

ALLINE ARAÚJO CURIEL

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE *ILEX*
PARAGUARIENSIS E *CAMELLIA SINENSIS* NA
ATIVIDADE DE LIPASE PANCREÁTICA

Bragança Paulista

2011

ALLINE ARAÚJO CURIEL

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE *ILEX*
PARAGUARIENSIS E *CAMELLIA SINENSIS* NA
ATIVIDADE DE LIPASE PANCREÁTICA

Prof. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Orientadora

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Stricto Sensu em
Ciências da Saúde da Universidade
São Francisco (USF) para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2011

WD 210 Curiel, Aline Araújo.

C985c Caracterização do efeito inibitório de *Ilex paraguariensis* e *Cammellia sinensis* na atividade de lipase pancreática / Aline Araújo Curiel. -- Bragança Paulista, 2011.
61 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Lipase pancreática. 2. Efeito inibitório. 3. Obesidade.
4. Chá verde. 5. Mate. 6. Catequinas.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

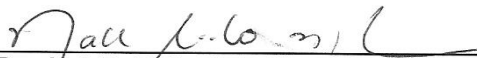
CURIEL, ALLINE ARAÚJO "CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE ILEX PARAGUARIENSIS E CAMELLIA SINENSIS NA ATIVIDADE DE LÍPASE PANCREÁTICA". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e um de Dezembro de 2011 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profª. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Profª. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco



Profª. Dra. Natalia Reiko Sato Miyasaka
Universidade São Francisco

Aos meus pais Vera e Eustáquio(*in memorian*) pelo apoio incondicional e
compreensão, ao meu filho Lucas pelas horas ausente em sua vida,
às minhas irmãs, sobrinhos e amigos pelo amor, atenção,
paciência e apoio nos momentos difíceis,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter realizado mais este sonho e por ter me dado forças para não desanimar com as dificuldades no meio do caminho.

Agradeço ao meu pai (*in memoriam*) e minha mãe pela força e incentivo diante de todas as dificuldades.

Agradeço ao meu filho e irmãs pelo carinho, apoio e torcida durante a trajetória.

Agradeço aos colegas de curso, aos alunos de iniciação científica, os técnicos do laboratório de pesquisa e amigos da pós-graduação da USF, em especial: Camila Moraes, Fernanda Fernandes, Verônica Tricoli, Thaís Raquel, Juliana Nogueira, Bel e Vilma pelo estímulo, amizade e principalmente as risadas que me ajudaram a superar as dificuldades.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patrícia de Oliveira Carvalho pela orientação, apoio e principalmente pela generosidade e paciência durante as dificuldades, que foram muitas, no decorrer do trabalho.

Agradeço a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química (Laboratório ThoMson de Espectrometria de Massas à Dra. Ildenize Cunha Barbosa) e ao Instituto de Biologia (Laboratório de Fisiologia Vegetal à Alexandra Christine H. Frankland Sawaya) pela parceria e cooperação na realização de análises utilizadas no trabalho.

Agradeço a instituição de apoio financeiro CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade São Francisco, meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

“ Não precisamos de mais dinheiro, não precisamos de mais sucesso ou fama,
não precisamos do corpo perfeito, nem mesmo do parceiro perfeito,
agora mesmo, neste momento exato, dispomos da mente,
que é todo o equipamento básico de que precisamos
para alcançar a plena felicidade ”

Dalai Lama

RESUMO

A obesidade é considerada uma desordem no metabolismo lipídico e as enzimas envolvidas neste processo são consideradas “alvos” para o desenvolvimento de novas drogas para tratamento da doença. Uma estratégia importante para este tratamento inclui o desenvolvimento de compostos capazes de inibir a atividade de lipase pancreática reduzindo a emulsificação e absorção de lípidos sem alterar o mecanismo central. No presente trabalho foram avaliados os extratos das ervas *Ilex paraguariensis* (mate erva e mate tostado) e *Camellia sinensis* (chá verde) como inibidores na atividade das lipases pancreáticas humana (LPH) e porcina (LPP). Como inibidores da reação foram usados extratos em diferentes concentrações, utilizando como substrato azeite de oliva emulsionado na presença de taurocolato, fosfatidilcolina, colesterol, albumina, NaCl, CaCl_2 em tampão Tris-HCl 0,1 M, mimetizando as condições *in vivo* e, as reações enzimáticas realizadas em condições ótimas de pH (pH = 7) e de temperatura (37° C). O mecanismo cinético das reações bem como o grau de inibição (K_i) foram avaliados através da determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) pelos gráficos recíprocos de Lineweaver-Burk. A quantificação dos teores de polifenóis e flavonóides totais foi realizada por espectrofotometria UV/Vis. A caracterização do perfil da composição dos extratos e a quantificação dos principais compostos foram realizadas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e cromatografia de ultra-eficiência acoplada a detector de massas (UPLC-MS). Os resultados mostraram que os inibidores atuaram de forma competitiva, dose-dependente, levando ao aumento significativo nos valores de K_m (constante que caracteriza a afinidade da enzima pelo substrato) sem alterar a $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima da reação enzimática sob concentrações saturantes de substrato) da reação enzimática. O chá verde além de ser mais rico em polifenólicos totais e flavonóides apresentou o maior efeito inibitório sobre as enzimas sugerindo que as catequinas e seus derivados são os principais compostos capazes de inibir a atividade das lipases pancreáticas.

Palavras-chave: Lipase pancreática, efeito inibitório, obesidade, chá verde, mate, catequinas.

ABSTRACT

Obesity is considered a disorder in the lipid metabolism and enzymes involved in this process are considered "targets" for development of new drugs to treat the disease. One important strategy to this treatment includes the development of compounds able to inhibit the pancreatic lipase activity by reducing the emulsification and absorption of lipids without modifying any central mechanism. In this study, were evaluated herbal extracts of *Ilex paraguariensis* (yerba mate and roasted mate) and *Camellia sinensis* (green tea) as inhibitors the activity of human pancreatic lipase (LPH) and porcine (LPP). As inhibitors of the reaction extracts were used in different concentrations, using as emulsified olive oil substrate in the presence of taurocholate, phosphatidylcholine, cholesterol, albumin, NaCl, CaCl_2 in Tris-HCl 0.1 M, mimicking *in vivo* conditions and the enzymatic reactions performed in optimal conditions of pH (pH = 7) and temperature (37° C). The kinetic mechanism of the reactions and the level of inhibition (K_i) were evaluated by determining the Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity ($V_{\text{máx}}$) for the graphics reciprocal Lineweaver-Burk. The quantification of the polyphenols and total flavonoids was performed by spectrophotometry UV/Vis. The collect data on the composition of the extracts and quantification of the main compounds were carried out by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS) and ultra-chromatography efficiency attached to mass detector (UPLC-MS). The results showed that the inhibitors acted in a competitive, dose-dependent, leading to significant increase in K_m values (constant which characterizes the enzyme affinity of the substrate) without altering the $V_{\text{máx}}$ (maximum speed of the enzymatic reaction under saturating concentrations of substrate) of the enzymatic reaction. The green tea besides being more rich in polyphenols and total flavonoids showed the highest inhibitory effect on the enzymes suggesting that catechins and their derivatives are the main compounds able of inhibiting the activity of pancreatic lipase.

Keywords: Pancreatic lipase, inhibition, obesity, green tea, mate, catechins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	ácido graxo livre
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAE	ácido clorogênico
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	chá verde
DAG	diacilglicerol
E	enzima
EC	epicatequina
ECG	epicatequina galato
EGC	epigallocatequina
EGCG	epigallocatequina galato
EI	complexo enzima inibidor
ES	complexo enzima substrato
EIS	complexo enzima inibidor substrato
ESI-MS	espectrômetro por ionização eletrospray acoplado a detector de massas
IC	inibição competitiva
[I]	concentração de inibidor
K_i	constante de inibição
K_m	constante de Michaelis-Menten
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LP	lipase pancreática
LPH	lipase pancreática humana
LPP	lipase pancreática porcina
MAG	monoacilglicerol
ME	mate erva
MT	mate tostado
MS	espectrometria de massas
m/z	relação massa/carga
nm	nanômetro

OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TAG	triacilglicerol
UPLC-MS	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massa
$V_{\text{máx}}$	velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparativo de Obesidade e Sobrepeso entre homens e mulheres de diversas partes do mundo.....	3
Figura 2	Absorção de Lipídeos.....	8
Figura 3	Estrutura do Triacilglicerol e designação das posições dos ácidos graxos.....	10
Figura 4	Representação tridimensional de Lipase Pancreática Humana - Unidade assimétrica da lipase humana contendo duas moléculas independentes arranjadas em um modelo cabeça/cauda ligadas por um eixo duplo.....	11
Figura 5	Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial catalisada enzimaticamente.....	13
Figura 6	Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk.....	14
Figura 7	Modelo de Inibição Competitiva.....	16
Figura 8	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk em presença de um inibidor competitivo.....	16
Figura 9	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk em presença de um inibidor competitivo para determinação de K_i	17
Figura 10	Fluxograma de produção da erva-mate.....	22
Figura 11	Estrutura das catequinas presentes no chá verde.....	25
Figura 12	% relativa de ácidos graxos liberados (% AGL) na reação enzimática em presença do extrato de mate tostado (MT).....	36
Figura 13	% relativa de ácidos graxos liberados (% AGL) na reação enzimática em presença do extrato de mate erva (ME).....	38
Figura 14	% relativa de ácidos graxos liberados (% AGL) na reação enzimática em presença do extrato de chá verde (CV).....	39
Figura 15	Inibição da atividade da LPH (A) e LPP (B) pelos extratos de <i>Ilex paraguariensis</i> (ME e MT) e <i>Camellia sinensis</i> (CV), na concentração de 50 µg/mL.....	40
Figura 16	Análise qualitativa dos compostos majoritários nos extratos de mate erva	42

	e tostado por ESI-MS.....	
Figura 17	Análise cromatográfica do extrato de <i>Ilex paraguariensis</i> por UPLC-MS.....	43
Figura 18	Análise qualitativa da composição do extrato chá verde por ESI-MS.....	44
Figura 19	Análise cromatográfica do extrato chá verde por UPLC-MS.....	45
Figura 20	Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk na presença de diferentes concentrações do substrato utilizando como inibidor extrato de mate erva.....	48
Figura 21	Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk na presença de diferentes concentrações do substrato utilizando como inibidor extrato de mate tostado.....	48
Figura 22	Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk na presença de diferentes concentrações do substrato utilizando como inibidor extrato de chá verde.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Regiões avaliadas pela OMS na prevalência da obesidade e sobrepeso.....	4
Tabela 2	Características dos medicamentos para o tratamento da obesidade.....	6
Tabela 3	Diversas aplicações da enzima lipase.....	9
Tabela 4	Diferentes aplicações industriais dos sub-produtos do mate e formas de uso.....	21
Tabela 5	Compostos químicos presentes no mate.....	23
Tabela 6	Fenólicos Totais e Conteúdo de Flavonóides nos extratos inibidores.....	41
Tabela 7	Compostos Fenólicos dos extratos aquosos de mate erva e tostado quantificados por UPLC-MS.....	42
Tabela 8	Composição dos principais polifenóis presentes no chá verde.....	45
Tabela 9	Comparação dos polifenóis encontrados no chá verde e mate erva.....	46
Tabela 10	Determinação de K_m e $V_{máx}$ pelo Gráfico de Lineweaver-Burk para os extratos mate erva (ME), mate tostado (MT) e chá verde (CV)	49
Tabela 11	Comparação dos parâmetros cinéticos da reação catalisada pela LPP e LPH na presença dos extratos mate erva, mate tostado, mate verde.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Obesidade e Tratamento	3
2.2 Obesidade e Metabolismo Lipídico	7
2.3 Lipase	9
2.3.1 Lipase Pancreática	11
2.4 Inibição Enzimática	12
2.4.1 Inibição competitiva	15
2.4.2 Inibição não-competitiva	17
2.4.3 Inibidores de Lipase Pancreática	18
2.5 <i>Ilex paraguariensis</i>	20
2.6 <i>Camellia sinensis</i>	24
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Materiais	29
4.1.1 Reagentes	29
4.1.2 Enzimas	29
4.1.3 Extratos inibidores	29
4.2 Métodos	30
4.2.1 Determinação da curva padrão de ácido graxo livre	30
4.2.2 Extratos e formas de preparo	30
4.2.3 Reação enzimática	31
4.2.4 Determinação do efeito inibitório dos extratos	31
4.2.5 Determinação das constantes cinéticas	32
4.3 Caracterização química dos extratos	32
4.3.1 Método Folin-Ciocalteu: determinação de polifenóis totais	32

4.3.2 Método para determinação de flavonóides totais	33
4.3.3 Análise quali e quantitativa dos extratos	33
4.3.3.1 Caracterização por ESI-MS	33
4.3.3.2 Quantificação dos compostos da <i>Ilex paraguariensis</i> por UPLC-MS	34
4.3.3.3 Quantificação dos compostos da <i>Camellia sinensis</i> por UPLC-MS	34
4.3.4 Análise estatística	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Efeito das diferentes concentrações de extrato de mate tostado na inibição da atividade da lipase pancreática porcina e humana.....	36
5.2 Efeito das diferentes concentrações de extrato de mate erva na inibição da atividade da lipase pancreática porcina e humana.....	37
5.3 Efeito das diferentes concentrações de extrato de chá verde na inibição da atividade da lipase pancreática porcina e humana.....	38
5.4 Efeito comparativo dos extratos na atividade inibitória das lipases.....	40
5.5 Análises químicas	41
5.5.1 Conteúdo de fenólicos e flavonóides nos extratos inibidores	41
5.5.2 Caracterização química da <i>Ilex paraguariensis</i>	41
5.5.3 Caracterização química da <i>Camellia sinensis</i>	44
5.6 Estudo dos Parâmetros Cinéticos	47
5.6.1 Parâmetros cinéticos segundo Lineweaver-Burke	47
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. ANEXOS	60
Anexo 1 - Curva padrão de ácido oléico.	60
Anexo 2 - Curva padrão de ácido gálico para determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	60
Anexo 3 - Curva padrão de quercetina utilizada no ensaio de quantificação dos flavonóides totais.....	61

1. INTRODUÇÃO

Obesidade é resultado do desequilíbrio entre energia armazenada e consumida pelo organismo (Borgstrom, 1981). Embora considerada um problema do mundo desenvolvido, a obesidade epidêmica está se alastrando também pelas nações em desenvolvimento. Esta mudança é resultante do estilo de vida atual da sociedade urbana moderna na qual o homem se expõe à fatores como estresse, ansiedade, sedentarismo e principalmente ao estilo de alimentação rápida que incluem *fast-foods* e *self-services* (Cairns, 2005).

As comorbidades da obesidade são tão comuns que estão substituindo os problemas tradicionais, como desnutrição e doenças infecciosas como as causas mais significativas de problemas de saúde. Dentre elas estão a doença cardíaca coronária, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, certos tipos de câncer, diabetes, dislipidemia, osteoartrite, gota, doenças pulmonares e apnéia do sono. Além disso, os obesos sofrem de preconceito social e discriminação por parte não só do público em geral, mas também de profissionais de saúde, e isso pode torná-los relutantes em procurar assistência médica (WHO, 2000).

A prevalência da obesidade está aumentando em ritmo alarmante e infelizmente somente alguns medicamentos estão disponíveis para tratamento no mercado. Estes medicamentos, a maioria das vezes são de ação no sistema nervoso central, causam dependência química (psicotrópicos) e são de uso controlado pela ANVISA. Sem alternativas variadas para o tratamento medicamentoso atual, as complicações decorrentes do sobrepeso incidirão cada vez mais no sistema de saúde pública sem garantias reais de sucesso terapêutico (Cardoso *et al.*, 2009).

Em paralelo a alopatria convencional, uma das mais importantes estratégias no tratamento da obesidade inclui o desenvolvimento de compostos com ação inibitória de enzimas digestivas reduzindo assim a emulsificação, absorção e armazenamento de lipídios durante o mecanismo de digestão no sistema gastrointestinal sem alterar nenhum mecanismo central (Strader *et al.*, 1998; Shi & Burn, 2004).

O potencial de compostos encontrados em produtos naturais pode ser uma excelente alternativa para o desenvolvimento de drogas seguras e efetivas para o tratamento da obesidade. Diversos produtos de origem vegetal (ervas) têm sido estudados como coadjuvantes no tratamento da obesidade demonstrando resultados satisfatórios (Bhutani, 2007).

Chás polifenólicos tem sido bem aceitos por ter várias funções biológicas e farmacológicas, bem como redução dos níveis de colesterol, atividades imunoestimulatória, antimicrobiana e antioxidante, auxiliando na prevenção de doenças crônico-degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (Cheng, 2006).

A *Camellia sinensis* (chá verde) e a *Ilex paraguariensis* (mate) são ricas em compostos polifenólicos os quais tem sido recentemente apontados pelo nosso grupo de pesquisa como potentes inibidores enzimáticos (Martins *et al.*, 2009; Battagim *et al.*, 2011).

Considerando que a ação da lipase pancreática é o ponto crucial na digestão e absorção de lípidos e que sua inibição é uma estratégia poderosa no desenvolvimento de novas moléculas bioativas para o tratamento da obesidade delineou-se o presente trabalho visando contribuir com o conhecimento referente às propriedades funcionais dos extratos de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis*, em relação ao potencial destes extratos na inibição da atividade das lipases pancreáticas humana e porcina, bem como a avaliação dos parâmetros cinéticos das reações enzimáticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Obesidade e Tratamento

A obesidade e o sobrepeso representam uma ameaça à saúde das populações em um número crescente de países. Segundo a Figura 1, estudos realizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apontam estimativas preliminares das taxas de prevalência de sobrepeso e obesidade em homens de meia idade e mulheres em todo o mundo (James *et al.*, 2001).

