

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ATIVIDADE HIPOLIPDÊMICA DE TRITERPENOS HIDROXILADOS E
CARBONILADOS OBTIDOS DE *PROTIUM PANICULATUM* VAR.
RIEDELIANUM (ENGLER) DALU E *P. STRUMOSSUM* DALY
(BURSERACEAE)

Bolsista: Deborah da Silva Braz, CNPQ

Manaus
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-E/0041/2010
ATIVIDADE HIPOLIPDÊMICA DE TRITERPENOS HIDROXILADOS E
CARBONILADOS OBTIDOS DE *PROTIUM PANICULATUM* VAR.
RIEDELIANUM (ENGLER) DALU E *P. STRUMOSSUM* DALY
(BURSERACEAE)

Bolsista: Deborah da Silva Braz, CNPQ.
Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior.

Manaus
2011

RESUMO

A família Burseraceae é uma das mais importantes famílias botânicas da Amazônia, conhecida popularmente na região pela denominação de “breu”, sendo o gênero *Protium* um dos mais ricos em espécies e o mais abundante. Uma das características do gênero *Protium* deve-se à produção de misturas triterpênicas, com potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, incluindo atividade inibitória de lipase pancreática: enzima responsável pela degradação de triglicerídeos em ácidos graxos. Neste estudo, o extrato em hexano da espécie de *Protium paniculatum* var. *riedelianum* (Engler) Daly foi submetido aos métodos de fracionamento, isolamento e identificação de seus compostos. A mistura triterpênica de α - e β - amirina, das cetonas α - e β - amirona, e dos diidroxilados breína e maniladiol foram isolados e identificados estruturalmente pela obtenção de espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Estes compostos e mais uma mistura de ácidos triterpênicos foram avaliados quanto ao perfil inibitório frente às enzimas lipase, α -amilase e α -glucosidase “*in vitro*”, obtendo valores em percentuais de inibição e concentração de inibição de 50% de atividade da enzima (CI_{50}). Como resultados, a mistura das cetonas α - e β - amirona, apresentou maior valor em percentuais de inibição de lipase, com IC_{50} (mg/mL) de $3,97 \pm 0,41$. A mistura dos ácidos triterpênicos foi o único composto com perfil de inibição significativa de α -amilase, apresentando CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de $23,03 \pm 0,5$. Diante os resultados de inibição da enzima α -glucosidase, com enzima extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, todos os compostos apresentaram inibição $\geq 80\%$, incentivando a continuidade do estudo desta espécie em ensaios *in vivo*, apresentando-se como uma alternativa na prevenção de síndromes metabólicas.

ABSTRACT

The Burseraceae family is one of the most important botany families in the Amazon. Regionally known as “breu”, the Protium genus has one of the most various and abundant species. One of the characteristics of the Protium genus is due to the production of triterpene mixtures, where they have demonstrated pharmacological potential with several therapeutic activities including pancreatic lipase inhibitory activity: the enzyme responsible for degradation of triglycerides into fatty acids. In this study, the hexane extract of Protium paniculatum species var. riedelianum (Engler) Daly was subjected into compound fractionation, isolation and identification methods. The triterpene mixture of α - and β - amyrin, ketones and α - β - amirona, the diols, maniladiol Breiner, were isolated and structurally identified by obtaining H^1 and C^{13} NMR spectra. These compounds and more a mixture of triterpenes acid were evaluated for inhibition against the enzyme lipase, α -amylase and α -glucosidase "in vitro", obtaining 50% of inhibition and concentration of inhibition of the enzyme activity (IC_{50}). As a result, the mixture of ketones and α - β -amirona showed higher percentages of lipase inhibition, presented IC_{50} (mg/mL) of $3,97 \pm 0,41$. The mixture of triterpenes acid was the only compound with significant α -amylase inhibition, showing IC_{50} (mg/mL) of $23,03 \pm 0,5$. Given the results for α -glucosidase enzyme inhibition, with enzyme extracted from Saccharomyces cerevisiae, all compounds showed inhibition greater the 80%, encouraging the continuation of studies for these species with in vitro tests, presenting itself as an alternative for metabolic syndromes prevention.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 - Substâncias observadas em PPR e PST.....	10
TABELA 2 - Atividade inibitória (%) frente as enzimas lipase e α -amilase para as substâncias de PST.....	13
TABELA 3 - Comparação dos métodos de inibição de α -glucosidase para as substâncias de PST	14

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3. METODOLOGIA.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5. CONCLUSÃO.....	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
7. CRONOGRAMA EXECUTADO.....	19

INTRODUÇÃO

A busca por espécies florestais pouco conhecidas é fundamental na identificação de novas substâncias de interesse medicinal. Na região Amazônica, a família Burseraceae destaca-se pelo seu alto potencial resinífero, e óleo-resinas com aplicações nas indústrias de perfumarias, fármacos, tintas e vernizes (PERNET, 1972).

