

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

CAIO CESAR RUY

**“SCREENING *IN VITRO* DE INIBIDORES DE LIPASE E AMILASE EM
EXTRATOS PADRONIZADOS DE PLANTAS SELECIONADAS”**

Bragança Paulista
2020

CAIO CESAR RUY – R.A. 001201806610

**“SCREENING IN VITRO DE INIBIDORES DE LIPASE E AMILASE
EM EXTRATOS PADRONIZADOS DE PLANTAS SELECIONADAS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr^a Raquel de Cássia dos Santos

Bragança Paulista
2020

QU 136
R947s

Ruy, Caio César

Screening *in vitro* de inibidores de lipase e amilase em extratos padronizados de plantas selecionadas / Caio César Ruy. – Bragança Paulista, 2020. 43 p.

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

Orientação de: Raquel de Cássia dos Santos.

1. Extratos Vegetais. 2. Inibidores. 3. Amilases. 4. Lipase. I. Santos, Raquel de Cássia dos. II. Título.



RUY, Caio Cesar "Screening *In Vitro* de Inibidores de Lipase e Amilase em Extratos Padronizados de Plantas Selecionadas". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 28 de fevereiro de 2020 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Raquel de Cássia dos Santos (Orientadora)
Universidade São Francisco

Cintia Rabelo e Paiva Caria
Membro Externo

Daniela Soares Razolli
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos os amigos que contribuíram com a execução deste trabalho até aqui, me apoiando e acreditando em meus projetos.

De forma especial, agradeço a professora Alessandra, pela orientação desde minha iniciação científica. Essa oportunidade me abriu portas para realizações pessoais e por isso, serei sempre grato.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e funcionários da Universidade São Francisco, pelas contribuições e convívio.

À minha família e principalmente a minha avó dona Maria, que me ensinou que um sonho para quem possui fé nunca é apenas um sonho. Muito obrigado pela compreensão, paciência e amor.

À CAPES pelo apoio financeiro. E a Deus, meu ponto mais forte.

“As pessoas são solitárias porque constroem muros ao invés de pontes”

O pequeno príncipe.

RESUMO

Enzimas como a amilase são responsáveis pelo processamento de carboidratos originários da dieta, agindo na quebra do amido e na absorção de monossacarídeos pelos enterócitos. Dessa forma, inibidores dessas enzimas, presentes em plantas, oferecem uma estratégia promissora para o controle da hiperglicemia associada ao diabetes tipo 2, obesidade e hipertensão através da redução da quebra do amido e da absorção da glicose no intestino. Ainda, a lipase pancreática está envolvida no metabolismo de lipídios e apresenta-se também como interessante alvo de inibidores, uma vez que sua inibição promove redução na absorção de triglicérides da dieta, ocasionando diminuição do aproveitamento calórico e perda de peso e demais parâmetros metabólicos. Atualmente, nota-se uma preocupação mundial a respeito da alimentação na manutenção a saúde e a prevenção de comorbidades. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que 2/3 da população mundial está acima do peso ou já são consideradas obesas, sendo um grande desafio para os programas de saúde pública. Com isso, surge a necessidade de novas fontes de tratamentos alternativos, reduzindo os altos custos para os cofres públicos. Plantas com potencial medicinal são utilizadas por aproximadamente 80% da população e sua diversidade metabólica justifica a busca por novas terapias baseadas em compostos de origem natural. Deste modo, o uso de plantas está cada vez mais difundido na literatura como tratamento complementar de diabetes e obesidade por apresentar potente atividade inibidora de lipase e amilase. Assim, este projeto visou o rastreamento *in vitro* de inibidores de lipase e amilase em extratos padronizados de plantas selecionadas, *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) e *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), quanto ao seu potencial de alterar a absorção de nutrientes. A partir dos resultados, pode-se verificar, que mesmo de forma tênue quando comparado ao inibidor comercial, com concentração inibitória (IC50) de 742 ug/mL para o extrato de *Byrsonima intermedia*, 805 ug/mL para o extrato de *Serjania marginata*, 803 ug/mL para o extrato de *Rhizophora mangle* e apenas o extrato de *Terminalia catappa* neste ensaio não apresentou atividade inibitória. Ao verificar a curva de inibição de α -amilase, observou-se que os extratos apresentaram potente potencial inibidor com um IC50 de 24,5 ug/mL para o extrato de *Byrsonima intermedia*, 19 ug/mL para o extrato de *Rhizophora mangle*, 0,74 ug/mL para o extrato de *Terminalia catappa* e 0,13ug/mL para o extrato de *Serjania marginata*, esses dois últimos demonstrando maior potencial inibidor. Deste modo, é possível sugerir sobre o caráter antinutricional dos extratos.

Palavras-Chave: Extratos Padronizados. Inibidores. Amilase. Lipase.

ABSTRACT

Enzymes such as amylase are responsible for processing carbohydrates from the diet, acting on the breakdown of starch and the absorption of monosaccharides by enterocytes. Thus, inhibitors of these enzymes, present in plants, offer a promising strategy for the control of hyperglycemia associated with type 2 diabetes, obesity and hypertension by reducing the breakdown of starch and the absorption of glucose in the intestine. Furthermore, pancreatic lipase is involved in lipid metabolism and is also an interesting target for inhibitors, since its inhibition promotes a reduction in the absorption of triglycerides from the diet, causing a decrease in caloric utilization and weight loss. Currently, there is a worldwide concern regarding food in maintaining health and preventing comorbidities. Data from the World Health Organization show that 2/3 of the world population is overweight or already considered obese, being a major challenge for public health programs. As a result, there is a need for new sources of alternative treatments, reducing the high costs for public coffers. Plants with medicinal potential are used by approximately 80% of the population and their metabolic diversity justifies the search for new therapies based on compounds of natural origin. Thus, the use of plants is increasingly widespread in the literature as a complementary treatment for diabetes and obesity as it has a potent lipase and amylase inhibitory activity. Thus, this project aimed at the in vitro screening of lipase and amylase inhibitors in standardized extracts from selected plants, *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) and *Rhizophora mangle*, regarding their potential to alter the absorption of nutrients and their possible anti-obesogenic character. From the results, it can be seen that even in a tenuous way when compared to the commercial inhibitor, with an inhibitory concentration (IC₅₀) of 742 ug / mL for the extract of *Byrsonima intermedia*, 805 ug / mL for the extract of *Serjania marginata*, 803ug / mL for *Rhizophora mangle* extract and only *Terminalia catappa* extract in this assay did not show inhibitory activity. When verifying the α -amylase inhibition curve, it was observed that the extracts showed a potent inhibitory potential with an IC₅₀ of 24,5 μ g / mL for *Byrsonima intermedia* extract, 19 μ g / mL for *Rhizophora mangle* extract, 0,74 μ g / mL for *Terminalia catappa* extract and 0,13ug / mL for *Serjania marginata* extract, the latter two showing greater inhibitory potential. In this way, it is possible to infer about the antinutritional character of the extracts.

Key Words: Standardized Extracts. Inhibitors. Amylase. Lipase.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK: Activated Protein Kinase

CaCl: Cloreto de Cálcio

CD36: Cluster of Differentiation 36

DCNT: Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DM1: Diabetes mellitus do tipo 1

