

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
FAR99002 - TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Uma Revisão Crítica dos Métodos de Ensaio da Inibição da  
Lipase Pancreática**

Vanessa Pittol

Porto Alegre, junho de 2013.

Vanessa Pittol

**Uma Revisão Crítica dos Métodos de Ensaio da Inibição da  
Lipase Pancreática**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Farmacêutica, pelo  
curso de Farmácia da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. George González Ortega  
Orientador

Porto Alegre, junho de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela agradável convivência. Em especial, ao Pedro Ernesto de Resende e à Renata Cougo Moraes por todo aprendizado, incentivo, amizade e ajuda desde o início da iniciação científica.

Ao professor Dr. George González Ortega, pelo exemplo como profissional, pelo carinho com o aluno, pelo acolhimento e incentivo durante toda iniciação científica, pela compreensão, pela convivência, pelos ensinamentos e pela orientação durante a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Beatriz Ladir Sopelsa Pittol e Valmor José Pittol, pelo apoio, incentivo e amor. Aos meus tios Antoninho Gasparotto e Bruni Gasparotto, pelo acolhimento, carinho e convivência aqui em Porto Alegre.

À minha “nona” Adelma Sopelsa (*in memoriam*) pelo exemplo de força, de superação, de amor e de sabedoria, e pela oração do estudante que sempre fazia para minha proteção.

Aos meus colegas de faculdade, por todos esses anos de convivência, pela amizade, pelo companheirismo, pelas conversas, risadas e horas de estudo.

## RESUMO

Obesidade é uma doença crônica que predispõe à hipertensão, diabetes tipo II, hiperlipidemia, doença coronariana, acidente vascular cerebral e certos tipos de câncer. O aumento da sua prevalência no Brasil, assim como em vários países, tem se tornado um problema de saúde pública e tem incentivado a busca por novas alternativas farmacológicas para o tratamento desta patologia. Os efeitos adversos dos inibidores de apetite de ação central e a sua recente proibição em alguns países, incluindo o Brasil, têm propiciado alternativamente a pesquisa de fármacos de ação periférica. Nesse contexto, o desenvolvimento de inibidores da digestão e absorção de lipídios através de mecanismos gastrointestinais surge como uma importante estratégia. Entre os potenciais alvos terapêuticos encontram-se enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios, com destaque para a lipase pancreática (**LP**). Orlistat, um forte inibidor da LP, é usualmente utilizado como fármaco de referência. A avaliação da inibição da atividade da LP pode ser realizada por diferentes métodos *in vitro*, mediante determinação dos ácidos graxos livres ou de outros produtos resultantes da hidrólise do substrato. Entretanto, a evidência acumulada indica a existência de variáveis analíticas que são determinantes para a exatidão e precisão do método e que, conseqüentemente, devem ser levadas em consideração a fim de se obter resultados confiáveis. Fatores críticos, como composição do meio de incubação, uso e tipo de tensoativo, tempo e modo de interromper a reação enzimática podem ser significativos, dependendo da substância a ser analisada. Neste trabalho, aspectos relevantes a este tema são abordados de modo sistemático, visando destacar as principais variáveis analíticas implícitas na avaliação *in vitro* da atividade inibitória sobre a LP.

**Palavras-chave:** lipase pancreática; ensaios de inibição; metabolismo de lipídios.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Extratos de espécies vegetais com atividade inibitória sobre a LP, determinados por ensaios espectrofotométricos.....	26
Tabela 2 -	Saponinas de espécies vegetais com atividade inibitória sobre a LP.....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura cristalográfica da LP.....	12
Figura 2 -	Representação da superfície da LP.....	13
Figura 3 -	Estrutura e interação entre LP e <i>Colipase</i> .....	14

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>OBESIDADE.....</b>	<b>9</b>
<b>3.</b>	<b>METABOLISMO LIPÍDICO.....</b>	<b>10</b>
3.1.	Lipase Pancreática.....	10
3.2.	Propriedades Estruturais da Lipase Pancreática.....	12
3.3.	Ligação entre Lipase Pancreática- <i>Colipase</i> .....	13
3.4.	Lipase Pancreática Porcina (LPP).....	14
<b>4.</b>	<b>INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....</b>	<b>15</b>
4.1.	Inibição da Lipase Pancreática.....	15
<b>5.</b>	<b>ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE PANCREÁTICA.....</b>	<b>17</b>
5.1.	Parâmetros Críticos dos Ensaios <i>in vitro</i> .....	17
5.1.1.	Tensoativos.....	17
5.1.2.	pH.....	19
5.1.3.	Temperatura.....	19
5.1.4.	Íons Metálicos.....	20
5.1.5.	Substratos.....	20
5.2.	Métodos de Determinação da Atividade.....	21
5.2.1.	Método Titulométrico.....	21
5.2.2.	Método Espectrofotométrico.....	22
5.2.3.	Método Colorimétrico.....	23
5.2.4.	Métodos Cromatográficos.....	24
5.2.5.	Método Fluorimétrico.....	25
<b>6.</b>	<b>SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A LIPASE PANCREÁTICA.....</b>	<b>26</b>
6.1.	Saponinas.....	27
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a obesidade pode ser definida como uma doença crônica, prevalente tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em via de desenvolvimento, podendo afetar crianças e adultos (WHO, 2013). Em termos numéricos, a obesidade é caracterizada quando o Índice de Massa Corporal (IMC)\* excede 30 kg/m<sup>2</sup>, diferenciando-a da condição de sobrepeso, quando o IMC resulta entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH-US, 1998; MARINO *et al.*, 2010). Atualmente, é considerada um dos maiores desafios da saúde pública global, tendo-se em vista o significativo aumento de sua prevalência, gerando custos substanciais, diretos e indiretos, aos cofres públicos (RÖSSNER, 2002; BRASIL, 2013b).

Estratégias atuais para o tratamento da obesidade e sobrepeso incluem modificações dos hábitos alimentares e exercícios físicos, terapia com medicamentos e cirurgia bariátrica, isolados ou em combinação (ELANGBAM, 2009). O tratamento com medicamentos, geralmente, é recomendado para pacientes com IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup> ou para pacientes com IMC entre 27 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> que apresentem alguma comorbidade relacionada à obesidade (ELANGBAM, 2009; KANG e PARK, 2012). Esses medicamentos podem atuar mediante ação central, periférica ou a combinação de ambas (ELANGBAM, 2009). Entretanto, os medicamentos com atuação sobre o sistema nervoso central, inibidores do apetite, especificamente, apresentam efeitos adversos consideráveis, como aumento dos riscos de problemas cardiovasculares (WOOLTORTON, 2002; ELANGBAM, 2009). Assim como em outros países, no Brasil a comercialização das anfetaminas está proibida desde 2011 e os derivados da sibutramina em assunto de discussão, sendo que recentemente decidiu-se por manter sua comercialização, contudo sob monitoramento (BRASIL, 2013a).

Uma das causas da obesidade está associada ao desequilíbrio no metabolismo de lipídios, afetando, assim, a homeostase no organismo (HOFBAUER, 2002; WEIGLE, 2003; SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2004). Nesse contexto, a intervenção sobre o metabolismo lipídico surge como alternativa intermediária no tratamento dessa doença. Uma importante estratégia inclui o desenvolvimento de inibidores da digestão e absorção de lipídios através de mecanismos gastrointestinais, caracterizando uma intervenção periférica, ao invés de central (SHI e BURN, 2004; FOSTER-SCHUBERT e CUMMINGS, 2006).

---

\*O IMC é calculado através da fórmula: peso (kg)/altura (m<sup>2</sup>)



Essa potencial abordagem terapêutica implica na identificação, cada dia crescente, das enzimas envolvidas nesse metabolismo, entre elas, a lipase pancreática (**LP**), provavelmente tida como principal alvo terapêutico em potencial (SHI e BURN, 2004; BIRARI e BHUTANI, 2007).

Para avaliar a atividade inibitória sobre a LP é necessário dispor de ensaios específicos capazes de avaliar a atividade da enzima e, conseqüentemente, a sua posterior inibição. Alguns métodos desenvolvidos com intuito de avaliar *in vitro* a atividade da LP têm se fundamentado no doseamento dos ácidos graxos livres ou dos produtos liberados pela hidrólise do substrato (SMELTZER *et al*, 1992; HASAN *et al*, 2009).

O presente trabalho consiste em uma revisão crítica dos métodos de determinação da inibição da lipase pancreática, à luz de aspectos relevantes relacionados com características da enzima e os mecanismos de ação e inibição.

## 2. OBESIDADE

Não é possível abordar temas referentes à determinação da atividade inibitória da LP sem contextualizar a importância desses no marco da obesidade.

A obesidade é tida como uma doença crônica, sendo caracterizada como uma proporção anormal ou excessiva de massa de gordura no corpo. O excesso de peso é um fator predisponente para doenças como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes II, doenças cardiovasculares, apneia do sono e alguns tipos de câncer. Entre os diversos fatores que levam ao sobrepeso e à obesidade, merecem destaque aqueles de natureza genética, metabólica, comportamental e ambiental (RÖSSNER, 2002). No entanto, várias consequências negativas associadas ao excesso de peso são de caráter reversível, desaparecendo com o restabelecimento do peso normal (RÖSSNER, 2002; CALLE *et al.*, 1999; WHO, 2013).

A obesidade é considerada um dos maiores desafios da saúde pública do século XXI, tendo em vista o aumento de sua prevalência na população mundial em níveis estatisticamente alarmantes. Considera-se que há cerca de 475 milhões de adultos obesos, mais de 200 milhões de crianças em idade escolar acima do peso, e, pelo menos, 2,8 milhões de adultos que vão a óbito a cada ano como resultado do excesso de peso ou obesidade (RÖSSNER, 2002; WHO, 2013; IASO, 2013). De igual importância, é o impacto dos custos substanciais, diretos e indiretos, aos cofres públicos, associados à necessidade de serviços de prevenção, diagnóstico e tratamento do excesso de peso e de comorbidades correlatas (WHO, 2013; IASO, 2013).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, a proporção de pessoas com sobrepeso avançou de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011, e, a proporção de pessoas obesas avançou de 11,4% para 15,8%. Anualmente, o Sistema Único de Saúde gasta cerca de R\$ 488 milhões com o tratamento de doenças associadas à obesidade (BRASIL, 2013b).

Também, a obesidade pode resultar em impactos sociais, pois os obesos são muitas vezes estigmatizados, podendo desencadear graves problemas psicológicos associados à depressão e baixa autoestima, em detrimento da qualidade de vida e saúde mental do indivíduo (IASO, 2013).

### 3. METABOLISMO LIPÍDICO

Muitos organismos armazenam energia sob a forma de óleos e gorduras, derivados de ácidos graxos. Mais da metade da energia utilizada pelo coração, por exemplo, deriva desses ácidos graxos, que procedem de várias fontes, entre elas, das gorduras consumidas na dieta. (NELSON e COX, 2008).