As letras representam os três países mais populosos de cada agrupamento como mostrado na Tabela 1. A pesquisa foi realizada em 14 sub-regiões do mundo, 191 países divididos em agrupamentos regionais compostos pelos três países mais populosos de cada sub-região, demonstrados pelas letras A-E. O resultado demonstrou, à nível global, uma notável variação na prevalência de sobrepeso e obesidade entre homens e mulheres com faixa etária entre 45 a 59 anos de idade.

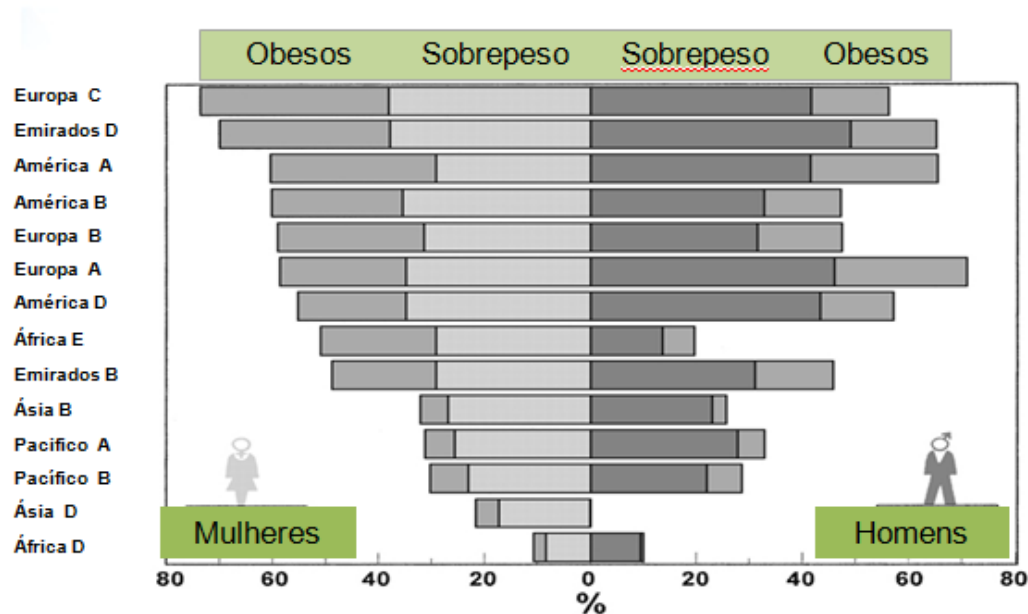


Figura 1 - Comparativo de Obesidade e Sobrepeso entre Homens e mulheres de diversas partes do mundo.

Fonte: WHO 2000, como modificações.

Tabela 1 – Regiões avaliadas pela OMS na prevalência da obesidade e sobrepeso.

Região de Estudo	Países envolvidos
América A	Estados Unidos, Canadá e Cuba
América B	Brasil, México e Colômbia
América D	Perú, Equador e Guatemala
África D	Nigéria, Argélia e Gana
África E	Etiópia, Congo e África do Sul
Emirados B	Irã, Emirados Árabes Unidos e Arábia Saudita
Emirados D	Paquistão, Egito e Sudão
Europa A	Alemanha, França e Reino Unido
Europa B	Turquia, Polónia, e Uzbequistão
Europa C	Federação Russa, Ucrânia e Cazaquistão
Ásia B	Indonésia, Tailândia e Sri Lanka
Ásia D	Índia, Bangladesh e Mianmar
Pacífico A	Japão, Austrália e Cingapura
Pacífico B	China, Vietnã e Filipinas.

Fonte: James *et al.*, 2001.

Estudos detalhados de diferentes países como Estados Unidos, Inglaterra, Brasil e Japão mostraram que há um aumento progressivo nas taxas de obesidade dentro de cada país e também uma clara relação inversa quanto ao nível de escolaridade e nível socioeconômico em relação a prevalência da obesidade.

Segundo WHO (2000), a obesidade está sendo vista como uma característica da população de baixa renda e isto está relacionado às circunstâncias sociais e às diferenças culturais que afetam diretamente na escolha da dieta nutricional de cada população (James *et al.*, 2001).

Os medicamentos utilizados para o tratamento da obesidade podem ser classificados em três grupos distintos: os que diminuem a fome ou modificam a saciedade, os que reduzem a digestão e a absorção de nutrientes e os que aumentam o gasto energético, sendo que estes últimos não são aprovados no Brasil (WHO, 1998).

Como mostrado na Tabela 2, a terapia farmacológica utilizada para tratamento da obesidade e sobrepeso é dividida nas seguintes classes: em agentes catecolaminérgicos (Anorexígenos: anfepramona, femproporex e mazindol); agentes serotoninérgicos (Sacietógenos: Fluoxetina, Sertralina); agentes serotoninérgicos e catecolaminérgicos (Sibutramina); termogênicos (Efedrina, Cafeína, Aminofilina), inibidores da absorção intestinal de gorduras (Orlistat) e inibidores de agonistas canabinóides (Bays-Harold, 2004).

Todas as possibilidades farmacológicas tem atividades potenciais, mas também sérias limitações. A farmacoterapia antiobesidade atual utiliza-se de drogas essencialmente de ação central (drogas anorexígenas) as quais apresentam efeitos colaterais severos (mais particularmente a hipertensão pulmonar e doença cardíaca valvular), levando à retirada de vários desses fármacos do mercado nacional e mundial, bem como a discussão acirrada de seus efeitos (ANFARMAG, 2011).

Como alternativa ao tratamento alopático encontramos o estudo de compostos naturais que atuam dificultando o metabolismo lipídico através da inibição enzimática desta via. A inibição da lipase pancreática (LP) é um dos mecanismos mais estudados para determinar a eficácia de produtos naturais como agentes antiobesidade (Birari *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Características dos medicamentos para o tratamento da obesidade.

	Mecanismo de Ação	Dose Diária máxima	Efeitos Colaterais
Catecolaminérgicos			
Fentermina	Diminui a ingesta alimentar por mecanismo noradrenérgico.	Retirado do mercado	Boca seca, insônia, taquicardia, ansiedade.
Femproporex	Diminui a ingesta alimentar por mecanismo noradrenérgico.	35 mg/dia	Boca seca, insônia, taquicardia, ansiedade.
Anfepramona (Dietilpropiona)	Diminui a ingesta alimentar por mecanismo noradrenérgico.	75 mg/dia	Boca seca, insônia, taquicardia, ansiedade.
Mazindol	Diminui a ingesta alimentar por mecanismo noradrenérgico e dopaminérgico.	1,5 mg/dia	Boca seca, insônia, taquicardia, ansiedade.
Fenilpropanolamina	Atua aumentando a ação adrenérgica.	Retirado do mercado	Sudorese, taquicardia, eventualmente aumenta a pressão arterial.
Serotoninérgicos			
Fluoxetina	Inibição da recaptação de Serotonina	20 – 60 mg/dia	Cefaléia, insônia, ansiedade, sonolência e diminuição da libido.
Sertralina	Inibição da recaptação de Serotonina	50 – 150 mg/dia	Cefaléia, insônia, ansiedade, sonolência e diminuição da libido.
Serotoninérgicos e Catecolaminérgicos			
Sibutramina	Inibição da recaptação da serotonina e da noradrenalina, diminuindo a ingesta e aumentando o gasto calórico.	15 mg/dia	Boca seca, constipação, taquicardia, sudorese.
Termogênicos			
Efedrina	Agonista Adrenérgico	50 – 75 mg/dia	Sudorese, taquicardia.
Caféina	Aumento da ação da noradrenalina em terminações nervosas potencializando o efeito da efedrina	60 mg/dia	Gastrite, taquicardia
Aminofilina	Aumento da ação da noradrenalina em terminações nervosas potencializando o efeito da efedrina	300 – 450 mg/dia	Gastrite, Taquicardia
Inibidor da Absorção Intestinal de Gorduras			
Orlistat	Atua no lúmen intestinal inibindo a lipase pancreática que é uma enzima necessária para a absorção de triacilglicerol	120 mg/dia divididas em 3 tomadas antes das refeições	Esteatorréia (diarréia gordurosa), incontinência fecal, interfere na absorção de vitamina A, D, E, K, necessitando de suplementação.
Inibidor de Agonistas Canabinóides			
Rimonabanto	Antagonista seletivo dos receptores canabinóide-1 (CB1) que inibe os efeitos farmacológicos dos agonistas	20 mg/dia	Suores noturnos, pânico, soluços, raiva, inquietação, p comportamento agressivo.

Fonte: ANFARMAG, 2011, com modificações.

2.2 Obesidade e Metabolismo Lipídico

O metabolismo lipídico é balanceado para manter a homeostase. Quando este equilíbrio é perdido, a obesidade é desenvolvida, levando a sérias doenças, incluindo aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes e depressão funcional de certos órgãos (Hofbauer, 2002; Srivastava R. & Srivastava N., 2004). Portanto, o controle do metabolismo lipídico por drogas deve ser usado para prevenir ou tratar estas doenças.

Um número crescente de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico estão sendo identificadas e caracterizadas, bem como uma série de alvos potencialmente terapêuticos para tratamento da obesidade e outras desordens metabólicas (Shi & Burn, 2004).

Uma importante estratégia no tratamento da obesidade inclui o desenvolvimento de inibidores atuantes na digestão e absorção de nutrientes, em uma tentativa de reduzir energia ingerida através do mecanismo gastrointestinal, sem alterar nenhum mecanismo central (Foster-Schubert & Cummings, 2006; Shi & Burn, 2004). Visto que os lipídeos da dieta representam a principal fonte de calorias indesejadas, inibir a digestão de triglicérides constitui uma abordagem para a redução da absorção de gordura (Mukherjee, 2003; Thomson *et al.*, 1997).

Os lipídeos ingeridos na dieta caem no trato gastrointestinal passando pela boca e estômago quase de forma inalterada, já que as enzimas presentes nas glândulas salivares e estômago têm capacidade de atuar na digestão de uma quantidade muito pequena destas moléculas. Somente os neonatos possuem lipases no estômago e glândulas salivares capazes de digerir triacilgliceróis em grande quantidade. Quando o lipídio chega ao duodeno (na forma de glóbulos lipídicos) juntamente com o quimo, é estimulada a secreção de bile (micelas de sais biliares, colesterol e lecitina) ocorrendo a emulsificação de gotas grandes de lipídeos em gotículas menores. Esse processo recebe o nome de emulsificação lipídica e não é considerado parte da digestão química de triacilglicerol já que ácidos graxos e glicerol ainda não foram hidrolisados.

A digestão propriamente dita ocorre na superfície dessas gotículas emulsificadas por meio da ação enzimática das lipases pancreáticas que são auxiliadas por outra

proteína denominada Colipase que reveste as gotículas lipídicas e as unem a lipase pancreática. Por reação de hidrólise a lipase pancreática remove dois de três ácidos graxos de cada triacilglicerol (TAG) liberando dois ácidos graxos livres (AGL) e um monoacilglicerol (MAG). Os ácidos graxos livres possuem polaridade maior que o lipídio não digerido e devido a isso se associam as micelas de sais biliares, lecitina e colesterol formando micelas mistas. Estas micelas mistas se movem para a borda do epitélio intestinal ocorrendo a absorção propriamente dita.

Os ácidos graxos liberados e os MAG na célula formam-se de novo em novos TAG (Figura 2). A principal via para a ressíntese envolve a síntese de TAG a partir de 2-MAG e os ácidos graxos ativados pela coenzima A (CoA). A lipase microssomal acil-CoA é necessária para a síntese de acil-CoA, a partir do ácido graxo antes da esterificação. Estes TAG reconstituídos então combinam-se com o colesterol, os fosfolipídios e as apoproteínas para formarem quilomícrons que consistem em um núcleo interno contendo TAG e um núcleo membranoso externo de fosfolipídios e apoproteínas. Os quilomícrons passam das células epiteliais para as lacteais, onde eles passam através dos linfáticos para dentro do sistema venoso. Pequenas quantidades de ácidos graxos de cadeia curta e média podem ser absorvidas diretamente para dentro do sangue portal, em vez de serem convertidos em TAG e absorvidos pelos linfáticos. Estes ácidos graxos de cadeia mais curta são mais hidrossolúveis, o que permite a sua difusão direta para dentro da corrente sanguínea (Fox, 2007).

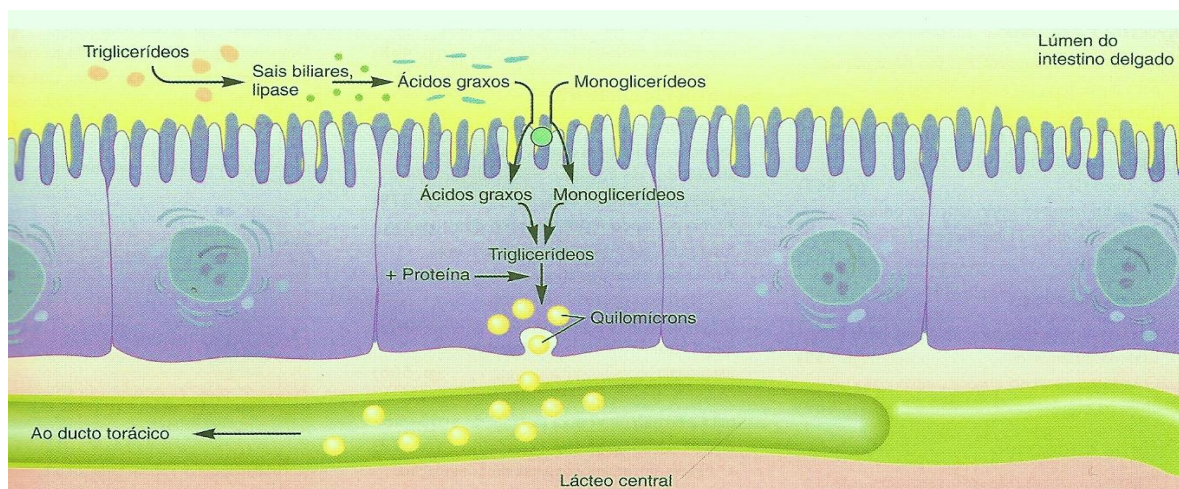


Figura 2 - Absorção de Lipídeos.

Fonte: Fox, 2007

2.3 Lipase

Lipases são enzimas que catalisam inúmeras reações de interesse para a indústria farmacêutica, alimentícia e química. Isso se deve a característica e especificidade dessas enzimas em relação a diversos tipos de substratos. Estas enzimas são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização (esterificação intramolecular) e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa (Brockman, 1984). Esta flexibilidade unida a capacidade de ligação com diferentes substratos confere a estas enzimas um imenso leque de aplicações em diversas áreas (Gandi, 1997), conforme resumido na Tabela 3:

Tabela 3 - Diversas aplicações da enzima lipase.

Área	Aplicação
Farmacêutica	Coadjuvantes de digestão
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes
Médica	Determinação de lipídeos no sangue (biossensores)
Química Fina	Síntese de esteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras

Fonte:Gandi, 1997

As lipases verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3 pertencem a classe das hidrolases e catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres conforme esquema abaixo:

Hidrólise parcial:

Triacilglicerol → Diacilglicerol + 1 molécula de ácido graxo

Triacilglicerol → Monoacilglicerol + 2 moléculas de ácidos graxos

Hidrólise total:

Triacilglicerol → Glicerol + 3 moléculas de ácidos graxos

Além de quebrar as ligações de éster de TAG com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas. Estas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água (Jaeger *et al.*, 1994; Brockman *et al.*, 1988). Dada esta propriedade, a cinética das reações lipolíticas é descrita pelas equações de Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorre em fase homogênea (Sharma *et al.*, 2001).

Lipases podem ser encontradas em células animais e vegetais e também podem ser produzidas por microorganismos (Melo *et al.*, 1996). Devido ao procedimento de isolamento, as enzimas provenientes de microorganismos são mais utilizadas industrialmente.

As lipases são um grupo versátil de enzimas e muitas vezes expressam outras atividades como, por exemplo, a fosfolipase, lisofosfolipase, colesterol esterase, cutinase, amidase (Schimid, 1988).

A região de seletividade da lipase é frequentemente mais alta para as posições **sn1** e **sn3** e menos para a **sn2** que é menos degradada conforme Figura 3 (Stadler *et al.*, 1995). A enzima lipase consiste de uma larga família de enzimas as quais tem a mesma dobra estrutural global, mas que tem uma enorme versatilidade de *loop* em contato com o substrato, e exibe versatilidade na especificidade do substrato (Estell, 1993).

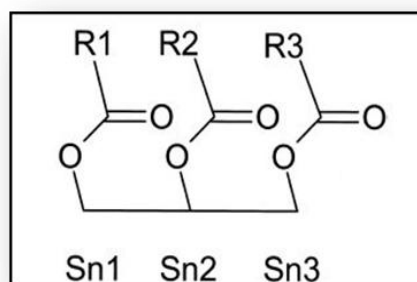


Figura 3 – Estrutura do Triacilglicerol e designação das posições dos ácidos graxos.

Fonte: Estell, 1993

2.3.1 Lipase Pancreática

A lipase pancreática é a enzima chave para absorção de lipídeos. É conhecido que os lipídeos não são diretamente absorvidos no intestino, antes eles ficam sujeitos a ação da lipase pancreática (Hill, 1999). Estas digerem gorduras, incluindo TAG e fosfolipídeos. As lipases humanas, representadas pela Figura 4, incluem as lipases pré-duodenal (lingual e gástrica) e extra-duodenal (pancreática, hepática, lipoproteína e endotelial) (Mukherjee, 2003).