DM2: Diabetes mellitus do tipo 2

HFD: High Fat Diet

IC50: The half maximal inhibitory concentration

IMC: Índice de Massa Corporal

mRNA: Ribonucleic Acid Messenger

NaCl: Cloreto de Sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de Sódio

nm: Nanômetros

p-NP: Paranitrofenol

p-NPP: Palmitato de paranitrofenol

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

SREBP-1: Sterol regulatory element-binding protein 1

SUS: Sistema Único de Saúde

TG: Triglicerídeos

USA: United State of America

WHO: World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Digestão de carboidratos e ação enzimática α -amilase	11
Figura 2.	Digestão de lipídeos e ação enzimática lipase pancreática	12
Figura 3.	Número de mortes por fator de risco no Mundo em 2017	14
Figura 4.	Prevalência de obesidade no Brasil 2006-2018	14
Figura 5.	Plantas que foram utilizadas	17
Figura 6.	<i>Terminalia catappa</i> L. (Combretaceae)	19
Figura 7.	<i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss. (Malpighiaceae)	20
Figura 8.	<i>Serjania marginata</i> Casar. (Sapindaceae)	21
Figura 9.	<i>Rhizophora mangle</i> L. (Rhizophoraceae)	22
Figura 10.	Curva de p-NP e curva de inibidor padrão fármaco Orlistat	27
Figura 11.	Porcentagens de inibição de extratos em ensaio de lipase pancreática.....	28
Figura 12.	Curva padrão de Acarbose e curva de glicose	29
Figura 13.	Porcentagens de inibição para os extratos utilizados em ensaio de α -amilase	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Metabolismo de carboidratos.....	12
1.1.1 α -amilase.....	12
1.2 Metabolismo de lipídeos.....	13
1.2.1 Lipase pancreática.....	14
1.3 Balanço energético.....	14
1.4 Número de mortes por fator de risco no Mundo em 2017.....	15
1.5 Tratamento para hiperglicemia e dislipidemias.....	17
1.6 Uso de plantas para fins terapêuticos.....	18
1.6.1 <i>Terminalia catappa</i> L. (Combretaceae).....	20
1.6.2 <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss. (Malpighiaceae).....	21
1.6.3 <i>Serjania marginata</i> Casar. (Sapindaceae).....	22
1.6.4 <i>Rhizophora mangle</i> L. (Rhizophoraceae).....	23
1.7 Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Extratos padronizados das plantas.....	27
3.2 Ensaio de atividade da lipase pancreática <i>in vitro</i>	27
3.3 Ensaio de atividade de α -amilase <i>in vitro</i>	27
3.4 Análise dos dados.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 Ensaio inibição de lipase pancreática.....	29
4.1.1 Curva de p-Np e inibidor padrão conhecido (Orlistat).....	29
4.1.2 Curvas de inibição de lipase pancreática com os extratos de plantas.....	29
4.2 Ensaio inibição de α -amilase.....	30
4.2.1 Curva padrão de glicose e inibidor Acarbose.....	30
4.2.2 Curvas de inibição de α -amilase com os extratos de plantas.....	31
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	36
ANEXO 1.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo de carboidratos

O metabolismo de carboidratos representa o centro de metabolismo energético e é a fonte primária de energia do corpo humano, seu processo digestivo tem origem na boca após a ingestão do alimento, que através da ação mecânica da mastigação e a liberação da enzima α amilase salivar se inicia o processo de degeneração dos carboidratos a partir do rompimento das ligações glicosídicas α 1-4. No estômago não há a ação da α -amilase salivar, que por sua vez se desnatura com a alteração de pH devido à liberação de suco gástrico. Ao chegar no pâncreas, a enzima α -amilase pancreática dará continuidade à digestão. A mucosa gástrica irá produzir enzimas específicas que irão digerir os trissacarídeos e dissacarídeos. Assim, o processo digestivo irá gerar os monossacarídeos, principalmente a glicose, frutose e galactose, que são absorvidos pelas células intestinais por meio de transporte ativo ou difusão simples (MOTTA, 2009).

1.1.1 α -amilase

Amilases são enzimas importantes que catalisam a hidrólise da amilopectina, amilose e do glicogênio em maltose e dextrinas, ou seja, são fundamentais no processo de digestão, cuja função consiste na quebra de açúcares. A ingestão de carboidratos ativa o funcionamento da amilase, o qual se inicia com o estímulo às glândulas salivares. A enzima na saliva é capaz de transformar fontes de amido em maltose e glicose. Mas é somente a amilase produzida no pâncreas que consegue quebrar o amido em unidades redutoras. Na saliva encontra-se uma forma de α -amilase denominada ptialina e no pâncreas, a amilase pancreática. Sendo uma enzima da classe das hidrolases que atua de forma extracelular para clivar o amido e o glicogênio que são os principais componentes ingeridos na dieta (MOTTA, 2009) (FIGURA 1).

São enzimas degradantes no qual se divide em dois grupos, enzimas denominadas de *branching*, que especificamente hidrolisam 1,6 acoplamentos entre cadeias, e as enzimas que quebram os 1,4 acoplamentos entre unidades de glicose das cadeias diretas. Este último grupo por sua vez consiste em endoenzimas que partem os laços de forma ao acaso, em pontos ao

longo das cadeias, e exoenzimas que partem pontos específicos nos fins de cadeia (MOTTA, 2009).

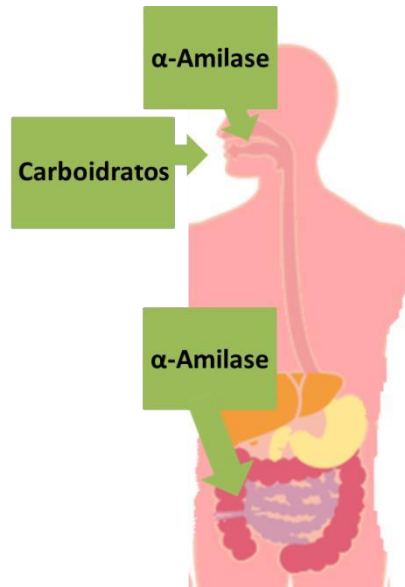


FIGURA 1: Digestão de carboidratos e ação enzimática α -amilase. Fonte: Bioquímica Ilustrada. 3a ed. CHAMPE, P.G., HARVEY, R.A. pg 105.

1.2 Metabolismo de lipídeos

O metabolismo dos lipídios ocorre no fígado, que por sua vez são provenientes de duas fontes distintas: dos alimentos ingeridos e da reserva orgânica que se encontra no tecido adiposo. O armazenamento de ácidos graxos na forma de triacilglicerídeo é o mais eficiente e quantitativamente mais importante. Quando necessário, hormônios são sinalizados a fim de suprir a necessidade metabólica, promovendo-se a liberação destes TG's com o objetivo de convertê-los em ácidos graxos livres, os quais serão oxidados para produzir energia. No entanto, outras formas de lipídios fazem parte da dieta diária, como os fosfolipídios, o colesterol e as vitaminas lipossolúveis (MOTTA, 2009).

É no duodeno, a primeira porção do intestino delgado, sob a ação da bile que é constituída por sais biliares, produzida no fígado e transportada pelo canal colédoco até o duodeno, que os lipídios da dieta são emulsionados. Estas partículas ativam as lipases pancreáticas, enzimas responsáveis pela digestão de lipídios (MOTTA, 2009).

1.2.1 Lipase pancreática

Produzida pelo pâncreas a lipase pancreática é uma enzima responsável pela quebra dos lipídios em substâncias simples (ácido graxo + glicerol (álcool)). As enzimas encontram-se no suco pancreático, atuando apenas em pH alcalino (8 a 8,5) que é garantido pelo bicarbonato de sódio (NaHCO_3) que também se encontra no suco. As lipases quebram os lipídios em ácidos graxos livres e monoglicerídeos, catalisando a hidrólise dos TG's com a formação de dois monoglicéridos e dois ácidos graxos. Os ácidos graxos são os principais mecanismos de produção de energia. A secreção da lipase é estimulada pela secretina que é liberada pela acidez do quimo no duodeno (FIGURA 02).

Esta enzima é liberada juntamente com a colipase, uma enzima que impede a inibição que os sais biliares causam na lipase pancreática, através do deslocamento dessa e da re-interação da lipase na interface lipídio-água (LI et al., 2020).

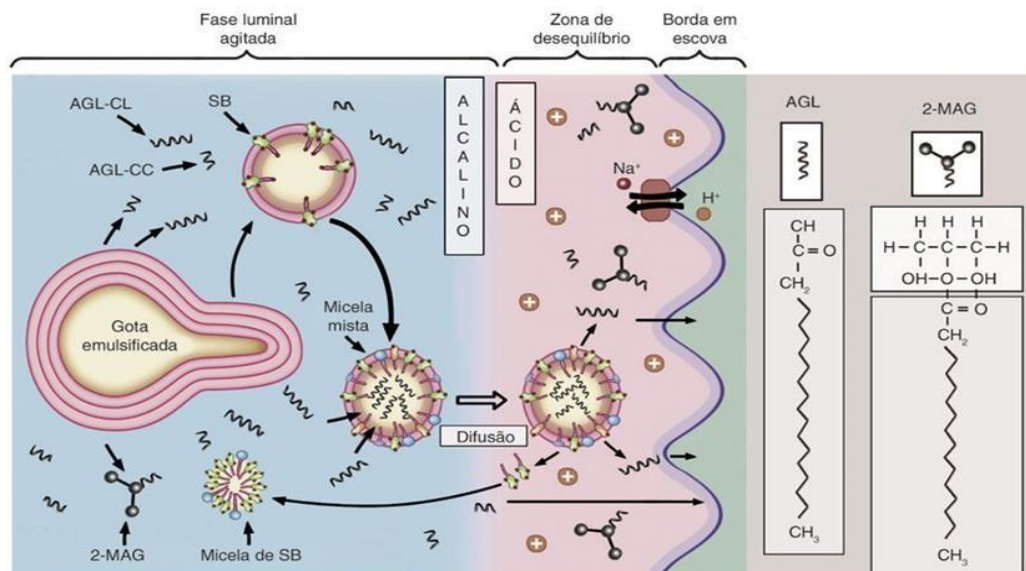


FIGURA 2: Digestão de lipídeos e ação enzimática lipase pancreática. Fonte: Bioquímica Ilustrada. 3a ed. CHAMPE, P.G., HARVEY, R.A. pg 183.

