

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Gustavo Rezende Bellei de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTILIPIDÊMICA DA *Endopleura uchi* HUBER  
CUATREC PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA**

Juiz de Fora  
2014

**GUSTAVO REZENDE BELLEI DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTILIPIDÊMICA DA *Endopleura uchi* HUBER  
CUATREC PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Célia Hitomi Yamamoto

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ailson da Luz André de Araújo

Juiz de Fora

2014

**GUSTAVO REZENDE BELLEI DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTILIPIDÊMICA DA *Endopleura uchi* HUBER  
CUATREC PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Célia Hitomi Yamamoto – Orientadora  
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Irene Satiko Kikuchi  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo  
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa  
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina Celi de Carvalho Costa  
Programa de Pós-Graduação - Faculdade Machado Sobrinho

*“À toda minha família e amigos que estão sempre ao meu lado incentivando minha formação pessoal e profissional. A vocês o meu eterno agradecimento.”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paciência, força de vontade, sabedoria e entendimento, por que sem Ele nada disso seria possível.

À minha família, pelo apoio incondicional nos meus sonhos e objetivos.

A FAPEMIG pelo auxílio financeiro concedido e a UFJF por toda estrutura cedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade e confiança.

Aos amigos de turma pela experiência, conhecimento compartilhado e incentivo.

Aos meus amigos Rodrigo José Lupatini Nogueira, João Paulo Roberto, Renato de Paula, Flávia Costa de Moraes, Valéria de Mello e Isabela Baumgratz, pela ajuda, apoio, companheirismo e imensa disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, responsável pelo Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, pelo apoio na realização do experimento e todos os colegas do laboratório.

A Professora Dra. Fabíola Dutra Rocha e colegas do laboratório de Farmacognosia, em especial Thamiris Vilela, Tamires Calaes e Helena do Carmo que se disponibilizaram em auxiliar no desenvolvimento prático do trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Lopes Silva Pereira do laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras que rapidamente se prontificou em ajudar, em especial o Doutorando Vinícius de Oliveira Ramos e o Pós-Doutorando Anderson Assaid Simão que não mediram esforços em auxiliar no desenvolvimento da metodologia proposta e por proporcionar a difusão do conhecimento científico.

Ao Laboratório NIQUA e a Natália Tassi pela imensa disposição e rapidez.

Ao Prof. Dr. Marcelo Silvério que acreditou em mim e me deu a oportunidade de iniciar no Programa de Pós-Graduação e ao Prof. Dr. Ailson da Luz André de Araújo que aceitou em me co-orientar e auxiliar no desenvolvimento pleno do projeto.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Hitomi Yamamoto, pelo conhecimento, atenção e disponibilidade com qual fui acolhido e orientado. Meu muito obrigado e eterna gratidão!

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia Louise, Jésus, Nádia e Maura, pela atenção e solicitude.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, de alguma forma apoiaram a realização deste trabalho.

## RESUMO

A obesidade é o resultado de diversas características do indivíduo, entre as quais se destacam os aspectos genéticos, ambientais e comportamentais. Sua ocorrência é devido ao acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode resultar em risco de desenvolvimento de doenças graves e alterações lipídicas como dislipidemias e hipercolesterolemia. Vários tratamentos terapêuticos são utilizados para redução do peso corporal. Medicamentos com ação inibidora da lipase digestiva na região do lumen intestinal são utilizados para controlar o metabolismo lipídico, que propicia a redução da absorção de gordura. As plantas têm sido amplamente estudadas como recurso terapêutico, fundamentado no uso popular. Várias plantas apresentam ação antilipidêmica comprovada, devido à presença dos catecois. A *Endopleura uchi*, conhecida popularmente como uxi amarelo, apresenta em seus extratos, derivados fenólicos e flavonoídicos (catequinas). Este trabalho teve como objetivo, o estudo de avaliação da eficácia antilipidêmica da casca de *Endopleura uchi*, empregando método espectrofotométrico. A amostra de casca de *E. uchi* seca e triturada foi adquirida comercialmente. A metodologia envolveu a obtenção dos extratos; quantificação de derivados flavonoídicos e derivados fenólicos totais; avaliação da atividade antioxidante e determinação do efeito inibidor dos extratos na atividade enzimática da lipase pancreática. Foram preparados três extratos em solventes com polaridades diferentes, a partir de 200g de casca seca triturada de *E. uchi*. Para a determinação de derivados flavonoídicos foi utilizado o método com cloreto de alumínio em meio ácido na presença de piridina e para derivados fenólicos totais o método com reagente de *Folin-Ciocalteu*. A atividade antioxidante foi realizada pelo ensaio de redução do radical DPPH. O efeito antilipidêmico dos extratos foi avaliado através da inibição enzimática da lipase pancreática utilizando como substrato o *p*-nitrofenolpalmitato. Os extratos obtidos apresentaram rendimento de 23,4 g (11,7%) para o extrato em água, 34,2g (17,1%) de extrato em etanol 80% e 26,6 g (13,3%) de extrato em acetona 80%. O conteúdo de derivados flavonoídicos equivalente em quercetina por grama de amostra foi de 1,35mg para extrato em água, 1,80mg para extrato em etanol 80% e 2,13 mg para extrato em acetona 80%. O conteúdo de derivados fenólicos expressos em equivalente em ácido tânico por grama de amostra foi de 0,639g para extrato em água, 0,950g para extrato em etanol 80% e 0,930g para extrato em acetona 80%. As concentrações efetivas 50% para o método de DPPH variaram de 12,4 µg/mL, 9,7 µg/mL e 7,9 µg/mL para os extratos em água, etanol 80% e em acetona 80% respectivamente. Foi encontrada forte correlação entre atividade antioxidante e o conteúdo de derivados fenólicos. O coeficiente de *Pearson* para os três extratos foi  $r > 0,9$ . Na avaliação dos extratos frente a inibição da lipase pancreática, o extrato aquoso mostrou atividade inibidora de 47,54% (106,90 UIL/g), em etanol 80% (1:1) 36,88% (96,06 UIL/g) e extrato em acetona 80% (1:1) 49,33% (112,14 UIL/g). Os resultados obtidos mostraram a presença das atividades antilipidêmica e antioxidante dos extratos de casca de *E. uchi*, importantes para o tratamento de redução de gordura corporal.

Palavras-chave: Obesidade. Atividade antilipidêmica, Método Espectrofotométrico. Lipase Pancreática. Palmitato de *p*-nitrofenol. *Endopleura uchi*.

## ABSTRACT

Obesity is the result of various individual characteristics, among which stand out the genetic, environmental and behavioral aspects. Its occurrence is due to abnormal or excessive fat accumulation that may result in the risk of developing serious diseases and lipid disorders such as dyslipidemia and hypercholesterolemia. Many therapeutic treatments are used for reducing body weight. Drugs that inhibit the digestive lipase in the intestinal lumen region are used to control lipid metabolism, which promotes the reduction of fat absorption. Plants have been widely studied as a treatment method based on the popular use. Several plants have proven, due to the presence of catechols antilipemic action. The *Endopleura uchi*, popularly known as yellow uxi presents in their extracts, phenolic derivatives and flavonoids (catechins). This work aimed to study the efficacy assessment antilipemic bark *Endopleura uchi*, employing spectrophotometric method. A sample of *E. uchi* bark was dried and crushed commercially acquired. The methodology involved obtaining the extracts; quantification of flavonoid compounds and phenolic derivatives; evaluation of antioxidant activity and determination of the inhibitory effect of the extract on the enzymatic activity of pancreatic lipase. Three extracts were prepared in solvents with different polarities from 200g dry shredded bark of *E. uchi*. For the determination of the method flavonoid derivative with aluminum chloride in an acid medium in the presence of pyridine and phenolic derivatives with the method of *Folin-Ciocalteu* reagent was used. The antioxidant activity assay was performed by reduction of DPPH. Antilipemic effect of the extracts was assessed by enzymatic inhibition of pancreatic lipase using a substrate of *p*-nitrofenylpalmitate. The extracts showed yield 23,4 g (11,7%) for the water extract, 34,2 g (17.1%) of 80% ethanol extract and 26,6 g (13,3%) of 80% acetone extract. The content of flavonoid compounds in quercetin equivalent of gram of sample was 1,35 mg to water extract, 1,80 mg extract in 80% ethanol and 2,13 mg 80% extract acetone. The contents of phenolic derivatives expressed in equivalent of gram of tannic acid was 0,639 g sample to extract in water to 0,950 g in 80% ethanol extract and 0,930 g in 80% acetone extract. The effective concentration for 50% DPPH assay ranged from 12,4 µg/mL, 9,7 µg/mL and 7,9 µg/mL for the extracts with water, 80% ethanol and 80% acetone, respectively. Strong correlation between antioxidant activity and content of phenolic derivatives was found. The *Pearson* coefficient for the three extracts was  $r > 0,9$ . In the evaluation of the extracts against pancreatic lipase inhibition of the aqueous extract showed inhibitory activity of 47.54% (106,90 ALI/g) in 80% ethanol (1:1) 36,88% (96,06 ALI/g) and extract with 80% acetone (1:1) 49,33% (112,14 ALI/g). The results showed the presence of antilipemic and antioxidant activities of the extracts of bark of *E. uchi*, important for the treatment of body fat reduction.

Keywords: Obesity, Antilipemic Activity, Spectrophotometric Method, *p*-nitrophenyl palmitate, Pancreatic Lipase, *Endopleura uchi*.

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1: Formação do Triglicerídio através da combinação de uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido graxo.....	21
Figura 2: Ação da lipase pancreática sobre os triglicerídeos.....	24
Figura 3: Micela formada pela ação dos sais biliares.....	25
Figura 4: Esquema da digestão e absorção de gorduras no organismo.....	27
Figura 5: Modelo de interação enzima-substrato.....	29
Figura 6: Mecanismo de ação do Orlistate.....	35
Figura 7: <i>Endopleura uchi</i> formando um uxizal (A) e tora do caule e da casca da <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	42
Figura 8: Estrutura química da bergenina e das substâncias análogas da bergenina.....	45
Figura 9: Estrutura básica dos flavonoides caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C).....	46
Figura 10: Casca de <i>Endopleura uchi</i> adquirida do mercado de produtos naturais.....	61
Figura 11: Extrato rotavaporado (A) e pós liofilizados dos extratos em água, em acetona 80% e em etanol 80% (B) de <i>Endopleura uchi</i> .....	62
Figura 12: Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.....	63
Figura 13: Reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	67
Figura 14: Reação do DPPH com compostos fenólicos.....	70
Figura 15: Ação enzimática da lipase pancreática.....	74



## LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1: Nomenclaturas botânicas da <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	41
Tabela 2: Quantificação de derivados flavonoídicos expressos como média $\pm$ desvio padrão obtido pelas três determinações.....	65
Tabela 3: Quantificação de derivados fenólicos expressos como média $\pm$ desvio padrão obtido pelas três determinações empregando reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	68
Tabela 4: Concentração efetiva 50% de atividade antioxidante no teste com DPPH	70
Tabela 5: Correlação entre concentração de derivados fenólicos e porcentagem de atividade antioxidante (%AAO).....	73
Tabela 6: Atividade da lipase pancreática na presença dos extratos de <i>Endopleura uchi</i> .....	75

## LISTA DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1: Curva analítica da quercetina.....	64
Gráfico 2: Curva analítica do ácido tânico.....	67
Gráfico 3: Concentrações efetivas 50% dos extratos de <i>Endopleura uchi</i> e do controle positivo.....	71
Gráfico 4: Curva analítica do $p$ -nitrofenol.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAO	Atividade antioxidante
%AAO	Porcentagem de atividade antioxidante
%AAOM	Porcentagem média de atividade antioxidante
Al	Alumínio
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente vascular cerebral
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CE 50%	Concentração efetiva em 50%
cm	Centímetros
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de Massa Corporal
I %	Porcentagem de Inibição
Kg/mL	Quilograma por mililitro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Metro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol por litro
mg/g	Miligrama por grama
mg/mL	Miligrama por mililitro
m/v	Massa por volume
mol/L	Mol por litro
NaCl	Cloreto de sódio

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.A	Puro para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
rpm	Rotação por minuto
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometane clorídrico - Trizamina
UIL/g	Unidade de lipase inibida por grama
VIS	Visível
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
v/v	Volume por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$R^2$	Coeficiente de determinação
$\lambda$	Comprimento de onda
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\geq$	Maior ou igual
$\rho$	para
%	Porcentagem
(1:1)	Proporção 1 para 1

## SUMÁRIO

	Pag.
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1. Excesso de peso e obesidade: conceito e considerações gerais.....	17
2.2. Metabolismo lipídico no organismo humano.....	20
2.2.1. Características das gorduras e lipídios da alimentação.....	20
2.2.2. Digestão e absorção de gorduras no trato gastrointestinal.....	22
2.2.3. Lipase pancreática: considerações gerais.....	28
2.3. Tratamento do excesso de peso e da obesidade.....	30
2.3.1. Inibidores Enzimáticos – Controle do metabolismo lipídico.....	33
2.3.2. Importância das plantas e fitoterápicos na saúde.....	36
2.3.2.1. Descrição e distribuição geográfica da espécie <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	40
2.3.2.1.1. Características, cultivo e manejo da <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	41
2.3.2.1.2. Atividades biológicas e constituintes químicos da <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	43
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	48
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
4.1. Material e equipamentos.....	49
4.1.1. Material.....	49
4.1.2. Equipamentos.....	50
4.1.3. Material vegetal.....	50
4.2. Métodos.....	50
4.2.1. Processos de extração a partir da casca seca e triturada de <i>Endopleura</i> <i>uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	50
4.2.1.1. Obtenção e rendimento do extrato em água (EA).....	51
4.2.1.2. Obtenção e rendimento dos extratos em etanol 80% (EE 80%) e em acetona 80% (EAc 80%).....	51
4.2.2. Determinação dos teores de derivados flavonoídicos e derivados fenólicos totais.....	51

4.2.2.1. Determinação quantitativa de derivados flavonoídicos totais.....	51
4.2.2.2. Determinação quantitativa de derivados fenólicos totais.....	54
4.2.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	55
4.2.3.1. Ensaio de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH).....	55
4.2.4. Avaliação do efeito dos extratos da casca de <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC na inibição da atividade enzimática da lipase pancreática.....	57
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1. Características e rendimento dos extratos em água (EA), em etanol 80% (EE 80%) e em acetona 80% (EAc 80%) da casca seca e triturada de <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC.....	61
5.2. Quantificação de derivados flavonoídicos totais.....	62
5.3. Quantificação de derivados fenólicos totais.....	66
5.4. Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH).....	69
5.4.1. Análise de correlação de <i>Pearson</i> entre a concentração de derivados fenólicos e a atividade antioxidante.....	72
5.5. Avaliação do efeito dos extratos da casca seca e triturada de <i>Endopleura uchi</i> (HUBER) CUATREC na inibição da atividade enzimática da lipase pancreática.....	73
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em uma escala global, a obesidade atingiu proporções de epidemia, sendo um dos principais contribuintes para a elevada prevalência de doenças crônicas e incapacidades atualmente (SOUZA *et al.*, 2012).

Estima-se que nos dias de hoje haja mais de dois bilhões de adultos acima do peso no mundo, e destes, mais de 700 milhões estejam clinicamente obesos. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, cerca de 60 milhões de brasileiros estão acima do peso, aproximadamente 51% da população, e 22 milhões considerados obesos, quase 20% (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014).

Uma alternativa para prevenir ou tratar o excesso de peso e a obesidade, seria o controle do metabolismo lipídico por fármacos, já que na maioria das vezes, uma alteração ou perda do metabolismo lipídico, balanceado para manter a homeostase, pode desencadear a obesidade (PEREIRA *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011).

Alguns estudos citam que inibir a digestão de lipídios constitui uma abordagem para a redução da absorção de gordura e conseqüentemente alteração no seu metabolismo. Com isto, haveria o controle de sérios problemas de saúde como aterosclerose, hiperlipidemia, colesterolemia, hipertensão arterial, diabetes e depressão funcional de certos órgãos causados pela obesidade (CURIEL, 2011; DODEROS, *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, o interesse da pesquisa científica nesta área tem aumentado significativamente, principalmente relacionada à plantas e a produtos naturais. Porém, grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e atualizadas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas (PIZZIOLO *et al.*, 2011).

Uma planta pouco estudada para essa finalidade é a *Endopleura uchi*. A espécie é conhecida popularmente como uchi amarelo e pode atingir até 30m de altura, sendo típica da América do Sul, ocorrendo no Brasil, principalmente



no Norte do país, especificamente nos estados do Pará e do Amazonas (NUNOMURA, *et al.*, 2002).

As partes mais utilizadas da planta são a casca e o fruto (óleo). O chá de suas cascas, segundo o uso popular, é utilizado no combate de várias enfermidades, dentre elas na redução do colesterol, fazendo dela amplamente comercializada em feiras, mercados e até mesmo em farmácias de manipulação (BILIERI, *et al.*, 2011).

Diante da relevância deste assunto para a saúde pública, justificou-se o presente trabalho ao avaliar a eficácia e a qualidade da *Endopleura uchi* como alternativa terapêutica ao emagrecimento, através da análise de eficácia antilipidêmica dos extratos obtidos de sua casca frente à inibição da lipase pancreática.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EXCESSO DE PESO E OBESIDADE: CONCEITO E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde os primórdios, a história da humanidade foi pautada pela luta contra a fome. Contudo, existem vários relatos e inúmeras figuras sobre pessoas acima do peso e obesas. Em algumas sociedades, como na ocidental, o excesso de peso e a obesidade chegaram a ser considerados sinal de saúde e de beleza (SANTOS *et al.*, 2013).

Entretanto, a partir de meados do século passado, começou-se a acumular evidências de que ambos poderiam prejudicar a saúde das pessoas. Atualmente a obesidade é considerada uma doença crônica moderna não transmissível, sendo uma das patologias de maior crescimento (LOTTENGERG, 2009).

Um estudo recente divulgado nos Estados Unidos comprovou que o número de pessoas acima do peso ideal está crescendo no planeta. Nos últimos 30 anos a população obesa cresceu 255%, alcançando cerca de 610 mil pessoas e hoje é responsável por mais de 70% do total de óbitos (BRASIL, 2014).

Dados do *International Obesity Task Force* mostram e reforçam que, nos últimos anos, a sua prevalência tem aumentado significativamente não só nos países em desenvolvimento, mas em várias regiões do mundo, sendo responsável, em grande parte, pelo aumento da mortalidade e morbidade com implicações significativas no indivíduo, na família, na comunidade e na população (BRASIL, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012).

No Brasil, segundo pesquisas do Ministério da Saúde, pela primeira vez em oito anos, conseguiu-se estabilizar as taxas de sobrepeso e obesidade. Mas devido ao aumento progressivo do peso nessas últimas três décadas, ainda 50,8% dos brasileiros estão acima do peso ideal. Destes, 17,5% são obesos, e 54,7% dos homens contra 47,4% das mulheres se encontram com sobrepeso (BRASIL, 2013; BRASIL 2014).

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS) talvez o maior desafio contra o excesso de peso e a obesidade pode estar no efetivo enfrentamento

dessa crescente epidemia mundial, já que a obesidade é reconhecida como um importante problema de saúde pública, afetando crianças, adolescentes e adultos (BALBINOT, *et al.*, 2009).

Um ponto para tentar conter a sua prevalência, seria a monitorização da sua evolução, permitindo avaliar a causa do problema, comparando várias regiões e ou países e determinar a eficácia das intervenções (medicamentosas ou não) introduzidas para minimizar o problema. Mas para que isso aconteça, é necessário uniformizar os conceitos de excesso de peso e obesidade para que possam ser amplamente utilizados e distinguidos (VILARTA, 2007).

O excesso de peso, segundo a OMS, significa um aumento do peso tendo como referência a altura do indivíduo. É definido por um IMC (Índice de Massa Corporal) em torno de 25 kg/m<sup>2</sup> enquanto a obesidade um IMC de 30 kg/m<sup>2</sup>. Todavia, os riscos do excesso de gordura corporal para a saúde aumentam a partir dos 20 a 22 kg/m<sup>2</sup> (BALBINOT *et al.*, 2009; LOTTENGERG, 2009; BARBIERI, 2012).

Já a obesidade reflete qualitativamente e quantitativamente, a proporção de tecido adiposo. É caracterizada pelo grau de armazenamento de gordura no organismo associado a riscos para a saúde, devido à sua relação com várias complicações metabólicas (SOUZA *et al.*, 2007).

Hoje está bem estabelecido que ela desencadeia o aumento do risco de desenvolvimento de alterações lipídicas como dislipidemias, hipercolesterolemia, aterosclerose. E como consequência pode levar à doenças crônicas tais como hipertensão, diabetes tipo II e problemas cardiovasculares; além de câncer, acidente vascular cerebral (AVC) e problemas respiratórios, sendo, portanto considerada uma doença plurimetabólica (ALTERIO, *et al.*, 2007; BRASIL, 2010).

Do ponto de vista fisiopatológico alguns autores argumentam e investigam a causa da obesidade que não está amplamente esclarecida. Acredita-se que as principais razões para um indivíduo se tornar obeso esteja relacionada a hormônios e substâncias reguladoras do metabolismo lipídico e da saciedade; a alimentos em excesso, principalmente gorduras; a atividade física com menor gasto de calorias; a tipos de alimentos e as interações entre eles; a adipogênese, com níveis elevados de lipase lipoproteica; a oxidar menos gorduras; a influência do peso ao nascer; ao tempo em frente à

televisão e a influência genética - mutações genéticas (BERTOLAMI, 2004; BORGES, 2008; SILVA *et al.*, 2009; BARBIERI, 2012).

Socioeconomicamente, as alterações decorrentes da melhoria das condições de vida da população também são objetos de estudos na investigação do que leva à obesidade. Muitos defendem que esse fato está associado a uma mudança dos hábitos de vida principalmente dos padrões alimentares, devido ao aumento do consumo de comidas designadas *fast food* e no sedentarismo (SOUZA *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos citados por Amaral e colaboradores em 2008 mostraram uma forte associação entre obesidade e as dietas inadequadas, com o consumo excessivo de alimentos hipercalóricos, resultando em aumento do peso corporal. De acordo com os estudos, as falhas nas dietas são frequentes e causadas por inúmeros fatores, dentre os quais, a instabilidade emocional, o desejo obsessivo de emagrecer, mas principalmente a ingestão de grandes quantidades de gorduras, o que acaba por contribuir para um aumento da prevalência de ganho de peso e posteriormente obesidade.

