ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPASE PANCREÁTICA DE EXTRATO DO FRUTO DO *Pithecellobium dulce* ORIUNDO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Haryel Lima Santos¹; Alessandro Branco²

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

haryellima@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: branco@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante; Lipase pancreática; *Pithecellobium dulce*.

INTRODUÇÃO

A introdução de alimentos funcionais na dieta humana pode proporcionar benefícios para a saúde, principalmente no início do desenvolvimento e crescimento, regulação de processos metabólicos, defesa contra o estresse oxidativo, benefícios cardiovasculares, fisiologia gastrointestinal e desempenho mental, cognitivo e físico.

Da família das Fabaceae, a *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth é uma espécie popularmente conhecida como ingá-doce, guamã-americano ou guamúchil. Árvore de porte médio pode atingir até 10 m de altura e encontra-se distribuída em diversas partes do mundo, sobretudo, nos trópicos americanos (LORENZI *et al.*, 2003; MALIK *et al.*, 2010). Suas vagens frescas contêm cerca de 50% de polpa, cuja composição é rica em proteínas, carboidratos, fibras, além de excelente fonte de vitaminas e minerais, podendo ser utilizada na alimentação animal (MALIK *et al.*, 2010).

A inibição da lipase pancreática está estreitamente ligada à diminuição da absorção de lipídeos e controle dos efeitos nocivos, enquanto que os antioxidantes estão relacionados à diminuição de radicais livres no organismo. Antioxidantes naturais podem ser adquiridos pela ingestão de alimentos que contenham, por exemplo, *α*-tocoferol (vitamina- E), *β*-caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina- C), e compostos fenólicos, onde se destacam principalmente os flavonoides e poliflavonoides (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A ingestão de frutos já está ligada a uma boa qualidade de vida, devido à riqueza de fibras e nutrientes, contudo a determinação da associação de frutos com o metabolismo de lipídios e com atividade antioxidante poderá ser uma medida de profilaxia de fácil uso pela população, sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antioxidante e inibitória da lipase pancreática do extrato do fruto de *Pithecellobium dulce* (Fabaceae).

METODOLOGIA

Coleta do material

Os frutos foram coletados na cidade de Ruy Barbosa- BA, identificados por um botânico do Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) e separadas manualmente as cascas e as polpas.

Obtenção dos extratos

Os frutos foram secos em estufa com temperatura controlada (40°C) e moídas em moinho de facas (tipo Wiley). Os extratos brutos foram obtidos por maceração do material pulverizado em etanol e água (EtOH/H₂O, 80:20), separadamente, por duas extrações consecutivas, de 72h cada, e o filtrado obtido em cada etapa reunido e o volume reduzido em rotaevaporador. Os extratos hidroetanólicos foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido com solventes. Os extratos brutos foram submetidos à cromatografia em

coluna aberta recheada com sílica gel e eluída com solventes orgânicos na ordem crescente de polaridade para obtenção das frações.

Ensaio da atividade inibitória da lipase pancreática

A enzima lipase pancreática suína (tipo II, SIGMA), na concentração de 10g L⁻¹, foi preparada em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0 (contendo CaCl₂ 0,010 mol L⁻¹ e NaCl 0,025 mol L⁻¹). Utilizou-se como substrato p-nitrofenilpalmitato na concentração de 0,008 mol L⁻¹, dissolvido em TritonX 100, 0,5% (p/v). Todas as análises foram feitas em triplicata. Em cada análise, a mistura de reação (100 mL de enzima, 50 mL de água e 50 mL de substrato) foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). Controles sem enzima (branco substrato) e sem substrato (branco enzima) foram incubados do mesmo modo que os tubos experimentais. Determinou-se a absorbância do produto da ação da lipase sobre o p-nitrofenilpalmitato (p-nitrofenol) em espectrofotômetro no λ de 410nm. A inclinação da reta do gráfico, Absorbância x Tempo, será calculada e utilizada como referência para o cálculo da % inibição da lipase pancreática.

