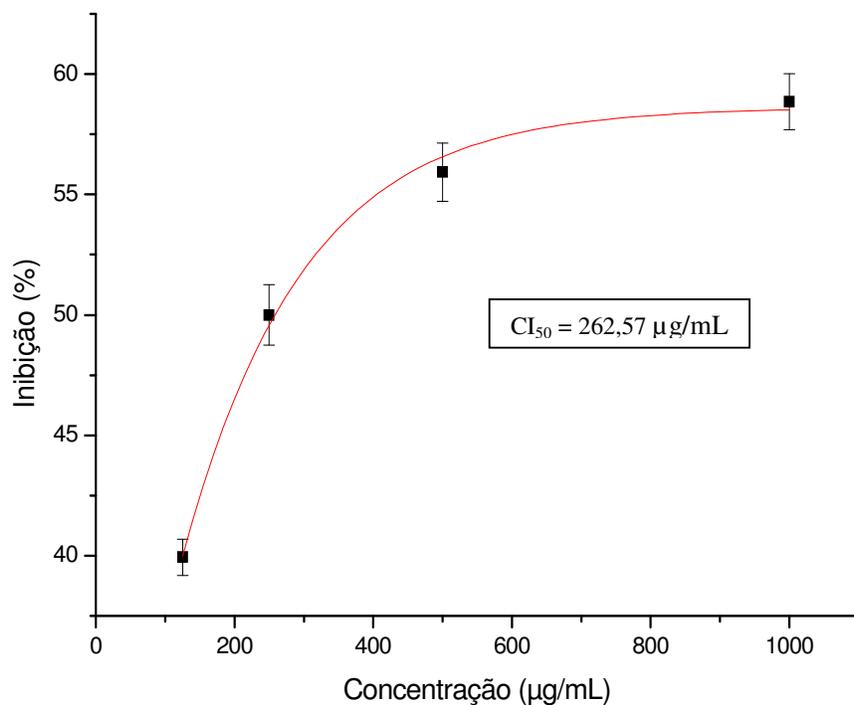


Figura 15: Curva da porcentagem de inibição da *Pourouma vilosa* (extrato aquoso) com desvio padrão e CI_{50} .

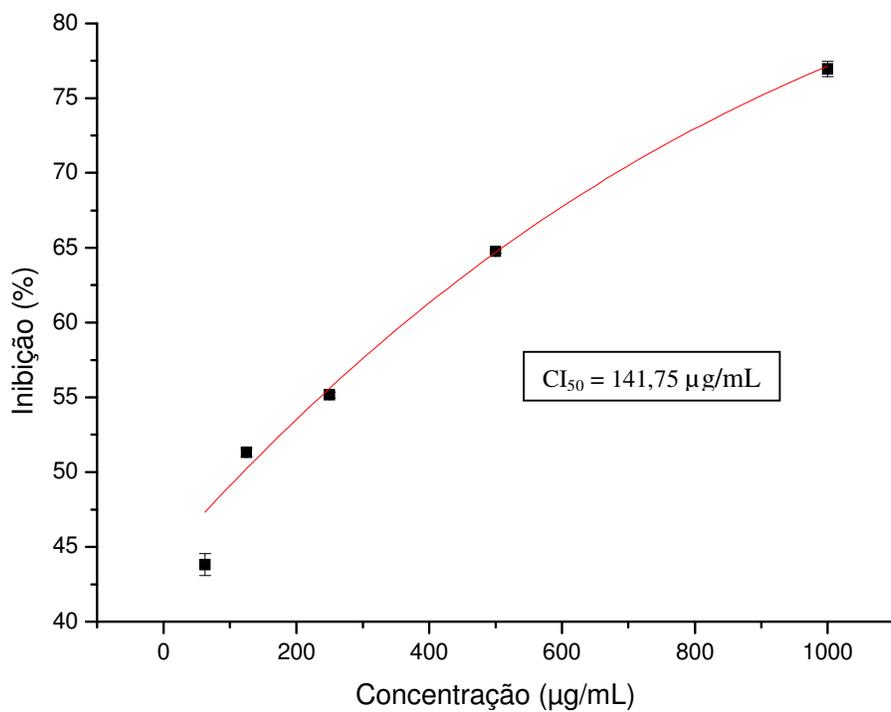


Figura 16: Curva da porcentagem de inibição da *Cecropia purpurascens* (extrato diclorometanico) com desvio padrão e CI_{50} .