Linhares *et al* (2012) destacam ainda, que o excesso de gordura ingerido pode interferir diretamente nos riscos associados ao excesso de peso e a sua distribuição no corpo. Segundo os autores, o excesso de gordura abdominal representa maior risco do que o excesso de gordura corporal por si só; o que explica ser um dos fatores de risco mais importantes para outras doenças crônicas e complicações não transmissíveis.

Uma dessas complicações está relacionada às doenças de alterações no metabolismo lipídico, que normalmente começam antes mesmo do desenvolvimento de qualquer outra. O aumento de gordura (ácidos graxos livres e triglicérides) circulante no sangue acarreta o aumento da formação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL), ao lado da redução dos níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL). E quando considerada junto das alterações do HDL, LDL, triglicérides, inflamatórias e à presença de aterosclerose na família, pode ser um dos grandes problemas frequentemente encontrados nos pacientes com sobrepeso ou obesos (BERTOLAMI, 2004; BRASIL, 2010).

Diversos mecanismos são propostos e descritos na literatura para controlar o desenvolvimento de tais complicações, havendo várias opções de

escolha e tratamentos, com a maioria deles focando principalmente o controle do excesso de peso e da obesidade (SANTOS *et al.*, 2013).

Porém, antes da escolha do tratamento ideal é necessário entender todo o processo, do ponto de vista do ganho de peso pelo consumo de gordura em excesso, de como ocorre o metabolismo dos lipídios e gorduras, como são digeridos, absorvidos e sua distribuição no sangue, já que a melhor escolha deve ser baseada na gravidade do problema e na presença de complicações associadas, uma vez que, quanto maior o grau de excesso de peso, maior a gravidade da doença (BRASIL, 2010).

## 2.2. METABOLISMO LIPÍDICO NO ORGANISMO HUMANO

### 2.2. 1. CARACTERÍSTICAS DAS GORDURAS E LIPÍDIOS DA ALIMENTAÇÃO

Os lipídios são misturas de diferentes tipos de gorduras como as gorduras neutras (acilglicerois); os fosfolipídios (glicerofosfolipídios); o colesterol; os colesterídios (ésteres do colesterol) dentre outras substâncias. No corpo humano, existem, sobretudo, no tecido adiposo e são os mais abundantes componentes do organismo e da dieta totalizando mais de 90% (BERTOLAMI, 2004; BRASIL, 2010; SIMÃO *et al.*, 2012).

Os fosfolipídios contem cadeias de ácido graxo no interior de suas moléculas e os ésteres de colesterol são combinações de colesterol livre e uma molécula de ácido graxo (GUERRA *et al.*, 2010). Já o colesterol é um composto esterol que não contém ácido graxo, mas exhibe algumas das características físicas e químicas das gorduras, além de derivar delas e ser metabolizado da mesma forma (GUYTON *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007).

As gorduras neutras ou lipídios simples são combinações de três moléculas de ácido graxo condensadas com uma única molécula de glicerol - núcleo de glicerol (Figura 1). São formados pela reação entre o álcool glicerol e ácidos graxos, por meio de uma reação de esterificação, originando um éster de ácido graxo (HERNANDES *et al.*, 2010).

Podem ser consideradas monoésteres, diésteres ou triésteres do glicerol com ácidos graxos, sendo denominados respectivamente, de monoacilglicerois, diacilglicerois e triacilglicerois (triglicerídios). Na dieta são constituintes

importantes dos alimentos de origem animal e vegetal (LU *et al.*, 2009; BEVILACQUA *et al.*, 2007).

Os triglicerídios, do ponto de vista químico, apresentam como componentes lipídicos básicos os ácidos graxos, que consistem simplesmente em ácidos orgânicos hidrocarbonatos de cadeia longa; e se considerar no contexto geral da alimentação e o fato dos triacilglicerois possuírem em sua estrutura três moléculas de ácido graxo, eles passam a ser os constituintes mais importantes do alimento, sendo praticamente inexistentes na forma livre (ALVIM, 2002; LU *et al.*, 2009).

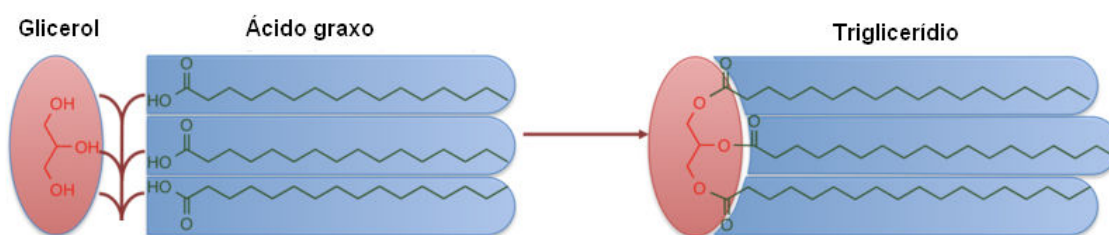


Figura 1: Formação do Triglicerídeo através da combinação de uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido graxo.

Fonte: LEHNINGER *et al.*, 2008.

Mesmo sendo considerados gorduras, esses diferentes tipos de lipídios provenientes de diversos alimentos são essenciais ao bom funcionamento do organismo e no caso dos triglicerídios ainda fornecem energia aos diferentes processos metabólicos. Essa função é quase igualmente compartilhada com os carboidratos (GUYTON *et al.*, 2006; LOTTENBERG, 2009).

Todavia, alguns lipídios, em particular o colesterol, os fosfolipídios e seus derivados são utilizados em todo o organismo no desempenho de outras funções celulares e de maneira geral estão relacionadas com a obesidade (ALVIM, 2002).

Quando consumidas nas proporções recomendadas, não excedendo os 30% do valor energético diário, as gorduras são bem toleradas e têm diversos efeitos benéficos. Elas apresentam diversas funções no organismo e apesar de ser uma excelente fonte de calorias, são componentes estruturais das membranas celulares e dos sistemas nervoso e circulatório e estão envolvidos

em uma grande variedade de funções hormonais, reguladoras e imunológicas em todos os animais (POZZAN *et al.*, 2004; SIMÃO *et al.*, 2012).

Por outro lado, quando consumidas em excesso e desregradamente, os efeitos prejudiciais são muitos e rapidamente se fazem sentir no estado de saúde. Podem contribuir para o depósito de gordura corporal, excesso de peso, dislipidemias, inflamações, irritações e disfunção fisiológica de alguns órgãos, além de câncer (EHRICH *et al.*, 2003; BEVILACQUA *et al.*, 2007).

Alguns estudos preconizam porcentagens para a menor quantidade e o menor consumo possível desses ácidos graxos. O ideal é que haja equilíbrio durante a alimentação, pois a gordura por si só não é, intrinsecamente, prejudicial para a saúde (LINHARES *et al.*, 2012).

A partir do momento em que se conhece os diferentes tipos de gorduras, quais as que se devem reduzir e as que se devem aumentar o consumo, então se consegue fazer escolhas que auxiliam a atingir um consumo diário saudável. Porém até o momento, não há um consenso com relação à quantidade máxima em gramas de gordura permitida na dieta (COLE *et al.*, 2009).

#### 2.2.2. DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE GORDURAS NO TRATO GASTROINTESTINAL

A grande maioria da gordura que chega até o organismo humano consiste em triglicerídios e é proveniente da alimentação. Apenas 5% ou menos dessa gordura não são absorvidos; o restante é normalmente absorvido pelo organismo (SILVA *et al.*, 1999).

Como as gorduras de que depende o organismo, não podem ser absorvidas em suas formas naturais através da mucosa gastrintestinal e, por esse motivo, são inúteis como nutrientes se não forem submetidos ao processo preliminar da digestão, é necessário que haja uma modificação química, sendo quebradas em pequenas moléculas durante a digestão (BORGES, 2008).

Ao serem ingeridas, as gorduras caem no trato gastrointestinal até o estômago, quase inalteradas, sofrendo pequena digestão por enzimas salivares e gástricas. Porém, o grau de digestão é tão pequeno que chega a ser insignificante (HSU *et al.*, 2008).

Então, praticamente toda a digestão das gorduras passa a ocorrer no intestino delgado e no duodeno, que juntamente com o quimo, estimula a secreção da bile ocorrendo a emulsificação lipídica (NEGREIROS, *et al.*, 2011).

A primeira etapa da digestão da gordura consiste em desdobrar os glóbulos de gordura em partículas de tamanho pequeno para que as enzimas digestivas possam atuar sobre as superfícies deles (CURIEL, 2011). Esse processo é denominado emulsificação da gordura e é efetuado pela bile, que contém grandes quantidades de sais biliares e o fosfolipídio lecitina sob a forma de sais ionizados de sódio, que são extremamente importantes para a emulsificação da gordura (GUYTON *et al.*, 2006; DODEROS, *et al.*, 2011).

No intestino delgado, a superfície da emulsificação lipídica é então exposta por meio da ação de enzimas - lipases gástricas e intestinais - auxiliadas por outra proteína denominada colipase que reveste as gotículas lipídicas da emulsão e as unem à lipase pancreática, que é encontrada no suco pancreático em quantidades enormes, suficientes para digerir em poucos minutos todos os triglicerídios com os quais entra em contato (BALBINOT *et al.*, 2009; LINHARES, *et al.*, 2012).

Por estar presente no intestino e ser hidrossolúvel, a lipase pancreática é capaz de atacar os glóbulos de gordura em suas superfícies e através de hidrólise quebrar sucessivamente os triglicerídeos em ácidos graxos livres (Figura 2) (VILARTA, 2007).

Porém, pequenas porções permanecem no estado de diacilgliceróis, ou seja, há desdobramento removendo dois de três ácidos graxos de cada triacilglicerol, deixando o ácido graxo central do triglicerídio original ligado a cadeia de glicerol e liberando dois ácidos graxos livres e um monoacilglicerol (FERREIRA, 2010; SIMÃO *et al.*, 2012).



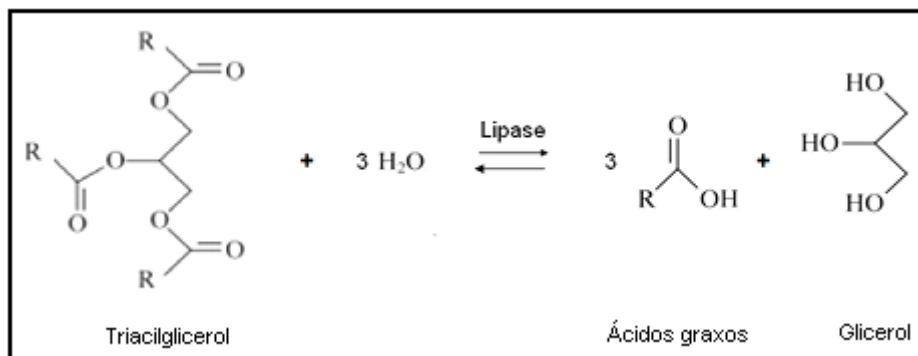


Figura 2: Ação da lipase pancreática sobre os triglicerídeos.

Fonte: BROD, 2010.

Durante esse processo são removidas, também, moléculas de água, pois a digestão dos triglicerídios consiste no processo inverso: as lipases devolvem moléculas de água à molécula de triglicerídio, clivando as moléculas de ácido graxo do glicerol. Essa hidrólise que ocorre com os triglicerídios é um processo altamente reversível (LOTTENBERG, 2009).

Ao mesmo tempo em que ocorre a hidrólise pelas lipases, há também o acúmulo de monoglicerídios e ácidos graxos livres na vizinhança de gorduras em processo de digestão, que acabam bloqueando rapidamente qualquer digestão subsequente. Daí, rapidamente surgem os sais biliares para removê-los e formar micelas, que são pequenos glóbulos esféricos. Esses glóbulos se formam porque cada molécula de sal biliar é composta de um núcleo esterol, cuja maior parte é altamente lipossolúvel, e de um grupo polar altamente hidrossolúvel (AILHAUD *et al.*, 2006; BORGES, 2008; FERNANDES, 2012).

Então, os núcleos esteróis das moléculas de sais biliares da micela agregam-se para formar um pequeno glóbulo de gordura no meio da micela. Essa agregação faz com que os grupos polares se projetem para fora, cobrindo a superfície da micela (Figura 3). Como esses grupos polares possuem cargas negativas, permitem que todo o glóbulo da micela se dissolva na água dos líquidos digestivos e permaneça em solução estável, apesar do tamanho muito grande da micela (THOMPSON, 1989; EHRICH *et al.*, 2003; GUYTON *et al.*, 2006; COLE *et al.*, 2009).

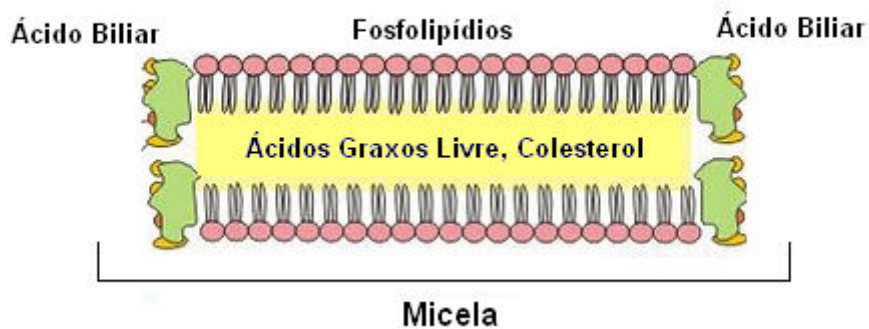


Figura 3: Micela formada pela ação dos sais biliares. Apresenta núcleo esterol altamente lipossolúvel e grupos polares projetados para fora.

Fonte: THOMPSON, 1989.

Devido às dimensões moleculares dessas micelas, e à sua alta carga na porção exterior, elas são solúveis no quimo, possibilitando atuar como meio de transporte para os monoglicerídios e os ácidos graxos livres até as superfícies das microvilosidades das bordas em escova das células epiteliais, chegando a penetrar nos recessos entre as microvilosidades em movimento uma vez que, de outro modo, ambos seriam relativamente insolúveis (CARVALHO *et al.*, 2012; FERNANDES, 2012)

Na borda em escova, tanto os monoglicerídios quanto os ácidos graxos livres são absorvidos. Primeiro, nos líquidos locais e depois através da membrana epitelial, visto serem tão solúveis nessa membrana quanto nas micelas (AILHAUD *et al.*, 2006).

Ao liberar essas substâncias na borda em escova, as micelas dos sais biliares difundem-se de volta ao quimo e novamente absorvem monoglicerídios e ácidos graxos e, da mesma forma, os transportam até as células epiteliais. Assim, os ácidos biliares desempenham uma função de transporte, que é muito importante para a absorção da gordura (GUERRA *et al.*, 2010; CURIEL, 2011).

Após penetrarem na célula epitelial, os ácidos graxos e os monoglicerídios são captados pelo retículo endoplasmático liso, onde são recombinados principalmente para a formação de novos triglicerídios. Alguns dos monoglicerídios são posteriormente digeridos a glicerol e ácidos graxos por uma lipase da célula epitelial (GUYTON *et al.*, 2006; HERNANDES *et al.*, 2010).

Depois, esses ácidos graxos livres são reconstituídos em triglicerídios pelo retículo endoplasmático liso e agregam-se em glóbulos, juntamente com o colesterol e os fosfolipídios absorvidos e pequenas quantidades de colesterol e fosfolipídios recém-sintetizados (VILARTA, 2007; DODEROS, *et al.*, 2011).

Dessa maneira, o glóbulo difunde-se para o lado da célula epitelial por canais lacteais das vilosidades, sendo excretado pelo processo de exocitose celular, para o espaço existente entre as células; daí passa para a linfa dos vasos quilíferos centrais da vilosidade. (HERNANDES *et al.*, 2010). Esses glóbulos são então chamados quilomícrons e também excretados por exocitose celular realizado pela apoproteína, que cria um meio de fixar o glóbulo gorduroso à membrana celular antes de ser expelido (CURIEL, 2011).

Os quilomícrons são então transportados pelos vasos linfáticos para dentro do sistema venoso – corrente sanguínea – e seguem seu trajeto nos vasos quilíferos centrais das vilosidades e, então, são propelidos juntamente com a linfa, pela bomba linfática para cima, através do duto torácico que deságua nas grandes veias do pescoço (GUYTON *et al.*, 2006; DODEROS, *et al.*, 2011).

A partir daí, são carregados para o fígado onde os triglicerídeos são reagrupados em lipoproteínas e transportados principalmente para o tecido adiposo para metabolismo e armazenamento (GRILLO *et al.*, 2005).

Pequenas quantidades de ácidos graxos de cadeia curta e média podem ser absorvidas diretamente para dentro do sangue portal (sistêmico), em vez de serem convertidos em triglicerídeos pelo retículo endoplasmático e absorvidos pelos linfáticos. Estes ácidos graxos são mais hidrossolúveis permitindo a sua difusão direta para dentro da corrente sanguínea, chegando primeiro no tecido adiposo, muscular e outros tecidos antes de entrarem em contato com o fígado (FERREIRA, 2010; NEGREIROS, *et al.*, 2011).

No transporte do colesterol livre, bem como das porções restantes das moléculas de fosfolipídios digeridas, as micelas de sais biliares desempenham o mesmo papel de transporte desempenhado no transporte dos monoglicerídios e dos ácidos graxos livres. Essa função das micelas é absolutamente essencial para a absorção do colesterol, visto que praticamente nenhum colesterol pode ser absorvido sem a função das micelas (ALVIM, 2002).

As etapas do processo de digestão e absorção das gorduras no organismo podem ser vistas na Figura 4.

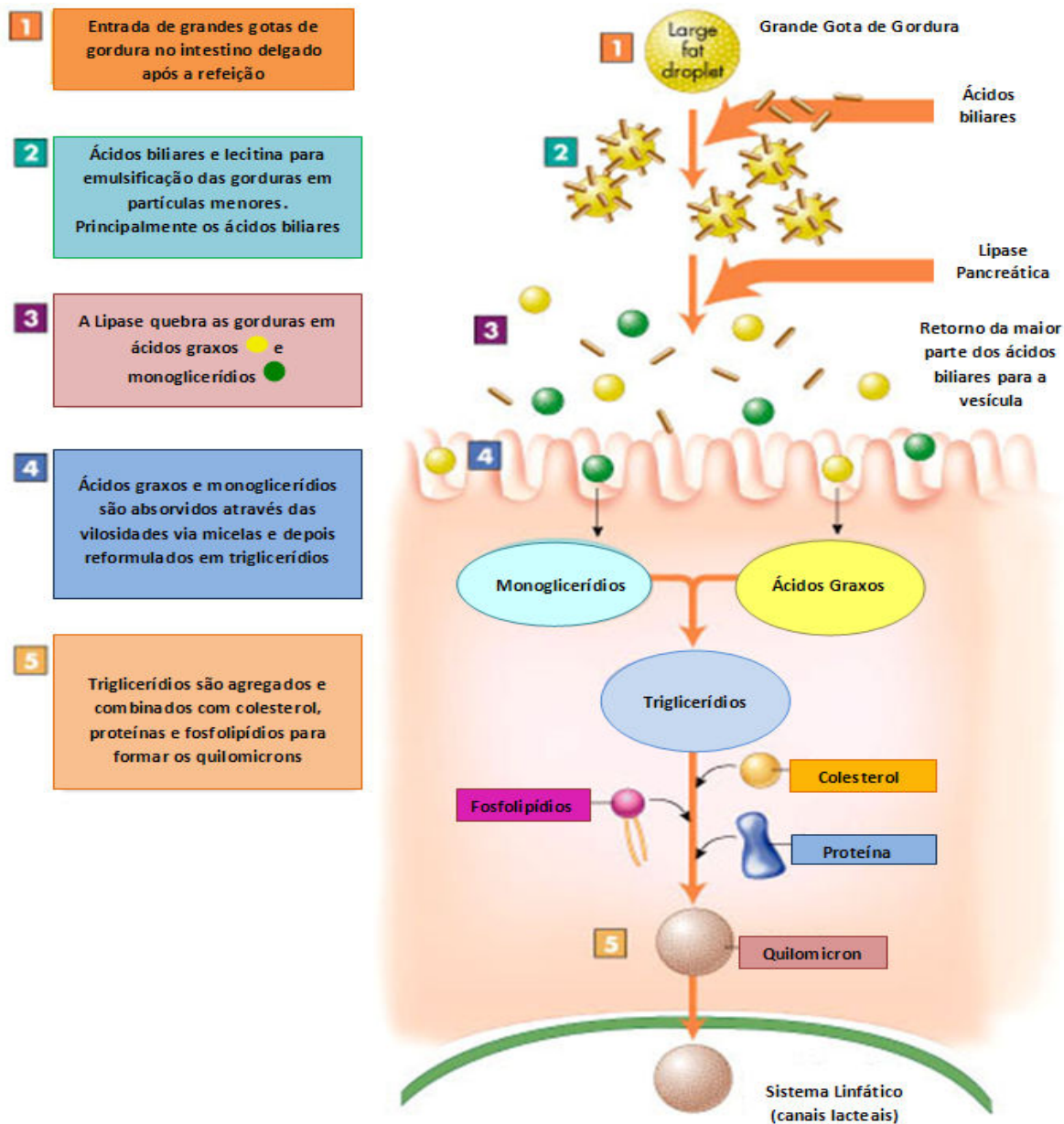


Figura 4: Esquema da digestão e absorção de gorduras no organismo. Inicia-se com a chegada da gordura do alimento, sua passagem pelo intestino delgado e sistema linfático após a absorção.

Fonte: GUYTON *et al.*, 2006

### 2.2.3. LIPASE PANCREÁTICA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As lipases são um grupo heterogêneo de proteínas encontradas em inúmeras espécies de plantas, micro-organismos e animais, sendo descritas como triacilglicerol lipase (E.C.3.1.1.3). Atuam diretamente sobre ligações ésteres de triglicerídios, hidrolisando principalmente os de cadeia longa (cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono) liberando ácidos graxos e glicerol (MESSIAS *et al.*, 2011).

Uma das mais conhecidas é a lipase pancreática. Esta enzima é considerada a peça chave na absorção de lipídios no corpo humano, sendo a principal enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas devido sua importância na eficiência da digestão de triacilglicerol (BROD, 2010).