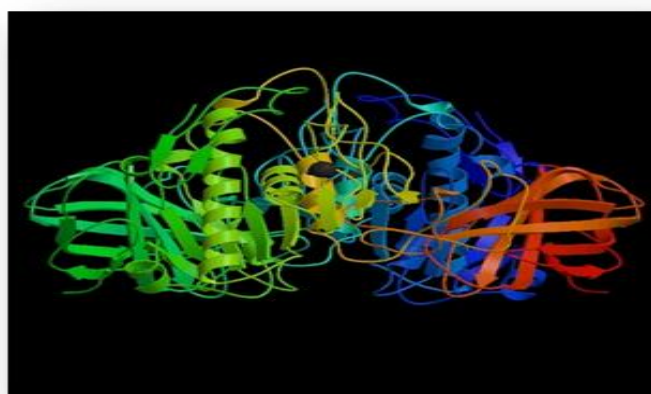


Figura 4 - Representação tridimensional de Lipase Pancreática Humana - Unidade assimétrica da lipase humana contendo duas moléculas independentes arranjadas em um modelo cabeça/cauda ligadas por um eixo duplo.
Fonte: Caro *et al.*, 1977

Lipase Pancreática (triacilglicerol acil hidrolase), a principal enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas desempenha um papel fundamental na eficiência da digestão de triacilglicerol. Ela remove ácidos graxos da posição α e α' de triacilglicerol da dieta, produzindo β -monoacilglicerol e ácidos graxos de cadeia longa saturada e poliinsaturada como produto lipolítico.

Lipase Pancreática é responsável pela hidrólise de 50-70% da gordura total da dieta (Shi & Burn, 2004; Mukherjee, 2003). Esta requer outra proteína exócrina pancreática, a Colipase, que é secretada pela pâncreas como uma molécula precursora, a procolipase, que se liga com o terminal C-dominante da molécula de lipase pancreática, sem indução nem troca conformacional (Tilbeurgh, 1992).

2.4 Inibição Enzimática

Victor Henri propôs em 1903 que uma enzima se liga a molécula de seu substrato para formar o complexo ES, sendo este um passo obrigatório para a catálise enzimática. *Leonor Michaelis* e *Maud Menten*, em 1913, expandiram a idéia de Henri propondo que a enzima primeiro se combine reversivelmente com o substrato para formar o complexo enzima-substrato em um passo reversível e rápido (Nelson & Cox, 2011), conforme reação (1) abaixo:



Em um passo mais lento, o complexo ES se rompe reaparecendo a enzima livre e a formação do produto P, conforme reação (2) abaixo:



A reação (2) é mais lenta, limitando a velocidade de transformação de reagente em produto. Conclui-se através desta equação que a velocidade da reação enzimática é proporcional à concentração de reagente (ES). Em qualquer instante da reação a enzima existe em duas formas: a forma livre E e a forma ligada ao substrato ES. A velocidade inicial máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) será atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma de complexo ES e a enzima livre (E) no sistema estiver em quantidade insignificante. Pode-se dizer que neste momento tem-se a “saturação” da enzima com o substrato e a partir disso a velocidade da reação não aumenta mais com o aumento da concentração de substrato (Segel, 1979). Nesta etapa tem-se o estado estacionário da reação enzimática conforme Figura 5:

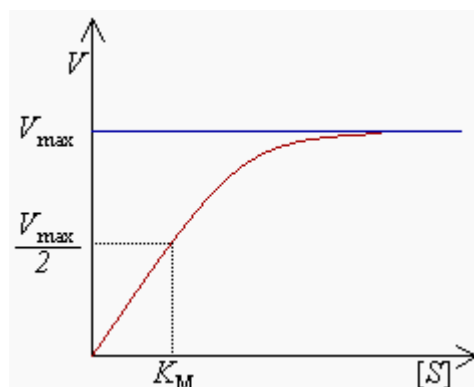


Figura 5 - Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial catalisada enzimaticamente.

A partir da Figura 5, os pesquisadores Michaelis e Menten expressaram uma equação partindo da hipótese que em uma reação enzimática o passo limitante da velocidade é a quebra do complexo ES para a formação de produto e enzima. A Equação de Michaelis-Menten expressa a relação quantitativa entre a velocidade inicial (V_0), a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a concentração de substrato $[S]$ (Segel, 1979), conforme equação (1) abaixo:

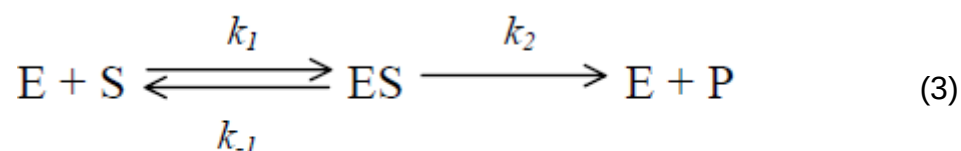
$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Quando V_0 é exatamente a metade da $V_{m\acute{a}x}$ tem-se relação importante na equação de Michaelis-Menten conforme equação (2) abaixo:

$$K_m = [S] \rightarrow V_0 = \frac{1}{2} V_{m\acute{a}x} \quad (2)$$

K_m é equivalente a concentração do substrato no qual V_0 é igual à metade da $V_{m\acute{a}x}$ e demonstra a afinidade da enzima em relação ao substrato, ou seja, estabelece o valor aproximado do nível intracelular de substrato. Quanto menor o valor de K_m maior a

afinidade da enzima pelo substrato. Já a $V_{\text{máx}}$ depende do K_2 , que é uma constante, e da concentração de enzima no sistema de reação (Segel, 1979), conforme reação (3):



Invertendo-se os dois lados da equação (2) de Michaelis-Menten tem-se a equação (3) abaixo:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (3)$$

Através da equação acima se tem o gráfico recíproco de Lineweaver-Burk onde se tem $1/V$ versus $1/[S]$, conforme Figura 6.

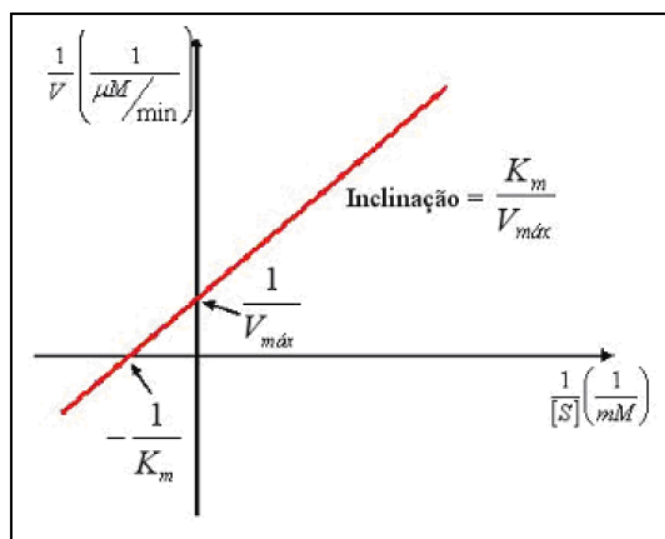


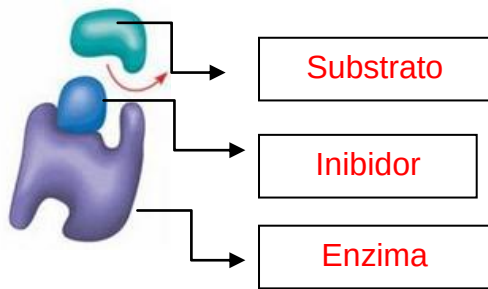
Figura 6 - Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk.

Qualquer substância que diminua a velocidade de reação enzimática pode ser considerada como um “inibidor”. Estudos de inibição podem sugerir diversos fatores relacionados à enzima tais como especificidade, arquitetura química e física do sítio ativo e mecanismo cinético da reação (Segel, 1979). No dia-a-dia temos várias substâncias que atuam como inibidores enzimáticos como drogas, antibióticos, venenos e toxinas.

Há dois tipos de inibição enzimática: reversível, quando a remoção do inibidor restaura a atividade enzimática e irreversível, quando o inibidor inativa, de forma permanente, a enzima. Os inibidores enzimáticos reversíveis podem ser classificados como competitivos, acompetitivos, não-competitivos e mistos, segundo o efeito que produzam nas constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ e K_i . Já os inibidores enzimáticos irreversíveis também podem se unir e inativar enzimas, porém de forma irreversível, geralmente por meio de modificações covalentes de resíduos do centro catalítico da enzima. Estas reações decaem de forma exponencial e são habitualmente saturáveis (Nelson & Cox, 2011).

2.4.1 Inibição competitiva

Um inibidor competitivo é uma substância que se combina com uma enzima livre de tal forma que impede sua ligação com o substrato sendo que este pode ser um análogo não metabolizado, um derivado de um substrato verdadeiro, um substrato substituto da enzima ou um produto da reação. O resultado de sua presença no meio reacional é o estabelecimento de uma competição entre as moléculas do inibidor competitivo e do substrato pela ligação do sítio ativo da enzima. O percentual de inibição resultante dependerá da concentração de substrato e inibidor competitivo e da afinidade diferencial da enzima pelo substrato e inibidor, por isso, a inibição competitiva é bastante específica (Nelson & Cox, 2011). A Figura 7 mostra os dois tipos de inibição competitiva.



Inibição Competitiva: Modelo Clássico - S e I competem pelo mesmo sítio de ligação. I deve se assemelhar estruturalmente a S.

Impedimento Estérico: Tensão provocada pela interação repulsiva quando átomos se aproximam muito um do outro ou competição por um sítio de ligação comum.

Figura 7 - Modelo de Inibição Competitiva.

Como o inibidor competitivo se liga reversivelmente à enzima, um aumento na concentração de substrato no meio reacional favorece a reação ao substrato tornando-se mínima a probabilidade de moléculas do inibidor se ligar às enzimas. Sendo assim a reação apresentará uma $V_{m\acute{a}x}$ normal. Entretanto, o K_m aumentará na presença do inibidor. Este aumento de K_m e ausência de efeito em $V_{m\acute{a}x}$ caracterizam a inibição enzimática como competitiva. Um inibidor competitivo age apenas para aumentar K_m aparente do substrato. À medida que a concentração do inibidor aumenta, o valor de K_m aumenta. A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) permanece a mesma em presença deste tipo de inibidor (Nelson & Cox, 2011), conforme demonstrado na Figura 8.

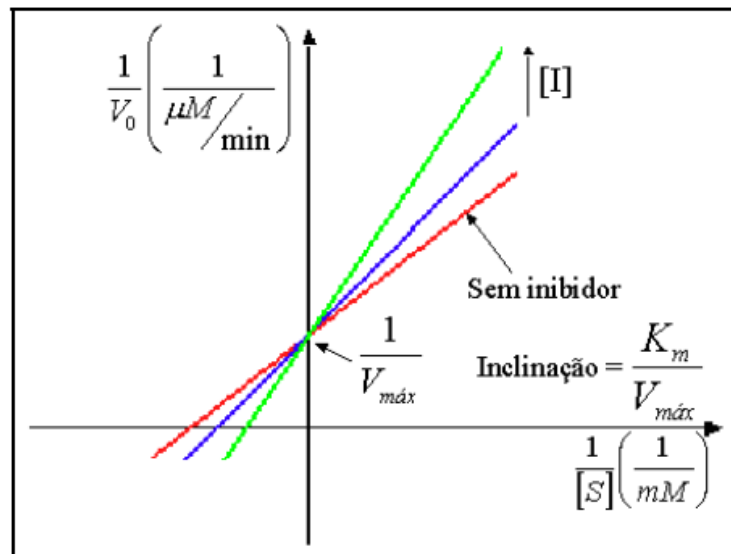


Figura 8 - Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk em presença de um inibidor competitivo.

O inibidor competitivo causa um grau de inibição (K_i) dependente da concentração de substrato e de inibidor, sendo que quando se tem um aumento na $[S]$ com $[I]$ constante o K_i diminui. Quanto menor o K_i , maior o grau de inibição. K_i equivale à concentração de inibidor que duplicará a inclinação do gráfico de $1/v$ vs $1/[S]$ (Segel, 1979), conforme demonstrado na Figura 9.

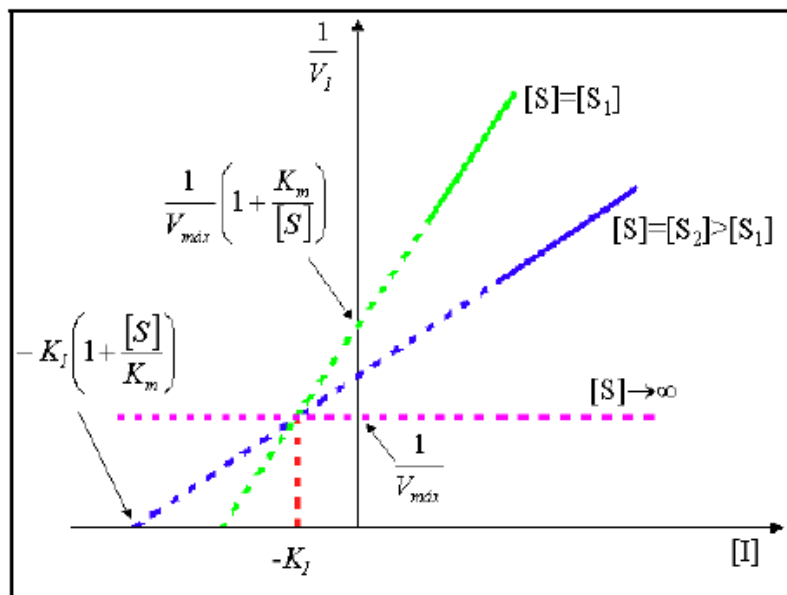


Figura 9 - Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk em presença de um inibidor competitivo para determinação de K_i .

2.4.2 Inibição não-competitiva

Na inibição não-competitiva o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo, porém ele ocupa outro sítio ativo da enzima formando um terceiro complexo enzima-inibidor-substrato (EIS). A enzima é inativada quando o inibidor está ligado a ela, tendo o substrato presente ou não. Para qualquer concentração do inibidor uma parte da enzima ficará na forma EIS e como consequência $V_{\max}$ será menor do que a $V_{\max}$ observada na ausência do inibidor. Nesse tipo de inibição o efeito de K_m é pequeno ou até mesmo nulo (Segel, 1979).

2.4.3 Inibidores de Lipase Pancreática

A inibição da lipase pancreática é um mecanismo de interesse para estudos e desenvolvimento de diversas drogas para o tratamento da obesidade. Dentre os medicamentos alopáticos aprovados para o tratamento da obesidade está o Orlistat (tetrahidrolipstatin) que é um inibidor de lipases digestivas derivado do lipstatin, produto natural de *Streptomyces toxytricini*. Orlistat é um inibidor direto do sítio ativo que reage com a serina nucleofílica residual da tríade catalítica da lipase pancreática. 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 (Borgstrom, 1988).

Fitoquímicos presentes em plantas medicinais tradicionais são uma excelente alternativa para o desenvolvimento de novos coadjuvantes terapêuticos para o tratamento da obesidade. Pesquisas têm explorando o potencial inibidor de compostos naturais na atividade das lipases digestivas. Dentre estes compostos presentes em plantas medicinais encontramos diversas classes químicas como as saponinas que são constituintes primários das raízes e rizomas de várias plantas compostos de açúcares ligados a um esteróide ou triterpeno e são responsáveis por uma diversidade de efeitos biológicos (Birari *et al.*, 2007). Estes tipos de metabólitos secundários de plantas inibem as lipases digestivas e, sendo assim, podem representar tratamentos potencialmente eficazes para obesidade e distúrbios relacionados a ela.

Saponinas do *platycodin* (PS) são os principais constituintes bioativos do *Platycodi radix*, cujas ações farmacológicas têm sido reconhecidas pela medicina tradicional chinesa como expectorante para doenças pulmonares e problemas respiratórios. Recentemente, este composto ganhou um maior interesse pelo seu potencial para aplicação no controle antiobesidade e da hipolipidemia. Platycodin D (PD), um dos principais componentes da PS, já foi relatado para possuir efeito inibitório para a lipase pancreática *in vitro*. Este inibe a atividade da lipase pancreática

por inibição do tipo competitiva e afeta o metabolismo lipídico no trato intestinal (Zhao & Kim, 2004). Na Korea, as raízes frescas de *Platycodin grandiflorum* são consumidas para prevenção da obesidade. A fração rica em saponina do *Platycodin grandiflorum radix* tem sido selecionada para utilização por seu efeito antiobesidade correlacionado com a inibição da lipase pancreática (Birari *et al.*, 2007).

A *Scabiosa tschiliensis* tem sido usada como planta medicinal para o tratamento de diversas doenças como dor de cabeça e febre na Mongolia. Foram isolados desta planta vários tipos de saponinas como as scabiosaponinas E, F, G e I, hookerosideo A e B e prosapogenina Ib e todos estes compostos exibiram, em estudos *in vitro*, forte inibição da atividade da lipase pancreática e atividade inibitória similar a que foi produzida pela inibição ocasionada pelos estudos com o orlistat (Zeng & Kolke, 2004).

O extrato de *Salacia reticulata*, que é rico em constituintes polifenólicos, é consumido como suplementação alimentar para a prevenção da obesidade e diabetes no Japão devido à supressão pós-prandial de absorção de lipídios através da inibição da lipase pancreática (Yoshikawa *et al.*, 2002).