As espécies da família Burseraceae são conhecidas popularmente na região Amazônica pela denominação de “breu”, sendo o gênero *Protium* um dos mais ricos em espécies e o mais abundante na região, correspondendo a 135 espécies, nos quais seus compostos aromáticos possuem um grande atrativo comercial (CRONQUIST, 1981). O gênero *Protium* é considerado como um importante agente terapêutico e suas espécies muito utilizadas como antiinflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante (CORREIA, 1984).

Uma das características do gênero *Protium* deve-se à produção de misturas triterpênicas, que têm despertado um grande interesse nos últimos anos em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas (MAHATO et al., 1992; MAHATO; SEN, 1997; YASUKAWA, 2000; AMARAL et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007). Porém, em trabalhos recentes, foram estudados o efeito inibitório de lipase pancreática por triterpenos glicosilados, demonstrando grande potencial, justificando a necessidade de estudos com novos triterpenóides de espécies amazônicas.

Substâncias fitoquímicas identificadas de plantas medicinais tradicionais apresentaram uma grande oportunidade para o desenvolvimento de terapêuticas mais recentes. Como parte da busca contínua de agentes biologicamente ativos com testes de anti-obesidade de recursos naturais, várias plantas tem sido testadas quanto à atividade antilipase (BIRARI & BHUTANI, 2007).

Portanto, a busca de novas substâncias com capacidade inibitória de lipase pancreática pode ser de grande relevância contra o perfil de promotores de síndrome metabólica (diabetes mellitus, obesidade mórbida) onde podem representar o início de planejamentos mais aprofundados no desenvolvimento de novos fármacos e purificação de compostos ativos eficazes na prevenção de patologias agravantes. Sendo assim, os objetivos deste trabalho consistem em isolar e identificar triterpenos hidroxilados e carbonilados da óleoresina de *Protium paniculatum* var. *riedelianum* (Engler) Daly e *Protium strumosum* Daly e avaliar a atividade hipolipidêmica dos triterpenos isolados através de ensaios “*in vitro*”.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família Burseraceae compreende aproximadamente 700 espécies distribuídas em 19 gêneros (THULIN *et al.*, 2008). Na região do Neotrópico há cerca de 230 espécies em oito gêneros, sendo que na Amazônia brasileira podem ser encontradas espécies do gênero *Bursera*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Protium*, *Tetragastris* e *Trattinnickia* (WEEKS *et al.*, 2005).

As espécies da família Burseraceae possuem importantes atividades medicinais, evidenciadas há tempos por comunidades de todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde estão presentes as árvores e arbustos desta família (PERNET, 1972).

O gênero *Protium* é considerado o principal gênero da família e caracteriza-se pela presença de misturas triterpênicas, sendo os principais constituintes de esqueletos do tipo oleanano e ursano, podendo ser encontrado também, mas em menor extensão, as séries lupano, tirucalano, taraxano e friedelano (RÜDIGER, 2007). Tschirch & Cremer (1902) realizaram os primeiros estudos com o gênero *Protium*, onde identificaram a presença da mistura binária dos alcoóis triterpênicos no óleo-resina. Estes pentacíclicos hidroxilados, α - e β - amirina, representam os constituintes majoritários e são os mais freqüentes mencionados em estudos das espécies do gênero *Protium*, como também suas respectivas cetonas, a-amirinona, b-amirinona e lupenona. Outros constituintes citados freqüentemente são os dióis breína e maniladiol (SILVA, 1995; SUSUNAGA, 1996; MAIA *et al.*, 2000, VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2005).

Os triterpenóides têm atividades biológicas com grandes potencialidades, são antiinflamatórios, bacterianos, fusicídicos, antivirais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais. Devido a sua grande diversidade o seu estudo tem sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades (PATOČKA, 2003). Estudos recentes têm relacionado o uso de triterpenos com atividade inibitória de lipases.