Ela consegue remover ácidos graxos do triacilglicerol que é ingerido na dieta, produzindo monoacilglicerol e ácidos graxos de cadeia longa saturada e poli-insaturada como produto lipolítico. Assim, consegue hidrolisar de 50-70% da gordura total da dieta (RASERA, 2012).

Tem como substratos naturais os óleos e as gorduras que contêm triacilgliceróis com ligações ésteres tríplex. É responsável por catalisar a hidrólise total ou parcial e a síntese desses triacilgliceróis, daí conhecida como triacilglicerol acil hidrolase e carboxil éster hidrolase (CURIEL, 2011).

Normalmente atua em meio aquoso, diretamente nas ligações éster das carboxilas presentes em acilgliceróis, agindo na interface entre o substrato insolúvel e a água (SALUM, 2010).

Quando atua na interface lipídeo-água de substratos micelares ou emulsificados há um drástico aumento de sua atividade, fenômeno esse denominado ativação interfacial descrito por *Michaelis-Menten*. Esse mecanismo é peculiar ao mecanismo de ação das lipases, as quais podem se apresentar sob as conformações ativa (aberta) e/ou inativa (fechada) (COSTA-SILVA, 2010)

Na presença de água e de um meio homogêneo essas formas se mostram em equilíbrio, entretanto esse equilíbrio está deslocado para a conformação inativa. Porém, esse comportamento cinético só é válido devido o sistema ser homogêneo, e o substrato e a enzima estarem solubilizados (MESSIAS *et al.*, 2011).

Na presença de superfícies hidrofóbicas como gorduras, óleos e micelas a formação do complexo enzima-substrato (ES) é precedida por uma adsorção reversível da lipase ao agregado de substrato movendo o equilíbrio para a conformação ativa. Isso considerando que o substrato não é solúvel no sistema e a enzima atua na interface (SIMÃO , 2013).

Neste caso a lipase e o substrato micelizado entram em contato para que ocorra a catálise enzimática, mas para isso alguns pontos do equilíbrio devem ser considerados (LIMA, 2004).

O primeiro é a interação da enzima (E) com a interface água-micela tornando-se ativa ( $E^*$ ). O segundo é a formação de um complexo enzima-substrato ( $E^*S$ ) de forma rápida e reversível, ou seja, uma molécula do substrato (S) liga-se a uma região específica da enzima ativada ( $E^*$ ) chamada de sítio ativo formada pela tríade catalítica: resíduos de serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico (Ser-His-Asp/Glu). E o terceiro é a reação da enzima, com rompimento do complexo  $E^*S$  mais lentamente, reaparecendo a enzima livre (E) e a formação do produto (P), como mostra a Figura 5 (SILVA, 2007; CURIEL, 2011).

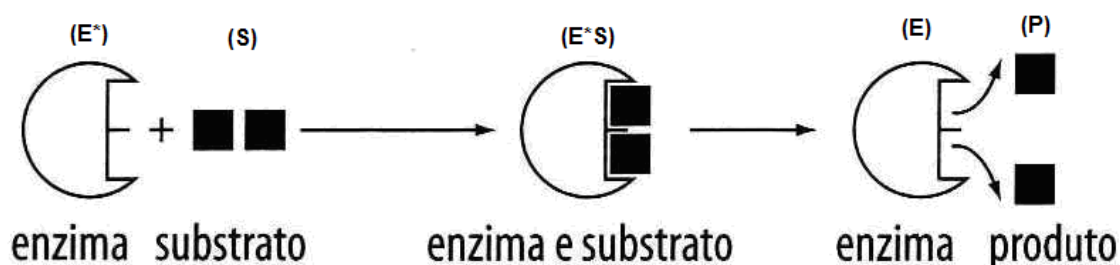


Figura 5: Modelo de interação enzima-substrato. Associação da enzima ativa ( $E^*$ ) com substrato (S) formando o complexo ( $E^*S$ ). Após reação há liberação da enzima (E) e do produto (P).

Fonte: COSTA *et al.*, 1999.

Este modelo descrito é equivalente ao equilíbrio clássico (cinética clássica) de *Michaelis-Menten*, visto que, após a formação do complexo  $E^*S$  para ocorrer a catálise há a regeneração da enzima na forma ativa com liberação do produto. Esse processo é mais lento, e acaba limitando a velocidade de transformação de reagente em produto, mas a velocidade de

reação passa a ser proporcional ao aumento da concentração do substrato no sistema, eventualmente ficando a enzima saturada a altas concentrações de substrato (SILVA, 2007; PEREIRA *et al.*, 2010).

Neste sentido, esse parâmetro de atuação das enzimas vem sendo estudado e alguns métodos têm sido descritos e utilizados para determinar a atividade enzimática *in vitro* das lipases por diversas substâncias. Um exemplo é a inibição da lipase pancreática como opção bastante promissora para auxiliar no tratamento da obesidade (SOUZA *et al.*, 2011; SIMÃO *et al.*, 2012).

Na maioria das vezes a atividade da enzima é determinada através da cinética da reação e da quantificação dos ácidos graxos liberados (produto) durante a hidrólise mediada pela enzima. Estes produtos podem ser determinados por métodos físico-químicos avaliando-se o desaparecimento do substrato ou a formação dos produtos da reação (ZHANG *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010).

Dentre os métodos recentemente utilizados que avaliam a cinética e o aparecimento dos produtos da reação de hidrólise compreendem os ensaios de titulometria, que são conhecidos como ensaios indiretos havendo a liberação de prótons durante a reação; e os ensaios de análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos derivados do glicerol ou que utilizam substratos sintéticos como ésteres de ácidos graxos de *p*-nitrofenol (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato) e metil-umbeliferila como nos ensaios espectrofotométricos – colorimétricos e fluorimétrico (LEE *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010; SIMÃO *et al.*, 2012).

### 2.3 TRATAMENTO DO EXCESSO DE PESO E DA OBESIDADE

Nas últimas décadas a abordagem terapêutica do excesso de peso e da obesidade tem sido objeto de profundas mudanças, principalmente devido ao desenvolvimento de novos fármacos e propostas não farmacológicas de tratamento (NEGREIROS *et al.*, 2011).

Para o Ministério da Saúde o tratamento do excesso de peso e da obesidade é difícil, complexo e multidisciplinar. Independente de como é conduzido, deve exigir identificação e mudança de componentes inadequados

de estilo de vida do indivíduo incluindo mudanças na alimentação e prática de atividade física (BRASIL, 2013).

O desafio da grande maioria está em poder controlar o ganho de peso, acelerar a oxidação da gordura e acabar com os fatores de risco que levam as complicações da doença (BARBARÁ, 2004).

Podem ser divididos em três grupos: tratamento clínico não medicamentoso, clínico medicamentoso e cirúrgico (cirurgias bariátricas) no caso de obesidade mórbida (GRILLO *et al.*, 2005).

O tratamento clínico não medicamentoso engloba tanto a prática de atividade física formal, quanto a informal, sempre considerando a manutenção e o aumento gradual com acompanhamento especializado. Inclui também mudanças de hábito alimentar, priorizando a boa mastigação dos alimentos, além da correção dos erros alimentares com tratamento dietético (BARBARÁ, 2004; BRASIL, 2009).

Entretanto, em certos casos, somente o tratamento não medicamentoso não é suficiente para chegar ao resultado buscado e esperado, havendo a necessidade de um tratamento clínico com a utilização de medicamentos sob prescrição médica, os quais devem servir apenas como auxílio ao tratamento dietético e não como estrutura fundamental do tratamento da obesidade (MOTYCKA *et al.*, 2005; NONINO-BORGES *et al.*, 2006).

Normalmente a intervenção medicamentosa deve ser estabelecida em cada população e sempre considerar o grau de obesidade aceitável, visto que, os critérios mais aceitos consideram um IMC de 30 kg/m<sup>2</sup> ou 25 kg/m<sup>2</sup> na presença de comorbidades, e/ou na falha em perder peso com o tratamento não farmacológico, ou seja, onde o tratamento com dieta, atividade física e modificações comportamentais provaram ser insuficientes (MOTYCKA *et al.*, 2005).

Dentre os tratamentos utilizados no combate da perda de peso, e posterior à obesidade, cita-se a farmacologia terapêutica alopática que é dividida em diferentes classes de medicamentos com atividades potenciais. Três grupos se destacam: medicamentos que diminuem a fome ou modificam a saciedade; medicamentos que reduzem a digestão e a absorção de nutrientes e os que aumentam o gasto energético (FERREIRA *et al.*, 2009).



Porém, para serem úteis, esses medicamentos devem possuir algumas características fundamentais para adesão à terapia, como induzir a redução do peso corporal e melhorar as doenças que são dependentes do excesso de peso. Seus efeitos colaterais devem ser toleráveis e/ou transitórios, não apresentando propriedades de adição. Devem sempre manter a eficácia e a segurança durante o período de utilização e em longo prazo. Devem possuir mecanismo de ação conhecido e oferecerem ao paciente um custo razoável (BARBARÁ, 2004; FORTES *et al.*, 2006).

Medicamentos que diminuem a fome ou modificam a saciedade, assim como os que elevam o gasto calórico, aumentam a disponibilidade de neurotransmissores como a noradrenalina, adrenalina, serotonina e dopamina no sistema nervoso central através da inibição específica da recaptação, sendo responsáveis por controlar a fome, melhorar o humor, a ansiedade, a depressão e a compulsão alimentar; modificando a ingestão de alimentos; pontos cruciais que modulam a resposta terapêutica (FERREIRA *et al.*, 2009; BRASIL, 2011)

Fármacos como Sertralina, Fluoxetina, Bupropiona e Sibutramina são indicados em doses relativamente seguras demonstrando uma boa eficácia na perda de peso; e quando associados à dieta hipocalórica, podem induzir a perda de até 5 a 8% de peso corporal em um período de até 6 meses, como é o caso da Sibutramina (BARBARÁ, 2004; BRASIL, 2011).

Mesmo com um aumento na perda de peso quando comparados com placebo, os efeitos colaterais como insônia, boca seca, constipação intestinal, euforia, taquicardia e hipertensão são muito comuns e importantes, além de que a associação de alguns pode até levar ao desenvolvimento de doença valvar cardíaca e até a morte (FORTES *et al.*, 2006; BRASIL, 2009).

Drogas como Anfepramona, Femproporex e Mazindol conhecidos como agentes catecolaminérgicos, ou anorexígenos e Fenfluramina e Dexfenfluramina, conhecidos como agentes serotoninérgicos ou sacietógenos, não estão mais disponíveis no mercado devido sérias limitações, especialmente pelo risco de abuso e de efeitos colaterais, além da recuperação do peso após a interrupção do seu uso, levando por parte dos órgãos regulamentadores à retirada do mercado, bem como a discussão acirrada do

efeito de vários de muitos desses fármacos (BRASIL, 2011; NEGREIROS, *et al.*, 2011).

Como opção a esses medicamentos, está disponível no mercado como coadjuvante no tratamento da obesidade e excesso de peso os inibidores enzimáticos. Essa classe de medicamento é responsável por reduzir a digestão ou absorção de nutrientes, como exemplo as gorduras da alimentação, cujo mecanismo de ação é ligar-se às enzimas específicas. Com isso, participa da digestão e absorção controlando, assim, o metabolismo (HILL *et al.*, 1999; FORTES *et al.*, 2006).

### 2.3.1 INIBIDORES ENZIMÁTICOS – CONTROLE DO METABOLISMO LIPÍDICO

Diversos estudos já evidenciaram que a gordura não é diretamente absorvida a partir do intestino a menos que tenha sido sujeita à ação de enzimas: as lipases. E para suprimir o aumento de peso, seria eficaz reduzir a absorção de gordura por inibição dessas enzimas (GRILLO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

Esse fato implica numa forma eficaz de prevenir a obesidade, perda de peso e ao mesmo tempo redução das taxas de gordura no sangue, o que evidencia uma predisposição à redução e controle do colesterol sanguíneo, ao inibir a absorção de gordura do intestino ou o aumento da sua taxa metabólica e oxidação (LIMA, 2004; NAKAI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2011).

Neste contexto, qualquer substância, seja ela sintética ou natural, isolada ou associada (como é o caso dos extratos de plantas que contem uma mistura de compostos) que consiga diminuir a velocidade de reação enzimática pode ser considerada como um “inibidor” enzimático (PEREIRA *et al.*, 2011).

Os inibidores enzimáticos são conhecidos e descritos como reversíveis e irreversíveis. Os irreversíveis inativam de forma permanente a enzima através da uma forte ligação no sítio catalítico, normalmente ligações covalentes, destruindo grupos funcionais importantes para a atividade enzimática. A dissociação é lenta e a enzima não retorna sua atividade normal (ARAUJO, 2009; COSTA-SILVA, 2010).

Os inibidores reversíveis inativam a enzima, mas quando removidos há a restauração da atividade enzimática. São divididos e classificados em

competitivos e não-competitivos, embora alguns autores ainda citam os inibidores mistos (BARON, 2008; SOUZA *et al.*, 2012).

Os inibidores reversíveis competitivos impedem a ligação da enzima com o substrato devido competir com a molécula do substrato pela ligação no sítio ativo da enzima. Isso ocorre, pois tais inibidores são semelhantes ao substrato ou um derivado de um substrato verdadeiro, um substrato substituto da enzima ou um produto da reação (BARON, 2008; ARAUJO, 2009; COSTA-SILVA, 2010).

Na inibição reversível não-competitiva o inibidor, semelhante ou não ao substrato, se liga ao sítio ativo da enzima ou ao complexo enzima-substrato e acaba distorcendo e inativando a enzima, tornando a catálise ineficiente. Neste caso, não há competição com o substrato, pois o inibidor ocupa outro sítio ativo da enzima formando um terceiro complexo: enzima-inibidor-substrato (EIS) (PEREIRA *et al.*, 2003; LIMA, 2004; SILVA, 2007).

Há também ações dos inibidores descritas como sendo específicas ou não específicas, onde podem atuar direta ou indiretamente no sítio ativo da enzima respectivamente. Com isso, podem inibir a atividade enzimática catalítica devido mudar a conformação da enzima (ARAUJO, 2009; COSTA-SILVA, 2010).

Um exemplo de inibidor enzimático irreversível é o Orlistate (tetrahidrolipostatina), um medicamento sintético aprovado e liberado em 1998 pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para tratamento a longo prazo do excesso de peso e da obesidade, pois consegue limitar a absorção de gordura da dieta (SILVA *et al.*, 2009; FORTES *et al.*, 2006).

Atua inibindo as lipases digestivas (Figura 6) na região do lúmen intestinal, sendo efetivo em 30% na hidrólise de triglicérides. Liga-se de maneira irreversível no sítio ativo das lipases, que reage especificamente com a serina nucleofílica residual da tríade catalítica da lipase pancreática (MANCINI *et al.*, 2002).

Por bloqueio covalente do sítio ativo, ele inibe a hidrólise da dieta de triacilgliceróis e assim reduz a subsequente absorção intestinal dos produtos da lipólise: monoacilglicerol e ácidos graxos livres. Ele também inibe a lipase gástrica, colesterol esterase, e várias outras lipases que são todas as serinas

hidrolases, porém não inativa as serinas proteases como a tripsina e quimiotripsina (ORSOLIN, 2011).

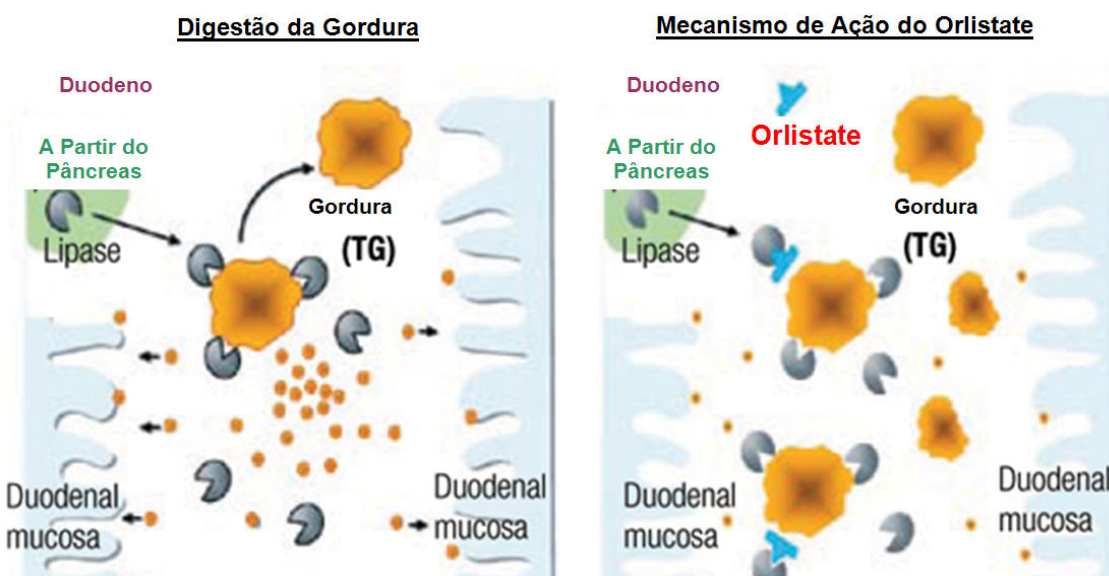


Figura 6: Mecanismo de ação do Orlistate. Inibição da lipase pancreática por ligação irreversível ao sítio catalítico, inibindo a hidrólise dos triglicerídios.

Fonte: COUTINHO, 2009.

Por não apresentar efeito a nível Sistema Nervoso Central, sua ação se baseia, não só no bloqueio dos triglicérides da dieta, mas também na redução do colesterol total e frações: LDL e VLDL. Entretanto, assim como a maioria dos medicamentos seus efeitos colaterais por serem muitos, acabam limitando o uso por alguns pacientes (COUTINHO, 2009; ORSOLIN, 2011).

Podem ocorrer desde desconfortos e dores abdominais, esteatorréia (diarréia gordurosa), incontinência fecal com manchas oleosas (15-30% dos casos), náuseas, vômitos, até interferência na absorção de algumas vitaminas lipossolúveis, sendo necessária a realização da dosagem sanguínea para controle sérico e confirmação da necessidade de suplementação (MANCINI *et al.*, 2002; CURIEL, 2011).

Assim, uma alternativa viável ao tratamento do excesso de peso e obesidade, é a fitoterapia com grande destaque para os produtos naturais e plantas. Algumas já vêm sendo utilizadas como fonte de estudos e com intuito de reduzir ao máximo os efeitos colaterais causados por grande parte desses medicamentos encontrados no mercado. Outras existem em grande variedade

na forma de extratos e de compostos isolados de plantas para a redução do peso corporal, mas sempre aliadas a uma dieta de baixa caloria (PIZZIOLO *et al.*, 2011).

### 2.3.2. IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS E FITOTERÁPICOS NA SAÚDE

As plantas e as ervas medicinais fazem parte do principal e mais importante recurso terapêutico no tratamento de várias doenças que afetam a saúde humana, seja em países emergentes ou em desenvolvimento (FOGLIO *et al.*, 2006).

Cerca de 25% da flora mundial e um patrimônio genético de grande potencial está no Brasil. Isso corresponde a mais de cem mil espécies existentes. Plantas como as do norte e nordeste brasileiro, da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica têm sido utilizadas há décadas como medicamentos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças (PAULA, 2013).

Graças à etnofarmacobotânica, etnofarmacognosia e etnofarmacologia que os costumes populares vêm sendo mais valorizados atualmente e o acervo de conhecimento a respeito de tratamentos de saúde praticado pelas culturas de influências indígena, afro-brasileira, oriental, além dos sertanejos e ribeirinhos, estão sendo totalmente explorado, contribuindo cada vez mais para a utilização correta das plantas (FRANCISCO, 2010).

Muitas já constituem fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos e de matéria-prima para elaboração de fitoterápicos ou de extração de compostos químicos farmacologicamente ativos. Grande parte delas já é utilizada na clínica médica em diversas especialidades (ALTERIO, *et al.*, 2007).

Um exemplo é a variedade de produtos naturais que vem sendo utilizada para a redução do peso corporal e prevenção da obesidade. Diversas espécies vegetais vêm ganhando espaço no mundo, principalmente em nosso país e várias são as opções distribuídas no mercado de naturais, seja em sua forma isolada ou em combinações com outras na forma de extratos, compostos isolados de plantas e chás (GUERRA *et al.*, 2010).

Algumas dessas espécies utilizadas são a laranja amarga (*Citrus Aurantium*), chá verde (*Camelia Sinensis*), alcachofra (*Cynara scolymus*), pholia negra (*Ilex paraguayensis*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), cáscara-sagrada (*Rhamnus prshiana*), fucus (*Fucus sp.*), sene (*Cassia angustifolia*), glucomanan (*Amorphophallus konjac*), garcínia (*Garcinia cambogia*), espirulina (*Spirulina máxima*) dentre outras. A maioria delas tem o uso estimulado por propagandas de diversos meios de comunicação, como *internet*, panfletos, revistas não científicas de fácil acesso em bancas de jornal e farmácias e drogarias (GOMES, 2009, MANENTI, 2010).

Muitos acabam recorrendo a esses produtos para obter resultados satisfatórios com o objetivo de reduzir a absorção de gorduras, diminuir o apetite ou acelerar o metabolismo, facilitando assim a perda de peso e de gordura abdominal localizada (FOGLIO *et al.*, 2006; ROSSATO, 2009).

E considerando ainda o aumento das taxas de sobrepeso observadas e da frequente e muitas vezes equivocada associação dos conceitos de magreza e saúde, observa-se uma busca crescente por esses métodos naturais que auxiliem ou promovam a rápida perda de peso (PEDROSO *et al.*, 2010).

Esse destaque na preferência da população pelo uso de plantas e produtos naturais é devido à facilidade de aquisição, ao esperado menor número de efeitos colaterais causados com frequência pelos medicamentos alopáticos, além de carregarem o estigma da segurança, favorecendo a inclusão como parte da dieta diária daqueles que buscam a fórmula milagrosa para a perda de peso e medida de forma instantânea (GOMES, 2009).

Porém, recentemente, uma revisão bibliográfica foi realizada a fim de verificar a condição de uso de algumas plantas como emagrecedoras pela população. Inúmeros trabalhos científicos foram avaliados, sendo mais de 50 plantas registradas como de uso para emagrecimento e anti-obesidade e vendidas no mercado de naturais (FERREIRA, 2010).