1.3 Balanço energético

Quando a quantidade de energia (calorias) ingerida através dos alimentos é maior do que aquela que o organismo gasta com seu metabolismo basal somado às atividades físicas diárias

diz-se que há um balanço energético positivo e a pessoa acumula gordura corpórea. Caso isso ocorra por um período longo de tempo, instala-se o sobrepeso e a obesidade em casos extremos.

O sobrepeso e a obesidade são considerados os principais fatores de risco para doenças como diabetes do tipo 2, doenças coronarianas, distúrbios respiratórios no sono estando também relaciona-se à resposta inflamatória e inúmeros tipos de câncer, como o de fígado, estômago, pâncreas, vesícula, ovário, tireoide e sangue (referência). Nos últimos 35 anos, o número de obesos mais que dobrou em todo o mundo tornando-se um desafio para a os programas de saúde pública (WHO, 2016).

A projeção é de que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de indivíduos estejam com excesso de peso, sendo mais de 700 milhões com obesidade. Já o número de crianças com sobrepeso e obesidade pode chegar a 75 milhões caso nada seja feito – incluindo 427 mil crianças com pré-diabetes, 1 milhão com hipertensão arterial e 1,4 milhão com aumento do acúmulo de gordura no fígado (LABOISSIÈRE, 2018).

As transições demográfica, epidemiológica e nutricional influenciaram no fenômeno da pandemia de obesidade. Outro fator contribuinte são os hábitos de vida da sociedade moderna (SWINBURN et al., 2011).

1.4 Número de mortes por fator de risco no Mundo em 2017

De acordo com o estudo *Global Burden of Disease*, cerca de 17 milhões de pessoas morreram prematuramente em 2017 como resultado dos altos níveis de glicemia no sangue e dislipidemias. Sendo a obesidade o quinto maior fator de risco para mortes prematuras em todo o mundo, como mostrado na FIGURA 3.

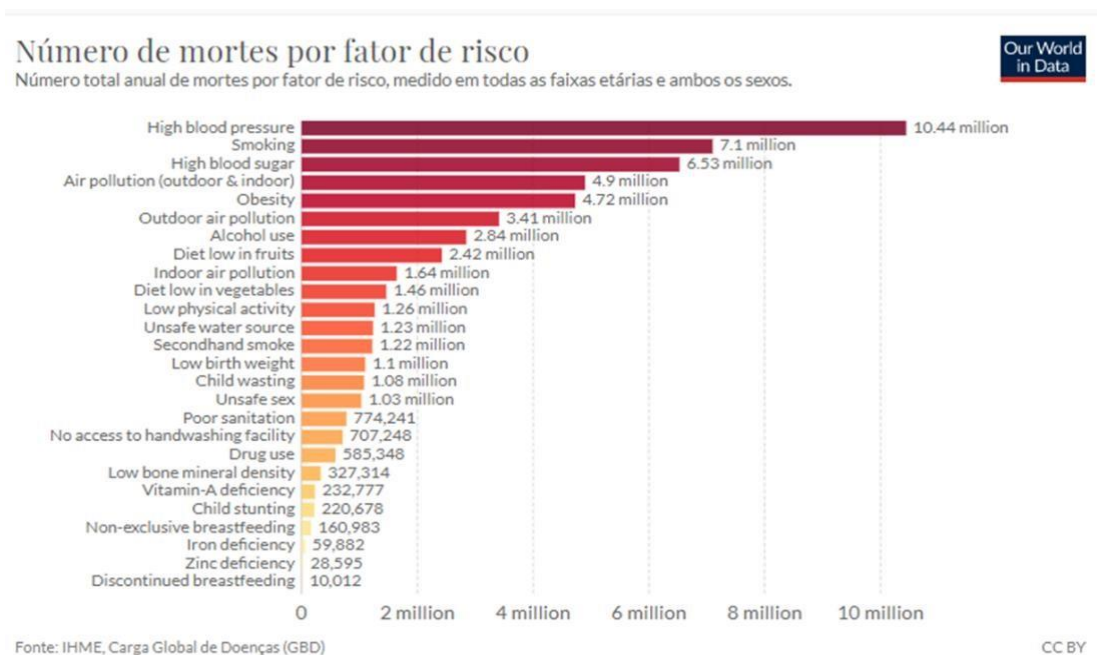


FIGURA 3: Número de mortes por fator de risco no Mundo em 2017 – Disponível em: <<https://ourworldindata.org/obesity>> Acesso em: 24/01/2020.

No Brasil, a prevalência de obesidade na população acima de 18 anos residente nas capitais apresentou importante aumento, de 12% em 2006 para 20% em 2018. Ou seja, um crescimento de 60% em uma década. Uma projeção feita pelo Ministério da Saúde em 2019 mostra uma tendência a um aumento anual de 0,83% (FIGURA 4).

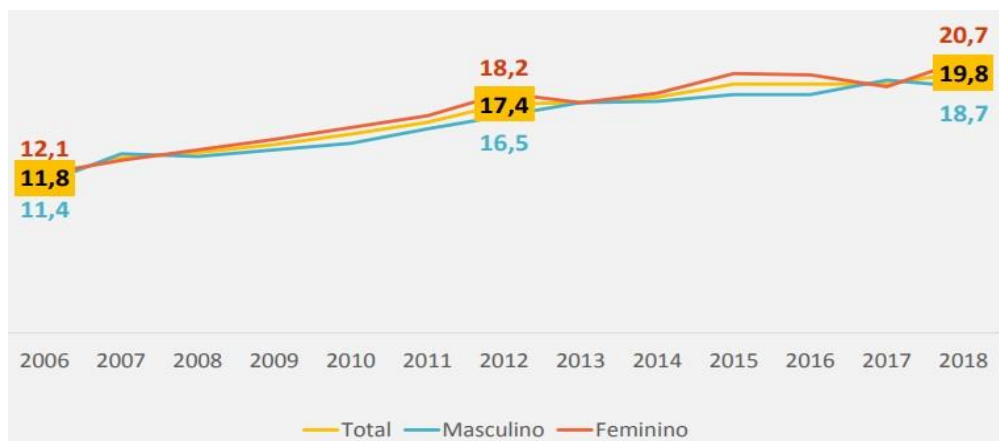


FIGURA 4: Prevalência de obesidade no Brasil 2006-2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/04/ApresentacaoWanderson-Vigitel.pdf>> Acesso em: 24/01/2020. Pg 6

Pesquisadores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) realizaram um estudo sobre os custos médicos das doenças associadas ao sobrepeso no Sistema Único de Saúde

(SUS). Um total de R\$ 3,65 bilhões são gastos anualmente com atendimentos ambulatoriais e hospitalares decorrentes dessas doenças (câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoartrose). Utilizando o método do risco atribuível, pode-se estimar qual o percentual dessas doenças é decorrente da presença de sobrepeso ou obesidade. Do total gasto pelo SUS, cerca de 10% seriam atribuíveis exclusivamente à obesidade como fator de risco. Deter o crescimento da obesidade constitui uma das metas do Plano Global de DCNT (2013-2020) e do Plano de Enfrentamento de doenças crônicas não transmissíveis no Brasil (2011-2022). No contexto do Sistema Único de Saúde (hospitais públicos), os custos diretos estimados de doenças relacionadas ao sobrepeso / obesidade em atendimento ambulatorial e hospitalar com base nos dados de 2008 a 2010 eram de US \$ 2,1 bilhões anualmente (valores do ano de 2010), 68,4% atribuíveis a hospitalizações e o restante devido a procedimentos ambulatoriais (BAHIA et al., 2012).

Os maiores custos de atendimento ambulatorial e hospitalar em ambos os sexos foram devidos a doenças cardiovasculares (US \$ 747 milhões), seguidos por neoplasias relacionadas ao sobrepeso e obesidade (US \$ 299,8 milhões), asma (US \$ 34 milhões), diabetes tipo 2 (US \$ 3,7 milhões) e osteoartrite (US \$ 3,9 milhões). Os autores estimaram que esses custos diretos eram uma subestimação considerável do verdadeiro ônus do sobrepeso / obesidade no Brasil, que incluiria gastos privados de saúde, bem como custos indiretos devido à perda de produtividade, morte prematura e atendimento domiciliar (BAHIA et al., 2012).

Dado o aumento previsto da obesidade no Brasil, projeta-se que pelo menos o dobro da doença coronariana, acidente vascular cerebral, hipertensão, câncer, osteoartrite e diabetes até 2050, com a duplicação concomitante nos custos com saúde, de US \$ 5,8 bilhões em 2010 para US \$ 10,1 bilhões por ano - totalizando US \$ 330 bilhões em 40 anos (valores do ano de 2010). Estima-se que uma redução de 5% no IMC médio em toda a população possa economizar ao Brasil cerca de US \$ 57 bilhões nesse período (RTVELADZE et al., 2013).