Previamente à absorção, ocorre a hidrólise dos triglicerídeos ingeridos na dieta. O processo se inicia na boca, continua no estômago mediante uma lipase gástrica estável ao ácido, e se completa no duodeno pela ação da LP, principalmente. Essa ação das lipases sobre os lipídios permite a conversão dos triglicerídeos em mono- e diglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol. Os produtos liberados pela hidrólise de lipídios são absorvidos pelos enterócitos na forma de micelas formadas pelos sais biliares, colesterol e ácido lisofosfatídico, seguindo-se a ressíntese em triglicerídeos, que são armazenados nos adipócitos (BIRARI e BHUTANI, 2007; NELSON e COX, 2010; DE LA GARZA *et al.*, 2011).

A síntese e o metabolismo de ácidos graxos e triglicerídeos são processos coordenados, mediados por enzimas reguladas por estímulos nutricionais e hormonais. O metabolismo lipídico deve ser mantido em equilíbrio para que o organismo permaneça em homeostase. Caso esse equilíbrio seja perdido, podem desenvolver-se obesidade e doenças correlacionadas (SHI e BURN, 2004; BIRARI e BUTHANI, 2007).

Conseqüentemente, as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico são alvos potenciais da descoberta de novos fármacos capazes de inibir a digestão e absorção de lipídios em nível periférico (LUNDER *et al.*, 2005; ELANGBAM, 2009). Assim, o mecanismo do metabolismo lipídico e a identificação de enzimas relacionadas, com destaque para a LP, vêm sendo fortemente estudados visando ao tratamento da obesidade. Uma das principais vantagens dessa estratégia é a exclusão dos mecanismos de ação central (LUNDER *et al.*, 2005; ELANGBAM, 2009).

#### 3.1. Lipase Pancreática

Lipases são enzimas que digerem gorduras, incluindo triglicerídeos e fosfolipídios, e que desempenham um papel fundamental no metabolismo lipídico. As lipases humanas incluem o grupo de lipases pré-duodenais (lingual e gástrica) e o grupo das extra-duodenais

(pancreática, hepática, lipoproteica e endotelial) (MUKHERJEE, 2003; BIRARI e BHUTANI, 2007).

As lipases, também conhecidas como *triacylglycerolacil-hidrolases*, catalisam a hidrólise de triglicerídeos formando ácidos graxos livres e glicerol em meio aquoso, ou atuam na reação inversa em meio orgânico (KILINÇ *et al.*, 2002). A enzima remove os ácidos graxos das posições  $\alpha$  e  $\alpha'$  dos triglicerídeos, resultando em  $\beta$ -monoglicerídeos, ácidos graxos saturados de cadeia longa e ácidos graxos poliinsaturados (MUKHERJEE, 2003; SHI e BURN, 2004; BIRARI e BHUTANI, 2007). Além da atividade hidrolítica, essas enzimas catalisam as reações de esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise dos triglicerídeos (JOSEPH *et al.*, 2008; HASAN *et al.*, 2009). A especificidade dessas enzimas para a hidrólise de triglicerídeos varia consideravelmente, sendo que lipases de diferentes origens mostram afinidades diferentes para tri-, di-, e monoglicerídeos, e para vários álcoois alifáticos (KAPOOR e GUPTA, 2012).

A LP, sintetizada pelas células acinares do pâncreas, é uma das enzimas que compõem o suco pancreático, tornando-se essencial para a digestão, a nível intestinal, de gorduras ingeridas na dieta (MUKHERJEE, 2003). A secreção da enzima pode ser estimulada por hormônios intestinais, como a colecistocinina e a secretina, recebendo reforço por mecanismos colinérgicos (BOROVICKA *et al.*, 1997; MILED *et al.*, 2000). Sendo responsável pela hidrólise de 50 a 70% do total de gorduras ingeridas pela dieta, a LP tem sido amplamente utilizada para a determinação da eficácia de produtos como agentes antiobesidade (SHI e BURN, 2004; BIRARI e BHUTANI, 2007).

O substrato para a lipase é a fase não aquosa, constituída por agregados lipídicos e não por uma molécula única (ESPOSITO *et al.*, 1973; LAGOCKI *et al.*, 1973; MUKHERJEE, 2003). Contudo, sais biliares e outras substâncias anfifílicas dificultam a atividade da LP, impedindo a ligação da enzima com a superfície lipídica (RUGANI *et al.*, 1995; VAN TILBEURGH *et al.*, 1999). Para que a enzima atue de forma ideal, faz-se necessária a presença de um cofator, a *colipase*, uma proteína exócrina do pâncreas que, na presença das substâncias interferentes, atua ancorando a enzima na interface entre água-lipídio (BROCKMAN, 2000; RUGANI *et al.*, 1995; MUKHERJEE, 2003).

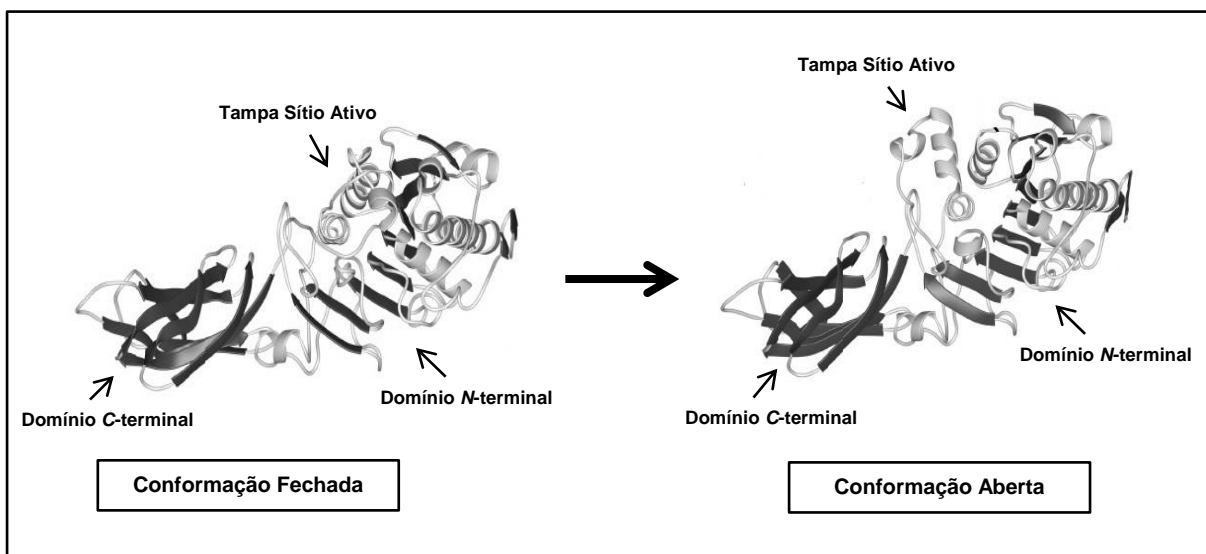
### 3.2. Propriedades Estruturais da Lipase Pancreática

A LP é uma enzima solúvel em água, com tamanho de 50 kDa, composta por 449 resíduos de aminoácidos, apresentando dois domínios estruturais: um domínio *N*-terminal grande (resíduos 1-336) e um domínio *C*-terminal menor (resíduos 337-449), demonstrado nas figuras 1 e 2 (WINKLER *et al.*, 1990; MILED *et al.*, 2000).

O domínio *N*-terminal contém um sítio ativo composto por uma tríade catalítica formada por Ser 152, Asp 176 e His 263. Identificou-se uma superfície em alça denominada *tampa do domínio*, formada por uma ponte dissulfeto entre os resíduos 237 e 261, cobrindo o sítio ativo (WINKLER *et al.*, 1990; LOWE, 2002). Essa superfície é estabilizada através de ligações de van der Waals com outras duas alças denominadas  $\beta 5$ , formada pela ligação entre os resíduos 75 e 84, e  $\beta 9$ , formada pela ligação entre os resíduos 203 e 223 (WINKLER *et al.*, 1990; VAN TILBEURGH *et al.*, 1993; MILED *et al.*, 2000). Na presença de lipídios, há a hipótese de que esses três elementos sofram um rearranjo com o intuito de permitir o acesso do substrato ao sítio ativo (VAN TILBEURGH *et al.*, 1993; MILED *et al.*, 2000).

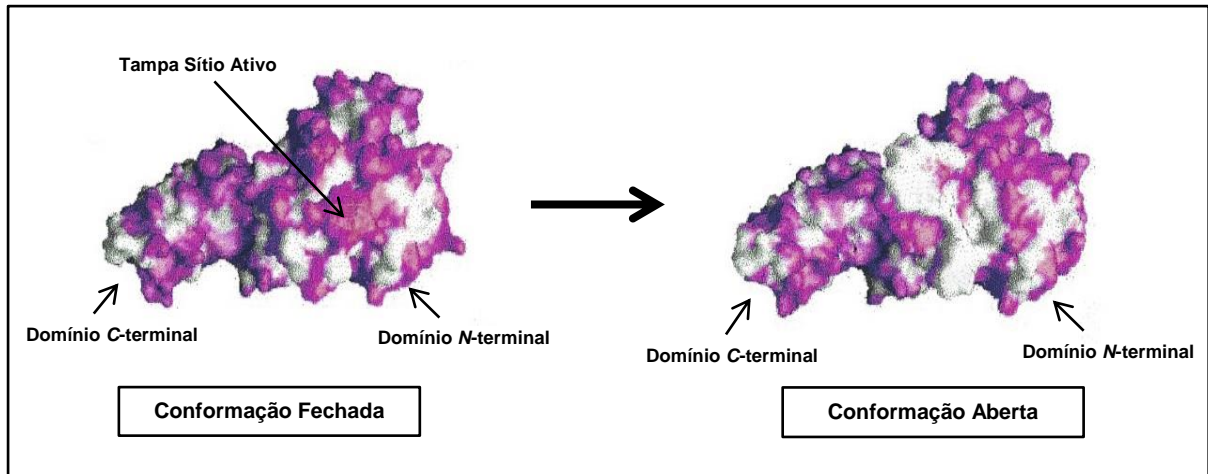
O domínio *C*-terminal da LP tem papel importante na ligação com a *colipase*. Entretanto, na ausência de interface, ou seja, substrato, não ocorre mudança conformacional na molécula da enzima induzida pela ligação com a *colipase* (CARRIÈRE *et al.*, 1998; MILED *et al.*, 2000).

**Figura 1** - Estrutura cristalográfica da LP



Fonte: Adaptado de LOWE, M. E. (2002).

**Figura 2** – Representação da superfície da LP



Fonte: Adaptado de MILED, N. *et al.* (2000).