A grande maioria não apresentava estudos validados e base científica quanto à eficácia, segurança e qualidade que atestavam a comprovação dos efeitos atribuídos, seja em qualquer mecanismo fisiológico conhecido: diminuição da absorção de lipídios; diminuição da absorção de carboidratos; aumento do gasto energético; diminuição da diferenciação e proliferação de

células de gordura; diminuição da lipogênese e aumento da lipólise (MANENTI, 2010; PIZZILO *et al.*, 2011).

Nesse sentido, nos últimos anos, várias substâncias extraídas de produtos naturais que podem ser uma proposta promissora para o desenvolvimento de drogas seguras e efetivas contra o excesso de peso e obesidade estão sendo pesquisadas e elucidadas (MANENTI, 2010).

E uma das mais importantes estratégias nessa área inclui tanto a busca de um respaldo científico estimulando o uso racional de plantas e fitoterápicos para o emagrecimento, quanto para desenvolver técnicas analíticas capazes de elucidar mecanismos de como agem os compostos presentes nas plantas, visto que, ainda existe um pequeno número de publicações disponíveis sobre compostos naturais e escassez nas informações sobre a estrutura e a atividade desses compostos (BERTOLAMI, 2004).

Com o sucesso do orlistate, um inibidor específico da lipase pancreática, pesquisas relacionadas à identificação de novos inibidores de lipase pancreática derivados de fontes naturais estão sendo realizadas. Isso em função dos inibidores dessa enzima serem considerados um reagente terapêutico valioso para o tratamento de obesidade induzida por dieta em seres humanos (LEE *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos vêm retratando a utilização de plantas que apresentam compostos com ação inibitória direta das enzimas digestivas. A maioria presente em tecidos vegetais, como semente, raízes, cascas, folhas e outros (GRILLO *et al.*, 2005).

Metabólitos como as saponinas presentes em raízes e rizomas de várias plantas, compostos de açúcares ligados a um esteróide ou triterpeno, constituintes de derivados polifenólicos como flavonoides, taninos e catequinas atuam dificultando o metabolismo lipídico através da inibição enzimática desta via e são uma excelente alternativa para o tratamento da obesidade e distúrbios relacionados a ela (NAKAI, *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010; CURIEL, 2011).

Para Grillo *et al.*, (2005), se houver interferência nesse metabolismo, haverá redução da emulsificação, absorção e armazenamento de lipídios durante o mecanismo de digestão no sistema gastrointestinal sem alterar nenhum mecanismo central. Porém poucas técnicas relacionadas para analisar

o efeito dessa inibição como um dos principais mecanismos utilizados para determinar a eficácia no controle do peso são descritas.

Em 2005, um estudo *in vitro* realizado por NAKAI *et al.*, demonstrou que derivados polifenólicos isolados a partir de folhas de *Camellia sinensis* L (chá verde, chá oolong e chá preto), puderam ser avaliados quanto ao seu efeito inibitório contra a lipase pancreática por método fluorimétrico. Segundo os resultados obtidos, os derivados polifenólicos contribuíram largamente para a inibição dessa enzima e mostraram a capacidade de suprimir o aumento de lipídios do plasma, reduzir o consumo de alimentos e depósitos de gordura corporal.

Mais tarde, outros ensaios *in vitro* foram realizados e descritos por ZHANG *et al.*, (2008), LEE *et al.*, (2010), CURIEL, (2011) e SOUZA *et al.*, (2012) utilizando espécies como *Taraxacum officinale* (dente de leão), *Eremochloa ophiuroides* (gramínea), *Ilex paraguariensis* (erva mate), *Platycodin grandiflorum radix* (flor de balão, campânula), *Scabiosa tschiliensis*, *Salacia reticulata*, *Baccharis trimera* (carqueja), *Costus spicatus* (cana-do-brejo), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Cynara cardunculus* (alcachofra), *Equisetum arvense* (cavalinha), e *Echinodorus grandiflorus* (chapéu-de-couro). Todas para avaliar a ação inibitória de extratos obtidos de plantas frente a lipase pancreática.

As determinações dos efeitos inibitórios foram realizadas por titulação ácido/base, espectrofotometria e fluorimetria. Em todos os estudos os extratos vegetais analisados foram capazes de inibir a atividade da lipase pancreática, fato de grande interesse para o tratamento do excesso de peso, dislipidemia e obesidade e futuro desenvolvimento de drogas e fármacos para o combate de tais complicações (ZHANG *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010; CURIEL, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

Dentro dessa linha de pesquisa, uma espécie pouco estudada para essa finalidade é a *Endopleura uchi*. É uma planta utilizada popularmente há décadas na região Norte e Nordeste do País e pode apresentar grande potencial frente ao tratamento do excesso de peso, obesidade e distúrbios lipidêmicos. O chá de suas cascas vem sendo utilizado para uma infinidade de doenças e distúrbios inclusive para o controle e redução do colesterol



sanguíneo, mesmo ainda não catalogado o mecanismo de como ocorre (MAGALHAES *et al.*, 2007; BORGES, 2010).

#### 2.3.2.1. DESCRIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *ENDOPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC

A família Humiriaceae apresenta cerca de 50 espécies de plantas e abrange oito gêneros, dentre eles o *Endopleura*. Os grandes representantes dessa família englobam espécies com plantas lenhosas, verdes, árvores e arbustos com folhas simples e presença de frutos (NUNOMURA, *et al.*, 2002; SHANLEY *et al.*, 2005).

As plantas pertencentes a essa família são angiospérmicas e sua distribuição se estende desde a Costa Rica até o Brasil, sendo considerada neotropical. Também podem ser encontradas na costa ocidental da África tropical (REVILLA, 2001; MAGALHAES *et al.*, 2007).

Um exemplo de planta dessa família a ser citado é a *Endopleura uchi*. Essa espécie é uma planta popularmente utilizada e pouco estudada, originária da Amazônia brasileira, distribuída principalmente em regiões tropicais das Américas sendo encontrada no estuário do Pará e regiões de Bragantina, Guamá e Capim, na parte ocidental do Marajó e regiões dos Furos. Também encontrada nas matas altas de terra firme do Amazonas e Pará e em estado nativo na Reserva Florestal Ducke. É cultivada na colônia Santo Antônio em Manaus e na cidade de Belém, capital do Pará (REVILLA, 2002).

Em cada localidade da região Norte do país recebe uma denominação ou sinonímia vulgar, sendo as mais usadas e conhecidas: uchi ou uxi, uchi-amarelo, uchi-liso, cumatê e pururu. Recebe em sua nomenclatura os referenciais aos botânicos que a descreveram pela primeira vez: o botânico suíço Jacques Huber (ou Jakob E. Huber ou Jakob Huber-Müller) e o espanhol José Cuatrecasas Arumí, daí seu nome *Endopleura uchi* (HUBER) CUATREC (NUNOMURA, *et al.*, 2002; NEPOMUCENO *et al.*, 2010).

Sua classificação botânica está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Nomenclaturas botânicas da *Endopleura uchi* (HUBER) CUATREC

REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Magnoliidae
ORDEM	Malpighiales
FAMÍLIA	Humiriaceae
GÊNERO	<i>Endopleura</i>
ESPÉCIE	<i>Endopleura uchi</i>
SINÔNIMO CIENTÍFICO	<i>Sacoglottis uchi</i> Huber
NOME POPULAR	Uchi (uxi)
SINONÍMIA POPULAR	uchi-amarelo, uchi-liso, uxipucu; uchi-pucu (Amazonas e Pará); uchi (Pará); fruta-de-pobre, uxi, uxi-liso. Kremp (índios Kayapó); cumatê, pururu, uxi-ordinário, uxi-verdadeiro, axuá.

Fonte: REVILLA, 2001

#### 2.3.2.1.1 CARACTERÍSTICAS, CULTIVO E MANEJO DA *ENDOPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC

A *Endopleura uchi* é uma planta tipicamente silvestre da mata alta, de terra firme e frequentemente forma a parte superior da floresta. É uma árvore conhecida como uxizeiro, de grande porte, alta, com tronco reto e liso, que se desenvolve muito lentamente e que pode alcançar os 25-30 metros de altura e 1 metro de diâmetro, como ilustrado na Figura 7 (TACON, 2012).

Cresce em condições de clima quente e úmido característico das regiões de baixa altitude e em solos arenosos e argilosos, ácidos, úmidos e muito úmidos, mas bem drenados de terra firme. É encontrado,

frequentemente, acompanhado de outras espécies, formando assim um “uxizal” (BEZZERRA *et al.*, 2012).

A casca é fina, rugosa, porém espessa (2-3 mm de espessura), de cor castanha acinzentada, com manchas castanho-claras internamente com manchas grandes negras e castanhas, e pequenas esbranquiçadas. A madeira é de boa qualidade e de coloração vermelho-escuro (Figura 7). Seu fruto, uma vagem, pode ter de 5 a 7 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro e pesar entre 50 e 70g e pode conter entre 1 e 5 sementes. Uma camada de aproximadamente 5 mm em volta da semente representa a parte comestível do fruto (MAGALHAES *et al.*, 2007).



(A)



(B)

Figura 7: *Endopleura uchi* formando um uxizal (A) e tora do caule e da casca da *Endopleura uchi* (HUBER) CUATREC.

Fonte: POLITI, 2009; BORGES, 2010.

O manejo da *Endopleura uchi* é difícil e economicamente inviável. A germinação ocorre de 10 a 16 meses, o crescimento é lento na sombra, mas cresce até um metro por ano no sol e a produção demora de 12 a 20 anos para ocorrer (SHANLEY *et al.*, 1998).

A planta é especialmente cultivada por enxertia, devido ao seu lento desenvolvimento, mas também através de transplante de mudas. Recomenda-se associá-la com espécies anuais como macaxeira ou banana nos primeiros anos, porém o solo tem que estar bem adubado (FERRÃO, 2001).

Dado o tamanho da árvore, o fruto não é colhido, mas aguarda-se que se desprenda da árvore e caia no chão. As sementes devem ser colocadas para germinação logo que colhidas, deixadas em local semi-sombreado e contendo substrato organo-argiloso. Devem ficar enterradas a 3-4cm e o viveiro irrigado duas vezes ao dia. A emergência corre em 9-10 meses e a taxa de germinação geralmente é alta (LORENZI, 1998).

Algumas sementes são colocadas no terreno, envolvidas ainda no endocarpo. Com o objetivo de apressar a germinação da semente tem se ensaiado a utilização das sementes desprovidas de endocarpo, mas os resultados não têm sido muito favoráveis na medida em que, com muita frequência, se afeta o embrião no ato de partir o endocarpo (FERRÃO, 2001).

#### 2.3.2.1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E CONSTITUINTES QUÍMICOS DA *ENDOPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC

De acordo com um estudo etnofarmacológico, tanto a casca quanto o fruto da *E. uchi* são utilizados como medicamento pela população há um bom tempo, por apresentarem constituintes químicos responsáveis pelas suas ações biológicas. Esses constituintes são os metabólitos secundários que são característicos de uma família de espécies relacionadas da planta (POLITI, *et al.*, 2010; TACON, 2012).

A casca pulverizada da *Endopleura uchi* normalmente é utilizada na forma de chá após decocção. Apresenta uma série de substâncias responsáveis por diferentes ações farmacológicas dentre elas redução e eliminação de miomas em mulheres; antiinflamatória para o tratamento de artrite e reumatismo; contra o diabetes; redução e controle do colesterol;

atividade antimicrobiana; diminuição da motilidade intestinal (auxiliar no tratamento de diarreia), atividade imunológica, dentre várias outras, fazendo dela amplamente comercializada em feiras, mercados e farmácias, principalmente das regiões norte e nordeste do país (BORGES, 2010; NEPOMUCENO *et al.*, 2010).

Em 2009 POLITI descreveu a fitoquímica da planta citando o principal marcador e componente majoritário da planta, a bergenina (uma isocumarina) e o ácido gálico confirmando a presença de taninos e de mais duas classes de metabólitos secundários predominantes: as cumarinas e as saponinas.

Um ano depois, BORGES (2010) através de um estudo de isolamento e avaliação de atividade antinociceptiva, constatou análogos da bergenina (Figura 8): acetilbergenina, norbergenina e desmetilbergenina, que são derivados do ácido gálico C-glicosídeos. Também citou a presença de dimetoxibergenina, triterpenóides pentacíclicos, ácido masilínico, açúcares redutores, glicosídeos cardíacos, purina, lactonas e lactonas sesquiterpênicas, derivados fenólicos e flavonoídicos.

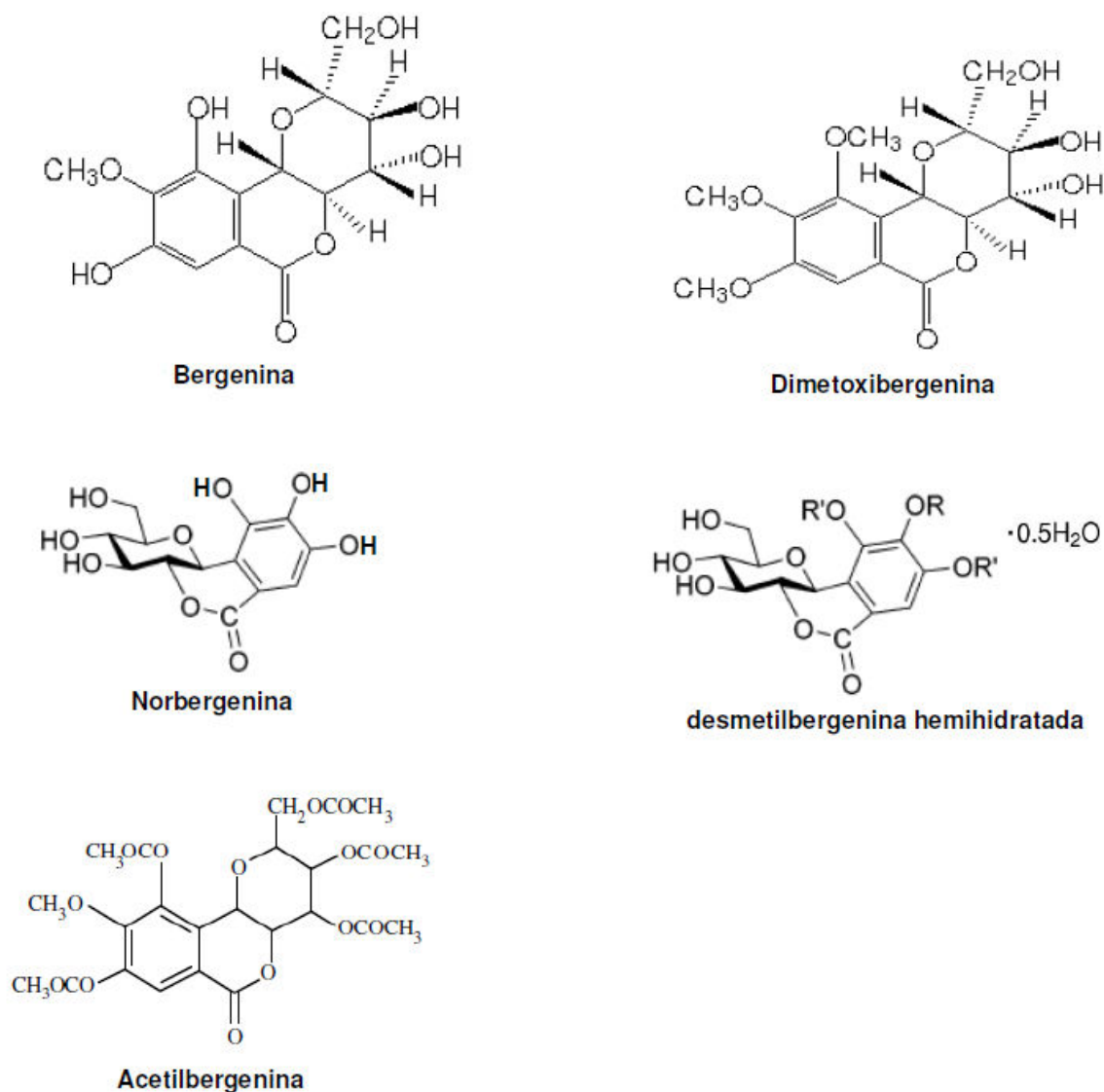


Figura 8: Estrutura química da bergenina e das substâncias análogas da bergenina isoladas da casca de *Endopleura uchi* HUBER CUATREC.

Fonte: BORGES, 2010.

Os derivados fenólicos apresentam em sua estrutura um grupo fenol, fazendo deles uma molécula aromática. Constituem parte de um grupo vegetal heterogêneo com mais de 10.000 compostos relacionados, sendo resultantes de duas vias metabólicas: a via do ácido chiquímico e do acetato. Dentre os compostos derivados fenólicos, destacam-se os flavonoides e os taninos não hidrolizáveis e condensados como os flavonóis de onde derivam as catequinas (DONADUZZI *et al.*, 2005; PETACCI *et al.*, 2012).

Os flavonoides representam uma ampla classe de constituintes encontrada no reino vegetal. Estão distribuídos em várias partes da planta, com destaque às cascas das árvores. A sua biossíntese ocorre a partir da via mista do acetil-CoA e do ácido chiquímico (PAULA, 2013).

Apresentam em sua estrutura 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental. Este núcleo comum é caracterizado por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) Figura 9. E devido a diversidade de grupos substituintes e vários padrões de hidroxilação, metilação e glicosilação, pode gerar uma infinidade de outros flavonoides (SOUZA *et al.*, 2005; PAULA, 2013).

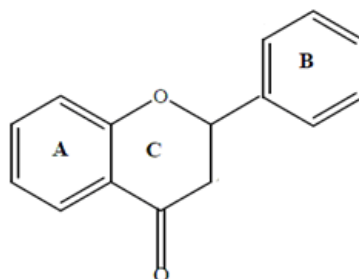


Figura 9: Estrutura básica dos flavonóides caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C)

Fonte: DORNAS *et al.*, 2007.

Os taninos são polifenóis que correspondem a um grupo diverso de substâncias fenólicas complexas muito disseminadas no reino vegetal, ocorrendo em quase todas as famílias vegetais. Localizam-se em certos órgãos da planta como folhas, fruto, mas com destaque ao caule. Sua biossíntese se dá pela via do ácido chiquímico e/ou via mista do acetil-CoA e do ácido chiquímico, mas também pela utilização de vários blocos de construção (NOZELLA, 2001; BILIERI *et al.*, 2011).

De acordo com a sua diversidade estrutural química, pode se dividir frente às características estruturais e propriedades em taninos hidrolisáveis (taninos gálicos e elágicos) e taninos condensados (proantocianidinas, catequinas) (NOZELLA, 2001; DONADUZZI *et al.*, 2005).

A presença desses derivados fenólicos e flavonoídicos na casca da *Endopleura uchi* pode contribuir, dentre outras, para a atividade antioxidante da

planta, uma vez que, ambos são considerados substâncias antioxidantes como resultado do processo evolutivo da espécie como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação ultravioleta necessária à fotossíntese (PETRY *et al.*, 2001).

Os derivados fenólicos podem atuar neutralizando a reatividade radicalar através da doação de um átomo de hidrogênio, bloqueando as reações em cadeia; enquanto os derivados flavonoídicos promovem deslocalização do elétron ou da nuvem eletrônica devido à presença de duplas ligações, hidroxila e de um grupo catecol no anel B da sua estrutura (Figura 8), conferindo uma maior estabilidade à forma radicalar (DONADUZZI *et al.*, 2005; BILIERI *et al.*, 2011).

Além da atividade antioxidante os derivados fenólicos e flavonoídicos ainda têm a capacidade de prevenir contra a peroxidação lipídica da membrana celular, reduzir os altos níveis de lipídios no sangue (triglicerídeos; colesterol), ou pela prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, complexar com metais, com proteínas e polissacarídeos; assim como inibir enzimas (ligações reversíveis ou irreversíveis) (NOZELLA, 2001; BILIERI *et al.*, 2011).

Na prática, uma variabilidade de técnicas colorimétricas é descrita para quantificar e determinar a atividade antioxidante desses constituintes, como pelo método do reagente de *Folin-Ciocalteu*, que determina derivados fenólicos; reação com cloreto de alumínio em meio ácido que quantifica derivados flavonoídicos e redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila – DPPH para atividade antioxidante (CHANG *et al.*, 2002; GONÇALVES, 2007; ROESLER *et al.*, 2007).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo a avaliação da eficácia antilipidêmica de amostras de casca de uchi amarelo (*Endopleura uchi*) adquiridas no mercado de produtos naturais.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este estudo teve como objetivos específicos:

Preparo e obtenção dos extratos a partir do material vegetal seco e triturado - casca de *Endopleura uchi*;

Determinação dos teores de derivados Flavonoídicos e Fenólicos totais a partir dos extratos obtidos da casca seca de *Endopleura uchi*;

Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Endopleura uchi* pelo método de DPPH;

Avaliação da eficácia de inibição da atividade enzimática da lipase pancreática dos extratos de *Endopleura uchi* empregando método espectrofotométrico;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados para o preparo e obtenção dos extratos a partir da casca seca e triturada de uchi amarelo (*Endopleura uchi*), para determinação de derivados flavonoídicos e fenólicos totais, para determinação da atividade antioxidante e avaliação da inibição da atividade enzimática da lipase pancreática estão listados abaixo:

#### 4.1.1. MATERIAL

- 2,2-Difenil-1-picrilidrazila (Aldrich Chem)
- Acetona P.A (CRQ)
- Ácido acético glacial (All Chemistry)
- Ácido Clorídrico Concentrado (Isofar)
- Álcool etílico P.A (CRQ)
- Álcool metílico (CRQ)
- Carbonato de sódio P.A (Synth)
- Cloreto de alumínio P.A (Synth)
- Cloreto de cálcio P.A (Isofar)
- Cloreto de sódio P.A (Reagen)
- Enzima lipase pancreática porcina tipo II (Sigma Aldrich)
- Extrato padronizado de *Ginkgo biloba* com 25,26% de flavonóides glicosídeos (Fagron) - Certificado de análise de qualidade Anexo I
- Orlistate sintético com teor de 100,32% (Pharma Nostra) - Certificado de análise de qualidade Anexo II
- Padrão ácido gálico (Riedel-de Haën - 99%)
- Padrão ácido tânico (Isofar – 88%)
- Padrão *p*-nitrofenol (Merck – 99,5%)
- Padrão quercetina (Fluka-Biochemika – 99%)
- Palmitato *p*-nitrofenila (Sigma Aldrich)
- Piridina P.A (Merck)
- Reagente de *Folin-Ciocalteu* (Haloquímica)

- Triton X-100 (Sigma Aldrich)

#### 4.1.2. EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (Fisaton 752)
- Agitador tipo vortex (Phoenix Luferco AP56)
- Aparelho ultrassom (Unique USC 700)
- Balança analítica (Precisa 205A)
- Centrifuga (Fanem® 206)
- Chapa aquecedora (Micro Química MQAMA 301)
- Espectrofotômetro UV/VIS (SP220-Biospectro)
- Liofilizador (Christ ALPHA 1-4 LD plus)
- pHmetro (Mettler Toledo MP220)
- Rotavapor® (R114-Buchi)

#### 4.1.3. MATERIAL VEGETAL

Casca seca finamente triturada de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec (Humiriaceae) obtida da empresa Chá e Cia ervas medicinais Ltda (Cert. Reg. IBAMA: 187956; Nº Insc. Prod.: 001010125361/98; Lote 003; colheita: 90/2012, validade: 09/2017). Certificado de análise de qualidade Anexo III.