Os chás Oolong e preto têm sido usados, desde os tempos antigos, pelos benefícios de suas propriedades medicinais, especialmente para prevenção da obesidade e metabolismo lipídico. As teasaponinas ou saponinas do chá, que são uma mistura de teasaponinas E1 e E2, inibem a atividade da lipase pancreática (Han *et al.*, 1999).

Em estudo realizado *in vitro* com o chá oolong, Nakai *et al.*, (2005), demonstraram a atividade inibitória de 54 polifenóis sobre a lipase pancreática, sendo que destes polifenóis, se destacaram por sua maior atividade inibitória compostos como a epigallocatequina galato e a galocatequina -galato.

O extrato de chá verde AR25® (25% de catequinas) *in vitro*, mostrou acentuada inibição de lipases digestivas. Verificou-se que a digestão de lipídios foi significativamente inibida utilizando 60 mg do AR25® e que tanto a inibição da lipase gástrica quanto a da lipase pancreática pode estar relacionada com a alteração da emulsificação de lipídios no duodeno (Juhel *et al.*, 2000).

2.5 *Ilex paraguariensis*

A *Ilex Paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoleacea) conhecida popularmente como erva-mate ocorre naturalmente em três países: Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, está distribuída principalmente nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Na década de 70, o Rio Grande do Sul foi o maior produtor responsável por 50% da produção, atualmente sua participação gira em torno de 25% da produção nacional (Winge *et al.*, 1995).

A palavra mate deriva do quíchua *matty* que designa a “cuia” ou seja, o recipiente onde o chá era bebido ou sorvido por um canudo (cana/bambu). A maior parte da erva-mate produzida destina-se ao consumo na forma de chimarrão. Esta bebida é obtida após a infusão da erva (folhas secas e picadas) com água quente, servida em cuias e sugada com o auxílio de uma bomba de metal. É também consumida na forma de tererê que constitui a bebida obtida pela maceração da erva em água fria ou gelada, ingerida principalmente no centro-oeste do Brasil. Outra forma é o chá mate, sendo produzido a partir da infusão da erva-mate que sofreu processo de torrefação e cuja temperatura de ingestão, frequência e volume ingeridos geralmente são menores do que aqueles do chimarrão, podendo ser ingeridos também na forma gelada (Brasil, 1998).

Quanto à designação, quando o produto for simples, produzido a partir da *Ilex paraguariensis*, deve conter a expressão “chá mate”, seguida dos termos verde, tostado ou queimado (Brasil, 1998). A Tabela 4 reporta as diferentes aplicações industriais dos sub-produtos da erva mate e formas de uso.

Assim como a *Camellia sinensis* (chá verde) a *Ilex paraguariensis* (chá mate) apresenta ácidos fenólicos e flavonóides que atuam no organismo como agentes antioxidantes, reduzindo o risco de inúmeras doenças, tais quais cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares, envelhecimento, câncer, e a ação de substâncias antioxidantes, presente naturalmente na erva, seria capaz de agir como protetoras do organismo frente a esse processo de oxidação (Bracesco *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Diferentes aplicações industriais dos sub-produtos do mate e formas de uso.

Produto Industrial	Sub-produto da Erva Mate	Modo de Utilização
Bebidas	Chimarrão, tererê, chá-mate:queimado, verde ou tostado	Infusão quente ou fria
	Refrigerantes, sucos, cerveja, vinho	Extrato de folhas diluído
Insumos de Alimentos	Corante natural, conservante alimentar	Clorofila e óleo essencial
	Sorvete, balas, bombons e caramelos, chicletes e gomas	
Medicamentos	Estimulante do sistema nervoso central	Extrato de cafeína e teobromina
	Tratamento da hipertensão, bronquite e pneumonia	Extrato de flavonóide
Higienização e meio ambiente	Bactericida hospitalar e doméstico	Extrato de saponina e óleo essencial
	Esterilizante, emulsificante	
	Tratamento de esgoto, reciclagem de lixo urbano	
Produtos de uso pessoal	Perfumes, desodorantes, cosméticos, sabonetes	Extrato de folhas seletivo e clorofila

Fonte: www.ead.fea.usp.br/Agronegócios

Conforme RDC nº 277 de 02 de setembro de 2005, o produto erva-mate é constituído exclusivamente de folhas e ramos das variedades da *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída e as etapas de produção podem ser observadas conforme Figura 10.

Segundo Souza (1991), a erva mate é constituída por: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, substâncias graxas, resina aromática, legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colessterina, metilxantinas e óleo essencial. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácidos fólicos, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênio.

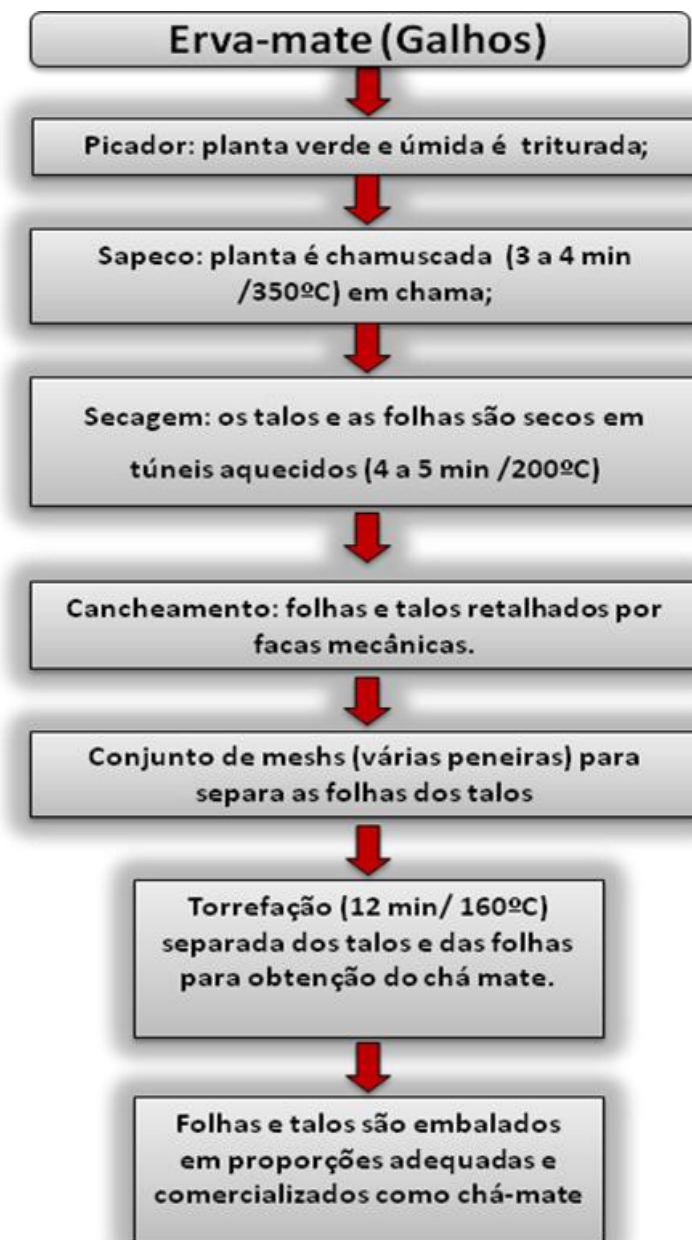


Figura 10 - Fluxograma de produção da erva-mate.

Fonte: RDC nº 277 com modificações.

Segundo Bastos *et al.*, (2007), os principais compostos encontrados na erva-mate estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Compostos químicos presentes no mate.

Compostos Químicos presentes no Mate	
Ácidos fenólicos	clorogênico, cafeico, quinico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico
Flavonóides	quercetina, Kampferol, rutina
Saponinas triterpênicas	derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico
Metilxantinas	cafeína e teobromina
Aminoácidos	não citados.
Minerais	P, Fe e Ca
Vitaminas	C, B ₁ e B ₂

A torragem das folhas para obtenção do chá mate tem mostrado alterar sua composição, levando a redução de alguns constituintes (saponinas e metilxantinas) e a formação de outros compostos biologicamente ativos. Vários fatores irão determinar a concentração dessas substâncias no chá mate, tais como o tempo de temperatura e infusão, a relação massa de erva/volume de água, granulometria da erva, composição da erva (porcentagem de talos e folhas), além da presença de outras espécies de *Ilex* que podem ser utilizadas como adulterantes (Bastos *et al.*, 2007).

Em trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa utilizando camundongos (*Swiss*) foi verificado o efeito hipolipidêmico do chá em camundongos obesos e também o efeito do chá mate tostado como inibidor da atividade da lipase pancreática (Martins *et al.*, 2009).

O efeito antiobesidade da erva mate também foi demonstrado em homens e mulheres normolipidêmicos e dislipidêmicos que consumiram mate verde ou tostado (50 e 20 mg/ml, respectivamente) os quais apresentaram redução nos níveis de LDL colesterol após 40 dias de consumo (De Moraes *et al.*, 2009).

2.6 *Camellia sinensis*

Camellia sinensis é um arbusto de pequeno porte, de origem asiática, pertencente à família *Theaceae*. Apresenta folhas simples, inteiras com margem serrada e textura coriácea. Originário da China, o chá é cultivado e consumido pelas características de aroma, sabor e propriedades medicinais em mais de 160 países (Kumudavally, 2008). É designado genericamente como chá-da-índia ou como chá-verde, oolong, banchá e chá-preto, em referência ao produto resultante do preparo diferencial das folhas (Duarte & Menarin, 2006).

De acordo com as condições de cultivo, coleta, preparo e acondicionamento das folhas esta planta dá origem a muitos chás diferentes. No entanto, todos esses tipos podem ser divididos em quatro categorias distintas: Chá branco: não fermentado, produzido de folhas jovens da planta, é retirado das plantas antes que as flores desabrochem quando os brotos ainda permanecem protegidos por pêlos finos e, por isso é mais raro e caro; para o preparo do chá preto, as folhas são fermentadas; para o preparo do chá verde, as folhas são apenas escaldadas e fervidas para garantir a preservação da cor.

O chá oolong se encaixa numa categoria intermediária: passa por um processo de fermentação mais brando e, por isso, têm aroma menos acentuado do que os pretos. Dos três tipos de chá, o chá verde é o mais rico em compostos com atividades funcionais (Kimura, 1984).

As propriedades funcionais do chá verde são provenientes do seu conteúdo polifenólico e demonstrou-se que participam de sua estrutura química aproximadamente 60 diferentes polifenóis (Chanadiri *et al.*, 2005).

A maioria dos polifenóis do chá verde se apresenta como flavanóis, e dentre estes, predominam as catequinas que são uma classe de polifenóis com propriedades funcionais caracterizadas por conter apenas a hidroxila no carbono-3, porém sem a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel C e serem compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (Matsubara & Rodrigues-Amaya, 2006).

Um estudo realizado por Xu *et al.* (2004) demonstrou que 50% das catequinas presentes no chá são epimerizadas por tratamento térmico, porém os autores concluíram neste estudo que a reação de epimerização não alterou significativamente a atividade antioxidante, absorção e metabolismo dos polifenóis do chá.

As catequinas do chá verde podem ser epimerizadas durante o tratamento térmico. Porém, foram observados que independentemente da epimerização, as catequinas impediram a hipertrigliceridemia pós-prandial, provavelmente por diminuir a capacidade ou velocidade de absorção de triacilglicerol no intestino pela inibição direta da lipase pancreática (Kao *et al.*, 2000).

As quatro principais catequinas do chá verde são (-)-epicatequina (EC), (-)-3-galato de epicatequina (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC) e 3-galato de epigallocatequina (EGCG) (Mukhtar & Ahmad, 2000), e suas estruturas estão dispostas na Figura 11.

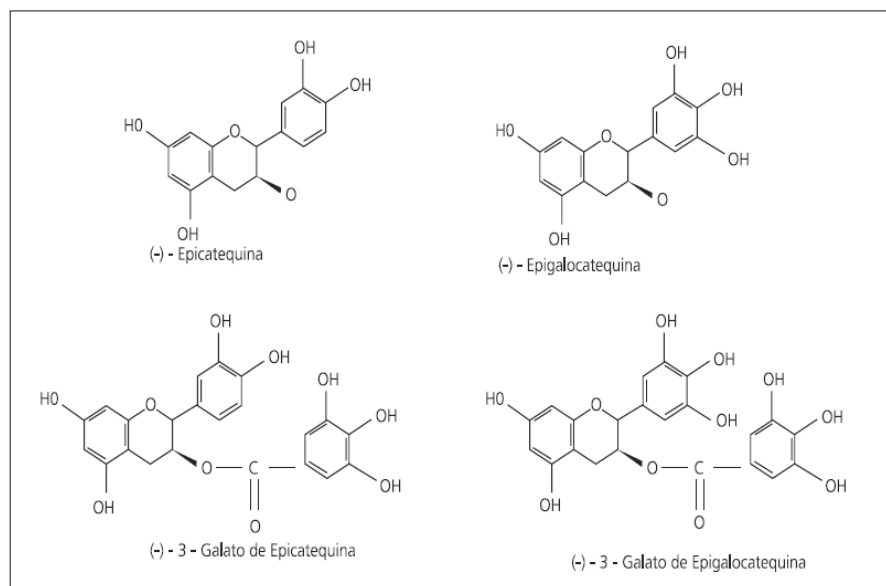


Figura 11 - Estrutura das catequinas presentes no chá verde.

Fonte: Lamarão & Fialho., 2009

Na preparação tradicional de uma xícara de chá verde erva, em proporção de 1% (p/v) em água, fervido por 3 minutos, contém aproximadamente 35-45 mg/100mL de catequinas e 6 mg/100 mL de cafeína dentre outros constituintes, sendo que o maior constituinte polifenólico é o EGCG. Estima-se que em uma xícara de 240 mL do chá verde tem cerca de 200mg de EGCG (Hasler, 2002).

Em relação à biodisponibilidade de catequinas em humanos a concentração de EGCG no plasma fica em torno de 1µM após 1 hora da ingestão de 6-12 copos (com 200mL cada) de chá verde. Os níveis plasmáticos de polifenóis apresentam-se em concentrações muito pequenas (micromols). Portanto, para que ocorra efeito benéfico à saúde deve-se ingerir o chá várias vezes ao dia em dieta fracionada (Manach *et al.*, 2005).

O chá verde apresenta muitos efeitos benéficos e dentre eles tem se destacado a possível redução da gordura corporal. A dose de chá verde que apresenta tal efeito ainda varia muito devido à diversidade na qualidade dos chás, porém acredita-se que a dosagem ótima encontra-se na ingestão em torno de 3 copos/dia, o que equivale a aproximadamente 240-320 mg de polifenóis (Xu *et al.*, 2004).

Diversos pesquisadores têm estudado o efeito das catequinas no metabolismo lipídico em nível de oxidação e sobre a massa corporal propriamente dita em animais. Grupos experimentais de ratos receberam uma dieta hiperlipídica durante 7 semanas. Um dos grupos recebeu as catequinas na quarta semana de experimento e ao final do estudo foi observado nesse grupo diminuição da concentração de colesterol total, TAG, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e de gordura visceral (Chanadiri *et al.*, 2005).

Estudos sobre o efeito da EGCG e outras catequinas, por via oral ou intraperitoneal, em ratos da raça *Sprague Dawley*, mostraram que injeções contendo 15 mg de EGCG foram capazes de causar intensa perda de peso, com valores aproximados em 50% dos ratos em 2 a 7 dias de tratamento. Tais efeitos não foram observados quando se utilizou EC, ECG e EGC e quando a administração de EGCG foi suspensa os ratos recuperaram o peso perdido (Kao *et al.*, 2000).

Segundo relatado por Ashida *et al.*, (2004) quando ratos adultos ingeriram chá verde por 3 semanas, os animais apresentaram redução do tecido adiposo sem

alteração na massa corporal e no consumo alimentar. Os mecanismos celulares possíveis atribuídos foram diminuição da translocação do transportador de glicose GLUT-4 no tecido adiposo e aumento da glicólise no tecido muscular esquelético, além da supressão da expressão ou ativação da adipogênese relacionada a fatores de transcrição.

Em estudo controlado realizado por Nagao *et al.*, (2005) foram examinados 35 homens saudáveis com sobrepeso, sendo que, 17 destes indivíduos ingeriram uma garrafa de chá verde por dia contendo 690 mg de catequinas provenientes do extrato de chá verde e o grupo controle ingeriu apenas 22 mg de catequinas. Após período de 12 semanas, o grupo tratado mostrou redução no peso corporal em 1,5%, no índice de massa corpórea em 1,5%, na circunferência da cintura em 2,0%, na massa corporal em 3,7%, nas pregas cutâneas em 6,9%, na área total de gordura em 7,9% e na área de gordura visceral 7,5%. Os autores verificaram que o consumo da bebida contendo altas concentrações de catequinas inibe a peroxidação lipídica e promove alterações na concentração de LDL.