### 3.3. Ligação entre Lipase Pancreática-Colipase

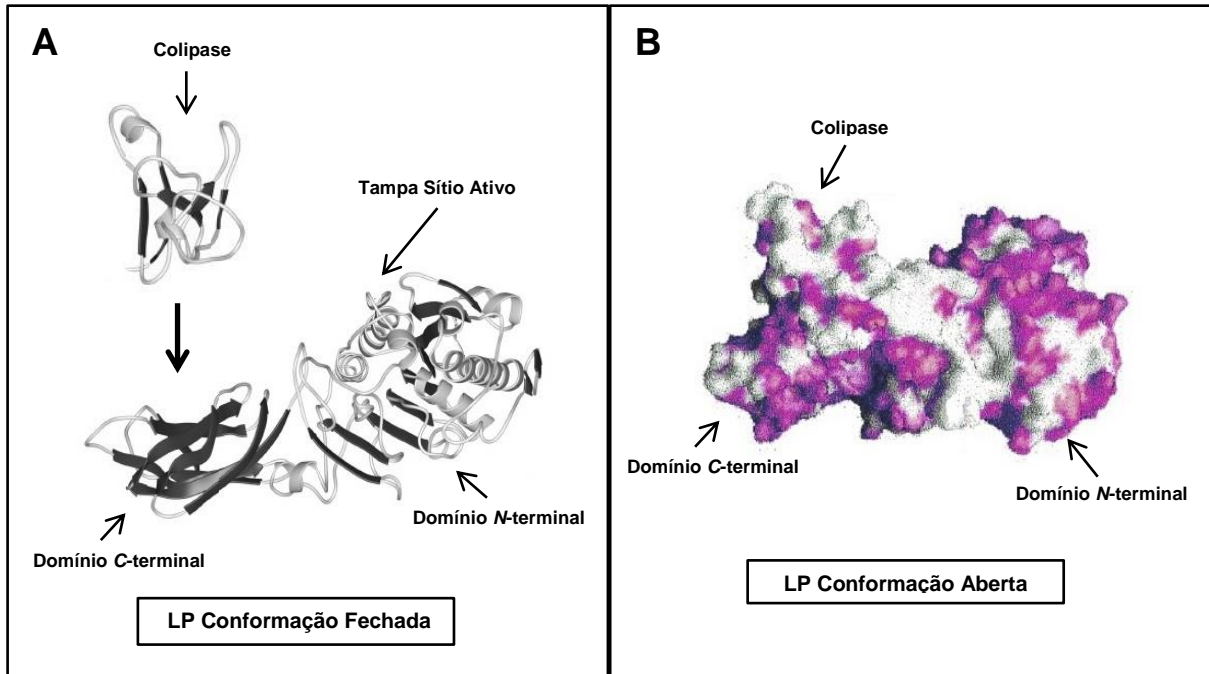
A *colipase* forma um complexo 1:1 com a LP (figura 3), facilitando a adsorção da enzima na superfície da interface lipídio-água coberta por sais biliares. O resultado disso é a hidrólise rápida e eficiente do substrato de triglicerídeos e fosfolipídios (BORGSTRÖM *et al.*, 1979; LARSSON e ERLANSON-ALBERTSSON, 1982; ERLANSON-ALBERTSSON, 1983; CARRIÈRE *et al.*, 1998). Na ausência de *colipase*, a LP é inativa frente à presença dos sais biliares encontrados no intestino delgado (CARRIÈRE *et al.*, 1998).

A *colipase* é uma proteína anfifílica, fato que explica sua capacidade de se ligar com a LP e, ao mesmo tempo, com o substrato lipídico (MILED *et al.*, 2000). A ligação com a LP ocorre mediante interações polares com sua extremidade hidrofílica, enquanto que o sítio de ligação interfacial com o substrato se dá pela extremidade formada por aminoácidos hidrofóbicos (CARRIÈRE *et al.*, 1998; MILED *et al.*, 2000).

A ligação LP-*colipase* é fortemente influenciada pela presença de lipídios, sendo que estudos revelaram que a orientação delas também depende do tipo de lipídio presente, resultando em consequências nas propriedades funcionais do complexo (ERLANSON-ALBERTSSON, 1982, 1983). Também, há relatos de que os produtos da lipólise exercem influência sobre a ligação LP-*colipase*, podendo, em alguns casos, ser maior do que a exercida pelo substrato. Nesse sentido, um aumento na interação entre a LP e a *colipase* na presença de

lipídios pode ser entendido como um aumento da concentração do componente hidrofóbico no meio. (PATTON *et al.*, 1978; ERLANSON-ALBERTSSON, 1983).

**Figura 3** - Estrutura e interação entre LP e *Colipase*



(A) Estrutura cristalográfica da *colipase* e da LP na conformação fechada; (B) Representação da superfície da ligação LP-*colipase*, na conformação aberta da LP. Fonte: Adaptado de MILED, N. *et al.* (2000) e LOWE, M. E. (2002).

### 3.4. Lipase Pancreática Porcina (LPP)

A LPP apresenta uma homologia de 86% com a LP humana, tornando-se uma das lipases mais utilizadas em reações de biotransformação (WINKLER *et al.*, 1990; BIRARI e BHUTANI, 2007). Também, a LPP é bastante termoestável, se mantém ativa em meios reacionais anidros, e é economicamente mais viável se comparada com as lipases de origem humana, microbiana e de outros animais (GOGOI *et al.*, 2008).

A LPP, assim como a LP humana, é uma pequena proteína globular composta por uma cadeia de 449 aminoácidos, possuindo um domínio N-terminal (resíduos 1-336) e um domínio C-terminal (resíduos 337-449). Como relatado anteriormente, a atividade hidrolítica da enzima resulta da combinação dos fatores lipase, *colipase* e sais biliares (DE CARO *et al.*, 1981; HERMOSO *et al.*, 1996; MENDES *et al.*, 2012).

## 4. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

As reações catalisadas por enzimas podem ser interrompidas ou retardadas pela temperatura, desidratação, pH, e também moléculas interferentes, genericamente denominados inibidores enzimáticos, que figuram entre algumas importantes substâncias de interesse farmacêutico e farmacológico (NELSON e COX, 2008).

Os inibidores enzimáticos são classificados em duas classes, de acordo com seu modo de ação: inibidores *reversíveis* e *irreversíveis* (NELSON e COX, 2008).

Os inibidores reversíveis compreendem dois grupos: os inibidores *competitivos*, que competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima e impedem sua ligação; e os inibidores *não competitivos*, que se ligam em um local diferente do sítio ativo, provocando a inibição da reação catalítica. Por sua vez, inibidores irreversíveis atuam ligando-se covalentemente com a enzima, ou formando uma ligação não covalente, porém, relativamente estável, ou destruindo um grupo funcional essencial para a sua atividade (NELSON e COX, 2008).

### 4.1. Inibição da Lipase Pancreática

Entre os principais mecanismos propostos para explicar a inibição da atividade da LP, dois deles destacam-se entre os demais. Assim, a LP pode ter sua atividade catalítica bloqueada através da inibição na interface lipídio-água, sendo específica, quando há alguma interação do inibidor com a lipase, ou não específica, quando não há interação com a enzima; e, também, através de ligação direta no seu sítio ativo, de forma irreversível (PIERONI, 1990; GUERCIOLINI, 1997; TISS, 2004; ALOULOU *et al.*, 2006).

A inibição específica na interface lipídio-água pode ser diferenciada em duas categorias:

- (i) A inibição via anticorpos monoclonais e;
- (ii) A inibição envolvendo o domínio C-terminal isolado.

Em relação à primeira, verificou-se que alguns anticorpos monoclonais, sintetizados a partir de epítomos da LP humana, foram capazes de reconhecer um epítopo conformacional no domínio C-terminal que, ao formarem complexos com a enzima, interferem na adsorção



interfacial, inibindo, assim, a atividade lipolítica (CHAHINIAN *et al.*, 2002; ALOULOU *et al.*, 2006).

No que tange à segunda categoria, a inibição através do domínio C-terminal, isolado da estrutura da enzima, baseia-se na capacidade deste de competir com a LP pela ligação com a *colipase*, na presença de elevadas concentrações micelares de sais biliares, impedindo a ancoragem na interface lipídio-água (AYVAZIAN, 1996, 2001; ALOULOU *et al.*, 2006).

A inibição não específica pode ser exemplificada através dos sais biliares. Como mencionado anteriormente, os sais biliares, moléculas com características anfifílicas, impedem a adsorção da LP na interface lipídio-água, inibindo a lipólise, de forma não específica (BORGSTRÖM 1975; MOMSEN e BROCKMANN, 1976; BEZZINE *et al.*, 1999; ALOULOU *et al.*, 2006). Da mesma forma, outras moléculas com características anfifílicas também podem apresentar efeitos inibidores, competindo com a LP pela ligação com a superfície lipídio-água. Pode-se citar como exemplo a albumina sérica bovina, que em elevadas concentrações diminui a ligação da LPP com a interface lipídio-água, reduzindo, portanto, a lipólise (BORGSTRÖM e ERLANSON, 1978; ALOULOU *et al.*, 2006).

Em relação à inibição por ligação direta no sítio ativo da enzima, um potente inibidor da LP é o Orlistat, uma  $\beta$ -lactona lipofílica sintetizada a partir da lipstatina, um produto natural do *Streptomyces toxytricini* (HADVÁRY *et al.*, 1988; BORGSTRÖM, 1988; LUNDER *et al.*, 2005; ALOULOU *et al.*, 2006). Este inibidor atua de forma covalente, formando um complexo com a enzima resultante do ataque nucleofílico da serina do sítio ativo da LP ao grupo  $\beta$ -lactona do fármaco (HADVÁRY *et al.*, 1991; ALOULOU *et al.*, 2006; TSUJITA *et al.*, 2006). Ao inibir a lipólise gastrointestinal, o Orlistat reduz em torno de 30% da absorção da gordura ingerida na dieta, sendo excretada quase totalmente pela via fecal (HAUPTMAN *et al.*, 2000; TOPLAK *et al.*, 2005; ELANGBAM, 2009).

Atualmente, o Orlistat (Xenical®, Hoffman-La Roche) é o único medicamento inibidor da LP disponível no mercado. Entretanto, apresenta diversos efeitos colaterais como flatulência, manchas oleosas, cólicas abdominais, urgência e incontinência fecal e esteatorréia, diminuindo a adesão do paciente ao tratamento e criando necessidade de tratamento adicional para minimizar esses efeitos indesejáveis (CHAPUT *et al.*, 2007; YUN, 2010).