#### 4.2. MÉTODOS

##### 4.2.1. PROCESSOS DE EXTRAÇÃO A PARTIR DA CASCA SECA E TRITURADA DE *ENDOPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC

Foram preparados 3 extratos vegetais a 20% (m/v – 200 g/L) por maceração a partir das cascas de *Endopleura uchi*, utilizando 3 solventes com polaridades diferentes: água deionizada; mistura de etanol e água (80:20) e mistura de acetona e água (80:20) (BERGOLD *et al.*, 2009; POLITI, 2009; BRASIL, 2010).

#### 4.2.1.1. OBTENÇÃO E RENDIMENTO DO EXTRATO EM ÁGUA (EA)

O material vegetal seco (200g), pesado em balança analítica, foi submetido à maceração estática, sendo deixado em contato com o líquido extrator (água deionizada – 1L) em frasco âmbar e hermeticamente fechado por uma semana. Todos os dias da semana, durante 2 horas, foi realizada a decocção. Ao final de uma semana, a mistura extrativa foi filtrada em papel de filtro e a torta resultante foi submetida a nova maceração estática com decocção diária por 2 horas. Os filtrados foram liofilizados e os extratos obtidos foram pesados e armazenados em freezer em frasco âmbar hermeticamente fechados.

#### 4.2.1.2. OBTENÇÃO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS EM ETANOL 80% (EE 80%) E EM ACETONA 80% (EAC 80%)

Para ambos os extratos a casca seca e triturada (200g), foi pesada em balança analítica, e submetida à maceração estática, sendo deixada em contato com o respectivo líquido extrator (1L - etanol 80% ou acetona 80%) em frasco âmbar e hermeticamente fechado por uma semana. Ao final de uma semana, a mistura extrativa foi filtrada em papel de filtro e a torta resultante foi submetida a nova maceração estática. Os filtrados foram submetidos a evaporação sob pressão reduzida até total eliminação do solvente orgânico. As frações aquosas que restaram foram então liofilizadas e os extratos obtidos foram pesados e armazenados em freezer em frasco âmbar hermeticamente fechados.

#### 4.2.2. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE DERIVADOS FLAVONOÍDICOS E DERIVADOS FENÓLICOS TOTAIS

##### 4.2.2.1. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DERIVADOS FLAVONOÍDICOS TOTAIS

O teor de derivados flavonoídicos totais, expresso em quercetina, foi determinado utilizando-se o método espectrofotométrico na região do visível, após reação com cloreto de alumínio 8% em metanol e ácido acético glacial na

presença de piridina (RUSAK *et al.* 1993; PETRY *et al.*, 2001; LUENGAS-CAICEDO, 2005), com pequenas modificações.

O ensaio foi realizado em triplicata a partir de 100 mg dos extratos liofilizados. Para cada réplica, a massa pesada da amostra foi transferida quantitativamente para balão de fundo redondo e adicionado 12 ml de metanol P.A. e aquecido sob refluxo por 30 minutos. Após esse tempo, a mistura de cada balão foi filtrada em algodão e transferida para balão volumétrico de 25 ml. Ao resíduo foi adicionado mais 10 ml de metanol P.A. e novamente aquecido sob refluxo por 30 minutos. A mistura foi filtrada em algodão e o volume transferido para o mesmo balão volumétrico da primeira etapa. O volume correspondente foi completado com metanol.

Foi então realizada reação de clarificação em funil de separação para eliminação de carotenoides e clorofilas. Para cada repetição foi transferido 15 ml da solução metanólica, acrescido de 10 ml de água deionizada e 5 ml de clorofórmio P.A.. Após partição, a mistura foi centrifugada a 3500 rpm em tudo tipo *Falcon* por 10 minutos para completa separação das fases e a camada hidrometanólica foi cuidadosamente retirada.

Em seguida, foi procedida a quantificação de flavonoides através das reações de coloração e de compensação de forma a anular a interferência da coloração natural do extrato ou da fração.

Na reação de coloração, em balão volumétrico de 10 ml, foi adicionado 4 ml da solução hidrometanólica, acrescido de 240  $\mu$ l de ácido acético glacial P.A., 4 ml de solução de piridina-metanol (20:80), 1 ml de cloreto de alumínio anidro 8% em metanol e completou-se o volume com água deionizada. A solução obtida foi agitada e deixada em repouso por 30 minutos. Decorrido o tempo da reação foi realizada a leitura da absorvância em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 415nm. Foi utilizado metanol como branco.

Para a solução de compensação realizou-se o mesmo procedimento da reação de coloração, porém não foi adicionado cloreto de alumínio anidro 8% em metanol, sendo substituído por água deionizada.

Os teores de flavonoides totais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad prism,

versão 5 (2007) da GraphPad Software com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

#### Curva analítica para quantificação de flavonoides totais

A curva analítica padrão foi realizada em triplicata em 3 dias diferentes. A solução estoque de quercetina a 0,5 mg/mL foi preparada a partir de 10 mg da substância pura de referência em balão volumétrico de 20mL utilizando metanol P. A. como solvente. Alíquotas dessas soluções foram pipetadas a fim de que se obtivessem as seguidas concentrações finais: 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram pipetadas alíquotas de 0,2 mL; 0,16 mL; 0,12 mL; 0,08 mL; 0,04 e 0,02 mL desta solução estoque para balões volumétricos de 10 mL, respectivamente. Adicionou-se a cada um deles 2,0 mL de água deionizada, 240  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial, 4 mL de solução de piridina–metanol (20:80), e 1 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio anidro a 8% em metanol e completou-se o volume para 10 mL com metanol, obtendo-se soluções de concentração de 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Também foi feita uma solução compensação constituída de todos os reagentes exceto a solução padrão. O volume foi completado com metanol para um balão de 10 mL.

As soluções foram agitadas e após 30 minutos de repouso, a temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 415 nm.

A partir das concentrações finais obtidas e das respectivas leituras de absorvância, foram construídas três curvas analíticas dos dias diferentes. Mediante análise de covariância através do programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software, comprovou-se a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas e, assim, reuniu-se todos os dados em uma única curva analítica, cuja equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.2.2.2. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DERIVADOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de derivados fenólicos totais, expresso em ácido tânico, foi determinado utilizando-se o método espectrofotométrico na região do visível, após reação com o reagente de *Folin-Ciocalteu* (TREVISAN, *et al.*, 2009), com pequenas modificações.

O ensaio foi realizado em triplicata, partindo cada uma delas de 10 mg dos extratos liofilizados. Para cada réplica, a massa da amostra foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 10 ml e adicionado metanol P.A. até completar o volume. As soluções estoque em metanol foram agitadas e homogeneizadas.

Foi preparado, a partir das soluções estoque, 1 ml de soluções amostras em microtubo tipo *ependorf*, utilizando metanol como solvente. Para cada réplica prepararam-se 7 soluções com concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 400 µg/mL para resultar nas seguintes concentrações finais: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; e 20 µg/mL.

Em tubos tipo *Falcon*, para cada concentração, foi transferido 250 µL de amostra, 250 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu*, 500 µL de solução saturada de carbonato de sódio e 4 mL de água deionizada. As soluções foram agitadas e após 25 minutos de repouso a temperatura ambiente, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 a 10 minutos e utilizado o sobrenadante para fazer a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 760 nm.

Para cada repetição foi preparado o branco controle dos reagentes e para cada concentração o branco amostra.

Os teores de derivados fenólicos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

#### Curva analítica para quantificação de derivados fenólicos totais

As curvas analíticas padrão para ácido tânico foram realizadas em triplicata e em 3 dias diferentes.

Para a curva padrão de ácido tânico a solução estoque de ácido tânico a 1 mg/mL foi preparada a partir de 10 mg da substância pura de referência em balão volumétrico de 10 mL. Alíquotas dessas soluções foram pipetadas para microtubos tipo *ependorf* completando o volume para 1 ml com água deionizada, a fim de que se obtivessem as seguidas concentrações finais: 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL.

Em tubos tipo *Falcon*, para cada concentração, foi transferido 250 µL de amostra, 250 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu*, 500 µL de solução saturada de carbonato de sódio e 4 mL de água deionizada. As soluções foram agitadas e após 25 minutos de repouso a temperatura ambiente foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 760 nm. A solução do branco foi preparado para cada repetição.

A partir das concentrações finais obtidas e das respectivas leituras das absorvâncias foram construídas três curvas analíticas em 3 dias diferentes. Mediante análise de covariância através do programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software e comprovação de ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas, todos os dados foram reunidos obtendo-se a curva analítica resultante, cuja equação de melhor ajuste e o coeficiente de correlação foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.2.3.1. ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILIDRAZILA (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante, foi determinada utilizando-se o método espectrofotométrico na região do visível, após reação com o radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazila (POIRIER *et al.*, 1952; BLOIS 1958; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995, SHARMA *et al.*, 2009), com pequenas modificações.

O ensaio foi realizado em triplicata a partir de 14 mg dos extratos liofilizados. Para cada réplica, a massa pesada da amostra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado



com etanol P.A., obtendo-se 3 soluções estoque em etanol. Cada uma delas foi agitada e homogeneizada.

A partir das soluções estoque (0,28 mg/mL), para cada réplica, foram preparadas soluções amostra em 7 concentrações 3,5; 7; 10,5; 14; 17,5; 21 e 28 µg/mL que resultassem nas seguintes concentrações finais: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; e 20 µg/mL.

Em tubos de ensaio, de cada concentração, foi transferido 2,5 mL da solução amostra acrescido de 1 mL da solução de DPPH 0,3mM. As soluções foram agitadas e após um período de 30 minutos de repouso, no escuro, foram feitas as leituras das absorvâncias no comprimento de onda de 516nm, onde o radical difenilpicrilidrazila apresenta o máximo de absorção e as mudanças observadas na absorvância são proporcionais à atividade antioxidante (AAO) da amostra.

Foi preparada uma solução branco reagente (controle) com 2,5 ml de etanol e 1 ml de solução de DPPH 0,3mM. Para cada concentração, de cada réplica, foi feito uma solução branco amostra com 2,5 mL solução amostra acrescido de 1,0 mL de etanol. As soluções foram agitadas e após um período de 30 minutos de repouso, no escuro, foram feitas as leituras das absorvâncias no comprimento de onda de 516nm.

Como controle positivo foi utilizado extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba*. O ensaio foi realizado em triplicata a partir de 10 mg do extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba*, obtendo-se 3 soluções estoque etanólicas. Cada uma delas foi agitada e homogeneizada.

A partir das soluções estoque (0,4 mg/mL), para cada réplica, foram preparadas soluções amostra em concentrações 105; 91; 70; 49; 35 e 14 µg/mL que resultassem nas seguintes concentrações finais: 75; 65; 50; 35; 25; e 10 µg/mL.

Cada amostra em determinada concentração foi analisada em triplicata e a média dos percentuais da atividade antioxidante (%AAOM), em cada uma das concentrações testadas, foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ AAO} = \frac{100 - [\text{ABS}_A - \text{ABS}_B] \times 100}{\text{ABS}_C}$$

Onde,

**ABS<sub>A</sub>** = Absorção da amostra (Abs da amostra + DPPH 0,3mM - Abs do branco da amostra)

**ABS<sub>B</sub>** = Absorção do solvente usado na reação (etanol)

**ABS<sub>C</sub>** = Absorção de uma solução de DPPH 0,3 mM em etanol

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos foram expressos em concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>), e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

Foi realizada também a análise estatística de correlação de Pearson (r) entre a concentração de derivados fenólicos equivalente em ácido tânico (EAT) e a porcentagem de atividade antioxidante dos extratos em água, em etanol 80% e em acetona 80%, pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.01 2007) da GraphPad Software com intervalo de confiança de 95% (p<0,05).

#### 4.2.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS DA CASCA DE *ENDOPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE PANCREÁTICA

O ensaio para determinação da inibição da atividade enzimática da lipase pancreática foi realizado em triplicata, no Laboratório de Bioquímica, no Departamento de Química, da Universidade Federal de Lavras (UFLA) com a colaboração da Professora Dra. Luciana Lopes Silva Pereira, utilizando-se método espectrofotométrico (PEREIRA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2011; SIMÃO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012), com algumas modificações.

Os extratos da casca de *E. uchi* foram preparados e utilizados na concentração de 2 mg/mL em água deionizada. As massas das amostras de

cada extrato foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água deionizada. A partir das soluções de trabalho obtidas, o ensaio de inibição da lipase pancreática foi realizado.

Foi preparada uma solução de lipase pancreática suína na concentração de 10 g/L em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 8,0, contendo  $\text{CaCl}_2$  0,010 mol/L e NaCl 0,025 mol/L. O substrato *p*-nitrofenolpalmitato, 8 mmol/L, foi dissolvido em Triton- X 100, 0,5% (p/v).

Para cada extrato, em tubos de ensaio, foi feita a mistura de 50  $\mu\text{L}$  da solução do extrato, 100  $\mu\text{L}$  da enzima e 50  $\mu\text{L}$  do substrato e incubada em banho-maria a 37 °C por quatro períodos de tempo (10, 20, 30, 40 minutos). Após esse período, a reação foi paralisada com banho de gelo e 1,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 mol/L. Para cada extrato foram feitos os controles sem enzima (branco substrato) e sem substrato (branco enzima). Todos foram preparados e incubados do mesmo modo que os tubos experimentais.

Como controle positivo foi utilizado orlistate 2mg/mL. Transferiu-se quantitativamente a massa de orlistate para balão volumétrico de 10 mL e completou volume com água deionizada. Foi feita a mistura de 50  $\mu\text{L}$  da solução de orlistate, 100  $\mu\text{L}$  da enzima e 50  $\mu\text{L}$  do substrato e incubada em banho-maria a 37 °C por quatro períodos de tempo (10, 20, 30, 40 minutos). Após esse período, a reação foi paralisada com banho de gelo e 1,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 mol/L.

As absorvâncias dos produtos da ação da lipase sobre o *p*-nitrofenolpalmitato (*p*-nitrofenol) de cada extrato e do controle positivo foi determinada em espectrofotômetro no  $\lambda$  de 410nm.

As inibições dos extratos em água, em etanol 80% e em acetona 80% e do orlistate foram obtidas a partir da inclinação da reta do gráfico, Absorvância x Tempo, previamente calculada e utilizada como referência para o cálculo da inibição da lipase pancreática.

A porcentagem de inibição (*I* %) da lipase pancreática foi determinada de acordo com a equação:

$$I \% = \frac{(A - a) - (B - b)}{(A - a)} \times 100$$

Onde,

A: na ausência do extrato (possível inibidor), que corresponde ao ensaio enzima controle

a: na ausência do extrato e da enzima (branco substrato)

B: na presença do extrato com a enzima e substrato

b: na ausência da enzima (branco extrato + substrato).

A inibição da atividade enzimática foi calculada a partir da diferença entre as inclinações na ausência do inibidor (A-a) e na presença do inibidor (B-b). A inclinação da reta é decorrente da velocidade de formação de produto por minuto de reação e a presença do inibidor ocasiona uma diminuição na inclinação.

A partir da inclinação, os valores de absorvância foram convertidos em  $\mu\text{mol}$  de produto por meio de uma curva padrão de *p*-nitrofenol realizada em triplicata. Alíquotas foram retiradas a fim de que se obtivessem concentrações variando de 0,089 a 0,898  $\mu\text{mol}$ . Como branco utilizou a solução tampão Tris-HCl 0,05 mol/L. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro no  $\lambda$  de 410nm.

A partir das concentrações finais obtidas e das respectivas leituras de absorvância, foram construídas três curvas analíticas. Mediante análise de covariância, comprovou-se a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas e, assim, reuniu-se todos os dados em uma única curva analítica, cuja equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Os resultados obtidos pelos extratos foram expressos em porcentagem de inibição e em unidade de enzima inibida por grama de extrato (UI/L/g) que corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol que deixou de ser produzido por minuto, devido à presença do inibidor nas condições de ensaio.

Após as leituras das absorvâncias e dos cálculos da porcentagem de inibição, os extratos em etanol 80% e em acetona 80% foram diluídos em água

deionizada na proporção de 1:1 (v/v), transferindo-se 5 mL da solução de trabalho para balão volumétrico de 10 mL e completando volume com água deionizada. O ensaio foi repetido e as absorvâncias determinadas em espectrofotômetro no  $\lambda$  de 410nm.

As inibições dos extratos em etanol 80% (1:1) e em acetona 80% (1:1) foram obtidas a partir da inclinação da reta do gráfico, Absorvância x Tempo, previamente calculada e utilizada como referência para o cálculo da inibição da lipase pancreática em porcentagem ( $I$  %) e em UIL/g.

Os resultados da inibição da atividade enzimática expressa em UIL/g extrato de cada extrato e do controle positivo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS E RENDIMENTO DOS EXTRATOS EM ÁGUA (EA), EM ETANOL 80% (EE 80%) E EM ACETONA 80% (EAC 80%) DA CASCA SECA E TRITURADA DE *ENDOPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC

Para a realização desse estudo, a casca de *Endopleura uchi* foi adquirida do mercado de produtos naturais, conforme descrito no subitem 4.1.3. De acordo com o certificado de análise botânica (AnexoIII), a casca apresentava-se plana, com grandes feixes de fibras longitudinais de coloração castanho-acinzentadas (Figura 10).



Figura 10: Casca de *Endopleura uchi* adquirida do mercado de produtos naturais.

A partir da casca de *Endopleura uchi* foram preparados 3 extratos em solventes com polaridades diferentes, como descrito no item 4.2.1.

A escolha da água como um dos solventes extratores baseou-se no fato da casca de *E. uchi* já ser utilizada popularmente no norte do país para uma série de enfermidades na forma de chá, dentre elas a redução do colesterol. Enquanto que a escolha pelos extratos em etanol 80% e em acetona 80% foi baseada em literatura e em função de ser o procedimento mais adequado à extração de derivados fenólicos e flavonoídicos, como por exemplo, taninos e catequinas; e por esses metabólitos secundários apresentarem intensa atividade antioxidante e de inibição enzimática comprovadas.

As soluções extrativas obtidas apresentaram coloração marrom avermelhada intensa. Após a evaporação sob alta pressão seguida de

liofilização foi observada a formação de pós heterogêneos, castanho a castanho avermelhado, cujos rendimentos foram cerca de 23,4 g (11,7%) do extrato em água; 34,2g (17,1%) do extrato em etanol 80% e 26,6 g (13,3%) do extrato em acetona 80%. O extrato rotavaporado (A) e os pós de cada extrato liofilizados (B) estão apresentados na Figura 11.



Figura 11: Extrato rotavaporado (A) e pós liofilizados dos extratos em água, em acetona 80% e em etanol 80% (B) de *Endopleura uchi*.

A partir dos extratos liofilizados foram determinados os teores de derivados flavonoídicos e derivados fenólicos totais; a atividade antioxidante pela redução do radical DPPH e o efeito dos extratos na inibição da atividade enzimática da lipase pancreática.

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS FLAVONOÍDICOS TOTAIS

O conteúdo flavonoídico dos extratos obtidos da espécie *Endopleura uchi* foi realizado por espectrofotometria no visível por complexação com cloreto de alumínio 8% em metanol, na presença de piridina:metanol e ácido acético glacial P.A., como descrito no ítem 4.2.2.

A escolha por esse método considerou aspectos técnicos como a simplicidade, rapidez, baixo custo e aplicabilidade, sendo um método descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

No método de quantificação, o cátion alumínio tem a propriedade de formar complexos coloridos e estáveis com os flavonoides em meio ácido

(Figura 12). A ligação nos complexos metal-flavonoide pode ocorrer através da transferência de elétron do metal para o flavonoide (MARKHAM, 1982).

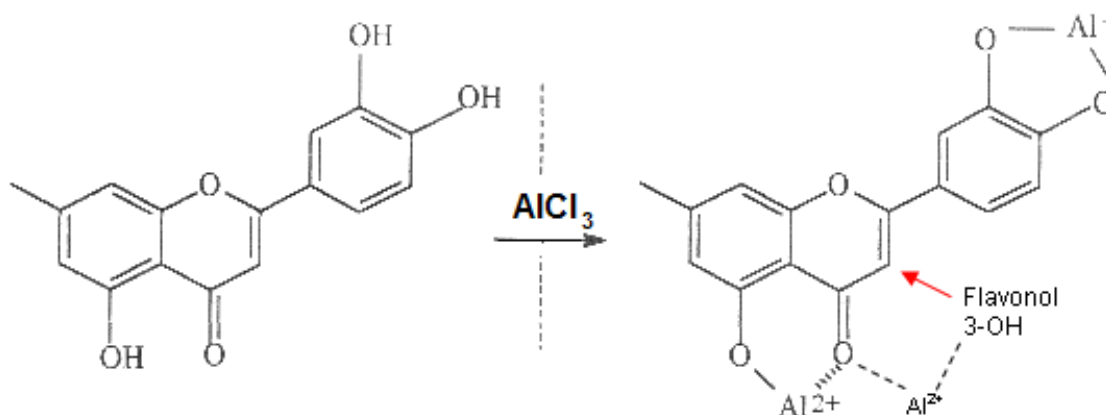


Figura 12: Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Reproduzido de MARKHAM, 1982).