Atividade antioxidante

Os extratos foram avaliados quanto ao potencial antioxidante pelo Teor de Fenólicos totais (TFT), Avaliação do sequestro do radical livre DPPH• e Avaliação da inibição da Auto-oxidação do betacaroteno.

Avaliação do teor de fenólicos totais

As amostras a serem testadas foram preparadas a 100 µg/mL em etanol. Em microplacas de 96 poços foram misturados 20 µL do extrato a 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e após 8 minutos foi adicionado 80 µL de carbonato de sódio a 7,5% (p/v). A placa foi incubada em uma câmara escura à temperatura ambiente (25 ° C) durante 60 min e em seguida a sua absorbância foi mensurada a 620 nm utilizando o leitor de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer contra um branco. A concentração dos polifenóis em amostras foi derivada a partir de uma curva de calibração padrão de ácido gálico no intervalo de 10-100 µg/mL. Os dados foram expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama do extrato seco.

Avaliação do sequestro do radical livre DPPH•

A atividade antioxidante também foi determinada através da capacidade dos compostos presentes nas amostras (100 µg/ml) em sequestrar o radical estável DPPH•. 40 µL das amostras a 160 µL de solução etanólica de DPPH• (0,2 mM). Substâncias padrão (BHT e Ácido Ascórbico - AA) foram testadas como controle positivo. Foi feito um branco para cada concentração de amostra ou padrão testado, substituindo a solução de DPPH• por etanol, e foi feito um controle negativo substituindo as soluções-teste por etanol. As soluções reagentes foram incubadas no escuro a temperatura ambiente durante 30 min para que a reação ocorresse e a redução do radical livre foi medida através da leitura da absorbância a 517 nm utilizando o leitor de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate e os resultados foram expressos em Porcentagem de Sequestro do Radical Livre (%SRL).

Avaliação da Inibição da Auto-oxidação do beta-caroteno

Uma mistura reacional foi preparada utilizando-se 1 mL de solução de beta-caroteno (0,2mg/mL em clorofórmio), 20mg de ácido linoleico e 200mg de tween 60 (emulsificador). A mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio e então adicionada 90 mL de água destilada, agitando-se vigorosamente para promover a aeração. Amostras a serem testadas foram preparadas a 100 µg/mL. Alíquotas de 20µL das amostras e 250 µL da mistura

reacional foram adicionadas à microplaca de 96 poços para a leitura de absorbância em aparelho Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer a 470 nm.

Tratamento Estatístico

As análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A significância estatística foi determinada utilizando a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet. Valores foram considerados significativos com $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o Graphpad Prism, versão 5.0.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Obtenção dos extratos

A etapa de secagem do material vegetal proporcionou a perda de água, o que promoveu maior estabilidade microbiológica do material, assim como facilidade no processo de trituração. A pulverização realizada possibilitou maior superfície de contato com o solvente extrator na maceração, resultando em um melhor arraste de compostos no procedimento. O rendimento da extração foi calculado pela razão das massas dos extratos após secagem e suas respectivas massas após a pulverização. O extrato das cascas obteve rendimento de 28,13 % enquanto que o da polpa rendeu 18,49%.

Inibição da lipase pancreática

O potencial dos extratos em inibir a enzima lipase pancreática foi expresso em porcentagem de Inibição da atividade da Lipase Pancreática (% ILP). Os extratos apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com o controle negativo de acordo com teste de Dunnet ($p < 0,05$). O padrão Orlistat atingiu 88,19% de ILP, enquanto que o melhor extrato, *Pithecellobium dulce* casca (EPDUC), obteve $24,48 \pm 0,56$ % de ILP enquanto que a polpa inibiu $11,4 \pm 2,94$ % da atividade da enzima.