## 5. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE PANCREÁTICA

Vários métodos foram desenvolvidos para avaliação da atividade lipolítica da LP *in vitro*, que pode, por exemplo, ser medida através da taxa de desaparecimento de um substrato ou da taxa de produção de um determinado produto (SMELTZER *et al.*, 1992; HASAN *et al.*, 2009). Além de observar as vantagens e possíveis restrições de cada protocolo no momento da escolha do método mais adequado, a confiabilidade nos resultados obtidos depende da identidade e qualidade da enzima utilizada, condições do meio reacional, possíveis interferentes e especificidade pelo substrato.

### 5.1. Parâmetros Críticos dos Ensaios *in vitro*

Tendo-se em vista a similaridade da LPP com a LP humana e o fato de ser uma das enzimas mais utilizadas nos trabalhos de avaliação da atividade da LP, os aspectos abordados apresentam um enfoque maior nas condições requeridas por essa enzima.

#### 5.1.1. Tensoativos

Alguns estudos para avaliar a atividade da LP utilizam substâncias anfifílicas com o intuito de maximizar a superfície de contato na interface lipídio-água e, com isso, favorecer as reações catalisadas pela enzima (DELORME *et al.*, 2011). Essas substâncias anfifílicas, ou tensoativos, têm uma forte influência sobre as interações físico-químicas na interface lipídio-água, causando redução da tensão interfacial, um conseqüente aumento do índice de dispersão das gotículas lipofílicas na forma de emulsão ou favorecendo a formação de micelas (TISS *et al.*, 2001; DELORME *et al.*, 2011).

Assim, sais biliares são tensoativos naturais que favorecem a dispersão dos produtos da hidrólise das gorduras mediante formação de micelas. Entretanto, observou-se que os sais biliares podem provocar inibição *in vitro* da atividade da LP, uma vez que esses também teriam a capacidade de se ligar ao substrato lipídico, reduzindo o contato direto entre substrato e enzima (MUN *et al.*, 2007; DELORME *et al.*, 2011; VIRANOV *et al.*, 2012). Estudos demonstram que os efeitos *in vitro* dos sais biliares sobre a LP dependem da sua concentração, assim uma maior proporção de sais biliares não conjugados tende a inibir a atividade da LP, enquanto que os sais biliares conjugados tendem a inibi-la quando em

concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) (BORGSTRÖM e ERLANSON, 1973; KNARREBORG *et al.*, 2003; BROWNLEE *et al.*, 2010). Por outro lado, alguns autores verificaram que os sais biliares conjugados em concentrações abaixo da CMC demonstraram um efeito estimulador sobre a lipólise (BORGSTRÖM e ERLANSON, 1973; BROWNLEE *et al.*, 2010). Algumas hipóteses foram levantadas, como uma possível estabilização da estrutura da enzima ou a formação de uma camada ótima de sais biliares na superfície do substrato, contudo esses resultados não foram confirmados (SCHOOR e MELIUS, 1970; BROCKERHOFF, 1971; BORGSTRÖM e ERLANSON, 1973). Ainda, outros estudos sugerem que os sais biliares evitam a adsorção da LP ao substrato por ligar-se ao sítio ativo da enzima (WILDE e CHU, 2011).

Analogamente aos sais biliares, tensoativos sintéticos também apresentam efeito inibidor sobre a LP, entretanto, ainda não existe consenso sobre o mecanismo responsável por essa inibição. Os tensoativos e a LP podem interagir, tanto em solução como na interface água-lipídio, sendo que as propriedades dos diferentes tensoativos (iônicos e não iônicos) podem modular essas interações (BROWNLEE *et al.*, 2010). Estudos indicam que tensoativos não iônicos promovem principalmente interações hidrofóbicas, enquanto os iônicos, por sua vez, promovem interações eletrostáticas relacionadas com a carga da enzima. Entretanto, independente do tensoativo escolhido, as interações entre esses dois componentes pode provocar diversas alterações sobre a estrutura e conformação da enzima e, também, sobre a interação entre a enzima e a interface lipídica (MILLER *et al.*, 2000; ANTIPOVA *et al.*, 2001; BROWNLEE *et al.*, 2010).

Segundo outros autores, os tensoativos competem com a LP pela adsorção na interface lipídica e, quando presentes em concentrações acima da CMC, mantêm a LP na fase aquosa e em sua forma inativa (TISS *et al.*, 2004; BROWNLEE *et al.*, 2010). Por outro lado, alguns estudos demonstram que os tensoativos podem induzir e, posteriormente, bloquear a forma ativa da enzima, tornando seu sítio ativo acessível a um eventual inibidor. Assim, por exemplo, o Orlistat teve sua atividade inibitória aumentada na presença de sais biliares, quando esses estavam em concentrações acima da CMC (BELLE *et al.*, 2007; BROWNLEE *et al.*, 2010). Além disso, alguns autores relatam que tensoativos com ligações éster em sua molécula podem, eventualmente, também servir de substrato para a enzima, configurando um mecanismo de competição com o substrato lipídico propriamente dito, como seria o caso do

polissorbato 20 (VON TIGERSTROM e STELMASCHUK, 1989; LEHNER e VERGER, 1997; GILHAM E LEHNER, 2005).

Tendo em vista que se trata de avaliação da atividade enzimática sobre substratos insolúveis, torna-se evidente a dificuldade de prever como esses tensoativos podem interagir, face à complexa compartimentalização da enzima entre várias faces e interfaces (BROWNLEE *et al.*, 2010). Outro efeito imponderável está relacionado com a capacidade dos tensoativos de formarem sistemas nano-estruturados, cuja complexidade é dependente da concentração de tensoativos utilizada no experimento (FLORENCE e ATWOOD, 2011).

### 5.1.2. pH

O pH do meio reacional não aparenta ser fator importante a considerar, embora a atividade máxima da LP ocorra na faixa entre 7,3 e 9,0 (MENDES *et al.*, 2012). Apesar de ser uma enzima alcalina, há relatos de sua atividade em meios neutros e moderadamente ácidos, sendo também estável nessas condições. Isso é coerente com a faixa de pH intestinal onde a LP atua, que varia de 5,0 a 7,0, e explica as diferenças entre as condições ótimas relatadas para ensaios *in vitro* com LP que visavam mimetizar as reações metabólicas *in vivo* (BAGI *et al.*, 1997; MENDES *et al.*, 2012). Alguns exemplos de substratos e respectivos valores de pH são: hidrólise de óleo de oliva emulsionado em pH entre 7,5 e 9,0; hidrólise de triacetina em pH 7,0; e hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila em pH entre 7,4 e 8,5 (BAGI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012).

### 5.1.3. Temperatura

A LP é classificada como uma enzima mesófila, apresentando atividade ótima na faixa de temperatura entre 35 e 45 °C. Para fins experimentais, é importante assegurar essa faixa de estabilidade térmica, de modo a melhor mimetizar as condições fisiológicas (BAI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012). Cabe salientar, por exemplo, que em solução Tris-HCl a 60 °C, a LP perde aproximadamente 90% de sua atividade original (LU *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2012).

#### 5.1.4. Íons Metálicos

Os sais de íons metálicos também têm um papel relevante na atividade da LP, que apresenta locais de ligação específicos, podendo induzir tanto efeitos positivos quanto efeitos negativos (SIMONS *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2012). Os íons metálicos  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , por exemplo, contribuem positivamente para a atividade da LP, entretanto por mecanismos distintos (FREITAS *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2012). O cálcio evita a inibição pelo acúmulo de produtos da ação enzimática, formando sais insolúveis de cálcio com os ácidos graxos liberados na hidrólise (LI *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2012). Já o íon sódio contribui aumentando o pH na interface enzima-lipídio, que tende a diminuir conforme progride a liberação de ácido graxos de cadeia longa, através da substituição dos íons hidrogênio pelos íons sódio em torno da enzima (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974; MENDES e DE CASTRO, 2005; MENDES *et al.*, 2012).

Contrariamente, os íons metálicos  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  são considerados inibidores potenciais da LP. Os três últimos íons inibem a enzima através de alteração na sua conformação nativa, ligando-se com os grupos SH dos resíduos cisteína da cadeia proteica (FREITAS *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2012).

#### 5.1.5. Substratos

Uma das propriedades mais importantes de qualquer enzima é a especificidade pelo seu substrato. Essa especificidade pode ser influenciada de duas formas: pelo efeito indutivo provocado pelos diferentes substituintes no substrato, sendo que átomos de halogênio, grupos nitro e ciano podem aumentar o processo de hidrólise, enquanto, por outro lado, o grupo hidroxila pode diminuí-la; e pelo impedimento estérico, por exemplo, pela diminuição na taxa de hidrólise de ésteres de álcoois secundários e fenólicos (MENDES *et al.*, 2012).

Na avaliação *in vitro* da atividade da LP, além dos substratos naturais, representados pelos ésteres de glicerol (tri-, di-, e monoacilgliceróis), ésteres de colesterol, fosfolipídios e os galactolipídios, também se utilizam os substratos sintéticos (MAURICH *et al.*, 1991a; MENDES *et al.*, 2012). É o caso dos substratos cromogênicos, representados por ésteres de ácidos graxos de *p*-nitrofenol,  $\beta$ -naftol, eosina, ácido salicílico, dimercaptoetanol ou por acilgliceróis esterificados com ácidos graxos contendo uma sonda cromogênica (MAURICH

*et al.*, 1991a). O palmitato de *p*-nitrofenila é um substrato utilizado para avaliar a atividade catalítica da LP e que libera *p*-nitrofenol, que pode ser detectado e quantificado espectrofotometricamente (WANG *et al.*, 1983; MAURICH *et al.*, 1991a).

## 5.2. Métodos de Determinação da Atividade

A atividade lipolítica da LP pode ser determinada por diferentes métodos. Os ácidos graxos livres ou outros produtos liberados durante a hidrólise dos substratos podem ser quantificados por titulação do ácido graxo ou por complexação desse com um reagente colorimétrico. Também, podem-se utilizar ésteres de *p*-nitrofenila como análogos dos substratos, seguido da quantificação por espectrometria UV-VIS ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os protocolos mais comumente utilizados na determinação da atividade da LP são comentados a seguir (PINSIRODOM e PARKIN, 2001; GILHAM e LEHNER, 2005; HASAN *et al.*, 2009).

### 5.2.1. Método Titulométrico

O método titulométrico, baseado na titulação da acidez resultante da liberação de ácidos graxos pela reação lipolítica, é comumente utilizado para determinar a atividade da LP e é tido como método de referência (BROCKMAN, 1981; DELLAMORA-ORTIZ *et al.*, 1997; PINSIRODOM e PARKIN, 2001; HASAN *et al.*, 2009). Trata-se de um método economicamente viável e de fácil execução, particularmente apropriado para caracterizar a atividade da enzima, assim como o fenômeno de ativação interfacial (HASAN *et al.*, 2009). Também, permite que praticamente qualquer triglicérido possa ser utilizado como substrato, desde que esse possa permanecer disperso em uma solução, evitando, conseqüentemente, erros resultados (JENSEN, 1983; PINSIRODOM e PARKIN, 2001).