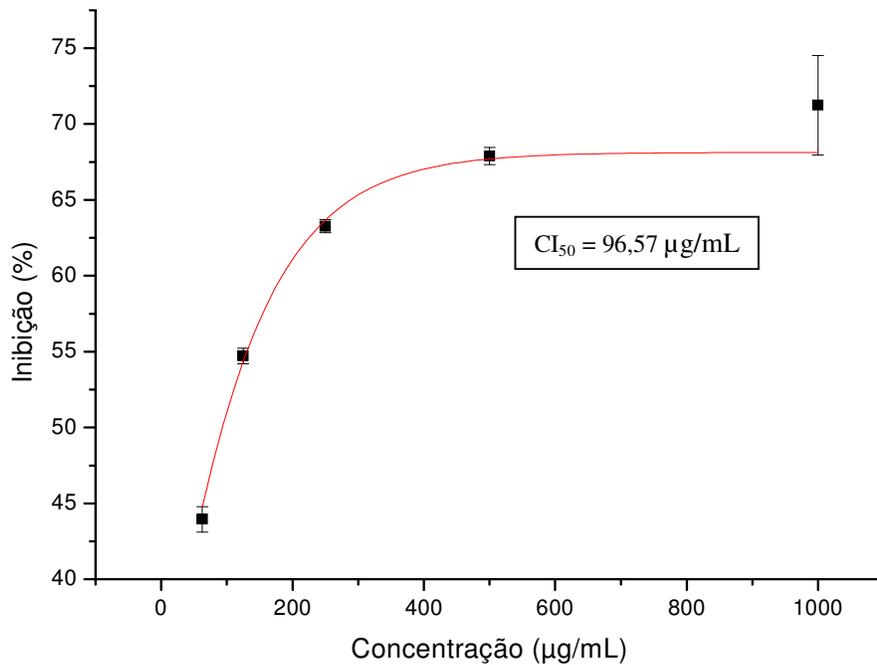


Figura 17: Curva da porcentagem de inibição *Pourouma sp.* (extrato diclorometânico) com desvio padrão e CI₅₀.

Os derivados semi – sintéticos BRU 72, 76, 89 que obtiveram inibição maior que 50% na concentração 0,2 mg/mL não apresentaram reprodutibilidade para o ensaio através de sucessivas diluições em diferentes concentrações, não sendo possível a determinação da CI 50%.

6. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Extratos	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Byrsonima japurensis</i> (extrato Aquoso)	26,55±1,5
<i>Passiflora nitida</i> - (Extrato Hidroetanólico)	32,04±2,5
<i>Byrsonima japurensis</i> (extrato Etanólico)	40,21±0,5
<i>Calycophyllum spruceanum</i> (extrato Etanólico)	49,02±2
<i>Pourouma vilosa</i> (extrato diclorometanico)	71,39±0,08
<i>Coussapoa asperifolia magnifolia</i> (extrato diclorometanico)	94,16±0,93
<i>Pourouma sp.</i> (extrato diclorometanico)	96,57±7,46
<i>Passiflora nitida</i> - (Infusão)	131,07±2,2
<i>Cecropia purpurascens</i> (extrato diclorometanico)	141,75±3,20
<i>Vismia guianensis</i> (extrato aquoso)	232,1±11
<i>Pourouma vilosa</i> (extrato aquoso)	262,57±35,48
<i>Coussapoa asperifolia magnifolia</i> (extrato metanólico)	319,49±27,34
<i>Pourouma vilosa</i> (extrato metanólico)	335,52±18,88

Tabela 3: Concentração dos extratos capaz de inibir 50% no ensaio de atividade inibitória sobre a lipase pancreática. Os extratos foram testados em triplicata em diferentes concentrações (µg/mL).

