

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *Myrciaria jaboticaba* SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE PANCREÁTICA DE CAMUNDONGOS

Vitor Gomes Gonçalves (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Pamela Alves Castilho,
Anacharis Babeto de Sá- Nakanishi (Orientador), e-mail:
absnakanishi@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá,
PR.

Bioquímica - Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: Lipase pancreática, *Myrciaria jaboticaba*, obesidade.

Resumo:

Nos últimos anos a obesidade tem se tornado um problema de saúde pública a nível mundial. A proposta deste estudo foi investigar o potencial efeito inibitório do extrato da casca de *Myrciaria jaboticaba* sobre a absorção intestinal de triacilgliceróis. O extrato da casca da jaboticaba inibiu a lipase pancreática (IC₅₀= 143,9µg/mL) de forma mais potente do que a inibição pelo extrato do fruto da jaboticaba (IC₅₀= 1080µg/mL). O extrato da casca da jaboticaba também inibiu a absorção de triglicerídeos, mas as doses foram consideravelmente mais baixas do que a prevista pela inibição da lipase pancreática (IC=3,65mg/Kg). Desse modo, além da ação inibitória sobre a lipase o extrato pode apresentar no mínimo outro mecanismo de ação adicional. Em conclusão, devido as baixas doses, o extrato da casca da jaboticaba apresenta muitas perspectivas favoráveis como inibidor da absorção de gorduras.

Introdução

A obesidade é uma desordem metabólica com acúmulo excessivo de gordura corporal e relacionado a várias comorbidades, como por exemplo o diabetes tipo 2 (Gallagher & LeRoith, 2015). Compostos naturais têm sido explorados como potenciais ferramentas seguras no tratamento da obesidade, já que muitos deles apresentam capacidade inibitória de enzimas pancreáticas envolvidas com a hidrólise e absorção de carboidratos e lipídeos da dieta (De La Garza, Milagro, Boque, Campión, & Martínez, 2011; Gu, Hurst, Stuart, & Lambert, 2011;). Há relatos que a *Myrciaria jaboticaba*, planta frutífera nativa do Brasil, apresenta potencial ação inibitória sobre estas enzimas *in vitro*. Com intuito de aproveitar a casca da fruta, rica em moléculas bioativas, este trabalho teve por função avaliar o efeito do extrato hidroalcóolico da casca da jaboticaba sobre a atividade da lipase pancreática de camundongos. Para um estudo cinético minucioso da potencial inibição desta enzima, também foram realizados estudos *in vitro*.

Materiais e métodos

O extrato hidroalcolólico da casca de *Myrciaria jaboticaba* 10%, foi preparado em solução hidroetanólica 70%. Lipase pancreática suína foi comprada da Sigma-Aldrich e orlistat adquirido de uma farmácia de manipulação local.

Todos procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA - UEM (nº 9577260819). Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss. Estes foram separados em 6 grupos (aproximadamente 6 animais cada grupo). Grupo C: receberam água. Grupo CO: Controle positivo: receberam orlistat (50mg/Kg). Grupo E0,5: receberam extrato 50mg/Kg. Grupo E1: receberam extrato 100mg/Kg. Grupo E2,5: receberam extrato 250mg/Kg. Grupo E5: receberam extrato 500mg/Kg. No momento do experimento o extrato liofilizado foi pesado e dissolvido em água filtrada. As doses do extrato foram determinadas com base em dados da literatura (da Silva et al., 2014).

O teste de tolerância a triacilgliceróis, foi realizado após administração de azeite de oliva (5mL/Kg) utilizando o monitor de triglicerídeos, AccutrendPlus® Roche. Uma gota de sangue foi obtida pela cisão da extremidade da cauda dos camundongos. O azeite e o extrato foram administrados via gavagem. A determinação de triglicerídeos plasmáticos foi realizada no animal em jejum de 18h e até 6 horas após administração do óleo e extrato.

Ensaio *in vitro* do efeito do extrato da *M. jaboticaba* sobre a atividade da lipase pancreática foi determinada espectrofotometricamente (410nm), com p-nitrofenil-palmitato (0,5mg/mL) como substrato. O ensaio foi realizado com uma curva de concentração do extrato (25 a 400µg/mL) como também foi realizado variando a concentração do substrato na ausência e presença de 2 concentrações de extrato (50 e 300µg/mL).

Resultados e Discussão

Com intuito de avaliar o potencial inibitório do extrato da casca da jaboticaba sobre a lipase, como determinar a força desta inibição foram realizados experimentos *in vitro*. A figura 1A revela que o extrato claramente inibiu a enzima de forma dependente da concentração. A concentração do extrato responsável por 50% da inibição máxima (IC₅₀), calculada por interpolação numérica, é de 143,9 µg/mL. O extrato da casca é 7,5 vezes mais potente do que o extrato do fruto (IC₅₀=1080 µg/mL) (Alejandro et al., 2013). A figura 1A também apresenta um gráfico do inverso da velocidade de reação contra as diferentes concentrações do extrato, e este apresentou uma relação parabólica, o qual denota que múltiplas ligações do inibidor ou inibidores com a enzima.