Embora o método de titulação não seja o mais específico para ácidos graxos, a forma como é conduzido proporciona a especificidade desejada (PINSIRODOM e PARKIN, 2001). Para isso, é necessário considerar algumas variáveis críticas como:

- (i) A adição de etanol à emulsão com o intuito de facilitar a solubilização dos ácidos graxos;
- (ii) Escolha do indicador mais adequado, a fim de garantir a titulação completa de todos os ácidos graxos;

- (iii) Escolha de um tampão consistente com o pH ideal e que não interfira nos resultados da análise;
- (iv) Presença de íons que possam provocar a saponificação dos ácidos graxos, como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ .

No caso de substratos contendo triglicerídeos naturais ou sintéticos na forma de emulsão, o meio pode ser agitado mecanicamente, neutralizando-se os ácidos graxos liberados com hidróxido de sódio (PINSIRODOM e PARKIN, 2001; HASAN *et al.*, 2009). As principais restrições ao método são a baixa sensibilidade e o fato de não permitir o estudo da cinética de reação (GILHAM e LEHNER, 2005).

### 5.2.2. Método Espectrofotométrico

O método espectrofotométrico é comumente utilizado para investigar a atividade de esterases e lipases, utilizando-se como substrato ésteres de *p*-nitrofenila com cadeias alifáticas de diversos tamanhos (PINSIRODOM e PARKIN, 2001; GILHAM e LEHNER, 2005). Esse método está baseado na capacidade esterolítica da lipase, que libera como produto o *p*-nitrofenol, um composto cromóforo de coloração amarela, em meio levemente alcalino, que apresenta  $\lambda_{max}$  entre 400 — 410 nm (PINSIRODOM e PARKIN, 2001; GILHAM e LEHNER, 2005).

Em geral, ésteres de cadeia curta, como o butirato, são utilizados para determinar a atividade de esterase, enquanto que ésteres de cadeia longa, como laurato, palmitato e oleato, são utilizados para a atividade da lipase (GILHAM e LEHNER, 2005). Apesar da facilidade de aquisição e ampla utilização, deve-se levar em consideração a natureza sintética desses substratos, razão pela qual eles fornecem apenas valores presuntivos da atividade enzimática. Desse modo, o método deve ser empregado com cautela, sendo recomendado na realização de avaliações preliminares, que deverão ser confirmadas posteriormente por um método mais específico (PINSIRODOM e PARKIN, 2001).

Os ésteres mais utilizados são o laurato e o palmitato, sendo os resultados obtidos com esse último os que melhor se correlacionam com os obtidos pelo método titulométrico (SIGURGÍSLADÓTTIR *et al.*, 1993; HASAN *et al.*, 2009). Deve-se levar em consideração que ésteres de cadeia curta são solúveis em soluções tamponadas, enquanto que substratos de

cadeia longa, que incluem laurato e palmitato, requerem o uso de agentes emulsionantes (GILHAM e LEHNER, 2005).

Entre as vantagens do método espectrofotométrico cabe mencionar o fato de se tratar de um método prático, rápido, direto, que permite o estudo da cinética da atividade enzimática. Além disso, a execução do método requer a utilização de pequenos volumes, sendo adaptável para placas tipo Elisa de 96 poços e, conseqüentemente, passível de automação. Por essas características, é o método de escolha para triagem de várias amostras ou preparações (JAEGER e REETZ, 2000; PINSIRODOM e PARKIN, 2001; GILHAM e LEHNER, 2005).

Algumas das limitações relacionadas a esse método incluem:

- (i) A utilização do método é desaconselhada no caso de amostras biológicas, sendo mais indicado para o emprego em amostras de lipase purificada, por não conterem substâncias interferentes;
- (ii) A absorvância do *p*-nitrofenol é dependente do pH do meio reacional, motivo pelo qual os ensaios cinéticos devem ser realizados em pH neutro e alcalino, ainda que essa condição seja tida como desfavorável à atividade de algumas lipases. Uma forma de contornar essa limitação é aumentando o pH do meio reacional após se atingir o platô na cinética de reação;
- (iii) Qualquer eventual turvação introduzida na mistura reacional, como pode ocorrer durante a preparação da amostra contendo a lipase, causaria um aumento errôneo na leitura da absorvância (GILHAM e LEHNER, 2005).

### 5.2.3. Método Colorimétrico

O método colorimétrico, que é considerado mais específico do que o titulométrico, envolve a complexação dos ácidos graxos livres com uma substância cromogênica, podendo aumentar a velocidade e a sensibilidade dos ensaios de atividade da LP (LOWRY e TINSLEY, 1976; PINSIRODOM e PARKIN, 2001). O princípio do método se baseia na formação de complexos entre ácidos graxos e um metal bivalente, normalmente cobre, que posteriormente são analisados espectrofotometricamente, no comprimento de onda adequado. Os ácidos graxos liberados complexados em meio orgânico na forma de sais cúpricos apresentam coloração azul. A quantificação é com auxílio de uma curva analítica preparada



com ácido oleico (DUNCOMBE, 1963; PINSIRODOM e PARKIN, 2001; HASAN *et al.*, 2009).

Para aumentar a sensibilidade do método costuma-se adicionar piridina ao meio reacional, o que aumenta a solubilidade dos complexos formados (PINSIRODOM e PARKIN, 2001).

#### 5.2.4. Métodos Cromatográficos

A cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) constam entre os métodos mais recentes utilizados na determinação direta dos ácidos graxos ou compostos cromóforos liberados após a hidrólise do substrato (CHRISTIE, 1987; GUNSTONE *et al.*, 1994; HASAN *et al.*, 2009).

Pela técnica de CCD os lipídios podem ser visualizados pela exposição ao vapor de iodo após sua separação. Os valores de  $R_f$  das manchas reveladas são então comparados com os obtidos com as respectivas substâncias de referência (LEHNER e KUKSIS, 1992; GILHAM e LEHNER, 2005). Embora versátil e barato, a separação é demorada e a técnica carece de especificidade, permitindo apenas a caracterização dos produtos analisados. A alternativa, baseada no uso de substâncias radio-marcadas, possibilita rastrear a origem dos produtos da ação enzimática, porém, requer cuidados adicionais no momento da manipulação (GILHAM e LEHNER, 2005).

O CLAE permite a identificação e quantificação dos produtos da hidrólise pela LP, por exemplo, de ésteres de *p*-nitrofenol (MAURICH *et al.*, 1991a, 1991b; GILHAM e LEHNER, 2005). Esse método também pode ser utilizado para separar misturas de ácidos graxos livres, misturas de diferentes triglicerídeos e, também, misturas desses dois grupos (ERGAN e ANDRE, 1989; GILHAM e LEHNER, 2005). A identificação dos tipos de ácidos graxos é realizada por comparação dos tempos de retenção com substâncias de referência. A exigência de equipamento especializado e de reagentes de alto grau de pureza limita a utilização desta técnica de custo elevado (GILHAM e LEHNER, 2005).

A CG também pode ser utilizada para separar e quantificar os produtos de hidrólise da lipase, sendo preferível ao CLAE devido a sua maior sensibilidade (GILHAM e LEHNER, 2005; HASAN *et al.*, 2009). A técnica possibilita a quantificação simultânea de mono-, di-, e

triglicerídeos, e outros lipídios, requerendo apenas a adição de uma quantidade conhecida de padrão interno (PLANK e LORBEER, 1995; GILHAM e LEHNER, 2005). Ainda que se trate de um método extremamente sensível, apresenta a desvantagem de ser trabalhoso e de requerer equipamento especializado e de elevado custo (GILHAM e LEHNER, 2005).

#### **5.2.5. Método Fluorimétrico**

O método baseia-se na quantificação dos produtos da reação que se tornam fluorescentes após sofrerem o processo de hidrólise (GILHAM e LEHNER, 2005). Como substrato é possível utilizar um triglicerídeo com um grupo alquila substituído por uma porção com propriedade fluorescente, como o pireno (NEGRE *et al.*, 1985; THUREN *et al.*, 1987; GILHAM e LEHNER, 2005). Apresenta como principais vantagens a sensibilidade, o monitoramento contínuo da cinética da reação e não interferência da turbidez do meio reacional. A maior atividade lipolítica da LP é proporcional à intensidade da fluorescência medida (GILHAM e LEHNER, 2005).

## 6. SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A LIPASE PANCREÁTICA

Descobertas recentes têm feito com que produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais tradicionais despertem o interesse na busca de novas substâncias capazes de inibir a LP. Esse efeito inibidor tem sido demonstrado tanto para extratos, como para frações enriquecidas e compostos químicos isolados de diferentes espécies de vegetais. Alguns exemplos de extratos estão listados na tabela 1 (BIRARI e BHUTANI, 2007; SLANC *et al.*, 2009; BUSTANJI *et al.*, 2011).

Pode-se observar que os ensaios de avaliação da atividade inibitória dos extratos de diferentes espécies vegetais empregaram como substrato os de origem sintética preferencialmente, sendo o método espectrofotométrico o mais frequentemente utilizado. Conforme foi salientado anteriormente, este método apenas fornece dados preliminares sobre a atividade da LP. Assim sendo, os resultados listados devem ser vistos com cautela, necessitando de avaliações mais específicas. Por esse motivo e considerando a complexidade da composição desses extratos, os estudos levantados certamente não possibilitam a identificação das substâncias especificamente envolvidas na atividade inibitória da LP. Conseqüentemente, o eventual efeito sinérgico entre substâncias de classes químicas iguais ou diferentes não pode ser considerado, do mesmo modo que qualquer interferência sobre mecanismos de inibição fica vedada. Outra restrição à aceitação irrestrita dos dados até hoje relatados para extratos de plantas reside na diversidade de condições de reação, que incluem o uso de tensoativos no meio reacional. Neste último caso, as evidências indicam que, em determinadas circunstâncias, esse tipo de substância pode interferir seriamente na atividade determinada *in vitro*.

**Tabela 1** - Extratos de espécies vegetais com atividade inibitória sobre a LP, determinados por ensaios espectrofotométricos.

Nome Científico	Substrato*	Referência
<i>Amaranthus retroflexus</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Anchusa azurea</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Anthemis palestina</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Asparagus acutifolius</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Baccharis trimera</i>	PPN	SOUZA, S. <i>et al.</i> , 2011
<i>Bellis perennis</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica nigra</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica oleracea subs. capitata</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009

*Continua.*

Continuação.