1.5 Tratamento para hiperglicemia e dislipidemias

Um importante alvo no tratamento das comorbidades associadas ao sobrepeso inclui o desenvolvimento de inibidores de digestão ou de absorção de nutrientes que reduzem o aporte calórico em nível intestinal. Desta forma, alvos em nível moleculares como enzimas e receptores vem sendo estudados para a obtenção de medicamentos cujo o mecanismo de ação se baseia

na inibição enzimática que ocasiona alterações benéficas no metabolismo glicêmico e lipídico e, conseqüentemente permitindo o uso no tratamento e controle de doenças como a hiperglicemia no diabetes do tipo 2 e as dislipidemias (MONTANARI; BOLZANI, 2001; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

As enzimas α -amilase e α -glicosidases são responsáveis pela quebra de carboidratos provenientes da dieta, o amido e assim auxiliando na absorção de mono e dissacarídeos pelos enterócitos (GUYTON & HALL 2002). Neste mesmo âmbito, a lipase, enzima importante no metabolismo de lipídios, apresenta-se também como promissor alvo de inibidores, uma vez que promove redução na absorção de triglicerídeos da dieta, ocasionando diminuição do aproveitamento calórico e facilitando a perda de peso. Cerca de 2 a 6% dos custos de saúde de sistemas públicos em diferentes países desenvolvidos estão sendo direcionados a compostos que reduzem os lipídeos séricos (BUSTANJI et al., 2011). O fármaco orlistat é um inibidor de lipase pancreático amplamente prescrito para auxiliar na perda de peso em adultos e crianças (CHAO; WADDEN; BERKOWITZ, 2018; CHUKIR et al., 2018).

Embora haja sua prescrição o mesmo apresenta uma série de efeitos colaterais. As reações adversas são, em sua absoluta maioria, de natureza gastrointestinal e relacionada ao próprio efeito farmacológico ao evitar a absorção de parte da gordura ingerida na dieta. Reações muito comuns são perdas ou evacuações oleosas, flatulência com perdas oleosas, urgência para evacuar, aumento das evacuações, desconforto/dor abdominal, flatulência, fezes líquidas, infecções do trato respiratório superior, gripe, cefaleia e hipoglicemia (YANOVSKI; YANOVSKI, 2014). Em maiores agravos podem levar à incontinência fecal, fezes amolecidas, desconforto/dor retal, distúrbios dentais ou gengivais, infecções do trato respiratório inferior, irregularidades menstruais, ansiedade, fadiga, infecção urinária e distensão abdominal e isso justificaria a procura por novas intervenções (KHERA et al., 2016).

1.6 Uso de plantas para fins terapêuticos

O uso de plantas têm sido empregado com finalidades terapêuticas há séculos pela humanidade. Ao redor do mundo milhares de produtos de origem vegetal são utilizados nas mais variadas formas como: cataplasmas, infusão, macerado, filtrado, tinturas, pomadas, xarope, cápsulas e na forma in natura. Um dos principais componentes químicos presentes em plantas, os compostos fenólicos cuja estrutura comum, interage com as proteínas formando complexos,

possivelmente inibindo algumas enzimas (SALUNKHE, 1990). Atualmente, estão disponíveis diversos produtos que auxiliam no controle de peso, incluindo preparos farmacológicos e suplementos dietéticos que tem por objetivo restringir a absorção de energia e promover a perda de peso, sendo a maioria constituída de extratos vegetais (BONIGLIA et al., 2008).

No Brasil, alguns trabalhos mostram que a população denomina algumas plantas de insulina e as utiliza regularmente visando o controle glicêmico inclusive por gestantes, como a *Bauhinia forficata* popularmente conhecida como pata-de-vaca, *Ricinus communis* L. também conhecida como mamona e *Salvia officinalis* L., sálvia (DAMASCENO et al., 2017; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012; VOLPATO et al., 2008).

O extrato aquoso do *Hibiscus sabdariffa* rico em flavonóide antocianina apresenta potente atividade inibidora de lipase, enquanto o extrato aquoso de *Tamarindus* indica potente atividade inibidora de -amilase, possivelmente pela presença de flavonóides quercetina reconhecidos como hipoglicemiantes (BUCHHOLZ; MELZIG, 2016).

Neste projeto, plantas presentes em território nacional (extratos padronizados e caracterizados) foram avaliadas quanto à capacidade de alterar a absorção de nutrientes.

As plantas selecionadas representadas na FIGURA 05 foram: *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae), *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) por já terem os extratos caracterizados quimicamente e serem de manejo biosustentável (DE FARIA et al., 2012; MININEL et al., 2014; PERICO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017; SANTOS et al., 2012).



Terminalia catappa



Byrsonima intermedia



Serjania marginata



Rhizophora mangle

FIGURA 5: Plantas que foram utilizadas: *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) e *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Fonte: Acervo pessoal.

1.6.1 *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)

A espécie *Terminalia catappa* é pertencente à família Combretaceae (FIGURA 06). Originária da Índia, no Brasil, esta espécie é popularmente conhecida como amendoeira-da-praia, cuca e chapéu de sol e sua distribuição ocorre em países de clima tropical e subtropical, principalmente em regiões costeiras devido a sua característica de adaptabilidade em regiões com presença de ventos e salinidade (THOMSON, 2006). Sua principal utilização em território nacional é na ornamentação de ruas e avenidas. A literatura aponta ainda que os extratos de diferentes órgãos de *Terminalia catappa* (folhas, frutos e cascas) apresentam diversas atividades biológicas, como: antimicrobiana e antifúngica (FYHRQUIST et al., 2002), antioxidante (CHEN; LI, 2006; MASUDA et al., 1999), inibidora da transcriptase reversa do vírus HIV (TAN et al., 1991), anti-inflamatória (FAN et al., 2004), hepatoprotetora (CHEN et al., 2000; FAN et al., 2004; LIN et al., 1997) e antidiabética (NAGAPPA et al., 2003).

Estudos fitoquímicos dessa planta constataram a presença de compostos polifenólicos no extrato das folhas, entre essas substâncias se destacam os triterpenóides e taninos hidrolisáveis como: punicalagina, punicalina, ácido chebulágico, geranina, ácido gálico, elágico, entre outros (KINOSHITA et al., 2007). Estes compostos se destacam principalmente, por sua atividade antioxidante, e por isso, se tornam importantes para a prevenção e terapia de doenças, como câncer, doenças degenerativas e inflamatórias. Os taninos, que se encontram entre esses compostos, apresentam estrutura química variada, porém possuem em comum seu caráter adstringente (VELAYUTHAM; SANKARADOSS; AHAMED, 2012).

Alguns trabalhos têm mostrado o aspecto antinutricional de cultivares com altos teores de taninos e sua resistência a pragas. Muitas espécies produtoras de taninos são usadas na medicina popular para diferentes finalidades e são considerados nutricionalmente indesejáveis porque precipitam proteínas, inibem enzimas digestivas e afetam a utilização de vitaminas e minerais (MONTEIRO et al., 2005).

Ainda, várias espécies de *Terminalia* têm sido estudadas quanto às suas propriedades antiobesogênicas. Extratos obtidos de casca da *Terminalia paniculatta* mostraram a capacidade de reduzir o peso corporal e melhorar o controle glicêmico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, sugerindo um efeito antiadipogênico e antiobesogênico (MOPURI et al., 2015). *Terminalia chebula* e *Terminalia arjuna* são plantas da medicina ayurvedica empregadas como antiobesogênicas seguras (GUJARATHI et al., 2014).



FIGURA 6: *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Terminalia_catappa_-_Indian_Badam_04.JPG>. Acesso em: 12/11/2019.

1.6.2 *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae)

Espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* vem sendo extensamente utilizada em estudos farmacológicos. A *Byrsonima crassifolia* (FIGURA 07) é tradicionalmente utilizada no tratamento de diabetes no México e seu extrato hexânico mostrou grande capacidade de controlar a glicemia em modelos experimentais de diabetes tipo 1 (GUTIERREZ; FLORES, 2014; PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010).

No Cerrado brasileiro, encontra-se a muricipequeno, *Byrsonima intermedia* A. Juss. Estudos etnofarmacológicos demonstraram o uso tradicional de diferentes partes da planta para o tratamento de disenteria e diarreia, dor de estômago, asma, infecções de pele, tuberculose, febre e como diurético (MOREIRA et al., 2011; ORLANDI et al., 2011).