Estudo realizado por Loest *et al.*, (2002) demonstraram que o extrato de chá verde pode ser utilizado para inibir a absorção intestinal de colesterol em ratas ovariectomizadas e ser efetiva na absorção de α -tocoferol e ácidos graxos. Os resultados demonstraram que o extrato de chá verde contendo 42,9 a 120,5 mg de catequinas foram capazes de diminuir significativamente a absorção intestinal de colesterol e α -tocoferol.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito inibitório *in vitro* dos extratos de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis*, nas formas verdes e tostadas, na atividade de lipases pancreáticas humana e porcina.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da concentração dos extratos de *Ilex paraguariensis* (formas verde e tostada) e *Camellia sinensis* como inibidores da atividade de lipase pancreática porcina e humana;
- Determinar os parâmetros cinéticos (K_m , K_i e $V_{máx}$) das reações enzimáticas;
- Caracterizar quimicamente as amostras fazendo uso de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massas (UPLC-MS);
- Comparar o efeito dos extratos nas formas verdes e tostados como inibidor de lipases pancreáticas; e sua relação com os principais compostos presentes nos extratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Para o preparo do meio *in vitro* foram utilizados os seguintes reagentes: Azeite de Oliva (Costa d'Oro S.A.-Loc Madona di Lugo Spoleto, Itália), tampão Tris/HCL, CaCl_2 (Merck), Albumina Bovina (Sigma), NaCl (Merck), L- α -fosfatidilcolina (PC; from egg yolk, Sigma), Colesterol (Sigma), sal hidratado de taurocolato ácido de sódio (Sigma). Para o preparo do titulante foi utilizado KOH (Hidróxido de Potássio) P.A. (Merck) e indicador Fenolftaleína (Synth). As curvas padrões foram realizadas utilizando Ácido Oléico (Synth), ácido gálico e quercetina (Sigma).

4.1.2 Enzimas

Lipase Pancreática Humana - LPH (de suco pancreático, BCR-693) e Lipase Pancreática Porcina - PPP (tipo II, 100-400 U/mg utilizando azeite de oliva) da marca Sigma Chemical (St Louis, MO).

4.1.3 Extratos inibidores

Chá Mate Erva, Chá Mate Tostado e Chá Verde fabricados pela empresa Leão Júnior S.A (Curitiba, Brasil) foram obtidas no comércio local, na cidade de Bragança Paulista, São Paulo.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da curva padrão de ácido graxo livre

A curva padrão de ácido graxo livre foi determinada utilizando Ácido Oléico padrão, em diferentes concentrações, diluído em 1 mL de Tampão Tris-HCl, pH 7,0. A faixa utilizada para determinação da curva padrão de ácido graxo livre foi feita nas concentrações 2.5; 5.0; 7.5; 10; 12.5; 15; 17.5; 25; 50; 75; 100; 175 mg/mL. Foi preparado também um branco somente com tampão e fenolftaleína para eliminação de possíveis interferentes. As soluções padrões foram tituladas com KOH 0,1M ($F_c=1.0042$) e 3 gotas de fenolftaleína como indicador ácido-base. Os resultados foram expressos em μmol de ácido oleico/mL (Anexo 1).

4.2.2 Extratos e formas de preparo

Os extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* (mate erva e mate tostado) e *Camellia sinensis* (chá verde) foram preparados utilizando a mistura de três lotes diferentes de cada erva. Os extratos aquosos foram preparados em água destilada, através de infusão por 10 minutos a temperatura de 80 °C. A liofilização dos extratos foi realizada com os extratos aquosos congelados por dois dias em placas de Petri e posteriormente liofilizados por mais dois dias. A partir deste extrato liofilizado concentrado foram realizadas subseqüentes diluições nas concentrações 5, 10, 30, 50, 70, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ que foram utilizadas no estudo como inibidores da atividade de lipase.

4.2.3 Reação enzimática

A emulsão do substrato foi preparada pela ultrassonificação do azeite de oliva (100mM) em solução contendo 9 mM de taurocolato, 1 mM de fosfatidilcolina, 0,1 mM de colesterol, 15 mg de albumina/ml, 100 mM de NaCl, tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,0) e 1 mM CaCl_2 e posteriormente pré-incubada por 3 minutos à 37 °C.

A reação enzimática iniciou-se pela adição de 50 μL de lipase pancreática humana (LPH) ou lipase pancreática porcina (LPP) (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão Tris-HCL pH 7). Os tubos foram incubados à 37° C por 30 minutos em agitador rotativo. Após incubação os tubos foram retirados e a reação enzimática foi paralisada por imersão dos tubos em banho-maria com água fervente a 100°C por 3 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo.

Os experimentos foram realizados em sistema de reação com diferentes concentrações dos extratos. Ensaios sem a enzima (branco) e sem o inibidor (controle) foram realizados para verificação de possíveis interferências no método. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.4 Determinação do efeito inibitório dos extratos

Após resfriamento dos tubos (branco, controle e amostras), o conteúdo foi quantitativamente transferido para erlenmeyers e adicionado três gotas de fenolftaleína. Foi utilizado como titulante KOH 0,1 M ($F_c=1.0042$) e o volume final determinado por diferença de volume do branco e volume da amostra (ou controle). Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de ácido oléico liberado por minuto de reação utilizando a curva padrão de ácido oleico. O efeito inibitório dos extratos foi expresso como % relativa de AGL considerando como 100% o controle da reação.

4.2.5 Determinação das constantes cinéticas

A fim de determinar a constante de Michaelis-Menten (K_m), a constante de inibição, (K_i) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) uma série de concentrações de substrato (10-100 mmol/L) foram testadas no sistema de ensaio. Cada análise foi realizada com e sem o extrato inibidor (concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$). Gráficos de Lineweaver-Burk foram utilizados para determinar o mecanismo cinético dos extratos sobre a atividade da lipase pancreática usando o programa GraphPad Prism cinética enzimática (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

A constante de inibição, K_i foi calculada a partir da equação seguinte:

$$K_{m\text{ ap}} = K_m (1 + [I] / K_i)$$

Onde K_m , e $K_{m\text{ ap}}$ representa o k_m sem e com os extratos e $[I]$ representa a concentração dos extratos testados.

4.3 Caracterização química dos extratos

4.3.1 Método Folin-Ciocalteu: determinação de polifenóis totais

O conteúdo polifenólico dos extratos foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, como descrito por Tsai *et al.* (2007). O reativo de Folin-Ciocalteu[®] (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) na presença de compostos fenólicos, modifica sua coloração de amarelo para azul, sendo que a intensidade da cor se correlaciona com a quantidade de fenóis na sua constituição (Singleton *et al.*, 1999). A reação ocorre visto que os fenóis contidos nas amostras são oxidados em meio básico, resultando na formação do O_2^- , que reage com os ácidos originando a coloração azul. Inicialmente foi preparado um extrato aquoso a 0,01% (m/v) à partir do extrato liofilizado de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis*. Transferiu-se uma alíquota de 1 mL para um tubo de ensaio e adicionou-se 0,25 mL de solução tampão carbonato-tartarato (750 mL de água quente, 200g de Na_2CO_3 e 12 g de tartarato de sódio), em seguida transferiu-se

0,025mL de reagente Folin-Ciocalteu (Merck) deixando-se agir por 30 minutos em repouso a temperatura de 20°C. A absorbância foi medida num comprimento de onda de 700 nm em espectrofotômetro UV/VIS. O conteúdo de polifenóis totais foi calculado através da curva padrão de ácido gálico (Anexo 2).

4.3.2 Método para determinação de flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais dos extratos foi determinado através de um ensaio colorimétrico simples (Tsai *et al.*, 2008): 0,25 ml de cada extrato foi adicionado a um tubo contendo 1 ml de água destilada e 0,75 ml de 5% NaNO₂, 0,075 ml de 10% AlCl₃ e 0,5 ml de 1 M NaOH adicionado seqüencialmente. O volume da solução de reação foi então ajustado para 2,5 ml com água destilada e lida a absorbância a 510 nm. O teor de flavonóides de cada extrato foi calculado usando uma curva padrão preparada com quercetina (Anexo 3).

4.3.3 Análise quali e quantitativa dos extratos

A caracterização química dos extratos foi realizada por análise qualitativa pelo método ESI-MS (ionização eletrospray) em espectrômetro de massa. Foi também utilizada a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massa (UPLC-MS) para a análise quantitativa dos compostos presentes nos extratos.

4.3.3.1 Caracterização por ESI-MS

Os extratos foram diretamente infundidos na fonte por meio de uma de seringa automática (Harvard Apparatus) a uma vazão de 10 μ L /min. Os espectros ESI-MS dos extratos foram adquiridos no modo de íons negativos utilizando um híbrido de alta resolução e alta precisão (5 ppm) em espectrômetro de massa Micromass Waters-Q-TOF (Manchester, UK). As tensões capilares e cone foram fixados em -3000 V e -40 V,

respectivamente, com uma temperatura dessolvatação de 100 ° C. Os extratos foram diluídos em uma solução contendo 70% (v / v) de metanol (grau cromatográfico), 30% (v / v) água purificada e 0,5% de hidróxido de amônio.

A limpeza do equipamento foi realizada utilizando uma solução de metanol/água adicionada de hidróxido de amônio a 0,1%, a fim de retirar os possíveis interferentes. Posteriormente, o equipamento foi calibrado com solução de ácido fórmico a 0,1%.

4.3.3.2 Quantificação dos compostos da *Ilex paraguariensis* por UPLC-MS

A separação cromatográfica dos compostos da *Ilex paraguariensis* foi obtida usando um sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com coluna Waters BEH UPLC (2,1 x 50 mm, tamanho de partícula 1.7µm) a temperatura de 25 ° C, injetando 5 µL de cada extrato. Um gradiente foi aplicado utilizando duas fases móveis - (A) água purificada com 1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 1% de ácido fórmico - começando com B 2%, aumentando para 35% em B 6 min, e depois para 100% B 6,10-6,50 min, e, finalmente, retornar às condições iniciais. A detecção foi feita em ambos os modos de íons positivos e negativos usando um espectrômetro de massa Acquity TQD com uma fonte de ESI (Waters Micromass, Milford, MA, EUA) Os compostos foram quantificados através de um método de padrão externo com base em curvas de calibração preparadas com ácidos clorogênicos e quínico.

4.3.3.3 Quantificação dos compostos da *Camellia sinensis* por UPLC-MS

A separação cromatográfica dos compostos da *Camellia sinensis* foi obtida usando um sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com coluna C18, (partículas 1.7 µm, diâmetro interno 2mm, comprimento 50 mm) Waters a temperatura de 25 ° C, injetando 5 µL de cada amostra. A detecção foi realizada por ionização eletrospray em modo negativo usando um espectrômetro de massa Acquity TQD com uma fonte de ESI (Waters Micromass, Milford, MA, EUA) nas condições:

capilar ± 3000 V, cone ± 30 V, temperatura de nebulização 150°C e de secagem 350°C, varrendo em modo positivo e negativo entre m/z 100 e 1000. Um gradiente foi aplicado utilizando duas fases móveis - (A) água purificada com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol. Os compostos foram quantificados através de um método de padrão externo com base em curvas de calibração preparadas com padrões de Galocatequina galato, Epigalocatequina, Epicatequina galato e Epigalocatequina galato.

4.3.4 Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. As médias entre o controle e as amostras foram comparadas pelo método estatístico t-student. Para a comparação entre as amostras foi realizado teste F seguido do teste T não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito das diferentes concentrações de extrato de mate tostado na inibição da atividade da lipase pancreática porcina e humana

O experimento foi realizado conforme itens 4.2.3. e 4.2.4., visando definir a concentração ótima do extrato de mate tostado para ação inibitória das lipases, utilizando concentração fixa das enzimas LPH e LPP (50 μ L na concentração de 250 μ g/mL em tampão Tris-HCL, pH 7). Os resultados obtidos estão representados na Figura 12.

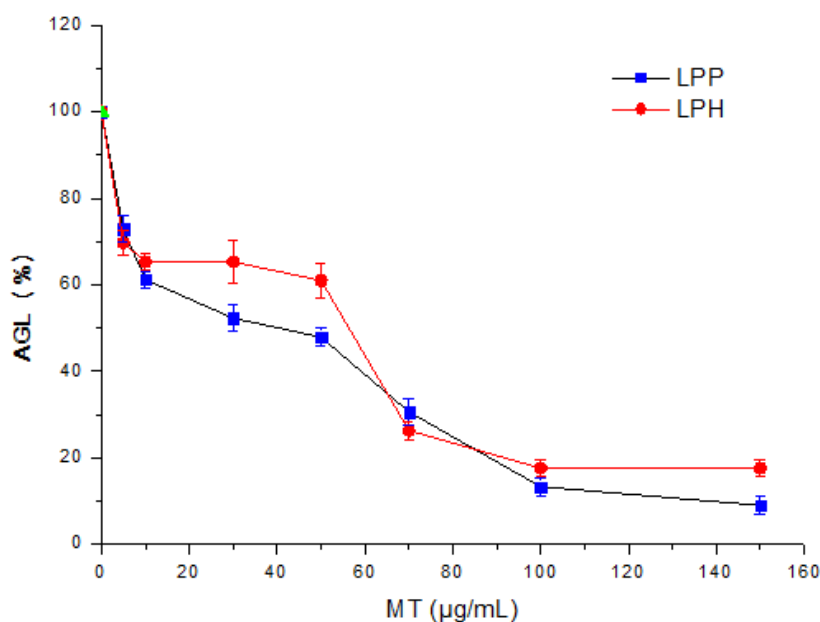


Figura 12 - % relativa de ácidos graxos liberados (% AGL) na reação enzimática em presença do extrato de mate tostado (MT).

O efeito do extrato de mate tostado na inibição da atividade da LPH e LPP foi calculado considerando o controle como 100% de AGL no sistema de reação.

Os resultados obtidos mostram que o extrato de mate tostado possui ação inibitória, com característica dose-dependente, tanto na atividade da LPH quanto na

LPP, observando significativa inibição na atividade das enzimas a partir da concentração 50 µg/mL de mate tostado (~ 50% de inibição). Na faixa de concentração 70 a 150 µg/mL deste inibidor, a porcentagem de AGL no sistema diminui significativamente. Estes resultados confirmam que este extrato é capaz de inibir a ação da lipase pancreática confirmando os dados relatados por Martins *et al.* (2009) e por Arcari *et al.* (2009).

5.2 Efeito das diferentes concentrações de extrato de mate erva na inibição da atividade da lipase pancreática porcina e humana

O experimento foi realizado conforme itens 4.2.3. e 4.2.4, visando definir a concentração ótima do extrato de mate erva para ação inibitória das lipases pancreáticas porcina e humana. O efeito do extrato de mate erva na inibição da atividade da LPH e LPP foi expresso como % relativa de AGL considerando o controle como 100% de AGL.

Conforme demonstrado na Figura 13, o extrato de mate erva também apresentou ação inibitória, dose-dependente tanto na atividade da LPH quanto na LPP quando comparado ao controle. O melhor efeito inibitório do extrato de mate erva na atividade da LPH foi observado a partir da concentração 50 µg/mL. Nas concentrações 70, 100 e 150 µg/mL do extrato os valores de ácidos graxos liberados se mantiveram em 4% sugerindo que 70 µg/mL é a concentração ótima para seu efeito inibitório.

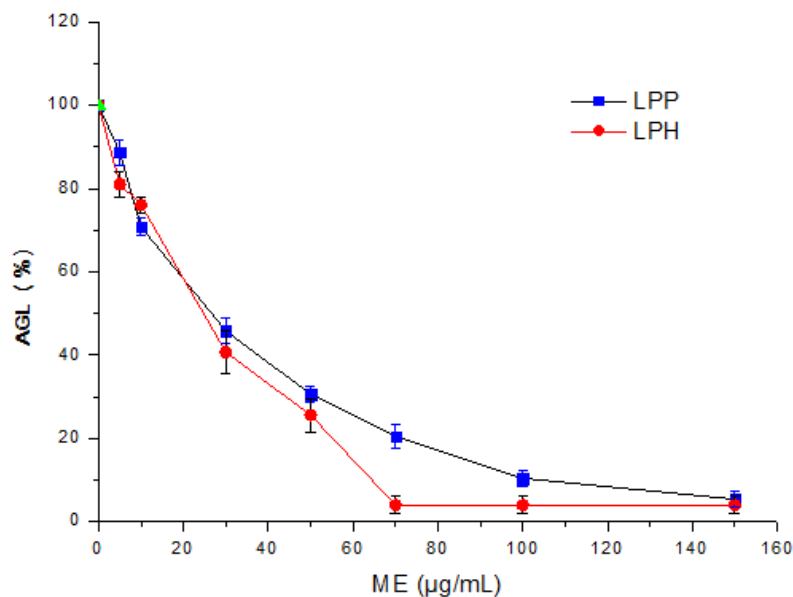


Figura 13 – % relativa de ácidos graxos liberados (% AGL) na reação enzimática em presença do extrato de mate erva (ME).

5.3 Efeito das diferentes concentrações de extrato de chá verde na inibição da atividade da lipase pancreática porcina e humana

O experimento foi realizado conforme itens 4.2.3 e 4.2.4 e o efeito do extrato de chá verde na inibição da atividade da LPH e LPP expresso como % relativa de AGL considerando o controle como 100% de AGL.

Conforme demonstrado na Figura 14, a ação inibitória do extrato de chá verde, na faixa de concentração de 5-50 µg/mL, foi maior sobre a atividade da LPP (reduzindo o conteúdo de AGL de 50 para 10% de AGL em relação ao controle) do que na LPH. Pode ser observado 100% de efeito inibitório na atividade da LPH e LPP a partir da concentração 70 µg/mL deste extrato, uma vez que não há AGL no sistema de reação. Podemos sugerir que nesta faixa de concentração tem-se o estacionário ou pseudo-equilíbrio da reação enzimática.