As espécies que obtiveram atividade inibitória foram extraídas em diferentes solventes e obtidas diferentes concentrações inibitórias de 50% no ensaio sobre a lipase pancreática (tabela 3). A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima (AYRES, 2002).

Byrsonima japurensis (extrato Aquoso) e *Passiflora nitida* - (Extrato Hidroetanólico) apresentaram CI₅₀ de 26,55 µg/mL e 32,04 µg/mL respectivamente, sendo os bioativos que obtiveram melhores menores concentrações capaz de inibir em 50% a atividade inibitoria da enzima. Para o mesmo ensaio outros compostos também apresentaram capacidade inibitória, como compostos fenólicos. Um estudo foi efetuado para comprovar o poder inibitório total de chá (oolong), de extrato de polifenóis poliméricos (EPPC) de chá e de EPPC tratado com tanase, de forma a gerar a despolimerização. Concluiu-se que existe uma clara relação entre o grau de

polimerização dos polifenóis de chá e o seu poder inibitório. O EPPC tratado com tanase possuía um CI50 de 1,38 µg/mL enquanto que o EPPC não tratado possui um CI50 de 0,28 µg/mL (NAKAI et al., 2005).

Outras substâncias também apresentam a mesma capacidade como a quitosana, também chamado de quitosano, um polissacarídeo catiônico produzido através da deacetilação da quitina. Diante disso, um grupo de chineses confirmou a ação inibitória da quitosana sobre a atividade da lipase pancreática em camundongos. A inibição da hidrólise da gordura dietética pela quitosana pode causar diminuição da absorção intestinal de gordura e reduzir o volume de quilomícron plasmático. Sabe-se que este, em excesso, pode induzir a hiperlipidemia, obesidade e esteatose (HAN et al., 1999; ZHANG et al., 2008).

Derivados sintéticos foram testados para o ensaio de atividade inibitória, sendo que neste trabalho apenas os derivados BRU 72, 76, 89 obtiveram inibição maior que 50% na concentração 0,2 mg/mL mas não apresentaram reprodutibilidade para o ensaio. Derivados sintéticos são descritos na literatura como inibidores da atividade da enzima lípase pancreática, como produtos comerciais utilizados no auxílio do tratamento antiobesidade. Orlistat (tetrahidrolipstatin, comercializado pela Roche como Xenical) é um derivado semi-sintético da lipstatina já aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA), para o tratamento da obesidade por inibir irreversivelmente a ação de lipases gástricas e pancreáticas (GUERCIOLINI et al., 1997). O uso de 120 mg ao dia de orlistat reduz a absorção de gordura em até 30%, reduzindo a oferta de gordura e calorias aos tecidos corporais. O uso de orlistat por um ano aumenta a perda de peso em cerca de 4% quando comparado ao placebo (LI Z ET al., 2005).

7. CONCLUSÃO

- As espécies que apresentaram melhores resultados nos ensaios de atividade inibitória foram *Byrsonima japurensis* (26,55µg/mL), *Passiflora nítida* (32,04µg/mL), *Calycophyllum spruceanum* (49,02µg/mL), *Pourouma sp.* (96,57µg/mL), *Cecropia purpurascens* (141,75µg/mL), *Vismia guianensis* (232µg/mL), *Pourouma vilosa* (262,57µg/mL), *Coussapoa asperifolia magnifolia* (319,49µg/mL).
- Os derivados sintéticos que obtiveram inibição maior que 50% na concentração 0,2 mg/mL não apresentaram reprodutibilidade para o ensaio através de sucessivas diluições em diferentes concentrações, não sendo possível a determinação da CI 50%.
- O extrato que obteve melhor atividade inibitória in vitro sobre a lipase pancreática foi extrato aquoso da espécie *Byrsonima japurensis* com concentração inibitória de 26,55±1,5µg/mL,