O perfil fitoquímico desta espécie indica a presença de proantocianidinas oligoméricas e flavonóides (SANNOMIYA et al., 2005; SANNOMIYA et al., 2004). Estudos farmacológicos de *B. intermedia* já caracterizaram esses fortes efeitos anti-inflamatórios da planta (ORLANDI et al, 2011) e cicatrizante gástrico (SANTOS et al., 2012).



FIGURA 7: *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). Fonte: imagem cedida por Leonardo Noboru Seito, 2008

1.6.3 *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae)

A *Serjania marginata* Casar (FIGURA 08), conhecida popularmente como cipó-uva e cipótimbó, é uma planta nativa do Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina. No Brasil, foi registrada sua presença na mata decídua, em campo inundável e na região chaquenha do Mato Grosso do Sul, em 18 fragmentos florestais no noroeste do Estado de São Paulo e na floresta densa do Estado de Pernambuco (GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2000). Diferentes espécies de *Serjania* e alguns dos seus compostos isolados têm atividades analgésica, antibacteriana, antifúngica, moluscicida, anti-inflamatória, antinociceptiva, dentre outra (DI STASI et al., 1988).

No entanto, há poucos relatos encontrados na literatura sobre o uso medicinal da *S. marginata*. Um estudo que realizou a caracterização do extrato de *S. marginata* (HEREDIAVIEIRA et al., 2015) evidenciou a presença de flavonoides e compostos fenólicos como, saponinas glicosiladas, flavonoides, taninos, isoprenóides, polifenóis, triterpenos, diterpenos, lecitinas e

hidrogéis (DA SILVA MOREIRA et al., 2019; DO CARMO OTA et al., 2019; HEREDIA-VIEIRA et al., 2015; PERICO et al., 2015). Compostos fenólicos, como flavonoides e taninos, apresentam propriedades analgésica, anti- inflamatória, antioxidante, como já citado, sendo estas, relacionadas a doenças como o câncer e problemas cardiovasculares (AMAROWICZ; DYKES; PEGG, 2008). Os taninos podem também inativar enzimas digestivas e criar complexos de taninos e proteínas vegetais difíceis de serem digeridos (BARBOSA, 2015; MCKAY et al., 2015).



FIGURA 8: *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) - Fonte: Toxicological safety evaluation in acute and 28-day studies of aqueous extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) leaves in rats, 2019.

1.6.4 *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae)

A *Rhizophora mangle* L. pertence à família Rhizophoraceae, também conhecido Manguevermelho e sapateiro, é uma espécie típica de manguezal (FIGURA 09). O nome da árvore é assim dado pois, quando sua casca é raspada, apresenta uma coloração avermelhada típica da espécie sendo uma das espécies mais importantes no litoral brasileiro e um dos biomas mais representativos.

Este ecossistema é caracterizado como um ambiente de transição entre ecossistemas terrestres e aquáticos. As plantas de mangue são fontes potenciais de compostos biologicamente ativos e têm ampla aplicação em práticas etnofarmacológicas. Os compostos fenólicos são a principal fonte de fitoquímicos encontrados nessas plantas de regiões estuárias, especialmente taninos condensados, suas cascas são compostas por proantocianidinas (PAs), oligômeros e polímeros do flavan-3-ol, que possuem alta atividade antioxidante e anti-inflamatória. Um estudo cujo extrato acetônico de *R. mangle* foi utilizado como tratamento para diabetes do tipo 2 em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica mostrou que o extrato foi capaz de atenuar níveis glicêmicos, insulínicos, também diminuindo a esteatose hepática e a expressão de mRNA hepático de CD36 podendo ser um coadjuvante no tratamento da obesidade e suas comorbidades (DE-FARIA et al., 2012; DE SOUZA MESQUITA et al., 2018).



FIGURA 9: *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Fonte: IFFSC, Douglas Meyer, 2010

1.7 Justificativa

A ausência de fármacos antinutricionais para tratamento de hiperglicemia e dislipidemias com reduzidos efeitos colaterais traz à tona a necessidade pela busca de novos compostos que possibilitem melhores efeitos farmacológicos uma vez que as comorbidades associadas ao aumento de peso crescem na população. Produtos naturais, como os vegetais, garantem uma grande diversidade de compostos, o que justifica a exploração de plantas para buscar novas possibilidades terapêuticas. Todas as espécies apontadas apresentam potencial farmacológico frente a diversas doenças, deste modo, uma triagem das plantas selecionadas pode revelar extratos com grande potencial de uso para o controle glicêmico e lipêmico e conseqüentemente contribuir para o controle da obesidade e de suas comorbidades que tem onerado o sistema público de saúde brasileiro e reduzido a qualidade de vida e tempo de vida de considerável parcela da população, não só brasileira

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de extratos padronizados de plantas brasileiras quanto a capacidade de inibir enzimas em modelos experimentais *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade inibidora de lipase pancreática;
- ✓ Avaliar a atividade inibidora de α -amilase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extratos padronizados das plantas

Os extratos padronizados (hidroalcoólicos) foram obtidos e fornecidos pelo Prof. Wagner Villegas da Unesp – campus São Vicente. Foram utilizadas cascas de *Rhizophora mangle* e folhas de *Byrsonima intermedia*, *Terminalia catappa* e *Serjania marginata* para obtenção dos extratos.

3.2 Ensaio de atividade da lipase pancreática *in vitro*

A atividade de lipase foi determinada medindo a liberação de p-nitrofenol a partir de palmitato de p-nitrofenil (p-NPP) utilizando um método espectrofotométrico a 410 nm (SOUZA, 2009). A enzima lipase pancreática suína (Sigma-Aldrich, USA) foi preparada em tampão Tris-HCl 0,05M. O p-nitrofenil (substrato da lipase) foi dissolvido em Triton-X 100 0,5%, a 37°C. Para cada reação, 100 mL de enzima, 50 mL de água e 50 mL de substrato foram incubados em diferentes tempos.

Controles sem enzima (branco) foram realizados. O produto da reação p-nitrofenol, o p-nitrofenolpalmitato foi quantificado em leitor de absorvância (410 nm). Os extratos foram adicionados previamente à enzima por 10 minutos em diferentes concentrações. O fármaco Orlistat foi utilizado como controle positivo. Cada experimento foi realizado em triplicata e a inibição foi expressa em porcentagem e IC 50 calculada usando *GraphPad Prism Software*.

3.3 Ensaio de atividade de α -amilase *in vitro*

Para a determinação da atividade de α -amilase foi utilizado o método proposto por NOELTING; BERNFELD (1948), no qual a solução de amido 1% foi utilizada como substrato preparada em tampão Tris 0,05 mol.L⁻¹, pH 7,0 acrescido de NaCl 38 mMol.L⁻¹ e CaCl₂ 0,1 mMol.L⁻¹.

Para o ensaio 100 μL de enzima e 100 μL do substrato foram incubados por 20 min e a reação interrompida adicionando 200 μL do reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico. Em seguida o produto formado foi lido em espectrofotômetro a 540 nm. Para calcular a atividade, foi feita uma curva padrão com glicose, o fármaco Acarbose foi usado como controle positivo e cada experimento foi realizado em triplicata. A inibição de α -amilase foi expressa em porcentagem e IC50 calculada usando *GraphPad Prism Software*.

3.4 Análise dos dados

Os resultados foram expressos em média, acompanhados do respectivo erro padrão da média (EPM). Os dados foram apresentados como porcentagem de inibição (IC50).

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio inibição de lipase pancreática

4.1.1 Curva de p-Np e inibidor padrão conhecido (Orlistat)

Na FIGURA 10 (a) podemos observar a curva de p-NP produto da reação enzimática, realizada juntamente com a curva padrão do fármaco Orlistat (FIGURA 10 (b)). Estes resultados nos permitiram validar o protocolo experimental utilizado como referência para os ensaios posteriores, no qual o fármaco Orlistat apresentou potente capacidade inibitória da enzima lipase pancreática com um IC₅₀ de 6.0 ug/mL.

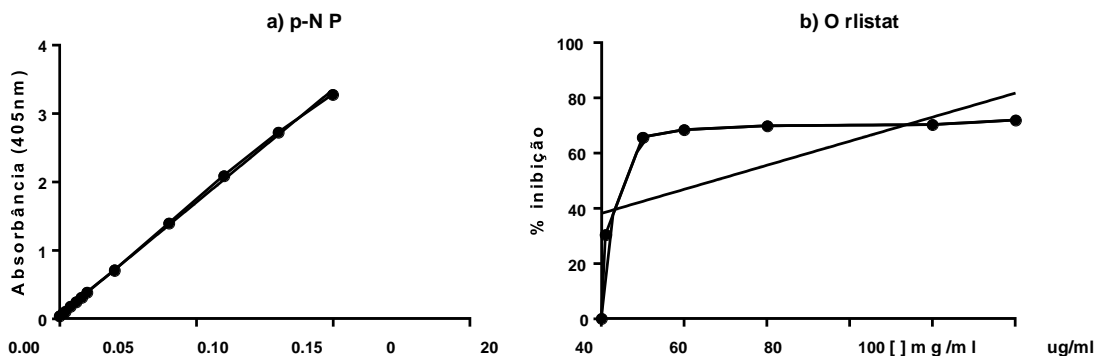


FIGURA 10: Curva de p-nitrofenol (p-NP) (a), produto resultante da ação enzimática da lipase pancreática em contato com o substrato palmitato de p-nitrofenil (p-NPP) e curva de inibidor padrão conhecido, fármaco Orlistat (b). Cada ponto da curva representa uma concentração (realizada em quadruplicata).