Atividade antioxidante

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos de *P. Dulce*

	%TFT (mg EAG/g de extrato)	%SRL	%IAB
<i>P. Dulce</i> Casca	$68,62 \pm 2,98$	$34,42 \pm 1,69$	$29,41 \pm 3,45$
<i>P. Dulce</i> Polpa	$50,79 \pm 3,34$	$22,99 \pm 0,81$	$14,22 \pm 3,17$

Legenda: Avaliação em porcentagem do potencial antioxidante pelo Teor de Fenólicos totais (TFT), sequestro do radical livre (SRL) e inibição da Auto-oxidação do betacaroteno (IAB).

Os resultados obtidos no teste de teor de fenólicos totais estão resumidos na tabela X. A curva padrão do ácido gálico que embasou os resultados, bem como a equação da reta e o valor do coeficiente de determinação (R^2) estão demonstrados na figura X. Os extratos apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com o controle negativo de acordo com teste de Dunnet ($p < 0,05$). O extrato que mais se destacou foi o da casca, com $68,62 \pm 2,98$ mg EAG/ g de extrato e a polpa obteve $50,79 \pm 3,34$ mg EAG/ g de extrato.

Figura 1. Curva padrão do ácido gálico

No teste da avaliação do sequestro do radical DPPH• o potencial antioxidante foi determinado pela capacidade de cada extrato, na concentração de 100 µg/mL, em sequestrar o DPPH• e os resultados foram expressos em %SRL (% Sequestro do Radical Livre). Os resultados das amostras se distinguiram estatisticamente do controle negativo ($p < 0,05$), segundo a ANOVA seguida do teste de Dunnett, o que indica a atividade positiva destas no teste. Dentre os extratos, a casca apresentou melhores resultados com $34,42 \pm 1,69\%$ SRL enquanto que a polpa conseguiu sequestrar $22,99 \pm 0,81\%$ dos radicais. Os controles positivos atingiram 95,60% SRL e 66,70% SRL para o Ácido Ascórbico e BHT, respectivamente. O teste que avalia a inibição da auto-oxidação do betacaroteno foi realizado e os resultados estão expressos na tabela x. Sabendo-se que há compostos fenólicos nos mesmos, comparou-se com flavonóides de atividade antioxidante já conhecida (Quercetina e Rutina). De acordo com o teste de Dunnett, houve diferença estatística significativa entre eles. Essa diferença já era esperada visto que um extrato bruto quando comparado a um padrão isolado terá sua atividade reduzida. Observou-se uma linearidade com o resultado da atividade sequestradora do DPPH•, isso significa dizer que os mesmos extratos mais ativos nos dois testes. O extrato da casca inibiu $29,41 \pm 3,45\%$ da auto-oxidação do Betacaroteno e a polpa inibiu $14,22 \pm 3,17\%$. Os padrões Quercetina e Rutina inibiram $50,24 \pm 5,44\%$ e $41,87 \pm 3,65\%$, respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade inibitória da lipase pancreática do extrato do fruto de *Pithecellobium dulce* (Fabaceae) mostrou-se baixa indicando que os extratos possuem baixo potencial em inibir a enzima. A atividade antioxidante mostrou diferença significativa na etapa do Teor de Fenólicos totais (TFT), detacando-se a casca e a polpa. No teste da avaliação do sequestro do radical DPPH• houve resposta satisfatória, a casca apresentou melhores resultados comparada a polpa. No teste de avaliação da inibição da Auto-oxidação do betacaroteno, o extrato da casca houve maior inibição quanto à polpa. O extrato da casca apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos e foi também o que apresentou melhores resultados nos testes antioxidantes e antiobesidade.

REFERÊNCIAS

- BARREIROS A.L.B.S, DAVID J.M, DAVID J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**. 2006;29 (1):113-23.
- LORENZI, H. *et al.* **Árvores Exóticas no Brasil**: madeiras, ornamentais e aromáticas. 1.ed. Nova Odessa: Platarum, 2003. 352p.
- MALIK, S. K. *et al.* **Genetic resources of tropical underutilized fruits in India**. New Delhi: National Bureau of Plant Genetic Resources, 2010. 168 p.