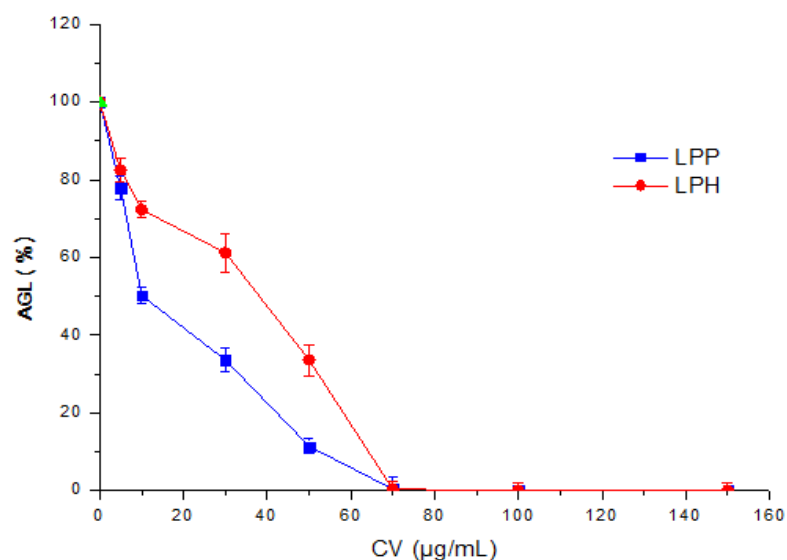


Figura 14 - % relativa de ácidos graxos liberados (% AGL) na reação enzimática em presença do extrato de chá verde (CV).

O extrato de chá verde apresentou maior ação inibitória na atividade da LPH e LPP em relação aos extratos de mate tostado e mate erva partir da concentração 70 µg/mL, conforme demonstrado nas Figura 14.

Os resultados confirmam a ação inibitória do extrato de chá verde na atividade de lipases pancreáticas como sugerido em estudo realizado por Juhel *et al.*(2000).

O efeito inibitório dos extratos de mate tostado, mate erva e chá verde na atividade da LPP e LPH pode ser caracterizado como dose-dependente, visto que os resultados mostraram que quanto maior a concentração do inibidor menor a porcentagem de ácido graxo liberados na reação.

5.4 Efeito comparativo dos extratos na atividade inibitória das lipases

Comparando a ação dos extratos na atividade das enzimas estudadas, observou-se que o extrato de chá verde apresentou maior efeito inibitório tanto na atividade da LPH quanto na LPP quando comparado aos outros extratos, conforme Figura 15.

O extrato de mate erva apresentou efeito inibitório intermediário tanto na LPH quanto na LPP. Por outro lado, quando utilizado o extrato de mate tostado, quantidades maiores de ácidos graxos foram liberados no sistema de reação, mostrando, portanto a baixa atividade inibitória na reação de hidrólise do azeite de oliva. Possivelmente, esta baixa atividade observada para o extrato de mate tostado comparada ao extrato de mate erva esteja relacionada com a diminuição da quantidade de polifenóis presentes na planta devido ao processo de torrefação para a obtenção do mate tostado.

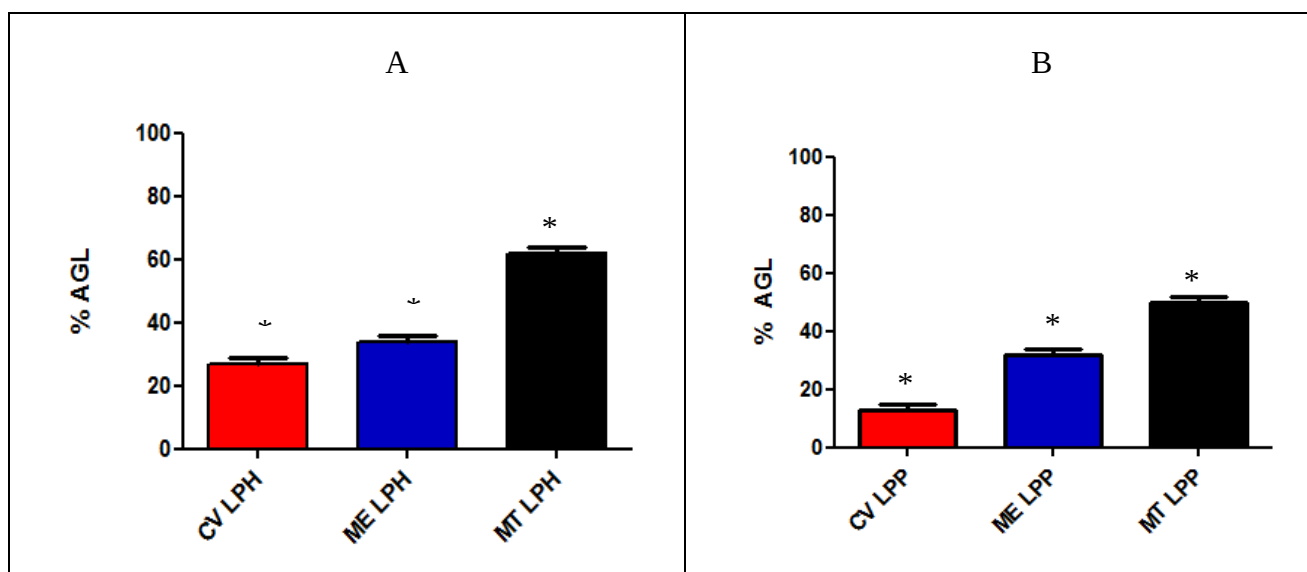


Figura 15 – Inibição da atividade da LPH (A) e LPP (B) pelos extratos de *Ilex paraguariensis* (ME e MT) e *Camellia sinensis* (CV), na concentração de 50 µg/mL.

*Inibição expressa como % de AGL no sistema de reação (*p < 0,05).

5.5 Análises químicas

As análises químicas dos extratos foram realizadas conforme descrito no item 4.3.

5.5.1 Conteúdo de fenólicos e flavonóides nos extratos inibidores

A Tabela 6 mostra que tanto a quantidade de polifenóis totais quanto a quantidade de flavonóides totais são significativamente maiores no extrato chá verde em relação à quantidade presente nos outros tipos de extratos e que o extrato mate tostado possui menor quantidade de polifenóis e flavonóides em comparação aos extratos mate erva e chá verde.

Tabela 6 - Fenólicos Totais e Conteúdo de Flavonóides nos extratos inibidores.

Extrato Aquoso	Polifenóis Totais (mg ácido gálico / g extrato)	Flavonóides Totais (mg quercetina/ g extrato)
Mate Erva	154.0 ± 0.6	125.9 ± 0.9
Mate Tostado	98.7 ± 0.2	74.6 ± 0.2
Chá Verde	268.3 ± 0.7	152.2 ± 0.4

Os resultados são expressos como valor médio ± DP de determinações em triplicata e expressos como equivalentes de ácido gálico (mg/g extrato) e equivalente de quercetina (mg/g de extrato) .

5.5.2 Caracterização química da *Ilex paraguariensis*

Os compostos fenólicos dos extratos de mate erva e tostado foram caracterizados no ESI-MS, conforme Figura 16, onde o espectro **A** representa o mate erva e **B** o mate tostado e, quantificados por UPLC-MS conforme Tabela 7. O cromatograma pode ser observado na Figura 17.

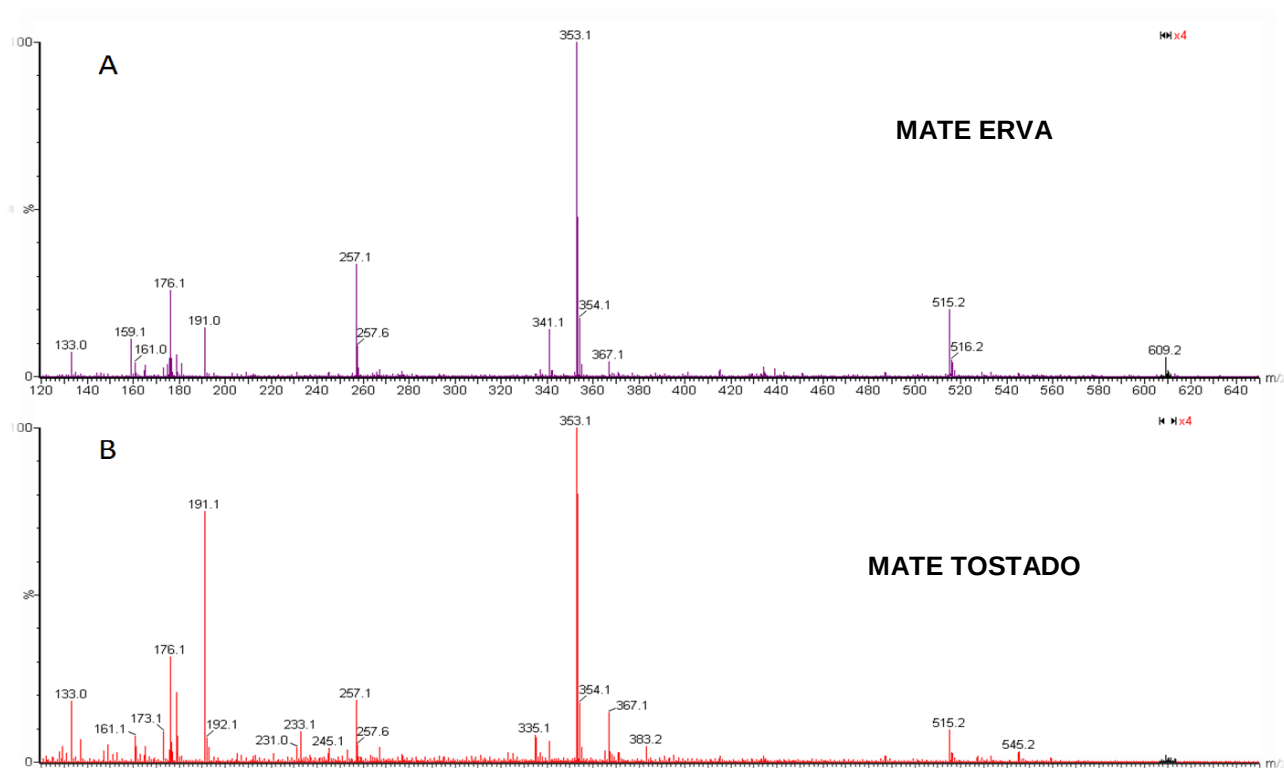


Figura 16 - Análise qualitativa dos compostos majoritários nos extratos de mate erva e mate tostado por ESI-MS.

Tabela 7 - Compostos Fenólicos dos extratos aquosos de mate erva e tostado quantificados por UPLC-MS.

Compostos	<i>m/z</i>	Extrato Mate Erva (µg/mL)	Extrato Mate Tostado (µg/mL)
Ácido cafeíco	179	3.9 ± 0.1	5.1 ± 0.3
Ácido quínico	191	2.8 ± 0.3	25.1 ± 0.1
Cafeína	194	113.6 ± 3.7	98.5 ± 1.3
Ácidos dicafeoilchiquímico*	335	5.5 ± 0.7	36.0 ± 0.5
Cafeoilglicose	341	180.0 ± 8.9	34.4 ± 2.5
Ácidos cafeoilquínicos*	353	335.4 ± 4.5	215.7 ± 3.5
Feruloilquínicos	367	33.1 ± 0.2	21.7 ± 0.2
Ácidos dicafeoilchiquímicos*	497	1.7 ± 0.1	4.6 ± 0.3
Ácidos dicafeoilquínicos*	515	1,414.9 ± 182.8	878.3 ± 96.7
Rutina	609	937.7 ± 80.6	145.1 ± 4.3

Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão (SD) de três determinações. * somatória dos isômeros

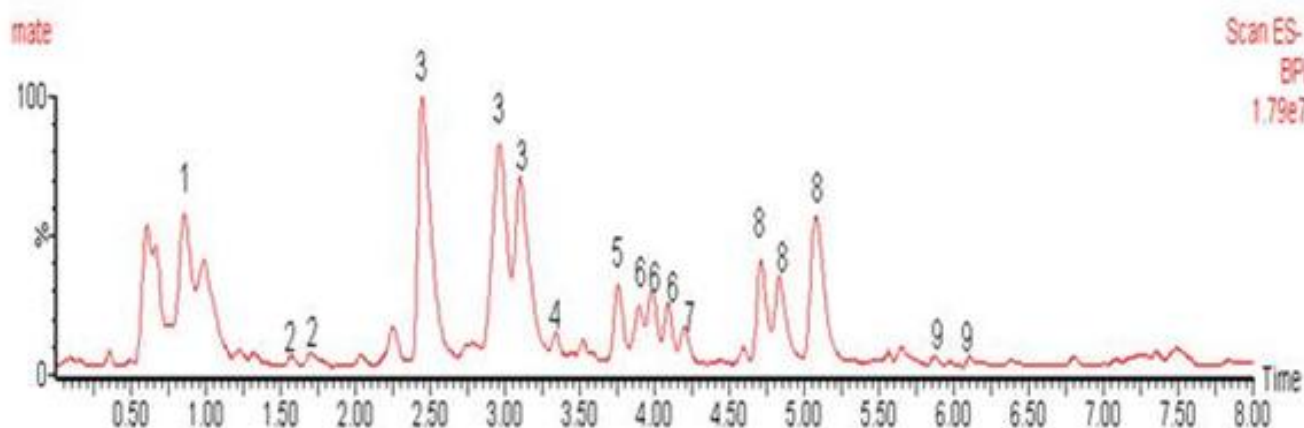


Figura 17 – Análise cromatográfica do extrato de *Ilex paraguariensis* por UPLC-MS.

Compostos identificados: (1) Ácido Quínico; (2) Cafeoilglicose ; (3) Ácidos cafeoilquínicos (4-O-ácido cafeoilquínico (cripto-ácido clorogênico) e 5-O-ácido cafeoilquínico (neo-ácido clorogênico)); (4) Ácido cafeico; (5) Ácido feruloilquínico; (6) Ácidos dicafeoilchiquímicos (ácido 3,4-dicafeoilquínico e ácido 3,5-dicafeoilquínico); (7) Rutina; (8) Ácidos dicafeoilquínicos; (9) Ácidos dicafeoilchiquímicos

Os seguintes compostos majoritários foram identificados nos extratos de mate erva e tostado: ácido caféico (m/z 179), ácido quínico (m/z 191), ácido cafeoilchiquímico (m/z 335), glicose cafeoil (m/z 341), ácido cafeoilquímico (m/z 353), ácido feruloilquínicos (m/z 367), ácido dicafeoilchiquímico (m/z 497), ácido dicafeoilquímico (m/z 515) e rutina (m/z 609). A semelhança entre os conjuntos de íons no espectro ESI-MS de mate erva e tostado indicou que ambos os extratos foram qualitativamente similares, entretanto conforme determinado por UPLC-MS e demonstrado na Tabela 7 há diferenças significativas em relação às quantidades dos compostos. Os compostos fenólicos cafeoilglicose, ácidos cafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos, dicafeoilquínicos e rutina apresentam diminuição na concentração durante o processo de torrefação, por outro lado, o ácido caféico, ácido quínico, ácido cafeoilchiquínico e ácido dicafeoilchiquímico apresentaram aumento na concentração. A presença de cafeína e

teobromina foram determinados por UPLC-MS no modo íon positivo, e as áreas de seus picos nos dois extratos foi ligeiramente diferente.

5.5.3 Caracterização química da *Camellia sinensis*

Os principais polifenóis do chá verde foram caracterizados no ESI-MS, conforme Figura 18 e as catequinas foram quantificadas por UPLC-MS conforme Figura 19. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 8.

Foram identificados no extrato de chá verde os seguintes compostos: m / z 191 - ácido quínico, m / z 305.5 – epigalocatequina, m / z 353 - ácido cafeoilquímico, m / z 441.5 – epicatequina galato, m / z 457.5 - galocatequina galato, m / z 457.5 – epigalocatequina galato e m / z 497 - ácido dicafeoilchiquímico.

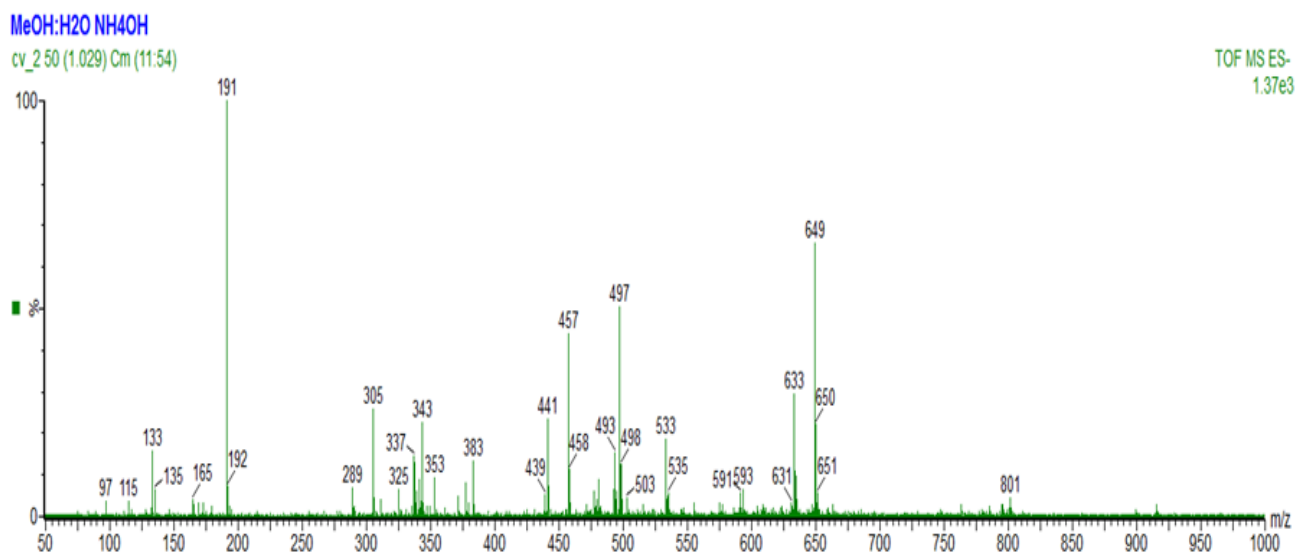


Figura 18 - Análise qualitativa da composição do extrato chá verde por ESI-MS.