Nome Científico	Substrato*	Referência
<i>Chrysanthemum coronarium</i> .	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Cleistocalyx operculatus</i>	PPN	ZHANG e LU, 2012
<i>Cnicus benedictus</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Cudrania tricuspidata</i>	BPN	KIM <i>et al.</i> , 2012
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Epilobium parviflorum</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Filipendula ulmaria</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Hypericum triquetrifolium</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Lythrum salicaria</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Malus domestica</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Malva nicaeensis</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Mentha spicata</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Morus bombycis</i>	BPN	KIM <i>et al.</i> , 2010
<i>Musa sapientum</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Olea sativa</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Ononis natrix</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Origanum syriacum</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Origanum vulgare</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Origanum vulgare subsp. viridulum</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Papaver rhoeas subsp. rhoeas</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Paronychia argentea</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Phaseolus vulgaris</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Picea abies</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Pisum sativum</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Portulaca orelacea</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Raphanus raphanistrum subsp. landra</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Raphanus sativus</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Reseda alba</i>	BPN	BUSTANJI <i>et al.</i> , 2011
<i>Rosmarinus officinalis</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Rubus caesius</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Rubus idaeus</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Rumex conglomeratus</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Salvia officinalis</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Satureja montana</i>	X-PAL	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Silene vulgaris</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Smyrniolus olusatrum</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Solanum tuberosum</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Sonchus asper</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Sonchus oleraceus</i>	OPN	CONFORTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Sorbus commixta</i>	BPN	YUN <i>et al.</i> , 2010
<i>Syzygium aromaticum</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Tilia platyphyllos</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Thymus pulegioides</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Vaccinium myrtillus</i>	PPN	SLANC <i>et al.</i> , 2009
<i>Viscum album</i>	BPN	YUN, 2010

Conclusão.

\*Palmitato de *p*-nitrofenila (PPN), Butirato de *p*-nitrofenila (BPN), Octanoato de *p*-nitrofenila (OPN), 5-bromo-4-cloro-3-indoxilpalmitato (X-PAL).

## 6.1. Saponinas

Entre os compostos químicos isolados, há relatos de atividade inibitória sobre a LP para polifenóis, metilxantinas, terpenos e saponinas (BIRARI E BHUTANI, 2007; DE LA

GARZA *et al.*, 2011). Dentre esses, dá-se destaque às saponinas em face de suas propriedades anfifílicas.

Saponinas são heterosídeos formados pela ligação de uma ou mais cadeias osídicas a um núcleo (aglicona) esteroide ou triterpênico. Constituem uma das classes de maior destaque entre os metabólitos secundários, podendo ocorrer em um grande número de espécies vegetais, sendo isoladas de raízes, rizomas, caules, cascas, folhas, sementes e frutos (SPARG *et al.*, 2004; VINCKEN *et al.*, 2007; DE LA GARZA *et al.*, 2011). Devido as suas características estruturais, as saponinas possuem propriedades anfifílicas, sendo identificáveis uma parte lipofílica, a aglicona, e outra hidrofílica, formada pelos açúcares (MITRA e DUNGAN, 1997; PAVEI *et al.*, 2007).

Além de seu emprego como tensoativo, as saponinas apresentam um grande número de propriedades biológicas e farmacológicas relevantes e têm despertado o interesse para a descoberta de propriedades ainda não estabelecidas (PAVEI *et al.*, 2007). Nesse contexto, alguns estudos avaliaram o potencial inibidor sobre a LP das saponinas de algumas espécies vegetais (tabela 2).

**Tabela 2** - Saponinas de espécies vegetais com atividade inibitória sobre a LP.

Nome Científico	Substrato	Método Determinação	Referência
<i>Aesculus turbinata</i>	OMU*	Fluorescência	KIMURA <i>et al.</i> , 2006
<i>Dioscorea nipponica</i>	OMU*	Fluorescência	KWON <i>et al.</i> , 2003
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Trioleína	Colorimétrico	LI <i>et al.</i> , 2007
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Óleo de Soja	Colorimétrico	YOSHIZUMI <i>et al.</i> , 2006
<i>Gardenia jasminoides</i>	Trioleína	CLAE	SHENG <i>et al.</i> , 2006
<i>Gypsophila oldhamiana</i>	Trioleína	Colorimétrico	ZHENG <i>et al.</i> , 2007
<i>Kochia scoparia</i>	Trioleína	Colorimétrico	HAN <i>et al.</i> , 2006
<i>Momordica charantia</i>	Trioleína	Colorimétrico	OISHI <i>et al.</i> , 2007
<i>Panax ginseng</i>	Trioleína	Colorimétrico	KARU <i>et al.</i> , 2007
<i>Panax japonicus</i>	Trioleína	Colorimétrico	HAN <i>et al.</i> , 2005
<i>Panax quinquefolium</i>	Trioleína	Colorimétrico	LIU <i>et al.</i> , 2008
<i>Platycodi radix</i>	Trioleína	Colorimétrico	XU <i>et al.</i> , 2005
<i>Sapindus rarak</i>	Trioleína	Colorimétrico	MORIKAWA <i>et al.</i> , 2009
<i>Scabiosa tschiliensis</i>	Trioleína	Colorimétrico	ZHENG <i>et al.</i> , 2004

\*Oleato de  $\rho$ -metilumbeliferona (OMU)

Como pode se constatar, os estudos listados relatam o uso preponderante da trioleína como substrato para a enzima, sendo o método colorimétrico desenvolvido por Zapf e col. (1981) o mais utilizado na determinação da atividade inibitória da LP, em alguns casos com modificações.

Em relação ao meio reacional, apenas o estudo realizado por Sheng e col. (2006) fez uso da *colipase*. Os demais ensaios fizeram uso apenas da LP. Praticamente todos os trabalhos fizeram uso de agentes com características tensoativas, a citar taurocolato de sódio e fosfatidilcolina. Apesar disso, a avaliação de eventuais interferências analíticas causadas por essas substâncias não consta em nenhum dos trabalhos acima listados. Como mencionado anteriormente, tensoativos podem interferir na atividade da LP, alterando os resultados determinados *in vitro*. A utilização de taurocolato de sódio na emulsificação do substrato, por exemplo, interferiu na atividade enzimática da LP, provocando uma diminuição na mesma (MARTINS *et al.*, 2010). Contrariamente, outros resultados relatados, onde sais biliares, incluindo ácido taurocólico, foram adicionados ao meio reacional não contemplaram essa interação dos tensoativos e a sua influência sobre a ativação ou inibição da atividade enzimática.

Em geral, os estudos se limitam a relatar a existência ou não da atividade inibitória, com exceção de dois deles. Sheng e col. (2006) propõem um possível mecanismo de ação das saponinas de *Gardenia jasminoides* baseado na competição pelo substrato dessas com a enzima. De forma similar, Oishi e col. (2007) propõem que a fração saponosídica de *Momordica charantia* interage com o substrato, reduzindo a área de contato entre substrato e a LP, inibindo-a, indiretamente.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos vem se observando uma intensificação na busca de novas alternativas terapêuticas no tratamento da obesidade. Nesse contexto, a inibição da atividade da LP tem se convertido em objeto de estudos destinados à identificação de substâncias que representem novos modelos moleculares e que sejam capazes de inativá-la seletivamente. Contudo, os aspectos que incidem na escolha e realização do método de determinação da atividade inibitória da LP são vários e distintos.

No que se refere aos produtos naturais de origem vegetal, os dados levantados mostram que os estudos foram realizados, majoritariamente, com os extratos brutos, mediante determinação pelo método espectrofotométrico e uso de substratos sintéticos. Contrariamente, os estudos realizados com frações saponosídicas utilizaram o método colorimétrico e substratos naturais. Este fato impede chegar a conclusões inequívocas, uma vez que o método escolhido pode não ser o mais indicado para as características da substância e do substrato utilizados.

Outro aspecto a ser levantado refere-se ao padrão de referência. Nem todos os ensaios mencionam a utilização de um fármaco de referência, mas quando mencionam, é o Orlistat. Este fármaco tem seu mecanismo de ação bem estabelecido e atua diretamente sobre a LP, inibindo-a de forma irreversível. Isso implica que um resultado positivo para a substância testada, em um ensaio realizado nas mesmas condições experimentais que o Orlistat, ocorreu de condições experimentais favoráveis a ambos, pressupondo-se um mecanismo de ação similar ao do Orlistat. Contudo, existe evidência que algumas substâncias dependem de fatores específicos para exercer atividade inibitória da LP *in vitro*, o que poderia levar a resultados falso-negativos decorrentes de condições experimentais inapropriadas.

Do ponto de vista analítico, as perspectivas futuras apontam para necessidade de:

- (i) Avaliar a atividade enzimática da LP em um meio reacional que mimetize o mais próximo possível o meio intestinal *in vivo*;
- (ii) Avaliar e padronizar criteriosamente o método de determinação da atividade inibitória da LP segundo as peculiaridades da substância testada e do substrato utilizado e;

- (iii) Face ao conhecimento acumulado sobre o mecanismo de ação das lipases, avaliar a atividade das substâncias candidatas visando estabelecer o mecanismo de ação próprio.



## REFERÊNCIAS

- ALOULO, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDEZ, S.; VAN OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 995-1013, 2006.
- ANTIPOVA, A.; SEMENOVA, M.; BELYAKOVA, L.; IL'IN M.M. On relationships between molecular structure, interaction and surface behavior in mixture: small-molecule surfactant + protein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 21, n. 1/3, p. 217-30, 2001.
- AYVAZIAN, L.; CRENON, I.; GRANON, S.; CHAPUS, C.; KERFELEC, B. Recombinant C-terminal domain of pancreatic lipase retains full ability to bind colipase. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 9, p. 707-711, 1996.
- AYVAZIAN, L.; KERFELEC, B.; GRANON, S.; FOGLIZZO, E.; CRENON, I.; DUBOIS, C.; CHAPUS, C. The lipase C-terminal domain. A novel unusual inhibitor of pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 14014-14018, 2001.
- BAI, Y.X.; LI, Y.F.; YANG, Y.; YI, L.X. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase on to functionalized nanoscale SiO<sub>2</sub> spheres. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 770-777, 2006.
- BAGI, K.; SIMON, L.M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 531-535, 1997.
- BELLE, V.; FOURNEL, A.; WOULDSTRA, M.; RANALDI, S.; PRIERI, F.; THOME, V. Probing the opening of the pancreatic lipase lid using site-directed spin labeling and EPR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 46, p. 2205-2214, 2007.
- BEZZINE, S.; FERRATO, F.; IVANOVA, M.G.; LOPEZ, V.; VERGER, R.; CARRIÈRE, F. Human pancreatic lipase: colipase dependence and interfacial binding of lid domain mutants. **Biochemistry**, v. 38, p. 5499-5510, 1999.
- BIRARI, R.B.; BHUTANI, K.K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19/20, p. 879-880, 2007.
- BORGSTRÖM, B.; ERLANSON, C. Pancreatic lipase and colipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. **European Journal of Biochemistry**, v.37, p. 60-68, 1973.
- BORGSTRÖM, B. On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. **Journal of Lipid Research**, v. 16, p. 411-417, 1975.
- BORGSTRÖM, B.; ERLANSON, C. Interactions of serum albumin and other proteins with pancreatic lipase. **Gastroenterology**, v. 75, p. 382-386, 1978.
- BORGSTRÖM, B.; WIELOCH, T.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Evidence for a pancreatic pro-colipase and its activation by trypsin. **FEBS Lett**, v. 108, p. 407-410, 1979.
- BORGSTRÖM, B. Mode of action of tetrahydrolipstatin: A derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 962, p. 308-316, 1988.