Lipase pancreática é a enzima mais importante na dieta de triglicerídeos (BORGSTÖM, 1986), secretadas pelo pâncreas sob forma fracamente ativa. Sua atividade é potencializada no duodeno por diversas substâncias entre elas os ácidos biliares, Ca^{++} e alguns aminoácidos e peptídeos. (CANTAROW A., 1968). O uso de suplemento de lipase pode ser desejável nos casos de indigestão crônica.

A aplicação de um inibidor de lipase tem sido analisada como um tratamento para obesidade. No mercado, o mais utilizado, Orlistate (cápsulas de 120mg), é um inibidor da lipase intestinal que diminui em 30% a absorção de gorduras. Os estudos mais prolongados de uso desta droga têm mostrado manutenção da perda de peso a longo prazo. Um estudo multicêntrico em 391 diabéticos tratados com Orlistat (360mg) por um ano, mostrou perda de peso duas vezes maior do que com placebo inicial após um ano, com significativa

melhora do controle e do perfil lipídico e diminuição da dose de hipoglicemiante (WEINTRAUB, M. et al, 1991).

Atualmente, as pesquisas direcionam-se para fontes naturais de lipase. Fang LI *et al* (2007) realizaram um estudo onde dezesseis saponinas triterpenóides foram isoladas a partir dos frutos da *Acanthopanax senticosus*. Na análise inibidora de lipase destes triterpenóides, cinco apresentaram atividade inibitória para lipase com valores de CI_{50} de 0,29 mM.

A partir de outro estudo clínico extensivo de avaliação para triterpenos glicosilados isolados das folhas de *Ilex paraguayensis*, realizado por Sugimoto *et al.* (2009), as saponinas matesaponins 1, Nudicaucin C e ácido 3-(O- α -L-rhamnopiranosyl(1-2)- α -L-arabinopiranosil)-28-(O- β -D-glucopirnosil(1-6)- β -D-glucopiranosideo)-oleanólico apresentaram inibição de 98, 74 e 77, respectivamente, para concentração de 100 μ M. Já os estudos com as flores de *Bellis perennis* (Morikawa et al, 2010), as saponinas perennisaponinas G, H, I, J, K, L e M obtiveram um CI_{50} para a inibição de lipase pancreática variando entre 137 e 223 μ M em estudos *in vitro*.

Além da lipase, outras enzimas citadas como importantes em processos biológicos e patológicos são a α -glucosidase e α -amilase. Essas enzimas são carboidrases que atuam sobre ligações glicosídicas, formando unidades menores de carboidratos que possam ser completamente digeridas pelo organismo (YOON & ROBYT, 2003). A redução ou bloqueio da atividade enzimática dessas carboidrases pode resultar na diminuição na degradação de polissacarídeos em glicose, maltose e maltotriose. Essa interrupção no metabolismo de uma dieta rica em carboidratos permite evitar conseqüentes picos hiperglicêmicos, assim como o desequilíbrio de triglicerídeos e ácidos graxos (WONG & JENKINS, 2007).

Apesar de já existirem formulações comerciais inibidoras da absorção intestinal de gorduras e carboidratos disponíveis no mercado, substâncias fitoquímicas identificadas de plantas medicinais tradicionais apresentam uma grande oportunidade para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes. Como parte da busca contínua de agentes biologicamente ativos com testes de antiobesidade e hipoglicemia de recursos naturais à base de plantas, várias plantas tem sido testadas quanto à atividade de inibidores de enzimas envolvidas em síndromes metabólicas (BIRARI & BHUTANI, 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Os extratos em hexano dos óleo-resinas de *Protium paniculatum* var. *riedelianum* (PPR) e *P. strumosum* (PST) foram obtidos em projetos oriundos do Grupo de Pesquisa Q-BiomA - UFAM.

3.2 Fracionamento, isolamento e identificação dos constituintes

Os extratos em hexano das espécies de PPR e PST foram avaliados por CCD e CG-EM, para avaliação do perfil das amostras. Foi realizada uma filtração cromatográfica (3,0024 g de amostra) em coluna aberta com gel de sílica 70-230 mesh (60 g), ($\varnothing_{\text{int}} = 3,5$ cm, $m_{\text{sílica}} = 60$ g, eluentes: hexano, diclorometano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade) coletando 5 frações. O processo de separação cromatográfica (1,1000 g de amostra) foi realizado por cromatografia em coluna em gel de sílica 70-230 mesh ($\varnothing_{\text{int}} = 3,5$ cm, $m_{\text{sílica}} = 67$ g, eluente: hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade) obtendo 28 frações. Um processo de cromatografia flash com gel de sílica 230-400 mesh ($\varnothing_{\text{int}} = 2,0$ cm, $m_{\text{sílica}} = 24$ g, eluente isocrático: hexano e acetato de etila (9:1)), coletando 20 frações. As estruturas das frações isoladas foram identificadas por CG-EM, RMN ^1H e ^{13}C .