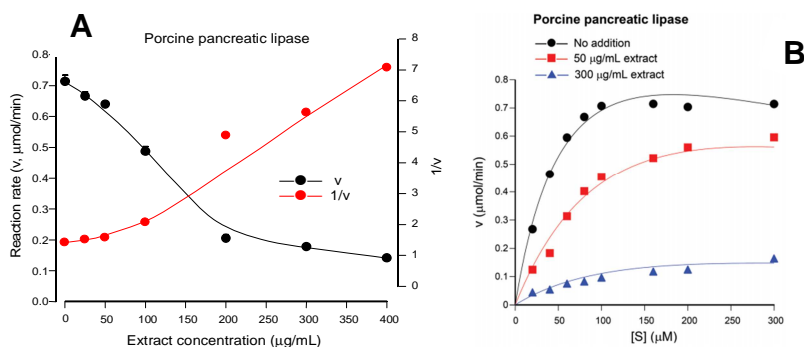


Figura 1- (A) Inibição dependente da concentração do extrato de *M. jaboricaba*. (B) Variação da velocidade da lipase pancreática obtidas por variações simultâneas entre as concentrações do substrato (p-nitro fenil palmitato) e do extrato da casca de *Myrciaria jaboricaba*.

O efeito do extrato da casca da jaboticaba sobre a curva de saturação do substrato da lipase pancreática está apresentado na figura 1B. Estes dados não apresentam qualquer tendência de convergência para a curva controle, sugerindo a priori que a inibição não é do tipo competitiva. Melhor equação que descreve todos esses dados é a seguinte:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left[1 + \frac{[I]}{K_{i1}} \right] + [S] \left[1 + \frac{[S]}{K_{is}} \right] \left[1 + \frac{[I]^2}{(K_{i2})^2} \right]}$$

Esta equação representa um mecanismo de inibição mista pelo extrato da jaboticaba com formação dos complexos enzimáticos. K_{is} é a constante de inibição pelo substrato, K_{i1} e K_{i2} são as constantes de inibição. As linhas contínuas percorrendo os pontos experimentais da figura 1B foram calculadas através da equação acima, com os parâmetros otimizados obtidos pelo procedimento de ajuste de mínimos quadrados, sendo K_{i1} de 33,3 μg/mL e K_{i2} de 171,3 μg/mL, o que significa que em baixas concentrações a inibição enzimática se dá principalmente pela ligação a enzima livre.

A figura 2, por sua vez, analisa a interferência de triglicerídeos (TG) através do extrato de jaboticaba por meio do teste de tolerância ao azeite de oliva, ilustrando o decurso temporal de variação de TG plasmático após administração do óleo e do extrato. O grupo controle apresentou um pico de concentração 3 horas após a administração do óleo. Após este pico a concentração de TG decaiu lentamente. O orlistat preveniu a elevação deste parâmetro, e as várias doses do extrato inibiram o mesmo de maneira dose dependente. Além disso, nos animais, o extrato inibiu a absorção de TG em doses muito mais baixas, do que ao esperado pelo resultado *in vitro*. A inibição iniciou-se com 1mg/Kg de extrato e atingiu 65% com a dose de 5mg/Kg. A IC_{50} foi de 3,65mg/Kg. Desse modo, além da inibição da lipase pancreática, estes resultados sugerem no mínimo um mecanismo adicional envolvido com a inibição da absorção de TG pelo extrato.

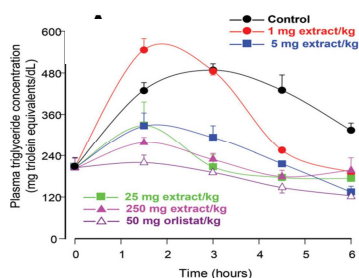


Figura 2 – Variação da concentração de triglicerídeos plasmático após ingestão de azeite em camundongos: efeito do extrato de jaboticaba. (média \pm erro padrão de 4 animais).

Conclusões

O extrato da casca da jaboticaba apresentou uma perspectiva favorável como um inibidor da absorção de gordura, até mesmo em baixas doses. Assim, este extrato pode ser considerado uma apresentação promissora para compor formulações farmacêuticas ou como aditivos alimentares no controle da obesidade.

Agradecimentos

Agradeço ao apoio e suporte fornecidos pelo programa PIBIC -UEM.

Referências:

Gallagher, E.J., LeRoith, D. **Obesity and diabetes: the increased risk of câncer and cancer-related mortality.** *Physiol.* v. 95, n. 3, p. 727-748, 2015.

de la Garza AL, Milagro FI, Boque N, Campion J, Martinez JA . **Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment.** *Planta Medica.* v. 77, n. 8, p. 773–785, 2011.

Gu, Y., Hurst, W.J., Stuart, D.A., Lambert, J.D. **Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts 1 and procyanidins.** *J. Agric. Food Chem.* v. 59, n. 10, p. 5305-5311, 2011.

S. M. da Silva, E. A. Koehnlein, A. Bracht, R. Castoldi, G. R. de Moraes, M. L. Baesso, R. A. Peralta, C. G. M. de Souza, A. B. de Sá-Nakanishi and R. M. Peralta, **Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin.** *Food Res. Int.* v. 56, p. 1-8, 2014.

M. R. Alezandro, P. Dubé, Y. Desjardins, F. M. Lajolo and M. I. Genovese, **Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg,** *Food Res. Int.* v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013.