Durante a análise espectrofotométrica ocorre um deslocamento para maiores comprimentos de onda (deslocamento batocrômico) dando origem a um novo anel e uma intensificação da absorção (efeito hiperacrômico), visto que o complexo flavonoide-alumínio absorve em comprimento de onda maior que o flavonoide sem a presença do agente complexante (CHANG *et al.*, 2002).

Este fato explica a utilização do comprimento de onda de 415 nm, justificado pelo estudo de Chang e colaboradores (2002), uma vez que os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com  $\text{AlCl}_3$ , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira, interferências nas medidas de absorvância. Assim, foi possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos.

A presença de piridina nas soluções de  $\text{Al}^{3+}$  é importante, pois o cloreto de alumínio, um ácido de Lewis, presente em solução reage vigorosamente com a piridina, que é uma base de Lewis, formando um aduto. O sal resultante é bastante solúvel à temperatura ambiente e o complexo piridina: $\text{Al}^{3+}$  formado é muito mais estável (CISAK e ELVING, 1965).

Em 2001 Petry e colaboradores tentaram estabelecer as condições ótimas para a reação de complexação de vários flavonoides em função das variáveis tempo de reação e concentração de  $\text{AlCl}_3$ . Os resultados



evidenciaram uma reação com características particulares para cada flavonoide, não sendo possível estabelecer um padrão único de comportamento geral, tornando evidente a necessidade de avaliação caso a caso. Este fator pode explicar, em parte, a obtenção de teores subestimados na quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais na região do visível empregando-se a complexação com  $\text{AlCl}_3$ .

O resultado da determinação do total de flavonoides foi expresso em equivalente em quercetina por grama de amostra (EQ/g amostra). A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das três regressões lineares de quercetina em 3 dias, eram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação  $y=0.0620603x - 0.00797809$ ,  $R^2= 1$  (Gráfico 1).

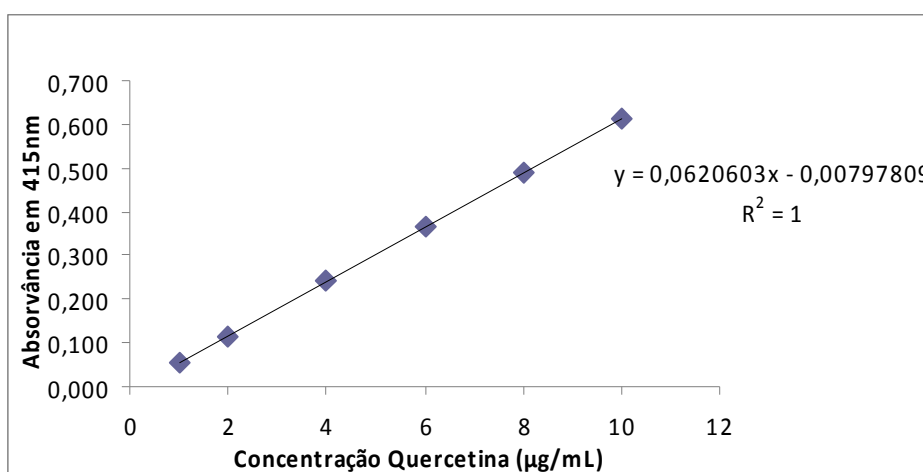


Gráfico 1: Curva analítica da quercetina equivalente à repetição do ensaio em três dias. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem a média das três curvas.

A partir dessa equação, e considerando-se as diluições envolvidas no método de quantificação, os teores e as concentrações médias de flavonoides totais expressos em quercetina dos extratos em água, em etanol 80% e em acetona 80% estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Quantificação de derivados flavonoídicos expressos como média  $\pm$  desvio padrão obtido pelas três determinações.

Amostra	Concentração Média Quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP	Concentração em (mg) EQ/g amostra	Teor Flavonóides (%)
EA	<b>1,299 <math>\pm</math> 0,065</b>	<b>1,350<sup>a</sup></b>	<b>0,135</b>
EE 80%	<b>1,730 <math>\pm</math> 0,713</b>	<b>1,800<sup>a</sup></b>	<b>0,180</b>
EAc 80%	<b>2,046 <math>\pm</math> 0,451</b>	<b>2,130<sup>a</sup></b>	<b>0,213</b>

EQ: equivalente em quercetina. DP: desvio padrão. EA: extrato em água. EE 80%: extrato em etanol 80% e EAc 80%: extrato em acetona 80%.

A Tabela 2 demonstra que os resultados obtidos indicaram a presença de derivados flavonoídicos nos extratos testados, no entanto, em baixa concentração. Os valores variaram de 1,350 a 2,130 mg EQ/g amostra. O EAc 80% apresentou maior teor com 2,130 mg EQ/g amostra e o menor teor o EA com 1,350 mg EQ/g amostra.

A análise de variância (ANOVA seguida pelo Teste de *Tukey*  $p < 0,05$ ) das médias de quantificação do conteúdo de derivados flavonoídicos em cada um dos extratos, mostrou que os valores seguidos por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

Com esses resultados pode-se sugerir que o processo de extração não interferiu muito para retirada de derivados flavonoídicos da casca de *Endopleura uchi*, mesmo que, normalmente, derivados flavonoídicos, como os taninos, largamente encontrados em cascas, sejam mais facilmente extraídos em solventes como etanol e acetona devido a polaridade e suas propriedades físico-químicas.

Esse fato vai de encontro ao analisado por Politi (2009), que no trabalho desenvolvido, realizou diferentes reações de caracterização para os derivados flavonoídicos de vários extratos obtidos da casca de *E. uchi* e preparados em solventes com diversas polaridades. Ao final foi constatada a presença desses derivados, devido apenas uma das reações ter sido positiva para esse grupo de substâncias, que foi utilizando a solução de cloreto férrico a 2%.

No entanto, a quantificação total desses derivados ainda não havia sido realizada por espectrofotometria, o que torna essa análise inédita para a parte

da planta utilizada. E apesar do método fornecer desvios muito pequenos ou nulos entre ensaios com a mesma amostra, pode ser pouco exato, fornecendo valores diferentes (geralmente inferiores) em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada (DORNAS *et al.*, 2007).

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação de derivados fenólicos dos extratos da espécie *Endopleura uchi* foi realizada por espectrofotometria no visível pelo método de *Folin-Ciocalteu* como descrito no ítem 4.2.2.

É um método que apresenta maior sensibilidade, menor interferência e facilidade de aquisição do reagente, já que este pode ser obtido comercialmente (ROESLER *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2009).

O reagente de *Folin-Ciocalteu* é composto por uma mistura de soluções aquosas dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, em que o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela no complexo). O método baseia-se no princípio de que em meio alcalino e na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis (FOLIN, *et al.*, 1927; ROESLER *et al.*, 2007).

De fato o que ocorre é a redução da mistura dos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico em óxidos de tungstênio e molibdênio, de cor azul, pelos derivados fenólicos, na qual a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (FOLIN, *et al.*, 1927).

O ajuste do pH ideal (pH = 9,0) para que ocorra a reação entre os grupos fenólicos e o reagente é feito com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Somente em meio básico ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos gerando os ânions fenolatos para que ocorra a reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente. Desta forma, ocorre a mudança de coloração de amarela para azul cuja intensidade aumenta linearmente em  $\lambda$  760 nm, (Figura 13) (TREVISAN *et al.*, 2009).

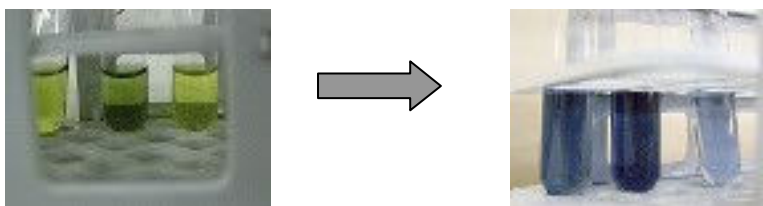


Figura 13: Reagente de *Folin-Ciocalteu*: o molibdênio, componente do reagente de *Folin*, sofre redução por derivados fenólicos presentes na amostra testada e muda de coloração amarela para azul (TREVISAN *et al.*, 2009).

A determinação do total de derivados fenólicos foi expressa em equivalente em ácido tânico por grama de extrato (EAT/g). A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das três regressões lineares obtidas em 3 dias de ácido tânico eram equivalentes e, portanto, as equações da reta foram estabelecidas com os valores médios, resultando na equação  $y = 0.0458889x - 0.00957781$ ,  $R^2 = 0,9994$ , conforme mostra o Gráfico 2.

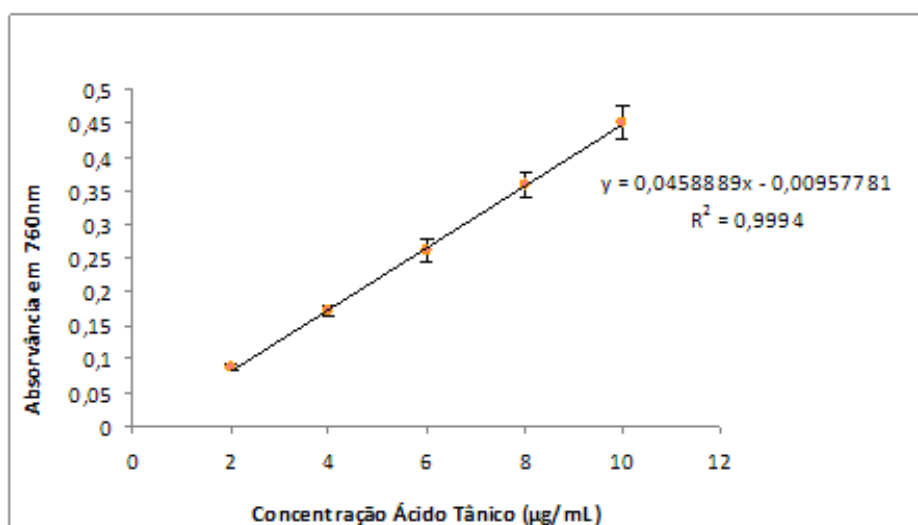


Gráfico 2: Curva analítica do ácido tânico equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem a média das três curvas.

A partir das equações, e considerando-se as diluições envolvidas no método de quantificação, o teor e a concentração média de derivados fenólicos totais expressos em ácido tânico dos extratos em água, em etanol 80% e em acetona 80% estão representados nas Tabelas 3.

Tabela 3: Quantificação de derivados fenólicos expressos como média  $\pm$  desvio padrão obtido pelas três determinações empregando reagente de *Folin-Ciocalteu*.

Amostra	Concentração média de Ácido Tânico $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	Concentração em g EAT/g amostra	Teor (%) EAT
EA	<b>6,390 <math>\pm</math> 0,552</b>	<b>0,639</b> <sup>a</sup>	<b>63,9</b>
EE 80%	<b>9,500 <math>\pm</math> 0,158</b>	<b>0,950</b> <sup>b</sup>	<b>95,0</b>
EAc 80%	<b>9,300 <math>\pm</math> 0,923</b>	<b>0,930</b> <sup>b</sup>	<b>93,0</b>

EAT: equivalente em ácido tânico. DP: desvio padrão. EA: extrato em água. EE 80%: extrato em etanol 80% e EAc 80%: extrato em acetona 80%.

A Tabela 3 demonstra que os resultados e os valores do conteúdo de derivados fenólicos expressos em EAT variaram de 0,639 a 0,950g em equivalente a ácido tânico por grama de amostra. O EE 80% e o EAc 80% apresentaram maiores teores EAT com 95,0% e 93,0% respectivamente, do que o EA 63,9%.

Isso explica o fato dos solventes como etanol 80% e acetona 80% apresentarem melhor eficiência de extração de compostos fenólicos totais e provavelmente de taninos hidrolisáveis (em menor quantidade) e condensados e catequinas (em maior quantidade), devido às características químicas dos constituintes e a polaridade da molécula frente a esses solventes (NONAKA *et al.*, 1983; BERGOLD *et al.*, 2009).

A análise de variância (ANOVA seguida pelo Teste de *Tukey*  $p < 0,05$ ) das médias de quantificação do conteúdo de derivados fenólicos expresso em EAT/g da amostra em cada um dos extratos mostrou que valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente entre si. Portanto, o EA difere estatisticamente dos EE 80% e EAc 80%, enquanto que os EE 80% e EAc 80% não são estatisticamente diferentes, comprovando a maior eficiência de extração do etanol e acetona para compostos fenólicos.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILIDRAZILA (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante (AAO) dos extratos em água, em etanol 80% e em acetona 80% da espécie *Endopleura uchi* foi realizado por espectrofotometria no visível pelo método de redução do radical 1,1-difenilpicriladrazila (DPPH) utilizando como controle positivo o extrato comercial de *Ginkgo biloba* padronizado por ter atividade antioxidante comprovada cientificamente.

A escolha pelo método se deu pela importância da atividade frente a classe de metabólitos (derivados flavonoídicos e fenólicos totais) presente na casca de *E. uchi* e por ser um modelo simples, prático, sensível e eficaz para avaliar a capacidade redutora de substâncias, sintéticas ou naturais, com potencial para serem usadas como antioxidantes, através da interação com o DPPH, resultando na formação irreversível do produto hidrogenado (hidrazina) que é incolor. É um método muito conveniente para realização de triagem de um grande número de amostras com diferentes polaridades, incluindo a *E. uchi* (ROESLER *et al.*, 2007).

O método baseia-se na capacidade das substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagirem com o DPPH, que é um radical relativamente estável, e convertê-lo em 2,2-difenil-1-picril hidrazina. Normalmente a reação ocorre com átomo de hidrogênio, radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), radical hidroperóxido ( $\text{HOO}\cdot$ ) e átomos de oxigênio com a captura desses constituintes pelo DPPH formando, de maneira irreversível, produtos estáveis (CHIDAMBARAM, *et al.*, 2013).

Quando em solução, o DPPH apresenta coloração violeta com forte absorção em torno de  $\lambda$  515 - 517 nm e apresenta paramagnetismo conferido pelo elétron não emparelhado. Assim, ao receber um elétron, seu elétron passa a ser pareado, tornando-se uma molécula diamagnética e a absorção característica desaparece (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995)

O grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato, ou seja, a descoloração resultante está relacionada estequiometricamente com o número de elétrons aceitos (Figura 14) (TABART *et al.*, 2009).

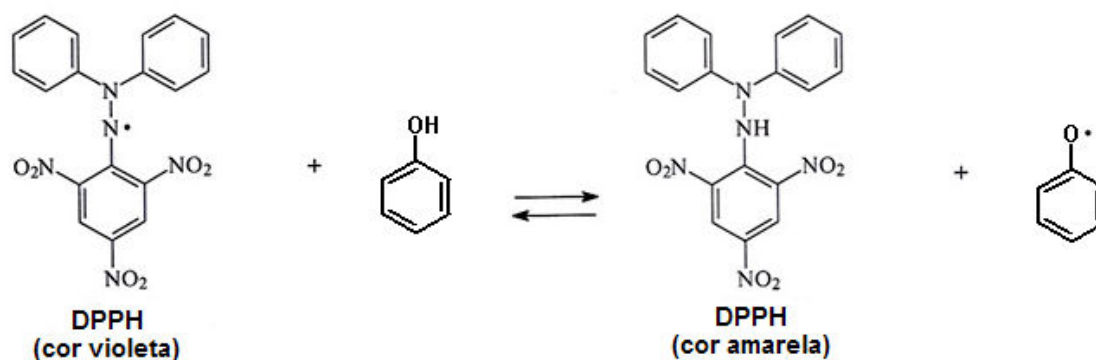


Figura 14: Reação do DPPH com compostos fenólicos. Método baseado na estabilização do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). A reação é determinada segundo mudança de cor de violeta ao amarelo. Fonte: CHENG *et al.*, 2003.

Como a AAO da amostra é expressa em função da capacidade de provocar um decréscimo na absorção ( $\lambda$  515 - 517 nm) de uma solução de DPPH a uma determinada concentração, um extrato que apresenta alto potencial em reduzir radicais livres possui baixo valor de  $CE_{50}$ . Desta forma, uma pequena quantidade de extrato é capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50%, ou seja, inibir a oxidação do radical em 50%.

O potencial dos três extratos obtidos da casca de *Endopleura uchi* em reduzir radicais livres foi expresso como concentração efetiva do extrato necessária para reduzir o radical DPPH em 50%, e os resultados são descritos e representados na Tabela 4 e Gráfico 3, respectivamente.

Tabela 4: Concentração efetiva 50% de atividade antioxidante no teste com DPPH

Amostra	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) Média $\pm$ DP
EA	<b>12,4 <math>\pm</math> 0,08</b> c
EE 80%	<b>9,7 <math>\pm</math> 0,38</b> b
EAc 80%	<b>7,9 <math>\pm</math> 0,31</b> a
Ext comercial de <i>Ginkgo biloba</i> padronizado	<b>37,8 <math>\pm</math> 2,49</b> d

$CE_{50}$ : concentração efetiva 50%. DP: desvio padrão. EA: extrato em água. EE 80%: extrato em etanol 80% e EAc 80%: extrato em acetona 80%.

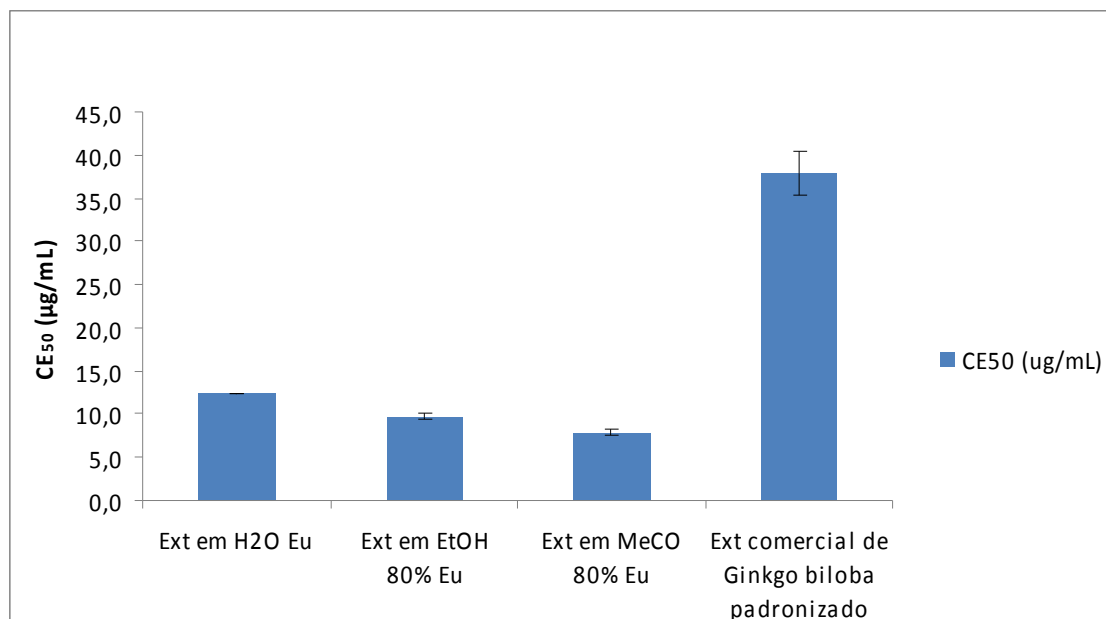


Gráfico 3: Concentrações efetivas 50% (médias de 3 determinações) dos extratos em água, etanol 80% e acetona 80% de *Endopleura uchi* e do controle positivo (extrato comercial de *Ginkgo biloba* padronizado).

Os valores crescentes de CE<sub>50</sub> foram: 7,9 µg/mL para extrato em acetona 80%, 9,7 µg/mL em etanol 80%, seguidos pelo extrato em água 12,4 µg/mL. O CE<sub>50</sub> para o extrato comercial de *Ginkgo biloba* padronizado foi de 37,8 µg/mL (Gráfico 3).

Conforme o resultado observado na determinação de derivados fenólicos, o EAc 80% e o EE 80% apresentaram alto conteúdo desses constituintes (item 5.3, Tabela 3) e conseqüentemente boa atividade antioxidante quando comparados com o controle positivo (extrato de *Ginkgo biloba* padronizado), sendo maior para o EAc 80% (cerca de 5 vezes mais ativo), seguido do EE 80% (cerca de 4 vezes mais) e do EA (3 vezes mais).

A atividade antioxidante do extrato em água, em etanol 80% e em acetona 80%, pode ser atribuída à habilidade desses compostos presentes nos extratos em reduzir radicais livres por meio da doação de hidrogênio (doar elétrons ao radical estável DPPH•), ou seja, devido à propriedade redox do grupo hidroxila.

Outros compostos como os flavonoides, mesmo em baixas concentrações em cada um dos extratos de *E. uchi*, também podem contribuir para o alto potencial antioxidante dos extratos da casca de *E. uchi*. Eles



reagem diretamente quando são colocados frente a radicais livres como o DPPH, pois em suas estruturas a presença de ligações duplas conjugadas e do grupo catecol no anel B vira alvo do ataque de radicais livres, havendo a deslocalização e doação de elétrons respectivamente (APAK *et al.*, 2007; (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O resultado ratifica o estudo realizado por Politi (2009), visto que, ambos são considerados substâncias antioxidantes como resultado do processo evolutivo da espécie como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação ultravioleta necessária à fotossíntese.

A análise de variância (ANOVA seguida pelo Teste de *Tukey*  $p < 0,05$ ) das médias das  $CE_{50}$  de cada um dos extratos mostrou que as médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si. Assim, o EA, EAc 80% e EE 80% diferem estatisticamente entre si e do extrato comercial de *Ginkgo biloba* padronizado, comprovando a presença de maior atividade antioxidante para os 3 extratos quando comparados ao controle positivo e maior atividade para EAc 80%, seguido do EE 80% e EA, quando comparados entre si. Isso se deve à diferença do conteúdo de derivados fenólicos e flavonoídicos presente nos extratos.

#### 5.4.1 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE *PEARSON* ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE DERIVADOS FENÓLICOS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O coeficiente de correlação de *Pearson* ( $r$ ) é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Ele quantifica a força de associação linear entre as duas variáveis. Pode variar entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis (FILHO *et al.*, 2009).