3.3 Ensaio inibitório de lipase “*in vitro*” (SLANC *et al*, 2009)

As substâncias isoladas foram diluídas em DMSO, partindo de 10 mg/mL e seguindo-se diluições seriadas. Fez-se a reação das amostras diluídas com a solução de enzima lipase pancreática de suíno cru tipo II. Após a incubação (5 min, 37°C, 120 rpm) e adição do tampão Tris PBSA, realizou-se a primeira leitura em leitor de microplaca a 405 nm. A segunda leitura foi feita após a adição do reativo de cor PNP e incubação (20 min, 37°C, 120 rpm), onde as absorbâncias foram convertidas em % de inibição. A IC₅₀ foi calculada por meio do programa Origin®, através de uma análise de progressão não-linear.

3.4 Ensaio inibitório de α -amilase “*in vitro*” (SUBRAMANIAM *et al*, 2008)

Fez-se a reação das substâncias diluídas com a enzima, em microplaca. Após incubação (5 min, 37°C), adicionou-se o substrato (kit não liquiforme -solução de amido) seguido de nova incubação (7 min e 30s, 37°C) e leitura a 620 nm seguida de segunda leitura após a reação com reativo (solução de iodo). Os resultados foram expressos em % de inibição e a IC₅₀ foi calculada através de uma análise de progressão não-linear.

3.5 Atividade inibitória de α -glucosidase “*in vitro*” (ANDRADE-CETTO *et al*, 2008)

Este experimento envolveu as enzimas do extrato cetônico de intestino de rato e de *Saccharomyces cerevisiae*. Com as substâncias diluídas, fez-se a reação em microplaca com a solução de enzima preparada. Em seguida, obteve-se os valores das absorbâncias a 405 nm. Com a adição do reagente de cor, procedeu-se em leituras a cada 5 minutos, até o tempo de 30 minutos. Os valores obtidos em leitor de microplaca foram convertidos em percentual de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das amostras por cromatografia gasosa com detector de massas demonstrou que os constituintes majoritários nos extratos de PPR e PST se tratam dos alcoóis triterpenicos α -amirina e β -amirina, e dos triterpenos carbonilados α -amirona e β -amirona. A presença dos triterpenos dihidroxilados foi observada para as duas amostras, sendo que uma maior concentração destes dois triterpenos foi observada para a amostra PST, como mostra a tabela 1. Além destes triterpenóides, a presença de outros triterpenos não identificados foram observados, junto a sesquiterpenos e monoterpenos comuns em oleoresinas de Burseraceae.

Tabela 1: Substâncias Observadas em PPR e PST

Rt	Substância	Area (%)	
		PPR	PST
4,391	α -pineno	1,1880	0
5,283	sabineno	0,2040	0
5,379	β -pineno	0,2503	0
6,685	<i>p</i> -cimenol	0,2452	1,5243
6,946	1,8-cineol	0,1806	0
7,005	Limoneno	0	0,5650
10,906	canfor	0,1795	0
13,033	Terpinen-4-ol	0,1365	0
13,061	<i>p</i> -cimen-8-ol	0	1,1449
22,628	α -cubebeno	0,1781	0
23,831	α -copaeno	0,1949	0,2544
74,423	β -amirona	10,8251	7,4808
74,950	β -amirina	19,1175	14,8305
75,198	α -amirona	20,9496	19,4583
75,716	α -amirina	34,3898	32,1746
76,017	ND	0,1888	0,2778
77,704	ND	1,2532	2,0908
78,474	16-hidroxi- β -amirona	1,0815	4,5568
78,867	ND	0,9358	0,5535
79,168	Maniladiol	1,3514	2,9109
79,415	16-hidroxi- α -amirona	1,7137	2,8143
79,683	ND	0,2567	0,2818
79,986	Breina	1,3337	2,4509
80,510	ND	0	0,5036
82,359	ND	0,2910	0
Total:		96,4449	93,8732

Rt: Tempo de Retenção. ND: Não determinada.