BOROVICKA J.; SCHWIZER W.; METTRAUX C.; KREISS C.; REMY B.; ASAL K.; JANSEN J.B.M.J.; DOUCHET I.; VERGER R.; FRIED M. Regulation of gastric and pancreatic lipase secretion by CCK and cholinergic mechanisms in humans. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. G374-G380, 1997.

BRASIL (a). Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **ANVISA mantém monitoramento do uso da sibutramina**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acessado em: 04/06/2013.

BRASIL (b). Ministério da Saúde. Doenças ligadas à obesidade custam R\$ 488 milhões. **Prevenção e Tratamento**. Disponível em: <www.saude.gov.br> Acessado em: 04/06/2013.

BROCKERHOFF, H. On the function of bile salts and proteins as cofactors of lipase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 5828-5831, 1971.

BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R.G. **Lipolytic Enzymes**. New York: Academic Press, 1974.

BROCKMAN, H.L. Triglyceride lipase from porcine pancreas. **Methods Enzymology**, v. 71, p. 619-27, 1981.

BROCKMAN, H.L. Kinetic behaviour of the pancreatic lipase-colipase-lipid system. **Biochimie**, v. 82, p. 987-995, 2000.

BROWNLEE, I.A.; FORSTER, D.J.; WILCOX, M.D.; DETTMAR, P.W.; SEAL, C.J.; PEARSON, J.P. Physiological parameters governing the action of pancreatic lipase. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 146-154, 2010.

BUSTANJI, Y.; MOHAMMAD, M.; HUDAIB, M.; TAWAHA, K.; AL-MASRI, I.M.; ALKHATIB, H.S.; ISSA, A.; ALALI, F.Q. Screening of some medicinal plants for their pancreatic lipase inhibitory potential. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 81-88, 2011.

CALLE, E.E.; THUN, M.J.; PETRELLI, J.M.; RODRIGUEZ, C.; HEATH, C.W. Body mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1097-1105, 1999.

CARRIÈRE, F.; WITHERS-MARTINEZ, C.; VAN TILBEURGH, H.; ROUSSEL, A.; CABBILLAU, C.; VERGER, R. Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1376, p. 417-432, 1998.

CHAHINIAN, H.; BEZZINE, S.; FERRATO, F.; IVANOVA, M.G.; PEREZ, B.; LOWE, M.E.; CARRIÈRE, F. The beta 5' loop of the pancreatic lipase C2-like domain plays a critical role in the lipase-lipid interactions. **Biochemistry**, v. 41, p. 13725-13735, 2002.

CHAPUT, J.P.; ST-PIERRE, S.; TREMBLAY, A. Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 3-10, 2007.

CHRISTIE W. **HPLC and lipids: A practical guide**. New York: Pergamon press, 1987.

CONFORTI, F.; PERRI, V.; MENICHINI, F.; MARRELLI, M.; UZUNOV, D.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Wild mediterranean dietary plants as inhibitors of pancreatic lipase. **Phytotherapy. Research**, v. 26, n. 4, p. 600-604, 2011.

DE CARO, J.; BOUDOUARD, M.; BONICEL, J.; GOUDONI, A.; DESNUELLE, P.; ROVERY, M. Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 671, p. 129-138, 1981.

DE LA GARZA, A.L.; MILAGRO, F.I.; BOQUE, N.; CAMPIÓN, J.; MARTÍNEZ, J.A. NATURAL Inhibitors of pancreatic Lipase as new players in obesity treatment. **Planta Medica**, v. 77, p. 773-785, 2011.

DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; MARTINS, R.C.; ROCHA, W.L.; DIAS, A.P. Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 26, p. 111-116, 1997.

DELORME, V.; DHOUIB, R.; CANAAN, S.; FOTIADU, F.; CARRIÈRE, F.; CAVALIER, J.F. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 1831-1842, 2011.

DUNCOMBE, W.G. The colorimetric determination of long- chain fatty acids in the 0,05–0,5  $\mu$ mol range. **Biochemical Journal**, p. 88-97, 1963.

ELANGBAM, C. S. Review Paper: Current strategies in the development of anti-obesity drugs and their safety concerns. **Veterinary Pathology**, V. 46, p. 10-24, 2009.

ERGAN, F.; ANDRE, G. Simple high performance liquid chromatography methods for monitoring lipase reactions. **Lipid**, v. 24, p. 76-78, 1989.

ERLANSON-ALBERTSSON, C.; ÅKERLUND, H.E. Conformational change in pancreatic lipase induced by colipase. **FEBS Lett**, v. 155, 38-42, 1982.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. The interaction between pancreatic lipase and colipase: a protein-protein interaction regulated by a lipid. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 162, n. 2, p. 225-229, 1983.

ESPOSITO, S.; SEMERIVA, M.; DESNUELLE, P. Effect of surface pressure on the hydrolysis of ester monolayers by pancreatic lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 302, p. 293-304, 1973.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical principles of pharmacy**. 5. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011.

FOSTER-SCHUBERT, K.E.; CUMMINGS, D.E. Emerging therapeutic strategies for obesity. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 779-793, 2006.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V.H.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1725-1731, 2007.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity *in vitro*. **Methods**, v. 36, p. 139-147, 2005.

GOGOI, S.; PATHAK, M.G.; DUTTA, A.; DUTTA, N.N. Porcine pancreas lipase catalized synthesis of lauryl laurate in organic solvent media: A kinetic study. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 45, p. 192-197, 2008.

GUERCIOLINI, R. Mode of action of Orlistat. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 21, n. 23, p. 12-23, 1997.

GUNSTONE, F.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. **The lipid handbook**. London: Chapman & Hall, 1994.

HADVÁRY, P.; LENGSELD, H.; WOLFER, H. Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. **Biochemistry**, v. 256, p. 357-361, 1988.

HADVÁRY, P.; SIDLER, W.; MEISTER, W.; VETTER, W.; WOLFER, H. The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 2021-2027, 1991.

HAN, L.K.; ZHENG, Y.N.; YOSHIKAWA, M.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 5-9, 2005.

HAN, L.K.; NOSE, R.; LI, W.; GONG, X.J.; ZHENG, Y.N.; YOSHIKAWA, M.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. Reduction of Fat Storage in Mice fed a High-fat Diet Long Term by Treatment with Saponins prepared from *Kochia scoparia* Fruit. **Phytotherapy Research**, v.20, p. 877-882, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.

HAUPTMAN, J.; LUCAS, C.; BOLDRIN, M.N.; COLLINS, H.; SEGAL, K.R. Orlistat in the long-term treatment of obesity in primary care settings. **Archives of Family Medicine**, v. 9, p. 160-167, 2000.

HERMOSO, J.; PIGNOL, D.; KERFELEC, B.; CRENON, I.; CHAPUS, C.; FONTECILLA-CAMPS, J.C. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoethyl ether complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 18007-18016, 1996.

HOFBAUER, K.G. Molecular pathways to obesity. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. S18-S27, 2002.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY (IASO). **The global epidemic**. Disponível em: <[www.iaso.org](http://www.iaso.org)> Acessado em: 04/06/2013.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 68-73, 2000.

JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.

JOSEPH, B.; RAMTEKE P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457-470, 2008.

KANG, J.G.; PARK, C.Y. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 36, p. 13-25, 2012.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

KARU, N.; REIFEN, R.; KEREM, Z. Weight gain reduction in mice fed *Panax ginseng* Saponin, a pancreatic lipase inhibitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2824-2828, 2007.

KILINÇ, A.; ÖNAL, S.; TELEFONCU, A. Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 641-647, 2002.

KIM, Y.S.; LEE, Y.M.; KIM, H.; KIM, J.; JANG, D.S.; KIM, J.H.; KIM, J.S. Anti-obesity effect of *Morus bombycis* root extract: Anti-lipase activity and lipolytic effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 621-624, 2010.

KIM, Y.S.; LEE, Y.; KIM, J.; SOHN, E.; KIM, C.S.; LEE, Y.M.; JO, K.; SHIN, S.; SONG, Y.; KIM, J.H.; KIM, K.S. Inhibitory activities of *Cudrania tricuspidata* leaves on pancreatic lipase *in vitro* and lipolysis *in vivo*. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KIMURA, H.; OGAWA, S.; JISAKA, M.; KIMURA, Y.; KATSUBE, T.; YOKOTA, K. Identification of novel saponins from edible seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* Blume) after treatment with wooden ashes and their nutraceutical activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1657-1665, 2006.

KNARREBORG, A.; JENSEN, S.K.; ENGBERG, R.M. Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 259-265, 2003.

KOWN, C.S.; SOHN, H.Y.; KIM, S.H.; KIM, J.H.; SON, K.H.; LEE, J.S.; LIM, J.K.; KIM, J.S. Antiobesity effect of *Dioscorea Nipponica* Makino with Lipase-inhibitory activity in rodents. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 7, p. 1451-1456, 2003.

LAGOCKI, J.; LAW, J.; KEZDY, F. The kinetic study of enzyme action on substrate monolayers. Pancreatic lipase reactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 580-587, 1973.

LARSSON, A.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. The identity of two forms of activated colipase from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 664, p. 538-48, 1982.

LEE, D.G.; PONVEL, K.M.; KIM, M.; HWANG, S.; AHN, I.S.; LEE, C.H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 62-66, 2009.

LEHNER, R.; KUKSIS, A. Utilization of 2-monoacylglycerols for phosphatidylcholine biosynthesis in the intestine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1125, p. 171-179, 1992.

LEHNER, R.; VERGER, R. Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase. **Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1861-1868, 1997.

LI, F.; LI, W.; FU, H.; ZHANG, Q.; KOIKE, K. Pancreatic Lipase-Inhibiting Triterpenoid Saponins from fruits *Acantophanax senticosus*. **Chemical & Pharmaceutical Bull.**, v.55, n. 7, p. 1087-1089, 2007.

LI, Y.; ZHOU, G.; LI, C.; QIN, D.; QIAO, W.; CHU, B. Adsorption and catalytic activity of porcine pancreatic lipase on Rod-like SBA-15 mesoporous material. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 341, p. 79-85, 2009.