ANEXOS

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Preparação dos extratos e frações	R											
Apresentação oral parcial				R								
Ensaio de atividade inibitória		R	R	R	R	R	R	R				
Análise dos resultados						R	R	R	R	R		
Elaboração do relatório parcial						R						
Elaboração do Resumo e Relatório Final											R	
Preparação da Apresentação Final para o Congresso												R

R = Realizado

8. REFERÊNCIAS

BAKRIS G, CALHOUN D, EGAN B *et al.* Orlistat improves blood pressure control in obese subjects with treated but inadequately controlled hypertension. *J Hypertens*; 20:2257-67, 2002.

BOREL, P., LAIRON, D., TERMINE, E., GRATAROLI, R., LAFONT., H, Isolation and properties of lipolysis inhibitory proteins from wheat germ and wheat bran. *Plant Foods and Human Nutrition* 39, 339– 348, 1989.

BITOU, N., NINOMIYA, M., TSUJITA, T., OKUDA, H., Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34, 441–445,1999.

BROCKERHOFF, H., Lipases. In: Brockerhoff, H., Jensen, R.G. (Eds.), *Lipolytic Enzymes. Academic Press*, New York, pp. 25–125, 1974.

CARROCCIO A, IACONO G, MONTALTO G, et al. Pancreatic enzyme therapy in childhood celiac disease. A double-blind prospective randomized study. *Dig Dis Sci*; 40(12):2555-2560, 1995.

CANTAROW A, SCHEPARTZ B,. *Bioquímica; W.B.Saunders company*, Editora Atheneu, 4º edição, 1968.

CHEN Q, STERNBY B, NILSSON A °. Hydrolysis of triacylglycerol arachidonic and linoleic acid ester bonds by human pancreatic lipase and carboxyl ester lipase. *Biochim Biophys Acta*; 1004: 372–385, 1989.

DRENT, M.L., LARSSON, I., WILLIAM-OLSSON, T., QUADE, F., CZUBAYKO, F., VON BERGMANN, K., STROBEL, W., SJOSTROM, L., VAN DER VEEN, E.A, Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *International Journal of Obesity* 19, 221–226, 1995.

FORESTI M.L.; FERREIRA M.L.; Chitosan- immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. *Enzyme Microbiol. Technol.*; 2006.

GARGOURI, Y., JULIEN, R., SUGIHARA, A., VERGER, R., SARDA, L, Inhibition of pancreatic and microbial lipases by proteins. *Biochemical Biophysical Acta* 795, 326–331, 1984.

GARGOURI, Y., RANSAC, S., VERGER, R., Covalent inhibition of digestive lipases: an in vitro study. *Biochemical Biophysical Acta* 1344, 6–37, 1997.

GODOI, T.G.; TEIXEIRA, M.A.C.; TOKUMOTO, P.M.; Ação celular de estrogênio e de antilipêmicos; *Instituto de Biociências - UNESP- Campus Rio Claro*; 2008.

GOTOR, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *J. Biotechnol.*, v. 96 (1), p. 35-42, 2002.

GUERCIOLINI R. Mode of action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 21 (Suppl 3): S12-S23, 1997.

HADVAY, P., LENGSELD, H., WOLFER, H., Inhibition of pancreatic lipase in vitro by covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochemical Journal* 256, 357–361, 1988.

HAN, L.K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *Inter. J. Obesity*, v.23, p.174-179, 1999.

HAN, L.K., KIMURA, Y., KAWASHIMA, M., TAKAKU, T., TANIYAMA, T., HAYASHI, T., ZHENG, Y.N., OKUDA, H. Antiobesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25, 1459–1464., 2001.

HAUPTMAN, J.B., JEUNT, F.S., HARTMANN, D. Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *American Journal of Clinical Nutrition* 55, 309s–313s., 1992.