A análise por CCD para as duas espécies de *Protium* possibilitou a observação de várias manchas, onde duas destas se destacavam. Em comparação com padrão de α - e β -amirina foi possível observar na amostra que uma destas manchas apresentava o mesmo R_f que o padrão em eluição com clorofórmio ($R_f = 0,3$), indicando a possibilidade de serem a mesma substância. Uma segunda mancha de coloração marron-alaranjada foi observada em $R_f = 0,1$, quando revelado com sulfato cérico IV, esta mancha após alguns minutos mudava para coloração verde, que segundo Vieira Jr. *et al* (2007) é indicativo da mistura dos grupos 3,16 diidroxi em esqueletos triterpenicos.

Como os extratos em hexano de PPR e PST apresentaram perfis semelhantes de acordo com as análises por CCD, e em PST foi observado uma maior concentração dos triterpenos dihidroxilados por CG-EM, priorizou-se o trabalho com esta amostra.

O extrato em hexano de PST (3,0024 g) submetido ao processo de separação deu origem a 5 frações, onde apenas a terceira fração (obtida em DCM) foi dada continuidade no processo de separação. Esta fração em DCM (1,1g) submetida a uma separação cromatográfica apresentou um perfil de separação mais eficiente gerando 15 subfrações. As frações 3 a 6 foram reunidas dando origem a fração identificada como PST-A¹, as frações 7 a 12 foram reunidas dando origem a fração identificada como PST-B¹ e as frações 14 e 15 foram reunidas dando origem a fração identificada como PST-C¹. O processo cromatográfico foi repetido sob as mesmas condições visando aumentar a massa de substância isolada, como o perfil do processo cromatográfico obteve repetibilidade, forneceu as mesmas subfrações que foram reunidas PST-A², PST-B² e PST-C². Como as subfrações se tratavam das mesmas substâncias as frações PST-A¹ e A² foram reunidas gerando PST-A' (208 mg), as frações PST-B¹ e B² foram reunidas gerando PST-B' (391 mg) e as frações PST-C¹ e C² foram reunidas gerando PST-C' (38 mg). A reunião das frações 5 a 8 do processo de cromatografia Flash de PST-A' deu origem a fração PST-A'F. As frações PST-A'F, PST-B' e PST-C' foram submetidas a análises espectrométricas de RMN e Cromatográficas (CG-EM).

Nos dados de CG-EM da fração PST-A'F observou-se dois picos majoritários nos R_t 's em 28,347 min (26%) e um pico em 29,435 min (68%). Em ambos os picos, foi observado o íon molecular em 424 m/z e pico base em 218 m/z , característico dos triterpenos α - e β -amirona. Os sinais de RMN ¹³C e DEPT, nos deslocamentos químicos (δ) em 217,76 e 217,71 ppm, mostraram a presença de C de carbonila. A presença de 4 sinais nos δ 121,50, 124,19, 139,72, e 145,25 ppm, evidenciaram a presença de carbonos sp^2 . Em comparação com a literatura, os carbonos em δ 121,50 (CH) e 145,25 ppm (C), se referem aos carbonos 12 e 13 de β -amirona, e os carbonos em δ 124,19 (CH) e 139,72 ppm (C) se referem aos carbonos 12 e 13 de α -amirona. Os demais picos foram comparados com Lima *et al.* (2005), confirmando a mistura dos dois triterpenos α - e β -amirona. A relação entre os

dois triterpenos foi de 1 de α -amirona para 0,37 de β -amirona, pelo cálculo das integrais nos espectros de RMN ^1H nos sinais de δ em 5,16 (α -amirona) e δ em 5,21 ppm (β -amirona).