4.1.2 Curvas de inibição de lipase pancreática com os extratos de plantas

Na FIGURA 11 podemos observar as curvas de inibição para o ensaio de lipase pancreática o qual os extratos apresentaram um IC₅₀ de: 742 ug/mL para o extrato de *Byrsonima intermedia* (a), 805 ug/mL para o extrato de *Serjania marginata* (c), 803 ug/mL para o extrato de *Rhizophora mangle* e apenas o extrato de *Terminalia catappa* neste ensaio não apresentou atividade inibitória.

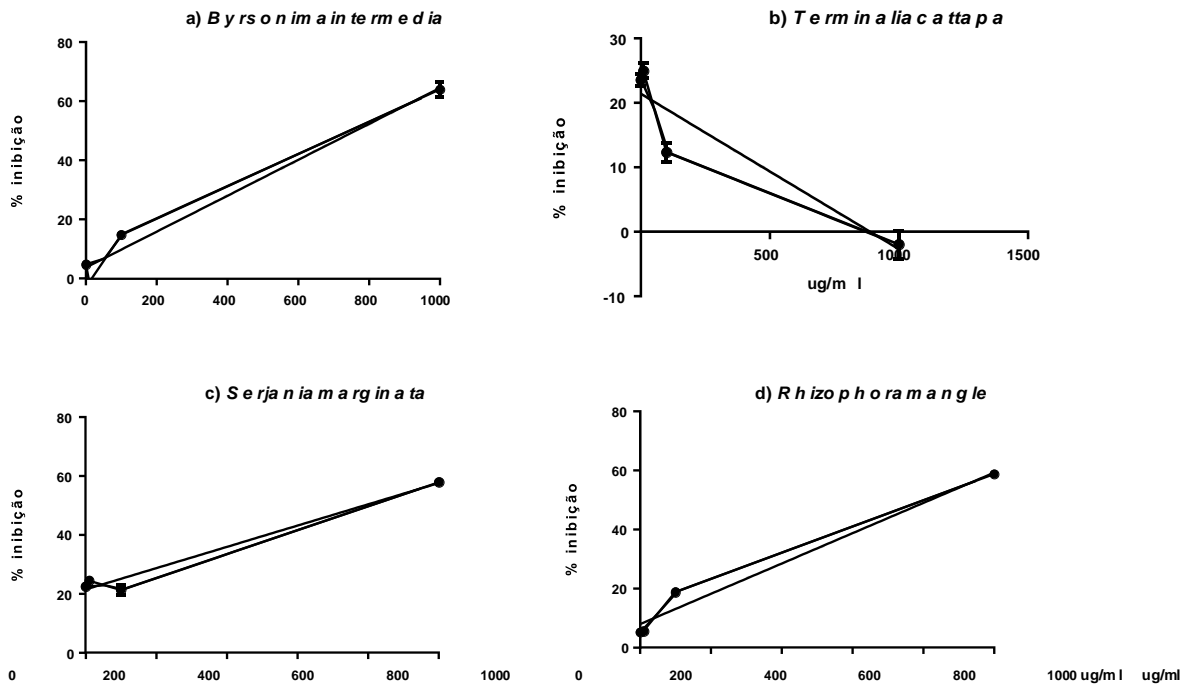


FIGURA 11: Porcentagens de inibição de extratos em ensaio de lipase pancreática para os extratos utilizados expressos em IC50. Cada ponto da curva representa uma concentração (realizada em quadruplicata).

4.2 Ensaio inibição de α -amilase

4.2.1 Curva padrão de glicose e inibidor Acarbose

Assim como no ensaio de lipase pancreática, no ensaio de inibição da enzima α -amilase também foi realizado como observado na FIGURA 12 (a) uma curva de inibidor padrão conhecido, com o fármaco Acarbose que neste ensaio apresentou um IC50 de 5.2 ug/mL apresentando potente potencial inibidor enzimático. Na FIGURA 12 (b) podemos visualizar uma curva de glicose para posterior análise comparativa.

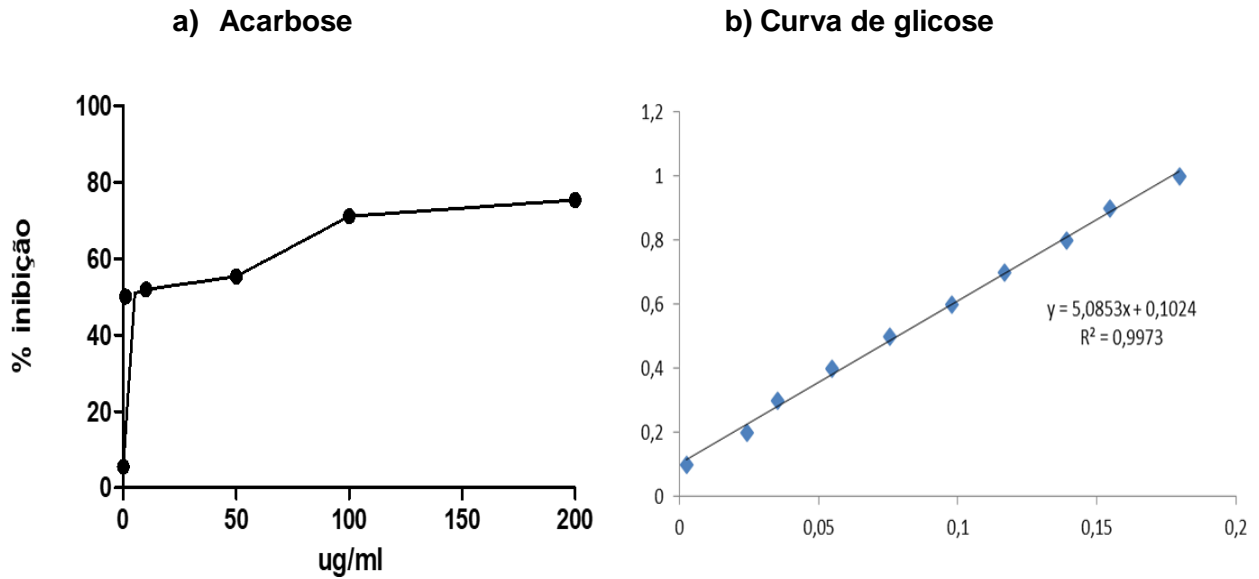
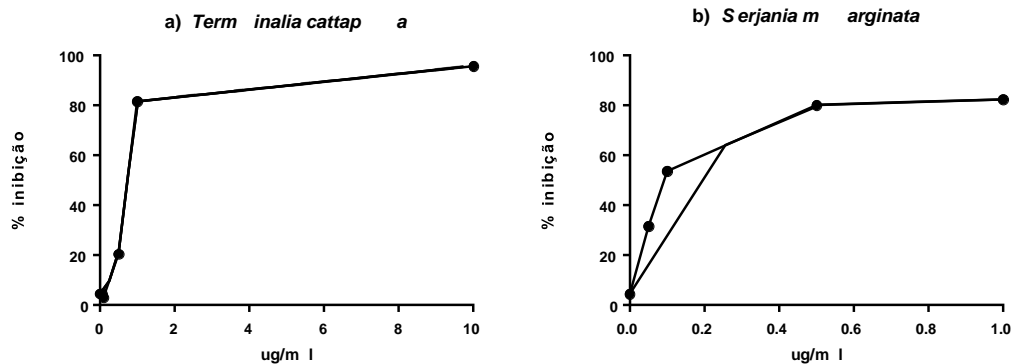


FIGURA 12: Curva padrão de Acarbose (a) e curva de glicose (b) para análise comparativa de inibição de α -amilase. Cada ponto da curva representa uma concentração (realizada em quadruplicata).

4.2.2 Curvas de inibição de α -amilase com os extratos de plantas

Na FIGURA 13 podemos observar as curvas de inibição para o ensaio de α -amilase, o qual os extratos apresentaram potente potencial inibidor com um IC50 de 24.5 ug/mL para o extrato de *Byrsonima intermedia* (d), 19 ug/mL para o extrato de *Rhizophora mangle* (c), 0.74 ug/mL para o extrato de *Terminalia catappa* e 0.13 ug/mL para o extrato de *Serjania marginata* (b), esses dois se mostrando os extratos com maior potencial inibidor.