He, Q., Y. Lv, et al, Effects of tea polyphenols on the activities of [alpha]- amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry* 101(3): 1178-1182, 2007.

HOSHINO, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; Agric. Biol. Chem., 54, 1459.; (b) Hanson, M.; *Oils Fats Int.* 1990, 5, 29., 1990.

JAEGER, K. E. and REETZ, M. T, Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech.*, 16, 396-402., 1998.

JIANG W., LI W., HAN L., LIU L., ZHANG Q., ZHANG S., NIKAIDO T., KOIKE K., Pancreatic Lipase-Inhibiting Triterpenoid Saponins from Fruits of *Acanthopanax senticosus* ; *Chem. Pharm. Bull.* 55(7) 1087—1089; 2007.

KAWAGUCHI, K., MIZUNO, T., AIDA, K., UCHINO, K., Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61, 102–104, 1997.

KOO, M. W. L. AND C. H. CHO; Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology* 500(1-3): 177-185, 2004.

KLEIN S., Long-term pharmacotherapy for obesity. *Obes Res* 12 (Suppl): 163-166, 2004.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1547, p. 262-267, 2001.

LEE YP, CHUNG GH, RHEE JS. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1169: 156-164, 1993.

LI Z, MAGLIONE M, TU W, MOJICA W, ARTERBURN D, SHUGARMAN LR, HILTON L, SUTTORP M, SOLOMON V, SHEKELLE PG, MORTON SC. Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Ann Intern Med*; 142:532-46, 2005.

LINDSTROM M, STERNBY B, BORGSTROM B. Concerted action of carboxyl ester lipase and pancreatic lipase during lipid digestion in vitro: importance of the physico-chemical state of the substrate. *Biochim Biophys Acta*; 959: 178–184, 1988.

MUKHERJEE, M.; Human digestive and metabolic lipases—a brief review *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, v.22, p. 369–376, 2003.

NAKAI, M., Y. FUKUI, et al; Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agric Food Chem* 53(11): 4593-4598, 2005.

RICKETTS, J., BRANNON, P. M. Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats. *The Journal of Nutrition*. 124:1166-1171, 1994.

SATOUCHI, K., HIRANO, K., FUJINO, O., IKOMA, M., TANAKA, T., KITAMURA, K. Lipoxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62, 1498–1503, 1998.

SHAW, J. F., Aqueous soluble lipase. Patent WO 9914338A1, 2003.

SHIMURA, S., TSUZUKI, W., KOBAYASHI, S., SUZUKI, T. Inhibitory effect on lipase activity of extracts from medicinal herbs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56, 1478–1479, 1992.

SJOSTROM, L., RISSANEN, A., ANDERSEN, T., BOLDRIN, M., GOLAY, A., KOPPESCHAAR, H.P.F., KREMPF, M., Randomised placebocontrolled trial of orlistat

for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Lancet* 352, 167–172. 1998.

TANI, H., OHISHI, H., WATANABE, K., Wheat flour lipase inhibitor decrease serum lipid levels in male rats. *Journal of Nutrition and Vitaminology* 41, 699–706, 1995.

VERGER, R., Interfacial activation of lipases: facts and artifacts; *Trends in Bioscience and Technology* 15, 32–37., 1997.

WEINTRAUB M, RUBIN A, GOLIK A, BYRNE L, SCHEINBAUM ML. Sibutramine in weight control: a dose-ranging, efficacy study. *Clin Pharmacol Ther*; 50:330-7, 1991.

ZHI J, MELIA AT, FUNK C, et al. Metabolic profile of minimally absorbed orlistat in obese/overweight volunteers. *J Clin Pharmacol*;36:1006-11., 1996.

ZHANG, J.; ZHANG, J.; LIU, J.; LI, L.; XIA, W. Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutr. Res.*, v.28, p.383-390, 2008.

“Zhong Hua Ben Cao,” Vol. 5, Shanghai Scientific Technologic Publisher, Shanghai, pp. 765—775, 1999.