A fração PST-B' apresentou uma única mancha observada por CCD, apresentando R_f em 0,56 (hexano:acetato de etila 7:3), mesmo R_f observado para o padrão de α - e β -amirina. Na análise de CG-EM desta amostra, foi observado apenas dois picos, um em 28,968 min (29%) e um pico em 29,692 min (71%). Em ambos os picos, foi observado o íon molecular em 426 m/z e pico base em 218 m/z , característico dos triterpenos α - e β -amirina. A análise dos espectro de RMN ^{13}C e DEPT, apresentaram dois sinais nos deslocamentos químicos (δ) em 79,03 e 79,06 ppm, região característica de CH ligado a hidroxila. A presença de 4 sinais nos δ 121,73, 124,42, 139,58, e 145,18 ppm, evidenciaram a presença de carbonos sp^2 . Em comparação com a literatura, os carbonos em δ 121,73 (CH) e 145,18 ppm (C), se referem aos carbonos 12 e 13 de β -amirina, e os carbonos em δ 124,42 (CH) e 139,58 ppm (C) se referem aos carbonos 12 e 13 de α -amirina. Os demais picos foram comparados com Maia *et al.* (2000), confirmando a mistura dos dois triterpenos α - e β -amirina. A relação entre os dois triterpenos foi de 1 de α -amirina para 0,55 de β -amirina, pelo cálculo das integrais nos espectros de RMN ^1H nos sinais de δ em 5,06 (α -amirina) e δ em 5,11 ppm (β -amirina).

Os triterpenos α - e β -amirina são constituintes comuns em espécies de Burseraceae, principalmente de suas oleoresinas (ZOGHBI *et al.*, 1994), onde α -amirina é correspondente ao grupo dos triterpenos ursanos, e β -amirina, correspondente ao grupo dos triterpenos oleananos (DEWICK, 2002).

A fração PST-C' apresentou em CCD uma mancha no R_f em 0,6, (hexano:acetona, 7:3), de coloração (verde) quando revelada com sulfato cérico IV, indicativo dos triterpenos dihidroxilados. Os dados de CG-EM desta fração, apresentou apenas dois picos, um em 32,942 min (28%) e um pico em 33,811 min (72%). Em ambos os picos, foi observado o íon molecular em 442 m/z e pico base em 234 m/z , característico dos triterpenos breina e maniladiol. Os dados de RMN ^{13}C e DEPT, apresentaram dois sinais no δ em 78,98 e 78,96 ppm, e dois sinais no δ em 67,04 e 66,00 ppm, região característica de CH ligado a hidroxila. A presença de 4 sinais nos δ 122,30, 125,11, 137,97, e 143,51 ppm, evidenciaram a presença de carbonos sp^2 . Em comparação com a literatura, os carbonos em δ 122,30 (CH) e 143,51 ppm (C), se referem aos carbonos 12 e 13 de maniladiol, e os carbonos em δ 125,11 (CH) e 137,97 ppm (C) se referem aos carbonos 12 e 13 de breina. Os demais picos foram comparados com Maia *et al.* (2000), confirmando a mistura dos dois triterpenos breina e maniladiol. A relação entre os dois triterpenos foi de 1 de breina para 0,45 de maniladiol, pelo cálculo das integrais nos espectros de RMN ^1H nos sinais de δ em 5,20 (breina) e δ em 5,26 ppm (maniladiol).

Os ensaios biológicos possibilitaram a determinação da atividade inibitória das substâncias referentes a três enzimas de grande importância em processos metabólicos e patológicos. Foram determinados os ensaios inibitórios de lipase, α -amilase e α -glucosidase “*in vitro*” para a mistura binária de α - e β - amirina, da mistura de α - e β - amirona, e da mistura dos triterpenos diidroxilados breína e maniladiol. Além dos triterpenos isolados foi realizado os ensaios para uma mistura binária de ácidos triterpênicos obtidos do extrato em acetato de etila de *P. paniculatum* var. Nova, mistura concedida para a cedida a para avaliação biológica.

A tabela 3 apresenta os resultados referentes ao cálculo de inibição para as enzimas lipase e α -amilase, com seus respectivos padrões.

Tabela 3: Atividade inibitória (%) frente as enzimas lipase e α -amilase para as substâncias de PST

Amostra	Inibição de lipase (%)	Inibição de α -amilase (%)
α - e β - amirina	25,01 \pm 4,96	11,14 \pm 0,68
α - e β - amirona	96,70 \pm 3,15	25,01 \pm 1,53
Breína e maniladiol	13,94 \pm 0,11	15,95 \pm 1,65
Ácido triterpênico	23,13 \pm 4,71	86,25 \pm 3,22

Observa-se através desta que o maior valor de inibição (%) para lipase foi obtida pela mistura de α - e β - amirona. Por esta apresentar capacidade inibitória significativa, ou seja, maior que 80%, foi selecionada para a determinação da concentração de inibição de 50% de atividade da enzima (CI_{50}). Através desta análise, a competitividade inibitória de lipase resultou em um valor de CI_{50} (mg/mL) de 3,97 \pm 0,41. Em estudo realizado com ácido carnósico, diterpeno isolado do extrato metanólico das folhas de *Salvia officinalis*, foi obtida uma atividade inibitória da lipase pancreática em uma maneira de concentração, resultando um valor de CI_{50} de 12 mg/mL (NINOMIYA et al, 2004).