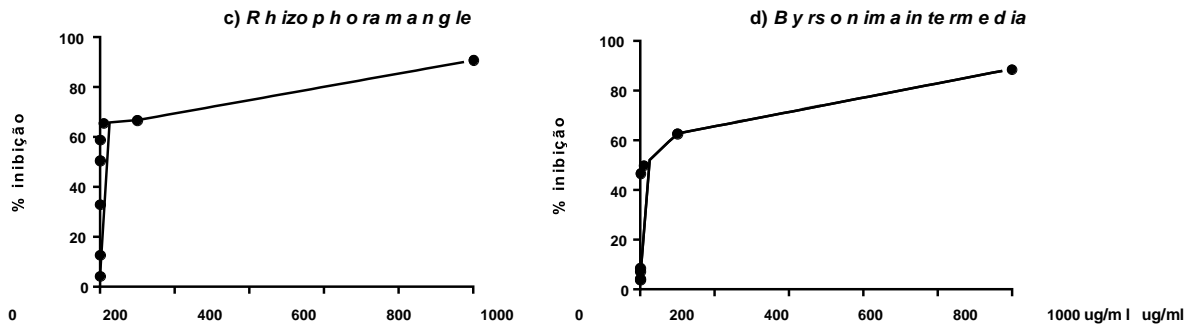


FIGURA 13: Porcentagens de inibição para os extratos utilizados em ensaio de α -amilase em IC50. Cada ponto da curva representa uma concentração (realizada em quadruplicata).

5. DISCUSSÃO

Os extratos de plantas utilizados no ensaio de inibição de lipase pancreática apresentaram potencial inibitório enzimático, embora em menor potência quando comparado ao inibidor padrão conhecido o fármaco Orlistat. Estes resultados podem ser atribuídos devido a forma bruta dos mesmos, já que estes não se trata de compostos isolados. Dentre os extratos utilizados a *Byrsonima intermedia* foi a que apresentou um valor menor de IC50 com 742 ug/ml.

Investigação fitoquímica do extrato metanólico da casca de *Byrsonima crassifolia* levou ao isolamento de 6 derivados galililados, confirmando a presença da epicatequina e epicatequina galato no extrato da casca de *Byrsonima crassifolia* (MALDINI; MONTORO; PIZZA, 2011). Estudo realizado com o fruto de *Byrsonima crassifolia* como tratamento de diabetes induzida em ratos por streptozotomicina associado à hiperlipidemia, mostrou o potente efeito anti-hiperlipidêmica do extrato em ratos através da diminuição dos níveis de colesterol, triglicerídeos e substância reativa ao ácido tiobarbiturico, parâmetro de peroxidação lipídica em ratos diabéticos induzidos por streptozotocina após a suplementação com extrato. Além disso, o efeito atenuante deste extrato foi confirmado testando a atividade da glicose -6- fosfatase no fígado (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010; PEREZ GUTIERREZ; MUNIZ RAMIREZ, 2013).

Para o ensaio de inibição de α -amilase podemos observar uma potente atividade inibidora enzimática, o qual todos os extratos utilizados se mostrarm promissores. Em destaque estão os extratos de *Terminalia catappa* com um IC50 de 0.74 ug/mL e 0.13 ug/mL para o extrato de *Serjania marginata*, sendo mais potente que o inibidor conhecido Acarbose (IC50 6.0 ug/mL).

Um estudo que realizou a caracterização do extrato de partes de *Terminalia catappa* mostrou a presença de taninos hidrolisáveis (pulicalagina e pulicanina), ácido gálico e glicosídeos C-flavonóides em sua maioria, demonstrado que os taninos hidrolisáveis, também chamados elagitaninos, são os principais constituintes químicos das folhas de *Terminalia catappa* e que estão ligados ao efeito antitumoral dessa planta (CHEN et al., 2000) e também relacionada às atividades antioxidantes atribuídas a essa planta (KINOSHITA et al., 2007).

Estando entre os compostos de origem natural do grupo dos metabólitos secundários mais abundantes no Reino Vegetal, os flavonoides desempenham papel importante na proteção de plantas contra agentes oxidativos (raios ultravioletas, poluição, substâncias químicas e outros). Sua ampla ação biológica é reconhecida atualmente na literatura, com efeitos que vão desde a ação anti-inflamatória, antialérgica, anti-hemorrágica e principalmente antioxidante. Com os

resultados obtidos neste estudo, podemos notar uma inibição enzimática de α -amilase potente para os extratos de *Terminalia catappa* e *Serjania marginata*, visto que estas plantas possuem em sua composição os flavonoides quercitina e pulicalagina os quais o papel etnofarmacológico difundido apresentam a capacidade de diminuir níveis glicêmicos sendo utilizado no DM2 e em modelos experimentais de DM1 e o mesmo já demonstrado para *Rhizophora mucronata*.

Os glicosídeos C flavonóides, obtidos de diferentes tipos de plantas, demonstraram também atividade antioxidante significativa, atividade anticâncer e antitumoral, atividade hepatoprotetora, antiinflamatória, antidiabética, antiviral, antibacteriana e antifúngica e outros efeitos biológicos (MA et al., 2016).

Entretanto, o tratamento para o sobrepeso e obesidade vai além da tentativa de atenuar os níveis glicêmicos séricos e de tornar a estabilizar a resistência insulínica no diabetes do tipo 2. Reduzir o aporte calórico e com isso o acúmulo de triglicerídeos nos tecidos de estoque é um dos focos primordiais para o tratamento da obesidade e conseqüentemente suas comorbidades. Fármacos hipolipemiantes se baseiam em sua maioria na inibição competitiva de sítios de enzimas importantes no processo de absorção desses lipídeos e para isso o uso popular de plantas é cada vez mais presente nas dietas atuais e nos costumes populares. Os dados obtidos com o ensaio de lipase pancreática nos mostram um potencial inibitório mesmo que ténue destes extratos.

Outro estudo com os extratos de *Terminalia paniculatta* e *Byrsonima crassifólia* também usados em diferentes concentrações em animais obesos induzido por HFD apresentaram diminuição de genes que regulam a adipogênese como SREPB-1, PPAR e também AMPK e leptina (GUJARATHI; DWIVEDI; VYAS, 2014; PANDEY; GUPTA; LAL, 2014).

Uma hipótese para a inibição de lipase pancreática observada e embora não tenha ocorrido com tanta potência, o efeito anti-obesidade da *Terminália catappa* é provavelmente devido à redução da expressão de genes lipogênicos como FAS, SREBP-1c, PPAR γ e leptina e até a regulação da adiponectina e AMPK-1 α como descrito em outros estudos (MOPURI et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo podemos observar que os extratos em sua maioria apresentam potencial inibidor das enzimas lipase e α -amilase e principalmente potencial inibidor para a enzima α -amilase e dessa forma possível caráter antinutricional e hipoglicemiante podendo ser utilizado como um coadjuvante para o tratamento dos altos níveis de açúcar no sangue e dislipidemias.

7. REFERÊNCIAS

AMAROWICZ, R.; DYKES, G. A.; PEGG, R. B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 217-19, 2008.

BAHIA, L., et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: Cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 12, p. 440, 2012.

BARBOSA, N. C. Uma revisão bibliográfica dos fatores antinutricionais: taninos, inibidores de proteases e lectinas. **Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Química**, 2014.

BONIGLIA, C., et al. Lectins, trypsin and α -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 3, p. 689-693, 2008.

BUCHHOLZ, T., MELZIG, M. F. Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus - Screening for Pancreatic Lipase and alpha-Amylase Inhibition. **Phytother Res**, v. 30, n. 2, p. 260-6, 2016.

BUSTANJI, Y., et al. Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of *Ginkgo biloba*. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 26, n. 4, p. 453-9, 2011.

CHAMPE, P.G., HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 3a ed, p. 105-112, 2015.

CHAMPE, P.G., HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 3a ed, p. 138-142, 2015.

CHAO, A. M., WADDEN, T. A., BERKOWITZ, R. I. The safety of pharmacologic treatment for pediatric obesity. **Expert Opin Drug Saf**, v. 17, n. 4, p. 379-385, 2018.

CHEN, P. S.; LI, J. H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. **Toxicol Lett**, v. 163, n. 1, p. 44-53, 2006.

CHEN, P. S., et al. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Lett**, v. 152, n. 2, p. 115-122, 2000.

CHUKIR, T., et al. Pharmacotherapy for obesity in individuals with type 2 diabetes. **Expert Opin Pharmacother**, v. 19, n. 3, p. 223-231, 2018.