LI, Y.; HU, M.; MCCLEMENTS, D.J. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardized pH-stat method. **Food Chemistry**, v. 126, p. 498-505, 2011.

LIU, W.; ZHENG, Y.; HAN, L.; WANG, H.; SAITO, M.; LING, M.; KIMURA, Y.; FENG, Y. Saponins (Ginsenosides) from stems and leaves of *Panax quinquefolium* prevented high fat diet induced obesity in mice. **Phytomedicine**, v. 15, p. 1140-1145, 2008.

LOWE, M.E.; The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 2007-2016, 2002.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.53, p. 470-472, 1976.

LU, S.; HE, J.; GUO, X. Architecture and performance of mesoporous silica-lipase hybrids via non-covalent interfacial adsorption. **AIChE Journal**, v. 56, n. 2, p. 506-514, 2012.

LUNDER, M.; BRATKOVIC, T.; KREFT, S.; STRUKELJ, B. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 1512-1515, 2005.

MARINOU, K.; TOUSOULIS, D.; ANTONOPOULOS, A.S.; STEFANADI, E.; STEFANADIS, C. Obesity and cardiovascular disease: From pathophysiology to risk stratification. **International Journal of Cardiology**, v. 138, p. 3-8, 2010.

MARTINS, F.; NOSO, T.M.; PORTO, V.B.; CURIEL, A.; GAMBERO, A.; BASTOS, D.H.M.; 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**, v. 18, p. 42-47, 2010.

MAURICH, V.; MONEGHINI, M.; ZACCHIGNA, M.; PITOTTI, A.; LENCIONIP, E. High performance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 427-431, 1991a.

MAURICH, V.; ZACCHIGNA, M.; PITOTTI, A. p-nitrophenyllaurate: a substrate for the high-performance liquid chromatographic determination of lipase activity **Journal Chromatography**, v. 566, p. 453-459, 1991b.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 135-142, 2005.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MILED, N.; CANAANA, S.; DUPUISA, L.; ROUSSELB, A.; RIVIÈREA, M.; CARRIÈREA, F.; CAROA, A.; CABBILLAUB, C.; VERGERA, R. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. **Biochimie**, v. 82, p. 973-986, 2000.

MILLER, R.; FAINERMAN, V.; MAKIEVSKI, A.; KRÄGEL, J.; GRIGORIEV, D.; KAZAKOV, V. Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 86, n. 1/2, p. 39-82, 2000.

MITRA, S.; DUNGAN, S.R. Micellar properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of temperature, salt, and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1587-1595, 1997.

MOMSEN, W.E.; BROCKMANN, H.L. Inhibition of pancreatic lipase B activity by taurodeoxycholate and its reversal by colipase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 384-388, 1976.

MORIKAWA, T.; XIE, Y.; ASAO, Y.; OKAMOTO, M.; YAMASHITA, C.; MURAOKA, O.; MATSUDA, H.; PONGPIRIYADACHA, Y.; YUAN, D.; YOSHIKAWA, M. Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1166-1172, 2009.

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

MUN, S.; DECKER, E.A.; JULIAN, MCCLEMENTS, D. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. **Food Research International**, v. 40, p. 770-781, 2007.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, IN COOPERATION WITH THE NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. **Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The Evidence Report**. Washington DC: US Government Press, 1998.

NEGRE, A.E.; SALVAYRE, R.S.; DAGAN, A.; GATT, S. New fluorometric assay of lysosomal acid lipase and its application to the diagnosis of wolman and cholesteryl ester storage diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 149, n. 1, p. 81-88, 1985.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5. ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

OISHI, Y.; SAKAMOTO, T.; UDAGAWA, H.; TANIGUCHI, H.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; OZAWA, Y.; TAKITA, T. Inhibition of increases in blood glucose and serum neutral fat by *Momordica charantia* saponin fraction. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 735-740, 2007.

PATTON, J.S.; ALBERTSSON, P.A.; ERLANSON, C.; BORGSTRÖM, B. Binding of porcine pancreatic lipase and colipase in the absence of substrate studied by two-phase partition and affinity chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 4195-4202, 1978.

PAVEL, C.; GUZATTO, P.; PETROVICK, P.R.; GOSMANN, G.; ORTEGA, G.G. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 30, n. 1, p. 87-95, 2007.

PIERONI, G.; GARGOURI, Y.; SARDA, L.; VERGER, R. Interactions of lipases with lipid monolayers. facts and questions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 32, p. 341-378, 1990.

PINSIRODOM, P.; PARKIN, K.L. Lipase assays. In: WROLSTAD, R.E; ACREE, T.E.; DECKER, E.A.; PENNER, M.H.; REID, D.S.; SCHWARTZ, S.J.; SHOEMAKER, C.F.; SMITH, D.M.; SPORNS, P. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2001.

PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography **Journal Chromatography A**, v. 697, p. 461-468, 1995.

RÖSSNER, S. Obesity: the disease of the twenty-first century. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 52-54, 2002.

RUGANI, N.; CARRIÈRE, F.; THIM, L.; BORGSTRÖM, B.; SARDA, L. Lipid binding and activating properties of porcine pancreatic colipase split at the Ile<sup>79</sup>-Thr<sup>80</sup> bond. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1247, p. 185-194, 1995.

SCHOOR, W. P.; MELIUS, P. The influence of sodium taurocholate on the pancreatic lipase-substrate adsorption and activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 212, p. 173-175, 1970.

SHENG, L.; QIAN, Z.; ZHENG, S.; XI, L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase. **European Journal of Pharmacology**, v. 543, p. 116-122, 2006.



SHI, Y.; BURN, P. Lipid metabolic enzymes: Emerging drug targets for the treatment of obesity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 695-710, 2004.

SIGURGÍSLADÓTTIR, S.; KONRÁSDÓTTIR, M.; JÓNSSON, A.; KRISTJÁNSSON, J.K.; MATTHIASSON, E. Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. **Biotechnology Lett.**, v. 15, p. 361-366, 1993.

SIMONS, J. W. F. A.; GÖTZ, F.; EGMOND, M. R.; VERHEIJ, H. M. Biochemical properties of staphylococcal (phospho)lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 27-37, 1998.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANE, D.S.; ÍTRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 874-877, 2009.

SMELTZER, M.S.; HART, M.E.; IANDOLO, J.J. Quantitative spectrophotometric assay for Staphylococcal lipase. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2815-2819, 1992.

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

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.

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

THUREN, T.; VIRTANEN, J.A.; VERGER, R.; KINNUNEN, P.K. Hydrolysis of 1-palmitoyl-2-[6-(pyren-1-yl)]hexanoyl-sn-glycero-3-phospholipids by phospholipase A2: effect of the polar head-group. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 917, p. 411-417, 1987.

TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n.1, p. 36-43, 2001.

TISS, A.; MILED, N.; VERGER, R.; GARGOURI, Y.; ABOUSALHAM, A. Digestive lipases inhibition: an *in vitro* study. In: PETRY, S.; MÜLLER, G. (Ed.). **Lipases and Phospholipases in Drug Development**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p. 155-193.

TOPLAK, H.; ZIEGLER, O.; KELLER, U.; HAMANN, A.; GODIN, C.; WITTERT, G.; ZANELLA, M.T.; ZUNIGA-GUAJARDO, S.; VAN GAAL, L. X-Pert: weight reduction with Orlistat in obese subjects receiving a mildly or moderately reduced-energy diet: early response to treatment predicts weight maintenance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, p. 699-708, 2005.

TSUJITA, T.; TAKAICHI, H.; TAKAKU, T.; AOYAMA, S.; HIRAKI, J. Antiobesity action of e-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1852-1858, 2006.

VAN TILBEURGH, H.; EGLOFF, M.P.; MARTINEZ, C.; RUGANI, N.; VERGER, R.; CABBILLAU, C. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, 814-820, 1993.

VAN TILBEURGH, H.; BEZZINE, S.; CABBILLAU, C.; VERGER, R.; CARRIÈRE, F. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1441, p. 173-184, 1999.

VINAROV, Z.; TCHOLAKOVA, S.; DAMYANOVA, B.; ATANASOV, Y.; DENKOV, N.D.; STOYANOV, S.D.; EDWARD PELAN, E.; LIPS, A. Effects of emulsifier charge and concentration on pancreatic lipolysis: 2. Interplay of emulsifiers and biles. **Langmuir**, v. 28, p. 12140-12150, 2012.

VINCKEN, J.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, p. 275-297, 2007.

VON TIGERSTRÖM, R.G.; STELMASCHUK, S. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 511-514, 1989.

WANG, C.S.; KUKSIS, A.; MANGANARO, F.; MYHER, J.J.; DOWNS, D.; BASS, H.B. Studies on the substrate specificity of purified human milk bile salt-activated lipase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 9197-9202, 1983.

WEIGLE, D.S. Pharmacological therapy of obesity: Past, present, and future. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 2462-2469, 2003.

WILDE, P.J.; CHU, B.S. Interfacial and colloidal aspects of lipid digestion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 14-22, 2011.

WINKLER, F.K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WOOLTORTON, E. Obesity drug sibutramine (Meridia): hypertension and cardiac arrhythmias. **Canadian Medical Association Journal**, v. 166, p. 1307-1308, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. Disponível em: <[www.who.int](http://www.who.int)> Acessado em: 04/06/2013.

XU, B.J.; HAN, L.K.; ZHENG, I.N.; LEE, J.H.; SUNG, C.K. *In vitro* Inhibitory Effect of Triterpenoidal Saponins from *Platycodi Radix* on Pancreatic Lipase. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 2, p. 180-185, 2005.

YOSHIZUMI, K.; HIRANO, K.; ANDO, H.; HIRAI, Y.; IDA, Y.; TSUJI, T.; TANAKA, T.; SATOUCHI, K.; TERAOKA, J. Lupane-Type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 335-341, 2006.

YUN, J.W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1625-1641, 2010.

ZAPF, J.; SCHOENLE, E.; WALDVOGE, M.; SAND, M.; FORESCH, E. R. Effects of trypsin treatment of rat adipocyte on biological effects and binding of insulin and insulin-like growth factors: further evidence for the action of insulin-like growth factors through the insulin receptor. **European Journal of Biochemistry**, v. 133, p. 605-609, 1981.

ZHANG, L.; LU, Y. Inhibitory activities of extracts from *Cleistocalyx operculatus* flower buds on pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 1133-1139, 2012.

ZHENG, Q.; KOIKE, K.; HAN, L.K.; OKUDA, H.; NIKAIDO, T. New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 604-613, 2004.

ZHENG, Q.; LI, W.; HAN, L.; KOIKE, K. Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from *Gypsophila oldhamiana*. **Chemical & Pharmaceutical Bull.**, v. 55, n. 4, p. 646-650, 2007.