Na verificação da atividade inibitória de α -amilase, o ácido triterpênico apresentou maior atividade inibitória. Considerando também, assim como para lipase, que este apresentou capacidade inibitória maior que 80%, fez-se a determinação da concentração de inibição de 50% de atividade (μ g/mL), resultando em um valor de 23,03 \pm 0,5. Segundo Silva (2008), a alta polaridade dos extratos confere a presença de moléculas que possivelmente são capazes de interagir com as α -amilases de forma mais eficiente. Esse resultado pode ser explicado devido à estrutura química do ácido, por apresentar maior polaridade em relação às outras substâncias, condizendo a trabalhos anteriores, cuja atividade inibitória relatada sobre amilases e capacidade de precipitação e inibição enzimática está associada a compostos polares.

Os ensaios realizados para inibição de α -glucosidase apresentaram resultados contraditórios. O perfil inibitório das amostras foi avaliado a partir de duas enzimas: extrato cetônico de intestino de rato e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 2).

Tabela 4: Comparação dos métodos de inibição de α -glucosidase para as substâncias de PST

Método	Amostra	Concentração (mg/mL)	
		1,25	0,625
Extrato Acetônico	Breína e maniladiol	34,1960	32,7431
	Ácido triterpênico	22,6530	21,8630
	α - e β - amirina	34,3741	32,8374
	α - e β - amirona	34,8910	35,4254
S. cerevisiae	Breína e maniladiol	94,4842	95,1958
	Ácido triterpênico	84,7167	87,8768
	α - e β - amirina	92,9859	90,0159
	α - e β - amirona	79,8329	81,1854

De acordo com os dados da tabela acima, nota-se que o ensaio realizado para o extrato cetônico não apresentou em nenhuma das substâncias inibição significativa, descartando o potencial inibitório das mesmas frente a esta enzima. Porém, observando o ensaio com α -glucosidase extraída de levedura *S. cerevisiae*, obtém-se inibição significativa referente às substâncias analisadas, considerando a mistura dos dióis breína e maniladiol com maior perfil inibitório. Em estudos extensivos de atividade inibitória sobre α -glucosidase realizado por Lima *et al* (2009), a acarbose na concentração de 1 mg/mL apresentou inibição (%) para alfa-glucosidase de $75,51 \pm 0,94$, quando utilizando enzima extraída de *S. cerevisiae*. Comparando estes dados com os resultados obtidos frente à inibição de α -glucosidase pelos compostos isolados, observa-se que estes apresentaram inibição superior ao padrão acarbose.

Esses resultados incentivam a continuidade dos estudos, principalmente por meio de ensaios in vivo de avaliação de inibição enzimática.

CONCLUSÃO

O presente trabalho abordou os métodos de fracionamento, isolamento e identificação das estruturas químicas dos compostos isolados oriundos de extrato em hexano da espécie *P. paniculatum*. Tais constituintes foram avaliados a partir de ensaios de inibição frente às enzimas lípase, α -amilase e α -glucosidase, consideradas estas de grande influência como promotores de síndromes metabólicas. Mereceu destaque na realização dos ensaios a mistura binária de α - e β - amirona, com maior atividade inibitória de lípase, e ácido triterpênico, como principal composto inibidor de α -amilase dentre os compostos analisados. Todos os extratos apresentaram valores de inibição significativos frente à α -glucosidase, superiores ao padrão acarbose. A continuidade dos estudos com essa espécie botânica permitirá avaliar as respostas em sistemas “*in vivo*”.