Neste trabalho a correlação de *Pearson* ( $r$ ) foi utilizada para medir a correlação entre a concentração de derivados fenólicos equivalentes em ácido tânico e a porcentagem de atividade antioxidante (%AAO). Os resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Correlação entre concentração de derivados fenólicos e porcentagem de atividade antioxidante (%AAO)

Amostra	Concentração de Ácido Tânico x %AAO r Pearson ( $p > 0,05$ )
EA	<b>0,9993</b>
EE 80%	<b>0,9967</b>
EAc 80%	<b>0,9945</b>

%AAO: percentual médio da atividade antioxidante. EA: extrato em água. EE 80%: extrato em etanol 80% e EAc 80%: extrato em acetona 80%.

Em uma avaliação comparativa dos dados, a relação entre concentração de derivados fenólicos totais e a capacidade de reduzir radicais livres dos extratos obtidos da amostra de casca de *E. uchi* se mostrou significativa, visto que os extratos com maior concentração de derivados fenólicos totais são aqueles com maior atividade antioxidante (EAc 80% e EE 80%).

Os três extratos apresentaram forte atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, pois  $r > 0,9$ ; independente do solvente utilizado na extração. Essa relação sugere que a contribuição dos compostos fenólicos nesse modelo é relevante, mesmo o EA ficando abaixo no conteúdo de fenólicos totais (63,9%, contra 95,0% do EE80% e 93,0% do EAc 80%).

O coeficiente de correlação de Pearson foi significativo para todas as amostras. Variou 0,9945 a 0,9993 equivalentes em ácido tânico, o que demonstra que a atividade antioxidante está relacionada com a composição fenólica das amostras devido à correlação forte positiva ( $r$  Pearson  $> 0,9$ ) para todos os extratos. Isto indica que os derivados fenólicos contribuem de forma importante para a capacidade antioxidante do extrato e das frações (FERREIRA, 2013).

#### 5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS DA CASCA SECA E TRITURADA DE *ENDOUPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE PANCREÁTICA

A avaliação da inibição da atividade enzimática da lipase pancreática pelos extratos em água, em etanol 80% e em acetona 80% da espécie

*Endopleura uchi* foi realizado por espectrofotometria como descrito no ítem 4.2.4, utilizando como controle positivo o fármaco sintético orlistate, um inibidor enzimático da lipase pancreática, liberado pelo FDA e ANVISA, para tratamento da obesidade.

A escolha do método foi devida o mesmo ser de fácil execução, rápido, exigir pequenos volumes de amostra e custo relativamente baixo, uma vez que, quanto menor a concentração de lipase utilizada e maior a resposta obtida para a atividade hidrolítica, menor será o custo da operação em análise (SEMIONATO, 2006).

O método baseia-se na cinética da reação de hidrólise, através da hidrólise lipolítica do substrato sintético palmitato de *p*-nitrofenol (*p*NPP) em *p*-nitrofenol e ácido palmítico pela enzima, em meio aquoso alcalino - pH ótimo da atividade enzimática – conforme demonstrado na Figura 15.

A liberação do *p*-nitrofenol, resulta em um cromógeno de coloração amarela que é intensificada em pH alcalino, sendo detectada a um  $\lambda$  de 410nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol *p*NP por minuto (BUENO, 2012).

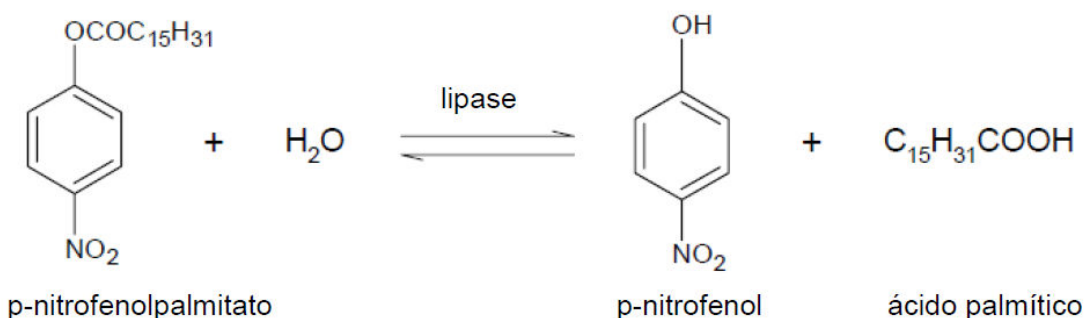


Figura 15: Ação enzimática da lipase pancreática: hidrólise do *p*-nitrofenolpalmitato em *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

Fonte: BUENO, 2012.

No método a adição de Triton X-100, um surfactante, se fez com intuito de melhorar e aumentar a permeabilidade, além de estabilizar a reação. A presença de sal como NaCl e CaCl<sub>2</sub> diminui a camada de solvatação da enzima, melhorando sua dissolução, assim como aumenta a força iônica do meio, possibilitando a lipase acoplar com o substrato apolar (SOUZA, *et al.*, 2011).

A atividade de inibição dos extratos em água, em etanol 80%, em acetona 80% e do controle positivo orlistate, está representada na Tabela 6.

A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das três regressões lineares de *p*-nitrofenol eram equivalentes e, portanto, as equações da reta foram estabelecidas com os valores médios, resultando na equação  $y = 0,9096x - 0,004$ ,  $R^2 = 0,9999$ , conforme mostra Gráfico 4.

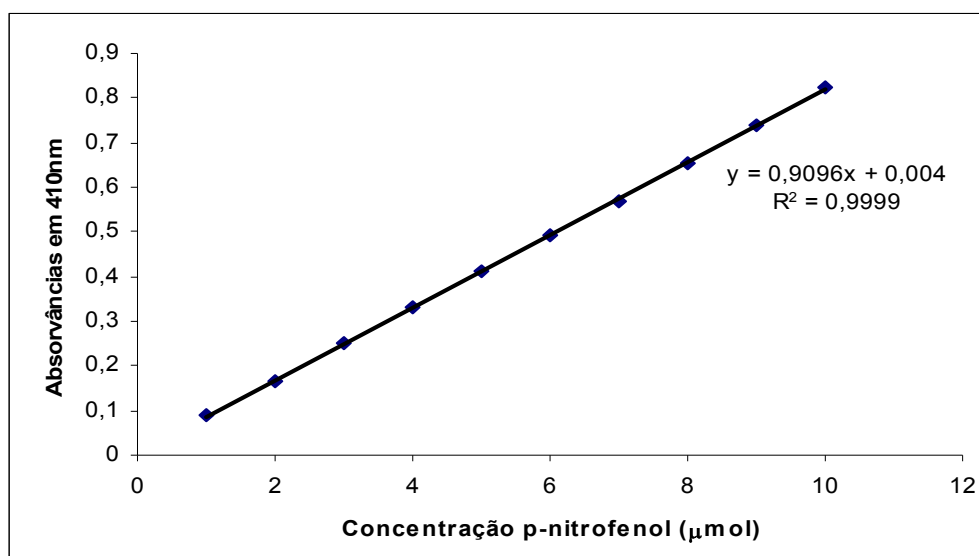


Gráfico 4: Curva analítica do *p*-nitrofenol. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem a média das três curvas.

Tabela 6: Atividade da lipase pancreática na presença dos extratos de *Endopleura uchi*

Amostra	Porcentagem de Inibição (I %)* $\pm$ DP	UIL/g* $\pm$ DP
EA	<b>47,54 <math>\pm</math> 2,576</b>	<b>106,90 <math>\pm</math> 7,018</b> b
EE 80% (1:1)	<b>36,88 <math>\pm</math> 1,075</b>	<b>96,06 <math>\pm</math> 4,678</b> c
EAc 80% (1:1)	<b>49,33 <math>\pm</math> 3,494</b>	<b>112,14 <math>\pm</math> 14,036</b> a
Orlistate	<b>54,36 <math>\pm</math> 4,181</b>	<b>133,34 <math>\pm</math> 2,339</b> d

. EA: extrato em água. EE 80%: extrato em etanol 80% diluído (1:1) e EAc 80%: extrato em acetona 80% diluído (1:1).

\*Média de três repetições  $\pm$  desvio padrão. UIL/g: Unidade de atividade de lipase inibida por grama de extrato.

Os valores da porcentagem de inibição (I %) dos três extratos foram capazes de inibir a lipase pancreática *in vitro*, conforme demonstrado na Tabela 6. O EA e o EAc 80% (1:1) apresentaram os maiores valores de

inibição, 47,54% e 49,33% respectivamente, seguidos do EE 80% (1:1) com a capacidade de inibição de 36,88%, quando comparados ao orlistate (controle positivo) que obteve 54,36% de inibição.

Os extratos em etanol 80% e em acetona 80% foram diluídos na proporção de 1:1 (v/v), pois quando utilizados na concentração de 2mg/mL apresentaram uma capacidade de inibição máxima  $\geq 100\%$ . E em se tratando de ensaios enzimáticos, a faixa aceitável de porcentagem para o cálculo da UIL/g deve variar entre 30 e 80%. Valores acima podem estar sendo mascarados, ou seja, a inibição é maior do que a observada; e valores menores podem ser devido a erros durante o ensaio (RAMOS, 2012).

Nesse sentido, o resultado expresso em porcentagem de inibição é relativo à atividade da enzima nas condições do ensaio, por isso os resultados foram transformados em unidade de lipase inibida por grama de extrato (UIL/g), um resultado absoluto.

A análise de variância (ANOVA seguida pelo Teste de *Tukey*  $p < 0,05$ ) das médias das inibições de cada um dos extratos e do controle positivo em UIL/g mostrou que as médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si.

Comparando cada um dos três extratos com o orlistate, observa-se que o extrato em acetona 80% (1:1) apresentou a maior inibição (112,14 UIL/g), seguido do extrato em água (106,90 UIL/g) e em etanol 80% (1:1) (96,06 UIL/g). Todos os três com resultados muito próximos ao do orlistate (133,34 UIL/g), que é responsável por inibir a lipase pancreática com cerca de 30% de hidrólise dos triglicerídeos (COUTINHO, 2009).

O que alguns estudos vêm relatando é que de extratos orgânicos de plantas têm-se isolado inibidores de lipases. Nesses trabalhos, bem como os resultados encontrados neste estudo, sugerem que compostos como os polifenóis solúveis em solventes como acetona e álcool apresentam alguma característica estrutural que tem a capacidade de ligar e inibir a lipase pancreática. Talvez isso explique os valores de UIL/g para EA, EE 80% (1:1) e EAc 80% (1:1), assim como para determinação de derivados fenólicos, 95,0% e 93,0% respectivamente, como mostrado no presente trabalho (NINOMIYA *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2005; AGBAFOR *et al.*, 2007).

Segundo Gonçalves (2007) a presença de derivados fenólicos e flavonoídicos em plantas utilizadas na prevenção e tratamento de hiperlipidemia e hipercolesterolemia sugere uma importante atividade de inibição da lipase pancreática. Os compostos fenólicos podem complexar com íons presente em solução fazendo com que a enzima perca sua atividade.

Derivados fenólicos como os taninos e as catequinas são reconhecidamente inibidores de enzimas não específicos. Na forma não oxidada, eles reagem com proteínas através de ligações de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas e quando oxidados formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais específicos das proteínas inativando-a (NAKAI *et al.*, 2005).

Alguns grupos presentes na estrutura dos taninos e catequinas como grupos galato, também permitem estabelecer pontes entre diversas moléculas protéicas, diminuindo a sua flexibilidade estrutural e a capacidade de se movimentarem em solução tornando-as insolúveis podendo inclusive causar a sua precipitação. Esta diminuição de solubilidade pode ser responsável pela diminuição da atividade da lipase (NAKAI *et al.* 2005; BENEVIDES *et al.*, 2011).

E como o teor de derivados polifenólicos encontrados na casca de *Endopleura uchi* foi expressivo e estudos têm demonstrado e considerado que a inibição enzimática de enzimas depende da concentração destes compostos fenólicos em solução, então sugere-se que essa classe de metabólito secundário apresenta compostos bioativos com papel importante na inibição de enzimas digestivas, e que tais substâncias podem estar diretamente relacionadas à capacidade de inibir a atividade enzimática da lipase pancreática, como peça chave no metabolismo digestivo de lipídios

## 6 CONCLUSÃO

As amostras estudadas da casca de *Endopleura uchi* adquiridas do mercado de produtos naturais apresentaram eficácia antilipidêmica pela inibição da lipase pancreática pelo método espectrofotométrico superior a 30%.

Os extratos obtidos apresentaram rendimentos de 23,4 g (11,7%) para o extrato em água; 34,2g (17,1%) para o extrato em etanol 80% e 26,6 g (13,3%) para o extrato em acetona 80%.

Foram obtidos teores de derivados flavonídicos de 0,135% para extrato em água; 0,180% para o extrato em etanol 80% e 0,213% para o extrato em acetona 80%. E teores de derivados fenólicos em equivalente em ácido tânico por grama de amostra de 63,9% para extrato em água; 95,0% para o extrato em etanol 80% e 93,0% para o extrato em acetona 80%.

Os extratos apresentaram atividade antioxidante com valores de concentração efetiva 50% variando de 12,4 µg/mL para extrato em água; 9,7 µg/mL para o extrato em etanol 80% e 7,9 µg/mL para o extrato em acetona 80%, pelo método de redução do DPPH.

No estudo comparativo da atividade antioxidante com o teor de derivados fenólicos totais, foi observada forte correlação pelo valor do coeficiente de correlação de *Pearson* (*r*) com  $r > 0,9$  para os três extratos.

Os valores de atividade enzimática foram de 106,90 UIL/g para extrato em água; 96,06 UIL/g para o extrato em etanol 80% (1:1) e mais eficaz para o extrato em acetona 80% (1:1) com 112,14 UIL/g.

Com base nos resultados obtidos e na análise da literatura especializada o presente trabalho abre perspectivas para um estudo mais detalhado da estabilidade digestiva dos compostos presentes nos extratos, a relação entre complexidade estrutural e atividade inibitória e a interação com os restantes dos componentes presentes. Assim como do potencial medicinal e toxicológico e da bioprospecção e possível isolamento e caracterização dos fitoquímicos presentes na casca de *E. uchi*, podendo constituir uma alternativa para futuras aplicações terapêuticas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBAFOR, K. N., AKUBUGWO, E.I. Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, p.596-598, 2007.

AILHAUD, G., MASSIERA, F., WEILL, P., LEGRAND, P., ALESSANDRI, J-M, GUESNET, P. Temporal changes in dietary fats: Role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. **Progress in Lipid Research** v. 45, p.203–236, 2006.

ALTERIO, A. A., FAVA, D. A. F., NAVARRO, F. Interação da Ingestão Diária de Chá Verde (*Camellia Sinensis*) no Metabolismo celular e na Célula adiposa Promovendo Emagrecimento – **Rev. Bras. Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo, v.1, n.3, p. 27-37, 2007.

ALVIM, T. C. **Redução *in vitro* do teor de colesterol de óleo de manteiga utilizando farelos de trigo, aveia e soja**. 106p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos, Universidade federal de Viçosa, Viçosa / Minas Gerais, 2002.

APAK, R., GÜÇLÜ, K. DEMIRATA, R., ÖZVÜREK, M. CELIK, S. E., BEKTASOGLU, B., BERKER, K. I., ÖZVURT, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v.12, p.1496-1547, 2007.

AMARAL, O., PEREIRA, C. Obesidade da genética ao ambiente. **Rev. Educação, Ciência e Tecnologia**. p. 311-322, 2008.

ARAUJO, L. T. C. **Aplicações de lipases**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte / Minas Gerais, 2009.

BALBINOT, E. L., ARENHART, M. BATISTA, C. P., PROCHNOW, L. R., BLASI, T. C. Interesterification as alternative to nutritional negative implications of trans fat. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v.10, n.1, p. 31-44, 2009.

BARBARÁ, R. G. Tratamiento farmacológico de la obesidad. **Rev Med Univ Navarra**, vol. 48, n. 2, p. 63-65, 2004.

BARBIERI, A. F. As causas da obesidade: uma análise sob a perspectiva materialista histórica. **Rev. da Faculdade de Educação Física da Unicamp, Campinas**, v. 10, n. 1, p. 133-153, 2012.

BARON, E. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba / Paraná, 2008.



BENEVIDES, C. M. J., SOUZA, M. V., SOUZA, R. D. B., LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 18 n.2, p.67-79, 2011.

BERGOLD, A. M., PUNGARTNIK, C. GOSMANN, G., BRENDEL, M., SAITO, S. T. **Processo de obtenção de extrato vegetal compreendendo catequinas e composições compreendendo o mesmo**. Universidade Estadual de Santa Catarina (UESC) / Universidade federal do Rio Grande do Sul (UFRS), 2009.

BERTOLAMI, M. C. Alterações do Metabolismo Lipídico no Paciente com síndrome Metabólica . **Rev. Soc. Cardio**. São Paulo, v.4 p.551-556, 2004.

BEVILACQUA, M. R., GIMENO, S. G. A., MATSUMURA, L. K. Hiperlipidemias e Fatores Dietéticos: Estudo Transversal Entre Nipo-Brasileiros. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n 4, p. 51-54, 2007.

BEZERRA, V. S., PEREIRA, S. S. C., FERREIRA, L. A. M. **Características físicas e físico-químicas do uxi (*Endopleura uchi* Cuatrec.)**. 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, Universidade Federal de Lavras, Lavras / Minas Gerais, 2012.

BILIERI, C. E.; KARSBRUG, I. V.; GOMES, C. M.; LAUTON, D. S.; NASCIMENTO, H. R. **Genotoxicidade de Infusões de Casca de Uxi Amarelo (*Endopleura uchi*) Pelo Sistema *Pisum sativum*** In: Congresso de Iniciação Científica, 4ª. (JC), v.7, 2011.

BLOIS, S. M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Rev. Nature**. v. 181(4617), p. 1199-1200, 1958.

BORGES, A. K. N. **Estudo do metabolismo lipídico através da espectroscopia de prótons por ressonância magnética em seres humanos obesos pré e pós-gastroplastia correlacionando com dados antropométricos, exames laboratoriais e biópsia hepática**. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BORGES, J. C. M. **Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém / Pará, 2010.

BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E., BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology** n. 28, p. 25-30. 1995.

BRASIL. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / **ABESO** - 3.ed. - Itapevi, São Paulo, 2009.

BRASIL. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Atualização das diretrizes brasileiras de obesidade para o tratamento farmacológico da obesidade e do sobrepeso 2010 / **ABESO** - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. - 3.ed. - Itapevi, SP : AC Farmacêutica, 2010.

BRASIL, **Farmacopeia Brasileira**, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v2, 904p., 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 52 de 06 de outubro de 2011**. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros, bem como intermediários e medidas de controle da prescrição e dispensação de medicamentos que contenham a substância sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermediários e dá outras providências. D.O.U. Diário oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília 10 de outubro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS - Secretaria de Atenção à Saúde – **Portaria nº 425 de 19 de março de 2013**. Estabelece regulamento técnico, normas e critérios para o Serviço de Assistência de Alta Complexidade ao Indivíduo com Obesidade. D.O.U. Diário oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília 29 de março de 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: **plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. D.O.U. Diário oficial da União, Poder Executivo, DF Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/12926/162/mais-da-metade-da-populacao-brasileira-tem-excesso-de-peso.html>>. Acesso em: 03 set. 2014.

BROD, F. C. A. **Expressão, purificação e caracterização bioquímica de lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum***. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis / Santa Catarina, 2010.

BUENO, P. R. **Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes da indústria de alimentos**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia / Goiás, 2012.

CARVALHO, F. G., MONTEIRO, B. A., GOULART-DE-ANDRADE, D. E., BRONZI, E. S., OLIVEIRA, M. R. M. Método de avaliação de necessidades nutricionais e consumo de energia em humanos. **Rev. Simbio-Logias**, V.5, n.7, 2012.

CHANG, C-C.; YANG, M-H.; WEN, H-M.; CHERN, J-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.10, n.3, p.178-182, 2002.

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorg. Chem.**, v.31, n.2, p.149-162, 2003.

CHIDAMBARAM, U.; PACHAMUTHU, V.; NATARAJAN, S.; ELANGO, BHAKKIYALAKSHMI, S.; RAMKUMAR, K. M. In vitro evaluation of free radical scavenging activity of *Codariocalyx motorius* root extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n.3, p.188-194, 2013.

CISAK e ELVING. Electrochimica. **Rev. Acta**, v.10, p. 935-946, 1965.

COLE, E. R., ARPINI, A. F., ANDRADE, C. R., BIANCARDI, E. F. Pharmacological treatment of obesity: a critical and reflexive analysis of catecholaminergics prescriptions received by a magistral pharmacy in the city Vila Velha, Espírito Santo. **Rev. Eletrônica de Farmácia** v.6, n.4, p.10-61, 2009.

COSTA, V. E. U., AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Rev. Quím. Nova** v.22 n.6, p. 863-873, 1999.

COSTA-SILVA, T. A. **Caracterização Bioquímica e secagem em “spray-dryer” de lipases produzidas pelo fungo endolítico *Cercospora Kikuchii***. 88p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Produtos Naturais e Biosintéticos, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto / São Paulo, 2010.

COUTINHO, W. A primeira década da sibutramina e do orlistate: reavaliação do seu crescente papel no tratamento da obesidade e condições associadas. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.53, n.2, p. 262-270, 2009.

CURIEL, A. A. **Caracterização do efeito inibitório de *Ilex paraguariensis* e *Cammellia sinensis* na atividade de lipase pancreática**. Bragança Paulista. 61p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, São Paulo, 2011.

DODERO. S. R.; COELHO-RAVAGNANI, C. F.; TIRAPEGUI, J. Efficacy and safety of conjugated linoleic acid on body fat reduction. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 36, n. 2, p. 91-108, 2011.

DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JR., E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná, 2005.

DORNAS, W. C., OLIVEIRA, T.T. DORES, R. G. R. SANTOS, A. F., NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.**, v.28, n3. p. 241-249, 2007.

EHRICH, T. H., JANE, P. K., TY T. VAUGHN, L. SUSAN PLETSCHER, AND JAMES M. CHEVERUD. Diet, obesity, and hyperglycemia in LG/J and SM/J mice. **Rev. Obes Res.** V. 11, p.1400 -1410, 2003.

FERNANDES, M. L. M. **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas.** 123f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Química - Área de Concentração em Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba / Paraná, 2002.

FERRÃO, J.E.M. **Fruticultura tropical:** espécies com frutos comestíveis. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, v 2. 580p. 2001.

FERREIRA, L., GOMES, E. Estudo sobre a Eficácia do Uso de Inibidores da Recaptação de Norepinefrina e Serotonina no tratamento da obesidade (Sibutramina®). **Rev. Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 363-369, 2009.