Tabela 8 - Composição dos principais polifenóis presentes no chá verde.

Compostos	<i>m/z</i>	Extrato Chá Verde (µg/mg)
Ácido quínico	191	nq*
Epigallocatequina	305.5	14.8 ± 1.0
Isômeros ácidos cafeoilquínicos	353	nq*
Epicatequina galato	441.5	22.8 ± 1.7
Galocatequina galato	457.5	5.1 ± 0.4
Epigallocatequina galato	457.5	106.1 ± 11.7
Isômeros ácido dicafeoilchiquímico	497	nq*

Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão (SD) de três determinações. *não quantificado.

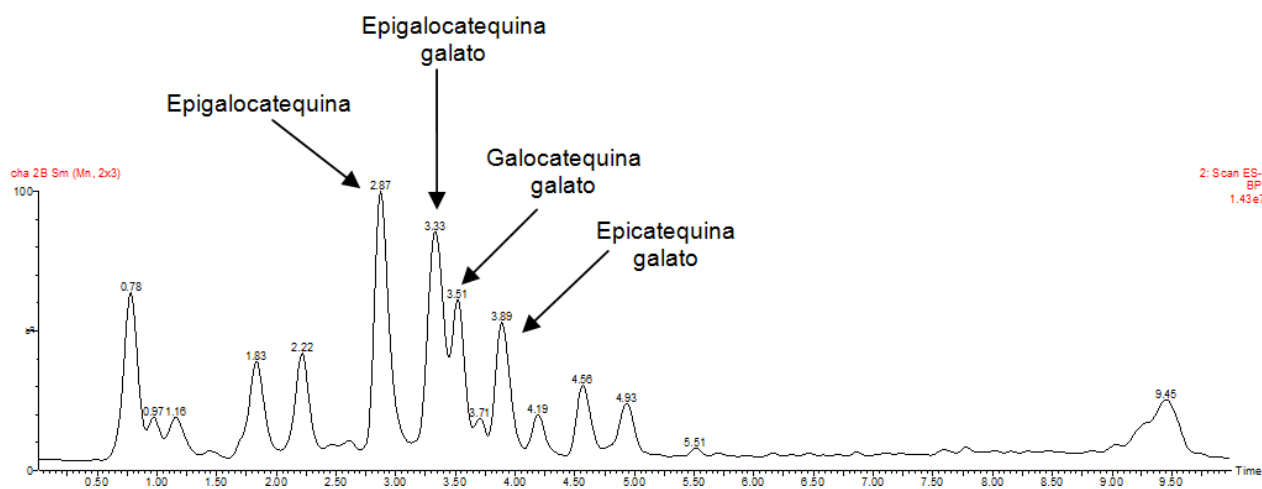


Figura 19 - Análise cromatográfica do extrato chá verde por UPLC-MS.

A Tabela 9 mostra uma comparação da composição dos polifenóis presentes no chá verde e no mate erva segundo dados obtidos no presente trabalho e em outros relatos da literatura.

Tabela 9 - Comparação dos polifenóis encontrados no chá verde e mate erva.

Composto	Chá verde	Mate Verde
Ácido cafeico	x	x
Cafeína	----	x
Derivados cafeoil	----	x
Ácido cafeoilchiquímico	----	x
Catequinas	x	----
Ácido clorogênico	----	x
Epicatequina galato	x	----
Epigallocatequina	x	----
Epigallocatequina galato	x	----
Ácido feruloilquínico	----	x
Galocatequina galato	x	----
Ácido quínico	x	x
Rutina	x	x

Fonte: Heck e Mejia, 2007, com modificações, onde (x) significa presença e (---) significa ausência de polifenóis.

5.6 Estudo dos Parâmetros Cinéticos

Para determinação da velocidade da reação (expressa em % AGL no sistema), catalisada pela lipase pancreática humana (LPH) e porcina (LPP), e o efeito inibitório dos extratos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis*, foram plotados gráficos recíprocos de Lineweaver-Burk e determinadas as constantes de Michaelis-Menten e velocidade máxima (K_m , $K_{m\ ap}$ e $V_{m\max}$) conforme item 4.2.5.

5.6.1 Parâmetros cinéticos segundo Lineweaver-Burke

Foi comparado o efeito inibitório do extrato de mate erva, mate tostado e chá verde na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ na atividade da LPP e LPH através dos gráficos de Lineweaver-Burk representados pelas Figuras 20, 21 e 22.

Todos os extratos mostraram efeito inibitório dose-dependente para os dois tipos de enzima, tendo em vista a linearidade obtida através das linhas de tendência dos gráficos. Pode ser observado nos gráficos que a ação inibitória dos três tipos de extratos, foi maior na LPP, fato que se explica pela baixa estabilidade da LPH no meio reacional *in vitro*.

Através da equação da reta obtida nos gráficos os valores K_m e $V_{m\max}$ foram determinados e estão demonstrados na Tabela 10.

Em relação a afinidade das enzimas LPP e LPH pelo substrato óleo de oliva, podemos verificar que as reações catalisadas pela LPH resultaram em valores menores de K_m , portanto, denota que esta enzima tem maior afinidade pelo substrato.

Quando se comparada o efeito dos diferentes inibidores podemos verificar que o extrato de chá verde (CV) é o mais efetivo, uma vez que resultou em maior aumento do valor de $K_{m\ ap}$ (de 36,19 mmol/L na ausência do inibidor para 50,69 e 91,24 mmol/L para a LPH e LPP respectivamente)

O extrato de mate erva (ME) também foi um inibidor efetivo levando ao aumento do $K_{m\ ap}$ (de 30,71 mmol/L na ausência do inibidor para 64,09 e 72,33 mmol/L para a

LPH e LPP respectivamente). Por outro lado o extrato de mate tostado não promoveu alteração significativa nos valores de K_m ap. Os resultados caracterizam os três inibidores como competitivos, uma vez que promoveram aumento dos valores de K_m sem alterar de forma significativa os valores de $V_{m\acute{a}x}$. Um inibidor competitivo age apenas para aumentar K_m aparente do substrato.

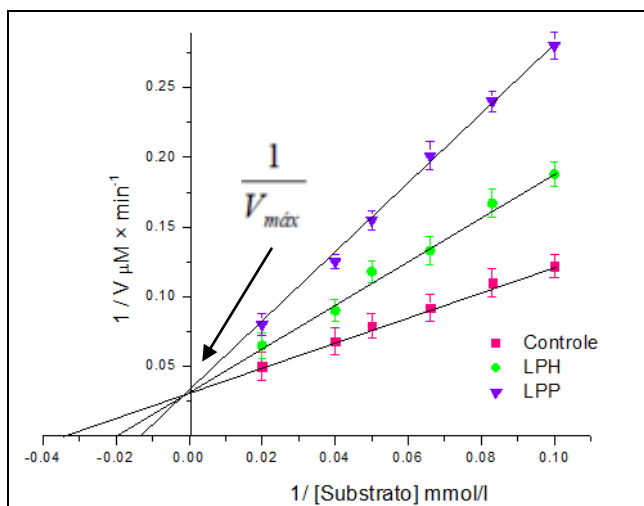


Figura 20 – Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk na presença de diferentes concentrações do substrato utilizando como inibidor extrato de mate erva.

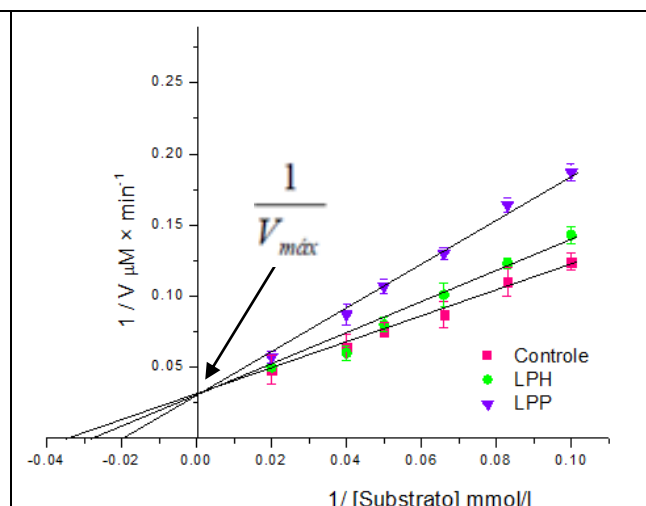


Figura 21 - Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk na presença de diferentes concentrações do substrato utilizando como inibidor extrato de mate tostado.

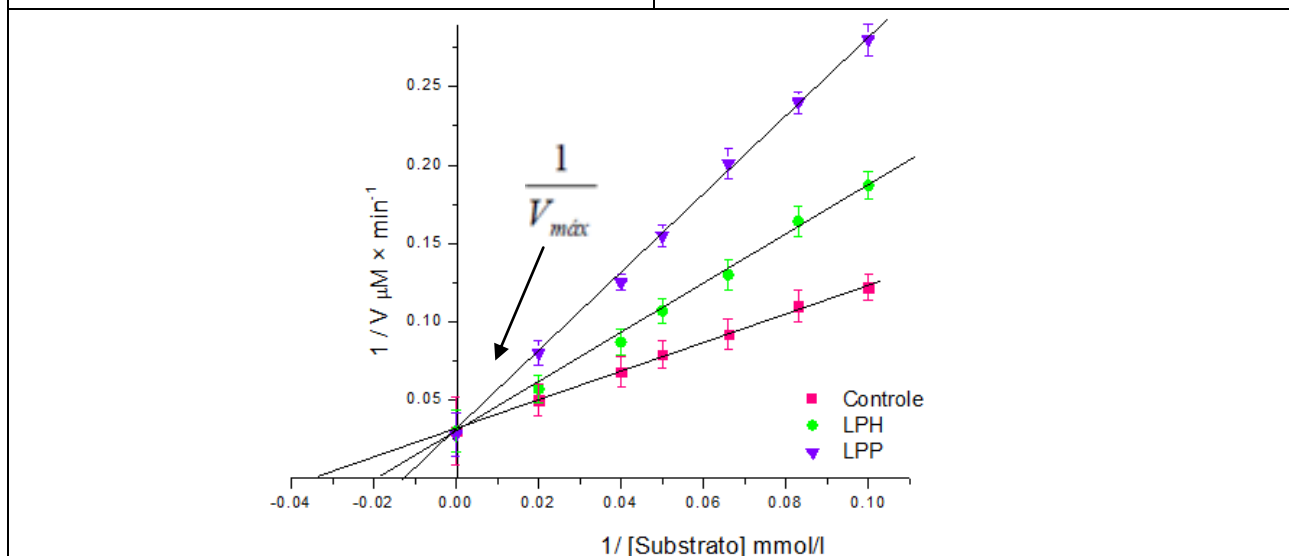


Figura 22 - Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk na presença de diferentes concentrações do substrato utilizando como inibidor extrato de chá verde.

Tabela 10 - Determinação de K_m , a_p e $V_{m\acute{a}x}$ pelo Gráfico de Lineweaver-Burk para os extratos de mate erva (ME), mate tostado (MT) e chá verde (CV).

Sistema de reação	Eq. da reta	Coordenadas X/Y	Valores obtidos X / Y	Parâmetros Cinéticos
Controle (sem inibidor)	$y = 0,97x + 0,0268$ $R^2 = 0,9977$	Para X=0	Y = 0,027	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 37,31
		Para Y=0	X = -0,028	K_m (mmol/L) 36,19
LPH ME	$y = 1,1591x + 0,0263$ $R^2 = 0,9917$	Para X=0	Y = 0,026	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 52,08
		Para Y=0	X = -0,016	$K_{m\ ap}$ (mmol/L) 64,09
LPP ME	$y = 1,6563x + 0,0229$ $R^2 = 0,9991$	Para X=0	Y = 0,023	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 43,67
		Para Y=0	X = -0,014	$K_{m\ ap}$ (mmol/L) 72,33
Controle (sem inibidor)	$y = 0,9256x + 0,0313$ $R^2 = 0,9984$	Para X=0	Y = 0,039	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 25,77
		Para Y=0	X = -0,032	K_m (mmol/L) 31,33
LPH MT	$y = 1,5451x + 0,0309$ $R^2 = 0,9913$	Para X=0	Y = 0,031	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 31,95
		Para Y=0	X = -0,034	$K_{m\ ap}$ (mmol/L) 29,58
LPP MT	$y = 1,2153x + 0,0388$ $R^2 = 0,9969$	Para X=0	Y = 0,031	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 32,36
		Para Y=0	X = -0,020	$K_{m\ ap}$ (mmol/L) 50,03
Controle (sem inibidor)	$y = 0,9368x + 0,0305$ $R^2 = 0,9979$	Para X=0	Y = 0,031	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 32,79
		Para Y=0	X = -0,028	K_m ($\mu\text{mol/L}$) 30,71
LPH CV	$y = 1,5916x + 0,0314$ $R^2 = 0,9941$	Para X=0	Y = 0,031	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 31,85
		Para Y=0	X = -0,021	$K_{m\ ap}$ (mmol/L) 50,69
LPP CV	$y = 2,5452x + 0,0279$ $R^2 = 0,9988$	Para X=0	Y = 0,028	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/L/min}$) 35,84
		Para Y=0	X = -0,011	$K_{m\ ap}$ (mmol/L) 91,24

O aumento de K_m ap observado nas reações em presença dos inibidores não significa que o complexo EI possua uma menor afinidade pelo substrato. O K_m , medido como $[S]$ para $\frac{1}{2} V_{m\acute{a}x}$, aumentará na presença de um inibidor competitivo porque qualquer que seja a concentração deste inibidor existirá uma fração de enzima sob a forma de EI, a qual não possui afinidade pelo substrato. O aumento de K_m resulta da distribuição da enzima disponível entre as formas de “afinidade total - E” e “nenhuma afinidade - EI” pelo substrato (Nelson & Cox, 2011).

A velocidade da reação na presença de um inibidor competitivo permanece a mesma, e uma concentração muito maior do substrato é necessária para atingir qualquer fração de $V_{m\acute{a}x}$. Para que a reação ocorra é necessário que o sistema chegue ao estado de transição que é um momento molecular transitório nos quais eventos como a quebra de ligação, a formação de ligação ou desenvolvimento de carga ocorre com a mesma probabilidade de seguirem tanto para formar novamente o substrato como para formar o produto. A função da enzima como catalisador é aumentar a velocidade da reação diminuindo a energia de ativação (ΔG) e o inibidor afeta a catálise apenas por diminuir a quantidade de enzima que se liga ao substrato. Sabe-se que $V_{m\acute{a}x}$ não varia devido à presença de um inibidor competitivo, isto é, o inibidor diminui apenas a ligação entre enzima/substrato se ligando a enzima de forma reversível, porém as ligações entre enzima e substrato no sistema reacional não são afetadas (Segel, 1979).

Pelos valores obtidos através do cálculo do grau de inibição (K_i), dispostos na Tabela 11, nota-se que os inibidores foram, significativamente, mais eficazes sobre a LPP visto que esta enzima apresentou menor valor de K_i e, portanto, maior grau de inibição neste sistema reacional.

Tabela 11 - Comparação dos parâmetros cinéticos da reação catalisada pela LPP e LPH na presença dos extratos mate erva, mate tostado, mate verde.

Sistema de reação	Inibidor	$K_{m\ ap}$ mmol/L	$V_{m\max}$ $\mu\text{mol/L/min}$	K_i^* mmol/L
Controle	sem inibidor	$K_m = 36,19$	37,31	
LPH	ME	64,09	52,08	0,57
LPP		72,33	43,67	0,51
Controle	sem inibidor	$K_m = 31,33$	25,77	
LPH	MT	29,58	31,95	1,06
LPP		50,03	32,36	0,63
Controle	sem inibidor	$K_m = 30,71$	32,79	
LPH	CV	50,69	31,85	0,61
LPP		91,24	35,84	0,34

* Onde $K_{m, ap} = K_m (1 + [I] / K_i)$; K_m , e $K_{m\ ap}$ representa o k_m sem e com os extratos e $[I]$ representa a concentração dos extratos testados.

Segundo a literatura, um aumento de $[S]$ a uma $[I]$ constante leva a diminuição do grau de inibição na reação. Os resultados mostram que houve inibição dos dois tipos de enzima, porém a enzima LPP apresentou menor K_i que a enzima LPH, o que demonstra que o inibidor foi mais efetivo para a enzima LPP nos três diferentes extratos.

O valor de K_i equivale à concentração de inibidor que duplicará a inclinação do gráfico de $1/v$ vs $1/[S]$, portanto quanto menor o valor de K_i maior o grau de inibição.

Em relação à inibição enzimática podemos notar, em ordem crescente, que o extrato de chá verde ($K_i = 0,34$ mmol/L) apresentou maior efeito inibitório na atividade da LPP que os demais, vindos em segundo lugar o mate erva ($K_i = 0,51$ mmol/L) e por último o mate tostado ($K_i = 0,63$ mmol/L). Por outro lado, a inibição da LPH foi maior para o extrato de mate erva ($K_i = 0,57$ mmol/L), em seguida para o chá verde ($K_i = 0,61$ mmol/L) e por último para o mate tostado ($K_i = 1,06$ mmol/L).