Os resultados obtidos foram apresentados em congresso científico de nível nacional e já possibilitam sua publicação em periódicos científicos. O artigo já está em fase de elaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, F.; RIBEIRO M.N.S.; BARBOSA-FILHO J.M.; REIS A.S. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Ver Bras Farmacogn*, p. 696-720, 2006.
- ANDRADE – CETTO, A.; BECERRA – JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS – VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 27-32, 2008.
- BIRARI, A. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, p. 879-889, 2007.
- CANTAROW A.; SCHEPARTZ B. *Bioquímica: W.B.Saunders company*, Editora Atheneu, 4ª edição, 1968.
- CORREIA, M. P. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*, p. 89, 1984.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, p. 804-805, 1981.
- DEWICK, P. M. Medicinal natural products – a biosynthetic approach. 2ª Edição, John Wiley & Sons, LTD, 2002.
- FANG LI, WEI LI, HONGWEI FU, QINGBO ZHANG, KAZUO KOIKE. Pancreatic Lipase-Inhibiting Triterpenoid Saponins from Fruits of *Acanthopanax senticosus*. *Chem. Pharm. Bull*, p. 1087-1089, 2007.
- LIMA, E. S.; LINS, E. C.; NUNES, C. V.; SANTOS, P. A. Atividade inibitória dos extratos vegetais de *Cecropia purpurascens* sobre as enzimas α -glucosidase e α -amilase. *Anais 61ª Reunião Anual da SPBC*, 2009.
- LIMA, F.V.; Malheiros, A.; OTUKI, M.F.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R. A.; CHECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F. Three New triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*, p. 578-582, 2005.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterização em misturas binárias. *QUÍMICA NOVA*, p.623-626, 2000.

MAHATO, S. B. Advances in triterpenoid research. *Phytochemistry*, p. 1185-1236, 1997.

MAIA, R.M. *et al.* Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (BURSERACEAE): caracterização em misturas binárias. *Química Nova*, p. 623-626, 2000.

PATOCKA, J. *Journal of Applied Biomedicine*, p. 7-12, 2003.

PERNET, R. Phytochimie des Burseracees. *Journal of Natural Products*, p. 280-287, 1972.

RÜDIGER, A.L.; SIANI, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews*, p. 93-104, 2007.

SILVA, E. V. Ação inibitória de extratos de plantas do Cerrado sobre α -amilases com ênfase em *Kielmeyera coriácea*. Brasília, 141 p. Dissertação (Mestrado) – Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2008.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFETS, S.; LUNDER, M.; JANES, D.; STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytother Res.*, p. 874-877, 2009.

SUBRAMANIAM, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica*, p. 391-398, 2008.

SUGIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; YAMAMOTO, S.; YAMASHITA, C.; ODA, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Brazilian Natural Medicines. III. Structures of Triterpene Oligoglycosides and Lipase Inhibitors from Mate, Leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, p. 257-261, 2009.

THULIN, M.; BEIER, B. A.; RAZAFIMANDIMBISON S. G.; BANKS, H. I. Ambilobea, a new genus from Madagascar, the position of Aucoumea and comments on the ribal classification

of the frankincense and myrrh family (Burseraceae). *Nordic Journal of Botany*, p. 218-229, 2008.

TSCHIRCH, A.; CREMER, J., Elemi. *Journal of Chemical Society, Abstract.*, p. 293- 324, 1902.

VIEIRA JUNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, p. 183-187, 2005.

WEEKS, A.; DALY, D.C.; SYMPSON, B.B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, p. 85-101, 2005.

WEINTRAUB, M.; RUBIN, A.; GOLIK A; BYRNE, L.; SCHEINBAUM, M. L. Sibutramine in weight control: a dose-ranging, efficacy study. *Clin Pharmacol Ther*, p. 330-337, 1991.

WONG, J. M. W.; JENKINS, D. J. A. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J. Nutrition*, p. 2539 – 2546, 2007.

YASUKAWA, T. Antitumor-promoting activities of sterol and triterpenoides. *J Jpn Oil Chem Soc*, p. 571-583, 2000.

YOON, S.H.; ROBYT, J. F. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4^{IV} – α-maltohexaosyl and 4^{IV} – α maltododecaosyl analogues. *Carbohydr. Res.*, p. 1969 - 1980, 2003

ZOGHBI, M. G.; SIQUEIRA, J. B.; WOLTER, E. L.; JÚNIOR, O. L. Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (Burseraceae). *Acta Amazônica*, p. 187-189, 1994.

CRONOGRAMA EXECUTADO

Nº	Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Pesquisa bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Fracionamento dos extratos	X	X	X	X	X							
3	Refracionamentos				X	X	X	X					
4	Purificações dos triterpenos					X	X	X	X				
5	Identificação dos triteprenos por técnicas espectrométricas								X	X	X	X	
6	Ensaio de atividade inibitória de lípase <i>in vitro</i>									X	X	X	X
7	Apresentação de relatório Parcial					X							
8	Elaboração do Resumo e Relatório Final											X	X
9	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X