DA SILVA MOREIRA, S., et al. Toxicological safety evaluation in acute and 28-day studies of aqueous extract from *Serjania marginata* Casar (Sapindaceae) leaves in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 231, p. 197-204, 2019.

DAMASCENO, D. C., et al. Medicinal Plants for Diabetes Treatment During Pregnancy. **Curr Med Chem**, v. 24, n. 4, p. 404-410, 2017.

DE-FARIA, F. M., et al. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle*. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 1, p. 234-243, 2012.

DE FARIA, F. M., et al. Effects of *Rhizophora mangle* on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 753-971, 2012.

DE SOUZA MESQUITA, L. M., et al. Modulatory Effect of Polyphenolic Compounds from the Mangrove Tree *Rhizophora mangle* L. on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance in HighFat Diet Obese Mice. **Molecules**, v. 23, n. 9, p.432-440, 2018.

DI STASI, L. C., et al. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. **J Ethnopharmacol**, v. 24, n. 2-3, p. 205-211, 1988.

DO CARMO OTA, E., et al. Hepatic and gastroprotective activity of *Serjania marginata* leaf aqueous extract in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Physiol Biochem**, v. 45, n. 3, p. 1051-1065, 2019.

FAN, Y. M., et al. Phytochemical and antiinflammatory studies on Terminalia catappa. **Fitoterapia**, v. 75, n. 34, p. 253-260, 2004.

FYHRQUIST, P., et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of Terminalia and Combretum (Combretaceae) growing in Tanzania. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 2, p. 169-177, 2002.

GUARIM NETO, G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. D. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, p. 327-334, 2000.

GUJARATHI, R. A.; DWIVEDI, R.; VYAS, M. K. An observational pilot study on the effect of Gomutra Haritaki, diet control and exercise in the management of Sthaulya (obesity). **Ayu**, v. 35, n. 2, p. 129-134, 2014.

GUTIERREZ, R. M.; FLORES, J. M. Effect of chronic administration of hexane extract of Byrsonima crassifolia seed on B-cell and pancreatic oxidative parameters in streptozotocininduced diabetic rat. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 11, n. 2, p. 231-236, 2014.

HEREDIA-VIEIRA, S. C., et al. Unusual C,O fused Glycosylapigenins from Serjania marginata Leaves. **J Nat Prod**, v. 78, n. 1, p. 77-84, 2015.

KHERA, R., et al. Association of Pharmacological Treatments for Obesity With Weight Loss and Adverse Events: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 315, n. 22, p. 2424-2434, 2016.

KINOSHITA, S., et al. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, Terminalia catappa L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. **Phytomedicine**, v. 14, n. 11, p. 755-762, 2007.

LI, J., et al. Triglyceride metabolism and angiotensin-like proteins in lipoprotein lipase regulation. **Clin Chim Acta**, v. 503, p. 19-34, 2020.

LIN, C. C., et al. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*. **Am J Chin Med**, v. 25, n. 2, p. 153-161, 1997.

MA, X., et al. Dual and Opposing Roles of Xanthine Dehydrogenase in Defense-Associated Reactive Oxygen Species Metabolism in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 28, n. 5, p. 1108-1126, 2016.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2011.

MASUDA, T., et al. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 4, p. 1749-1754, 1999.

MCKAY, D. L., et al. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. **Food Chem**, v. 168, p. 233-240, 2015.

MININEL, F. J., et al. Characterization and Quantification of Compounds in the Hydroalcoholic Extract of the Leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and Their Mutagenic Activity. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p. 676-902, 2014.

MEYER, D. *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), **IFFSC**, 2010.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MONTEIRO, J. M., et al. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, p. 999-1005, 2005.

MOPURI, R., et al. Evaluation of anti-obesity activities of ethanolic extract of *Terminalia paniculata* bark on high fat diet-induced obese rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 76, 2015.

MOREIRA, L. Q., et al. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 138, n. 2, p. 610-615, 2011.

MOREIRA S.S., et al. Toxicological safety evaluation in acute and 28-day studies of aqueous extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) leaves in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 231, p. 197-204, 2019.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica para o laboratório - princípios e interpretações. In: LTDA, E. C. (Ed.). 3a. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

NAGAPPA, A. N., et al. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **J Ethnopharmacol**, v. 88, n. 1, p. 45-50, 2003.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques; la beta-amylase; dosage d'activite et controle de l'absence d' alpha-amylase. **Helv Chim Acta**, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

ORLANDI, L., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 3, p. 1469-1476, 2011.

PANDEY, A. K.; GUPTA, P. P.; LAL, V. K. Hypoglycemic effect of *Rhizophora mucronata* in streptozotocin induced diabetic rats. **J Complement Integr Med**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2014.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M., et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of *Byrsonima crassifolia* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 65, n. 4, p. 350-357, 2010.

PEREZ GUTIERREZ, R. M.; MUNIZ RAMIREZ, A. Hexane extract of the seeds of *Byrsonima crassifolia* accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Chin J Integr Med**, p. 1-7, 2013.

PERICO, L. L., et al. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 172, p. 312-324, 2015.

PESQUISA VIGITEL BRASIL 2018. Vigitel, p.6,2018 – Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/imagens/pdf/2019/novembro/04/ApresentacaoWanderson-Vigitel.pdf>> Acesso em: 24/01/2020.

RITCHIE, H., MAX, R. Our World In Data. **Obesity**, 2020. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/obesity>> Acesso em: 24/01/2020.

RODRIGUES, V. P., et al. Involvement of Opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 11, 2017.

RTVELADZE, K., et al. Health and economic burden of obesity in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

SALUNKHE, D. K., CHAVAN, J.K., KADAM, S.S. Dietary tannins: consequences and remedies. **CRC Press**, 1989.

SANNOMIYA, M., et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 16, p. 2244-2250, 2005.

SANNOMIYA, M., et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of chromatography. A**, v. 1035, n. 1, p. 47-51, 2004.

SANTOS, R. C., et al. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 203-212, 2012.

SEITO, NL. *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), 2008

TAN, G. T., et al. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. **J Nat Prod**, v. 54, n. 1, p. 143-154, 1991.

THOMSON, L. A. J., et al. Terminalia catappa. **Species profiles for pacific Island agroforestry: permanent agriculture resources**, 2006.

TROJAN-RODRIGUES, M., et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

VELAYUTHAM, R.; SANKARADOSS, N.; AHAMED, K. F. Protective effect of tannins from *Ficus racemosa* in hypercholesterolemia and diabetes induced vascular tissue damage in rats. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, n. 5, p. 367-373, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOLPATO, G. T., et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 116, n. 1, p. 131-137, 2008.

YANOVSKI, S. Z.; YANOVSKI, J. A. Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. **JAMA**, v. 311, n. 1, p. 74-86, 2014.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ANEXO 1

Artigo publicado com o extrato das cascas da *Rizhophora mangle*



Article

Modulatory Effect of Polyphenolic Compounds from the Mangrove Tree *Rhizophora mangle* L. on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance in High-Fat Diet Obese Mice

Leonardo Mendes de Souza Mesquita ¹, Cíntia Rabelo e Paiva Caria ², Paola Souza Santos ², Caio Cesar Ruy ², Natalia da Silva Lima ², Débora Kono Taketa Moreira ², Claudia Quintino da Rocha ^{1,3}, Daniella Carisa Murador ⁴, Veridiana Vera de Rosso ⁴, Alessandra Gambero ² and Wagner Vilegas ^{1,*}

¹ UNESP—São Paulo State University /Coastal Campus of São Vicente, Laboratory of Bioprospection of Natural Products (LBPn) Pça Infante Dom Henrique S/N, 11330-900 São Vicente, SP, Brazil; mesquitams@gmail.com (L.M.d.S.M.); claudiarocha3@yahoo.com.br (C.Q.d.R.)

² Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, USF—São Francisco University, Av. São Francisco de Assis, 218, 12916-900 Bragança Paulista, SP, Brazil; cintiarabelo@yahoo.com.br (C.R.e.P.C.); pa.s.santos@hotmail.com (P.S.S.); ruyccao@gmail.com (C.C.R.); lima.nat@gmail.com (N.d.S.L.); deboraktmoreira@gmail.com (D.K.T.M.); alessandra.gambero@usf.edu.br (A.G.)

³ Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos (LEAF), UFMA—Federal University of Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966-Bacanga, CEP: 65080-805 São Luís, Maranhão, Brazil

⁴ Department of Biosciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Silva Jardim Street, 136, Vila Mathias, 11015-020 Santos City, SP, Brazil; daniellamurador@gmail.com (D.C.M.); veriderosso@yahoo.com (V.V.d.R.)

* Correspondence: vilegasw@gmail.com; Tel.: +55-13-996-195-031

Received: 12 July 2018; Accepted: 11 August 2018; Published: 22 August 2018