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos concluiu-se que:

Todos os extratos analisados, em especial os extratos de chá verde e mate erva foram capazes de inibir de forma competitiva e dose dependente a atividade das LPH e LPP, fato de grande interesse para o tratamento da obesidade;

O extrato que apresentou efeito inibitório mais significativo foi o chá verde, o qual possui altas concentrações de catequinas e seus derivados e, portanto, podem ser apontados como os principais compostos capazes de inibir a atividade das lipases;

A caracterização química dos extratos de *Ilex paraguariensis* (mate erva e tostado) mostrou que o processo de torrefação da erva leva a perda de importantes compostos polifenólicos, como rutina e isômeros do ácido cafeoilquínico e dicafeoilquínico possivelmente responsáveis pela atividade inibitória do extrato de mate erva;

A determinação dos parâmetros cinéticos das reações (K_m , K_i e $V_{m\acute{a}x}$) confirmou que embora os extratos de *Ilex paraguarensis* e *Camellia sinensis* apresentem composições diferentes, ambos apresentaram potencial inibitório na atividade das enzimas, em especial sobre a atividade da LPP.

Pode-se concluir que o extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) e de *Ilex paraguarensis* (erva verde) pode ser de interesse para o desenvolvimento de coadjuvantes no tratamento da obesidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arcari D.P.; , Bartchewsky, W.; dos Santos, T.W.; Oliveira, K.A., Funck; A., Pedrazzoli, J.; de Souza, M.F.; Saad, M.J.; Bastos, D.H.; Gambero, A.; Ribeiro, M.L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, 17: 2127 - 2133, 2009.

Ashida, H.; Furuyashiki, T.; Nagayasu, H.; Bessho, H.; Sakakibara, H.; Hashimoto, T.; Kanazawa, K. Anti-obesity actions of green tea: possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors. **Biofactors**, 22: 135-140, 2004.

Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais - ANFARMAG. **Estudo sobre o uso de Anorexígenos**, 7 – 18, 2011.

Bastos, D.H.M.; Oliveira, D.M.; Matsumoto, R.L.; Carvalho, P.O.; Ribeiro, M.L. Yerba maté: Pharmacological properties, Research and Biotechnology. **Medical and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, 1: 37- 46, 2007.

Battagim, J.; de Souza, V.T.; Sato, N.R.M. ; Cunha, I.B.S.; Sawaya, A.H.C.; Fernandes, A.M. A.P.; Eberlin, M.N.; Ribeiro, M.L.; Carvalho, P.O. Comparative study of the effect of green and roasted water extracts of mate (*Ilex paraguariensis*) on glucosyltransferase activity of. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 1-9, 2011.

Bays-Harold, E. Current and Investigational Antiobesity Agents and Obesity Therapeutic Targets. **Obesity**, 12: 1197-1211, 2004.

Bhutani, K.K. Birari, R.; Kapat, K. Potential antiobesity and lipid lowering natural products: a review. **Natural Product Communications**, 2: 331 – 348, 2007.

Birari, R.B.; Bhutani, K.K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, 20(12): 879 – 889, 2007.

Borgstrom, B. In Exocrine Pancreas Pathology and Diseases. **Raven Press, New York**, 361-401, 1981.

Borgstrom, B. Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. **Biochim Biophys Acta**, 962: 308 – 316, 1988.

Bracesco, N.; Sanchez, A.G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A. Recent Advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, 136(3): 378 - 384, 2010.

Brasil, Portaria n. 519, 26 de junho de 1998, Ministério da Saúde. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de "Chás" - Plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, 1998.

Brockman, H.L. **Lipases**. Bergstrom, B. e Bröckman, H.L., eds) Amsterdam: Elsevier Science Publishers, , 1 – 46, 1984.

Brockman, H. I; Momensen, W. E; Tsujita, T. The biology, biochemistry and technology of lipases. **Journal American Oil Chemistry Society**, 65: 891 – 896, 1988.

Cairns, E. Obesity: the fat lady sings? **Drug Discovery Today**, 10: 305 – 307, 2005.

Cardoso, L.O; Engstrom, E. M; Leite, I. C; Castro, I. R.R. Fatores socioeconômicos, demográficos, ambientais e comportamentais associados ao excesso de peso em adolescentes: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 12(3): 378 – 403, 2009.

Caro, A. Human pancreatic lipase: A glycoprotein. **Biochim Biophys Acta**, 22(2): 411-419, 1977.

Chanadiri, T.; Sanikidze, T.; Esaishvili, M.; Chkhikvishvili, I.; Datunashvili, I. Effectiveness of green tea catechines for correction of the alimentary obesity in the experiment. **Medical News**, 126: 61- 3, 2005.

Cheng, T.O. All teas are not created equal: the chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, 3 (108): 301-308, 2006.

De Moraes, E.C.; Stefanuto, A.; Klein, G.A.; Boaventura, B.C.; Andrade, F.; Wazlawik, E.; Di-Pietro, P.F.; Maraschin, M.; Silva, E.L. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(18): 8316-8324, 2009.

Duarte, M. R.; Menarim, D.O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 545 - 55, 2006.

Estell, D.A. Engineering enzymes for improved performance in industrial applications. **Journal Biotechnology**, 28: 25 – 30, 1993.

Foster-Schubertm, K.E.; Cummings, D.E. Emerging therapeutic strategies for obesity. **Endocrine Reviews**, 27: 779 – 793, 2006.

Fox, S.I. **Fisiologia Humana**. 7^a ed. Barueri: Manole, 2007. 686p.

Gandi, N.N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemistry**, 6(74): 621-634, 1997.

Han, L.K.; Kimura, Y.; Kawashima, M.; Takaku, T.; Taniyama, T.; Hayashi, T.; Zheng, Y.N., Okuda, H. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. **International Journal of Obesity and related metabolic disorders**, 25(10): 1459 – 64, 2001.

Hasler, C.M. Functional foods: benefits, concerns and challenges. **Journal of Nutrition**, 132(12): 3772 – 3781, 2002.

Hill, J.O. Orlistat, a lipase inhibition, for weight maintenance after conventional dieting: A 1-y study. **American Journal of Clinical Nutrition**, 69: 1108 – 1116, 1999.

Hofbauer, K.G. Molecular pathways to obesity. **International Journal of Obesity**, 26: S18 - S27, 2002.

Jaeger, K.E; Ransac, S; Dijkstra, B. W; Colson, C; Heuvel, M; Misset, O. Bacterial lipases. **Federation of European Microbiological Societies Reviews**, 15(1):29-63, 1994.

James, P.T.; Leach, R.; Kalamara, E.; Shayeghi, M. The worldwide obesity epidemic. **Obesity Research**, 9(4): S228 – S233, 2001.

Juhel, C., Armand, M.; Pafumi, Y. Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, 11(1): 45 - 51, 2000.

Kao, Y.H; Hiipakka, R.A; Liao, S. Modulation of obesity by a green tea catechin. **American Journal of Clinical Nutrition**, 72: 1232 – 1241, 2000.

Kimura, Y.; Okuda, H.; Mori, K.; Okuda, T.; Arichi, S. Effects of extracts of various kinds of tea on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. **Journal Japan Society Nutrition Food Science**, 37: 223 – 232, 1984.

Kumudavally, K.V. Green tea - a potential preservative for extending the shelf life of fresh mutton at ambient temperature. **Food Chemistry**, 1(107): 426 – 433, 2008.

Lamarão, R.C.; Fialho, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde. **Revista de Nutrição**, UNICAMP, 22(2): 257 – 269, 2009.

Loest, H.B.; Noh, S.K.; Koo, S.I. Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and alfa-tocopherol in rats ovariectomized. **Journal of Nutrition**, 132(6): 1282 – 8, 2002.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81(1): 230S - 242S, 2005.

Martins, F.; Noso, T.M.; Porto, V.B.; Curiel, A.A.; Gambero, A.; Bastos, D.H.; Ribeiro, M.L.; Carvalho, P.O. Maté Tea Inhibits In Vitro Pancreatic Lipase Activity and Has Hypolipidemic Effect on High-fat Diet-induced Obese Mice. **Obesity**, 18(1): 42 – 7, 2009.

Matsubara, S.; Rodrigues-Amaya, D.B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(2): 401 - 407, 2006.

Melo, E.P.; Gonçalves, A.P.; Sebastião, M.J.; Cunnah, P.J.; Carvalho, C.M.L.; Madeira-Lopes, J.M.; Lemos, F.; Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S. **In Engineering of/with Lipases**. (Malcata, F. X. ed.), Kluwer Academic Publishers, 297- 327, 1996.

Mukherjee, M. Human digestive and metabolic lipases - a brief review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 22: 369 – 376, 2003.

Mukhtar, H.; Ahmad, N. Tea polyphenols: prevention of cancer optimizing health. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71: 1698 - 1702, 2000.

Nagao, T.; Komine, Y.; Soga, S.; Meguro, S.; Hase, T.; Tanaka, Y.; Tokimitsu, I. Ingestion of tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81(1): 122 - 9, 2005.

Nakai, M.; Fukui, Y.; Asami, S.; Toyoda-Ono, Y.; Iwashita, T.; Shibata, H.; Mitsunaga, T.; Hashimoto, F.; Kiso, Y. Inhibitory Effects of Oolong Tea Polyphenols on Lipase in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(11): 4593 – 8, 2005.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5, ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2011. 1273p.

Schimid, R.D. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International**, 37(12): 1608 – 1633, 1988.

Segel, I.H. **Bioquímica. Teoria e problemas: Enzimas**. RJ: Ed. Livros Técnicos e científicos, 1979.

Sharma, R.; Chisty, Y.; Bonerjee, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19(8): 627 - 62, 2001.

Shi, Y.; Burn, P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. **Nature Reviews**, 3(8): 695 - 710, 2004.

Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152-178, 1999.

Souza, M.P. Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 515 - 26, 1991.

Srivastava, R.K.; Srivastava, N. Search for obesity drugs: Targeting central and peripheral pathways. **Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents**, 4: 75-90, 2004.

Stadler, A.; Kovac; Paltauf, F. Understanding lipase action and selectivity. **Croatica Chemica Acta**, 68(3): 649 - 674, 1995.

Strader, C.D; Hwa, J.J; Van Heek, M; Parker, E.M. Novel molecular targets for the treatment of obesity. **Drug Discovery Today**, 3: 250 – 256, 1998.

Thomson, A.B.R.; De Pover, A.; Keelan, M.; Jarocka-Cyrta, E.; Clandinin, M.T. Inhibition of lipid absorption as an approach to the treatment of obesity. In: Rubin B, Dennis EA (eds). **Methods in Enzymology**. Academic Press: San Diego, CA, 3 – 41, 1997.

Tilbeurgh, H.V. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. **Nature**, 359: 159 – 162, 1992.

Tsai, P.J.; Tsai, T.H.; Ho, S.C. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. **Food Chemistry**, 105(2): 311 - 316, 2007.

Tsai, T.H.; Tsai, T.H.; Chien, Y.C.; Lee, C.W.; Tsai, P.J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food Chemistry**, 110(4): 859 - 864, 2008.

Winge, H.; Ferreira, A.G.; Mariath, J.E., Tarasconi, L.C. **Erva Mate: Biologia e Cultura no Cone Sul**. Ed. UFRGS. Porto Alegre, 1995.

World Health Organization - WHO. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 8: 1 - 276, 1998.

World Health Organization - WHO. **Obesity. Preventing and managing the Global Epidemic**. Nutrition. Geneva, 894 - 897, 2000.

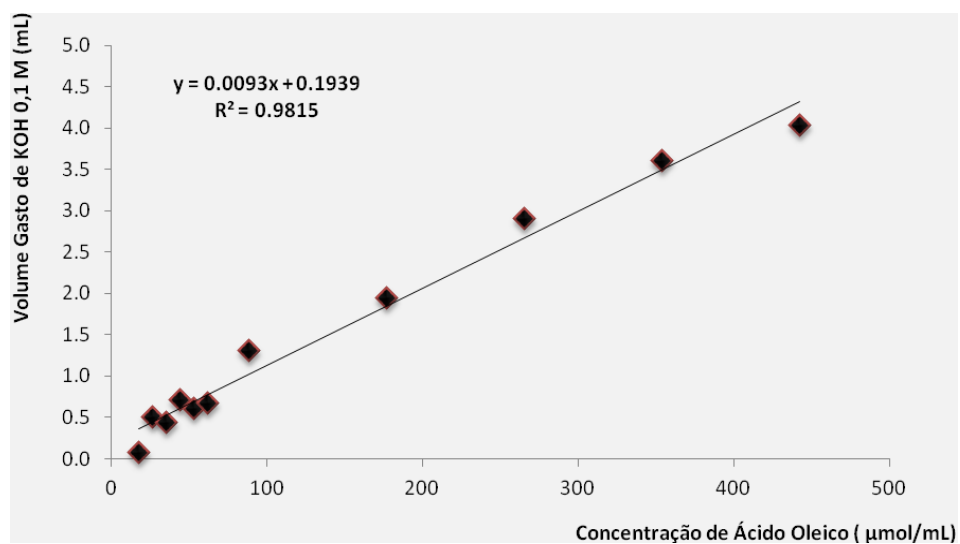
Xu, J.Z.; Yeung, S.Y.; Chang, Q.; Huang, Y.; Chen, Z.Y. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. **Journal of Nutrition**, 91: 873 – 881, 2004.

Yoshikawa, M.; Shimoda, H.; Nishida, N.; Takada, M.; Matsuda, H. Salacia reticulata and its polyphenolic constituents with Lipase Inhibitory and Lipolytic Activities Have Mild Antiobesity Effects in Rats. **The Journal of Nutrition**, 132 (7): 1819 - 1824, 2002.

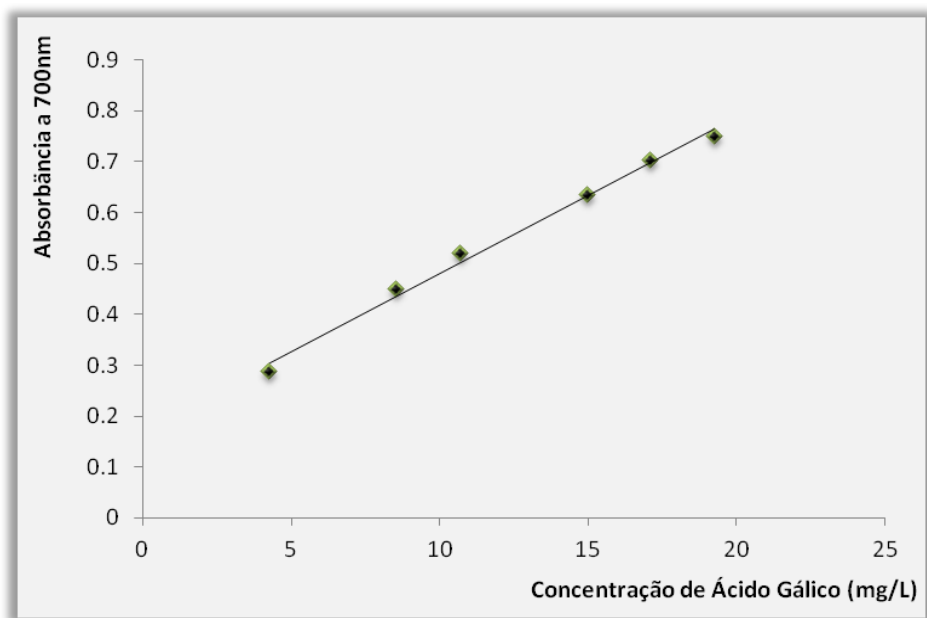
Zeng, Q.; Kolke, K. New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschilliensis*. **Journal of Natural Products**, 67: 604 – 613, 2004.

Zhao, H.L. ; Kim, Y.S. Determination of the kinetic Properties of Platycodin D for the inhibition of pancreatic lipase using a 1,2-diglyceride based colorimetric assay. **Natural Products Research Institute**, 27(9): 968 - 72, 2004.

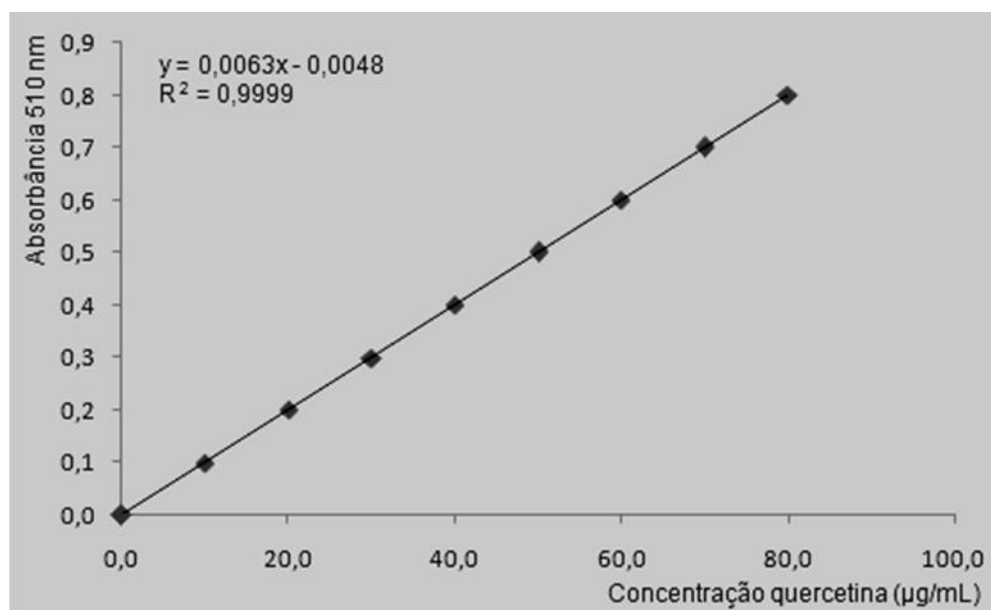
8. ANEXOS



Anexo 1 - Curva padrão de ácido oléico.



Anexo 2 - Curva padrão de ácido gálico para determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.



Anexo 3 - Curva padrão de quercetina utilizada no ensaio de quantificação dos flavonóides totais.