FERREIRA, E. A. **Efeito hipolipemiante e hepatoprotetor de 2'4'6'-trihidroxiacetofenona isolada de *Myrcia multiflora*.** 100p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.

FERREIRA, A.V.D. **Caracterização química e potencial antimalárico de *Andira nitida* Mart. ex Benth.** 153p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas., Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013.

FILHO, D. B. F., JUNIOR, J. A. S. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Rev. Política Hoje**, v.18, n. 1, p. 115-146, 2009.

FOLIN, OTTO E CIOCAULTEU. **J. Biol. Chem.** v. 73, p. 627-650, 1927.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUZA, I. M. O., RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar - Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP,** 2006.

FORTES, R. C., GUIMARÃES, N. G., HAACK, A., TORRES, A. A. L., CARVALHO, K. M. B. Orlistat e sibutramina: bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso? **Rev Bras Nutr Clin;** v. 21, n.3, p. 244-51, 2006.

FRANCISCO, K. M. S. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, Araçatuba/SP. v.4, n.1, p. 18-24, 2010.

GOMES, S. V. F. **Desenvolvimento de Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Diferenciação de Genótipos de *Lippia gracilis* –** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/Sergipe, 2009.

GONÇALVES, R. M. F. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais**: efeito antinutricional de bebidas comuns. 128f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal, 2007

GRILLO, L. P., CRISPIM, S. P., SIEBERT, A. N., ANDRADE, A. T. W., ROSSI, A., CAMPOS, I. C. Perfil lipídico e obesidade em escolares de baixa renda. **Rev Bras Epidemiol**. Santa Catarina; v.8, n.1, p. 75-81, 2005.

GUERRA, SE. S., ARENT, M. D., MACHADO, M. **Fitoterapia no controle e prevenção da obesidade**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade do Vale do Itajaí, Florianópolis / Santa Catarina, 2010.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E.; **O Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Elsevier, 2006.

HERNANDES, F., VALENTINI, M. P. Obesidade: causas e conseqüências em crianças e adolescentes. **Rev. Faculdade de Educação Física da UNICAMP**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 47-63, 2010.

HILL, J. O., HAUPTMAN, J. ANDERSON, J. W., FUJIOKA, K., NEIL, P. M. O., SMITH, D. K., ZAVORAL, J. H., ARONNE, L. J. Orlistat, a lipase inhibitor, for weight maintenance after conventional dieting: a 1-y study. **Am J Clin Nutr** v.69, p. 1108–1116, 1999.

HSU, C-H., TSAI, T-H., KAO, Y-H., HWANG, K-C, TSENG, T-Y, CHOU, P. Effect of green tea extract on obese women: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical Trial. **Clinical Nutrition** v. 27, p. 363-370, 2008.

LEE, E. M., LEE, S. S., CHUNG, B. Y., CHO, J-Y., LEE, I. C., AHN, S. R., JANG, S. J., KIM, T. H. Pancreatic lipase inhibition by c-glycosidic flavones isolated from *Eremochloa ophiuroides*. **Journal Molecules**, v.15, p. 8251-8259, 2010.

LEHNINGER, A. NELSON, D., COX, M. A. **Lehninger principles of biochemistry**, Fifth Edition, W.H. Freeman: New York, 2008.

LIMA, V. M. G. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba / Paraná, 2004.

LINHARES, R. S., HORTA, B. L., GIGANTE, D. P., DIAS-DA-COSTA, J. S., OLINTO, M. T. A. Distribuição de obesidade geral e abdominal em adultos de uma cidade no Sul do Brasil - **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p. 438-448, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v 2.1998.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LU, C., XINA, Z., RENB, Z. MIQUELA, M., BROWSEA, J. An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of Arabidopsis. PNAS, **Plant Biology**, v. 106, n. 44, p. 18837–18842, 2009.

LUENGAS-CAICEDO, P.E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.**: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante. 259f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte / Minas Gerais, 2005.

MAGALHÃES, L. A. M., LIMA, M. P., MARINHO, H. A., FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Rev Acta Amaz.** v. 37, n.3, p.447 – 450, 2007.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Tratamento farmacológico da obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab** v.46 n.5, p.497-513, 2002.

MANENTI, A. V. **Plantas Medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**: uma revisão. 89 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) Curso de Nutrição, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma / Santa Catarina, 2010.

MARKHAM, K R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press; London, UK; 113 pp., 1982.

MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z., LIMA, V. M. G. GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Rev Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MOTYCKA, C., ONGE, E. S. T. ONGE. **Current Treatments For Obesity**. Jointly sponsored by The Dulaney Foundation and Diabetic Microvascular, v., n. p. 38-45, 2005.

NAKAI, M. FUKUI, Y., ASAMI, S. TOYODA-ONO, T., IWASHITA, T., SHIBATA, H., MITSUNAGA, T., HASHIMOTO, F., KISO, Y. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. **J. Agric Food Chem**, v. 53, n. 11, p. 4593-4598, 2005.

NEGREIROS, I. I. F.; OLIVEIRA, D. C.; FIGUEREDO, M. R. O.; FERRAZ, D. L. M.; SOUZA, L. S.; MOREIRA, J.; GAVIOLI, E. C. Side effects and contraindications of anti-obesity drugs: a systematic review. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 36, n. 2, p. 137-160, 2011.

NEPOMUCENO, A. L. A., OLIVEIRA, J. R. S., MOREIRA, R. R. D., CARLOS, I. Z. Avaliação da Atividade Antioxidante de *Endopleura uchi* (HUBER.) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara; Dep. de Análises Clínicas; Dep. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, 2010.

NINOMIYA, K., MATSUDA, H., SHIMODA, H., NISHIDA, N., KASAJIMA, N., YOSHINO, T., MORIKAWA, T. YPSHIKAWA, M. Carnosic acid, a nem class os lipid absorption inhibitor from sage. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, Maryland Heights, v.14, p.1943-1946, 2004.

NONAKA, G-I., KAWAHARA, O., NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XV. A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensis A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf. **Chem. Pharm. Bull**, v. 31, n. 11, p. 3906-3914, 1983.

NONINO-BORGES, C. B., BORGES R. M., DOS SANTOS J. E. **Tratamento clínico da obesidade. Medicina** (Ribeirão Preto), v. 39 n.2, p. 246-252, 2006.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Centro de energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba / São Paulo, 2001.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, S. M. **Atividade antioxidante da espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.** 25a Reun. Anl. SBQ. 2002.

OLIVEIRA, A. C., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. Fontes Vegetais naturais de antioxidantes. **Rev. Quim. Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.

ORSOLIN, P. C. **Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** 75p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia / Minas Gerais, 2011.

PAULA, I. M. B. **Determinação da composição química e da atividade antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* Linn avaliando o potencial para preparação de enxaguatório bucal.** 85p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora / Minas Gerais, 2013.

PEDROSO, G. L.; MENDES, R. H., PERSCH, K., JAHN, M. P., KUCHARSKI, L. C. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo de ratos machos. **Rev HCPA**, v. 30, n. 3, p. 241-246, 2010.

PEREIRA, L. O., FRANCISCHI, R. P., JR, A. H. L. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 47 n. 2, p. 111-127, 2003.

PEREIRA, L. L. S., SOUZA, S. P., SILVA, M. C., CARVALHO, G. A., SANTOS, C. D., CORRÊA, A. D., ABREU, C. M. P. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu. v. 12. n. 4. p. 516-518, 2010.

PEREIRA, L. L. S., SANTOS, C. D., SÁTIRO, L. C. MARCUSSI, S., PEREIRA, C. A., SOUZA, S. P. Ação Inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Rev. Bras. Farm.** v.92, n.4, p. 367-372, 2011.

PEREIRA, C. A., PEREIRA, L. L. S., CORRÊA, A. D., CHAGAS, P. M. B., SOUZA, S. P., SANTOS, C. D. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. **Rev. Bras. Bioci.** Porto Alegre. v. 9. n. 3. p. 265-269, 2011.

PETACCI, F., TAVARES, W.S., FREITAS, S.S., TELES, A.M., SERRÃO, J.E. and ZANUNCIO, J.C. Fitoquímica e Quantificação de Polifenóis em Extratos de Plantas Daninhas Asteraceae de Diamantina, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 9-15, 2012.

PETRY, R.D.; ORTEGA, G.G.; SILVA, W.B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride- flavonoid complex. **Pharmazie**, v. 56, n.6, p. 465-470, 2001.

PIZZIOLO, V.R.; BRASILEIRO, B.G.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008 - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa - **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.1, p.98-109, 2011.

POIRIER, R. H., KAHLER, E. J. e BENINGTON, F. The chemistry of hyfrazyl free radicals. I. Spectrimetric evidence on the structure of  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl and  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picryl- $\beta$ -oxyhydrazyl. **J. Organic Chemistry**. v.17, p. 1437-1445, 1952.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber)**. 143 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara / São Paulo, 2009.



POLITI, F. A. S., MOREIRA, R. R. D., SALGADO, H. R. N., PIETRO, R. C. L. R. Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) em camundongos. **Rev Pan-Amaz Saúde**, São Paulo; v.1, n.1, p.187-189, 2010.

POZZAN, R. POZZAN, R., MAGALHÃES, M. E. C., BRANDÃO, A. A. Dislipidemia, Síndrome Metabólica e Risco Cardiovascular. **Rev. SOCERJ**, v. 17, n.2, p. 97-104, 2004.

RAMOS, V. O. **Isolamento de inibidores de tripsina de sementes de mamona e sua ação sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).** 59 p.: il. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Lavras, Lavras / Minas Gerais, 2012.

RASERA, K. **Utilização de sólido fermentado obtido a partir de fungos do gênero *Rhizopus* como catalisador para modificação de óleos e gorduras.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba / Paraná, 2012.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis.** Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 405p. 2001.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica.** Manaus: INPA/SEBRAE, 2002b. v.1, 2002.

ROESLER, R., MALTA, L. G., CARRASCO, L. C., HOLANDA, R. B., SOUSA, C. A. S., PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Rev.Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n.1, p.53-60, 2007.

ROSSATO, L. G. **A sinefrina e o seu potencial cardiotoxicó:** O uso no emagrecimento e metodologias analíticas para detectar a sinefrina. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós graduação em Toxicologia Analítica Clínica e Forense, Universidade do Porto, Cidade do Porto / Portugal, 2009.

RUSAK, G.; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 43, p.121-125, 1993.

SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para síntese de ésteres etílicos.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba / Paraná, 2010.

SANTOS, R.D., GAGLIARDI, A. C. M., XAVIER H. T., MAGNONI C. D., CASSANI R., LOTTENBERG A. M. et al. Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I. **Arq Bras Cardiol.** v.100, n.3, p. 1-40, 2013.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura de ETE-UFES**. 82f. Dissertação (Mestrado) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santos, ES, 2006.

SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém: [s.n.], 1998.

SHANLEY, P.; MEOINA, G. (Ed.) **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém, PA: CIFOR: Embrapa Amazônia Oriental: IMAZON, 304 p.l., 2005.

SHARMA, N. SHARMA, V. K., SEO, S. Y. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. **J. Ethnopharmacology, Amsterdam**, v.97, p.453-456, 2005.

SHARMA, OM. P., CHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.113, p.1202-1205, 2009.

SILVA, F. A. M., BORGES, M. F., FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Rev. Quím. Nova.**, v. 22, n.1, 1999.

SILVA, M. R., SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n.1, p. 5-19, 1999.

SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Cândida antarctica* tipo B imobilizada para síntese de ésteres de vitamina A**. 102f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza / Ceará, 2007.

SILVA, P. C., ZAFFARI, D. Prevalência de excesso de peso e associação com outras variáveis em indivíduos adultos atendidos em unidade básica de saúde - **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2009.

SIMÃO, A. A., CORRÊA, A. D. C., BATISTA, P. M. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **J. Med. Plants Research** v. 6, n.47, p. 5826-5830, 2012.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**. 182f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras, Lavras / Minas Gerais, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.

SOUZA, T.M., SANTOS, L. E., MOREIRA, R. R. D., RANGEL, V. L. B. I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v.15, n.1, p.36-38, 2005.

SOUZA, M. S. F., LEME, R. B. FRANCO, R. R., ROMALDINI, C. C., TUMAS, R., CARDOSO, A. L., DAMIANI, D. Metabolic syndrome in obese and overweight adolescents. **Rev Paul Pediatr**. v.25, n.3, p.214-20, 2007.

SOUZA, S. P., PEREIRA, L. L. S., SOUZA, A. A., SANTOS, C. D. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Rev. Bras. Farmacogn**. v.21, n.3, p.450-455, 2011.

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.4, p.643-648, 2012.

TABART, J. KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.O., DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry** v.113, p. 1226–1233, 2009.

TACON, L. A. **Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae**. 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto / São Paulo, 2012.

THOMPSON, A. B. R. **Intestinal Aspects of Lipid Absorption**. Nutr Today v.24, n.4, p. 16, 1989.

TREVISAN, M. T. S., OLIVEIRA, A. C., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Rev. Quim. Nova**, v.32, n. 3, 689-702, 2009.


VILARTA, R. **Alimentação saudável e atividade física para a qualidade de vida** Campinas, IPES Editorial, 229p.: Il, 2007.

ZHANG, J., KANG, M-J., KIM, M-J., KIM, M-E., SONG, J-H., LEE, Y-M., KIM, J-I. Pancreatic lipase inhibitory activity of *Taraxacum officinale* *in vitro* and *in vivo*. **Nutrition Research and Practice**, v.2, n.4, p. 200-203, 2008.

## ANEXOS

## ANEXO I

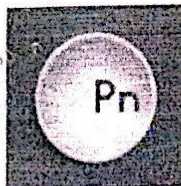
CERTIFICADO DE ANÁLISE DE QUALIDADE DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Ginkgo biloba*

	<b>CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE</b>		Pagina 13/21
	Autorização de Funcionamento M.S.:1.01284-7 Aut.Especial de Funcionamento M.S.:1.20182-2		Impressão 12/09/13 17:41 NF. 351.095 de 12/09/2013
Insumo: <b>GINKGO BILOBA 24%</b>			
Lote : 120815 #3 ✓	Origem : China	Fabric : 31/08/2012 ✓	
Lote Fab: 120815	Procedencia : Brasil	Validade : 01/08/2015 ✓	
Formula : NADA CONSTA	PM : N/C	Frac : 617095 01/07/2013	
DCB :	DCI :	CAS : SEM DADOS	Analise : 123867 02/07/2013
Categoria Terapeutica : VASOATIVADOR / ANTISQUEMICO/ ANTI RADICAIS LIVRES			
Ensaio	Especificação	Resultado	
DESCRIÇÃO	PÓ FINO AMARELO CLARO À MARROM	PÓ FINO MARROM AMARELADO	
PERDA POR DESSECAÇÃO	MÁXIMO 4,0% (2 HORAS / 105°C)	1,80%	
RESIDUO POR IGNIÇÃO	MÁXIMO 1,5%	0,58%	
GRANULOMETRIA	PASSA 100% NA MALHA 80	100%	
METAIS PESADOS	MÁXIMO: 10 ppm	< 10 ppm	
TEOR	FLAVONÓIDES GLICOSÍDEOS: MÍNIMO 24,0%	25,26%	
MICROBIOLOGIA	CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS: MÁXIMO 10 <sup>3</sup> UFC/g	< 10 UFC/g	
MICROBIOLOGIA	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS: MÁXIMO 10 <sup>3</sup> UFC/g	< 10 UFC/g	
MICROBIOLOGIA	ESCHERICHIA COLI: NEGATIVO	NEGATIVO	
MICROBIOLOGIA	SALMONELLA SP: NEGATIVO	NEGATIVO	
PESTICIDA REDIMENTAL	NEGATIVO	NEGATIVO	
DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO (SEM COMPACTAÇÃO)	0,40 g/mL	
MONOGRAFIA	: DADOS TRANSCRITOS DO LAUDO DO FORNECEDOR		
NOMENCLATURA	: NOME BOTÂNICO: Ginkgo Biloba		
	: PARTE UTILIZADA: FOLHA		
Ficha de Segurança			
SEGURANÇA	: EXTRATO SECO HIGROSCÓPICO. CONSERVE EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, LONGE DA LUZ, CALOR E UMIDADE		
Parecer Técnico	: INSUMO NA EMB.ORIGINAL DO FABR/FORN. DADOS TRANSCRITOS DO CERT.ORIGINAL		

OBS: (\*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade FAGRON e os demais estão em conformidade com o Certif. de Análise do Fabrica

## ANEXO II

## CERTIFICADO DE ANÁLISE DE QUALIDADE DO ORLISTATE



Pharmanostra®


## CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:			ORLISTAT (SINTETICO)	Pág 1	
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHINA/DINAMARCA	DATA DE ANÁLISE:	14/03/2014		
LOTE PHARMA NOSTRA:	14010427B	LOTE FABRICANTE:	T12-C0091312001M.		
DATA DE FABRICAÇÃO:	Novembro/2013	DATA DE VALIDADE:	Outubro/2016		
DCB:	06635	CAS:	96829-58-2		
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA AMBIENTE					
OBS 1: FM: C <sub>29</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>5</sub>					
OBS 2: PM: 495,73					
DATA DE EMISSÃO:	09/04/2014	NF:	6-033.136	ORDEM FRACIONAMENTO:	1586-14
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS		
Descrição*	Pó cristalino branco ou quase branco	Pó cristalino branco	Fabricante		
Identificação*	IV - O espectro da amostra está de acordo com o do padrão HPLC - O tempo de retenção da amostra corresponde ao tempo de retenção do padrão	Conforme  Conforme	Fabricante		
Ponto de fusão*	42,0°C - 46,0°C	44,3°C	Fabricante		
Metais pesados*	≤ 20 ppm	< 20 ppm	Fabricante		
Resíduo por ignição*	≤ 0,1%	0,04%	Fabricante		
Rotação específica*	-48,0° a -51,0°	-51,00°	Fabricante		
Sulfato*	≤ 0,05%	< 0,05%	Fabricante		
Substâncias relacionadas*	Impureza individual ≤ 0,5%	Não detectado	Fabricante		
	Total de impureza ≤ 2,0%	Não detectado	Fabricante		
Solventes residuais*	N-heptano ≤ 5000 ppm	1893,64 ppm	Fabricante		
	Éter isopropílico ≤ 5000 ppm	Não detectado	Fabricante		
Teor*	98,5 - 101,5%	100,32%	Fabricante		
TESTES ADICIONAIS					
Densidade aparente*	Informativo (Sem compactação)	0,38 g/mL	Met.Geral FB V		

\* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopéico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA).

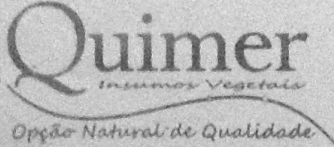
CONCLUSÃO: ( X ) Aprovado ( ) Reprovado

  
 Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade  
 João Paulo Sartin Mendes - CRF -GO: 7355

  
 Responsável Técnico  
 Rodrigo Molinari Elias - CRF-GO Nº 3234

## ANEXO III

CERTIFICADO DE ANÁLISE DE QUALIDADE DA CASCA DE *Endopleura uchi* (HUBER) CUATREC

		<b>Informações Gerais</b> <b>Laudo de Análise Botânica</b>		Téc. Resp. e Reg.: Inscr. CRO-SP: ANDERSON SANDRIM/4261952 Data: <del>CRP 23471-F</del> Ass.: 28/05/13 Cert. Reg. IBAMA 187956 Aut. Func. M.S.: 1.04.653-0 Nº Pr. SUS.: Lic. Func. Vg. Sanit.: 00101012536L/98 35503089021100000817	
Rua Andaraí, 789/799/821 - Vila Maria - Cep 02117-001 - São Paulo - SP - Brasil Fone / Fax: 55 (11) 2955-8800 - CNPJ: 68.224.997/0001 - 05 - INSCR. EST.: 113.478.712.111					
E-mail: quimer@quimer.com.br		Website: www.quimer.com.br			
<b>Insumo</b>	: UXI AMARELO (ENDOUPLEURA UCHI (HUBER) CUAT. )				
<b>Família</b>	:				
<b>Classificação (NCM)</b>	: 12119090	<b>Número / Nosso Pedido</b>	: 300471		
<b>Método de Secagem</b>	: AO SOL	<b>Peso Liq. (Entregue) Kg.</b>	: 51,000		
<b>Procedência (Região)</b>	: BRASIL	<b>Volumes (Entregue)</b>	: 3		
<b>Origem (Região)</b>	: BRASIL	<b>Tara por Volume - Kg.</b>	: 0,30		
<b>Odor e Sabor (Ins. em Bruto)</b>	: CARACTERISTICO	<b>Data do Preparo</b>	: 28/05/13		
<b>Parte Utilizada</b>	: CASCA	<b>Abertura do Tamis</b>	: 2.00		
<b>Colheita (Mês/Ano)</b>	: 09/2012 val:09/2017	<b>Descontaminação / Método</b>	: NAO HOLVE		
<b>Número do Lote</b>	: 003	<b>Validade (Mês / Ano)</b>	: VER COLHEITA		
<b>Aspecto Macroscópico:</b>					
CASCAS PLANAS, SUBER QUANDO PRESENTE, ACINZENTADO COM GRANDES FENDAS LONGITUDINAIS. SUPERFICIE INTERNA ESTRIADA LONGITUDINAL DEVIDO A PRESENÇA DE GRANDES FEIXES DE FIBRAS.					
<b>Aspecto Microscópico:</b>					
CELLULAS PARENQUIMATICAS PREENCHIDAS POR MATERIAL FENOLICO. FIBRAS ENVOLTAS POR BAINHA CRISTALINA, IDIOBLASTOS DISPOSTOS POR TODO PARENQUIMA.					
A assinatura gráfica constante neste Documento é válida e autenticada pela Quimer Comercial Ltda somente quando acompanhada da nossa respectiva Nota Fiscal. Para garantir qualidade e a validade desse insumo, armazene-o em local seco e arejado, longe do calor direto e da umidade, mantendo-o na embalagem original. Não exponha o insumo ao contato direto com embalagens confeccionadas com resinas plásticas de baixa densidade. É responsabilidade do cliente efetuar a descontaminação e as análises comprobatórias nesse insumo vegetal por não terem sido solicitadas durante seu pedido de compra. Por se tratar de insumo de origem vegetal, poderão ocorrer leves variações em sua cor, odor e sabor.					