



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA

OBTENÇÃO DA MISTURA TRITERPÊNICA DE α,β - AMIRENONA E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS HIPOLIPEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E ANTIPOBESIDADE

ROSILENE GOMES DA SILVA FERREIRA

MANAUS
2017

ROSILENE GOMES DA SILVA FERREIRA

OBTENÇÃO DA MISTURA TRITERPÊNICA DE A, B- AMIRENONA E AVALIAÇÃO
DE SEUS EFEITOS HIPOLIPEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E ANTI-OBESIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia como requisito para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia,
Área de concentração em Biotecnologia.

Orientador: prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coorientador: prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga
Junior

MANAUS
2017

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA

ROSILENE GOMES DA SILVA FERREIRA

Área de concentração: Biotecnologia
Linha de pesquisa: Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

MANAUS
2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383o Ferreira, Rosilene Gomes da Silva
Obtenção da mistura triterpênica de α, β - amirenona e avaliação de seus efeitos hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade / Rosilene Gomes da Silva Ferreira. 2017
111 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima
Coorientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amirenona. 2. Atividade hipolipemiante. 3. Obesidade. 4. Hiperglicemia. 5. Breus Amazônicos . I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

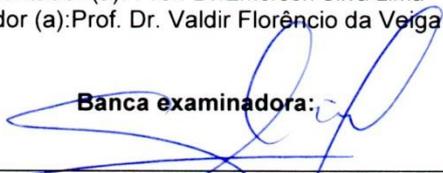
ROSILENE GOMES DA SILVA FERREIRA

OBTENÇÃO DA MISTURA TRITERPÊNICA DE α , β - AMIRENONA E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS HIPOLIPEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E ANTIOBESIDADE

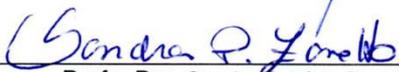
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Conservação e Uso da Biodiversidade.

Orientador (a): Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Co-orientador (a): Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

Banca examinadora:



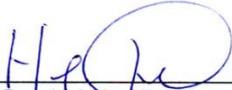
Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Orientador – Presidente da banca



Profa. Dra. Sandra Patricia Zanotto
Membro



Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos
Membro



Profa. Dra. Helyde Albuquerque Marinho
Membro



Prof. Dr. José Carlos Tavares
Membro

MANAUS –AMAZONAS
Março/2017

*Dedico aos meus amores Paulo (marido) e Luís Eduardo (filho), e aos meus pais Raimundo
Gomes e Maria Izes, pelo amor, incentivo e apoio sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por me fortalecer sempre na busca de meus objetivos, ajudando-me a superar todas as provações e dificuldades.

Aos professores orientadores Dr. Emerson Silva Lima e Valdir Florêncio da Veiga Junior, pela oportunidade, orientações, incentivo e liberdade de trabalho, proporcionando as condições para meu desenvolvimento intelectual e profissional.

Aos professores Dr. José Fernando Marques Barcellos, do laboratório de histologia/UFAM, e Dr. Adley Lima, pela contribuição neste trabalho, e ao professor Fabricio Rolin pela contribuição nas análises realizadas no Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos FCF/UFAM.

Aos meus familiares, especialmente Paulo (esposo) e Luís (filho), e aos meus amigos pelo incentivo e força para atingir essa conquista.

Aos companheiros dos grupos BHIOPHAR, especialmente Leonard Domingo Acho, Rebbeka Danyelle Lima da Silva, Lucileno Silva, Tallita, Carla Virgínia Lopes Machado, e do grupo Qbioma: Igor Medeiros, Klenyce Iamaguchi, Milena Campelo, pela indispensável ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos estimados colegas Leonard Domingo Acho, Nayana Yared Batista, Carla Virginia e Lucileno pelo apoio, incentivo e colaboração nos experimentos de diabetes e obesidade.

Às amigas da turma de doutorado PPGBIONORTE/AM de 2013, Aldeniza Cardoso Lima, Fernanda Guillon Simplício, Sirley Pereira Almeida.

Aos Coordenadores e às secretárias do PPGBIONORTE/AM e Geral, pela disponibilidade e contribuição indispensável.

Aos bolsistas de iniciação científica do BIOPHAR Frank do Carmo Guedes Junior e PIBIT do Priscila Brasil e Luiz Pedro Costa de Souza pelo apoio e contribuição nos experimentos.

Às técnicas de laboratório de histologia Rosilene Ribeiro Campos, Maiza Conceição Ferreira da Cunha e as estagiárias Mayla Silva Leão Ferreira e Ingrid do laboratório de histologia funcional da UFAM pela organização, contribuição nos experimentos, além da amizade, carinho e disposição em me ajudar durante o processamento das amostras.

À professora Dra. Geane Antiques Lourenço (ICB/UFAM) pelo apoio indispensável e à equipe do Biotério da UFAM, pelo suporte na finalização do experimento.

À FAPEAM, pelo apoio financeiro, de extrema importância para a realização deste projeto.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta colaboraram no desenvolvimento desta pesquisa e para esta realização pessoal.

RESUMO

As α -amirenona e β -amirenona são isômeros triterpenoides que ocorrem naturalmente em várias oleorresinas de espécies de *Protium* (Burseraceae) da Amazônia Brasileira. Esta mistura de α e β -amirenonas pode também ser sintetizada por oxidação a partir dos compostos principais α e β -amirinas, obtidas das mesmas oleorresinas. Apesar disso, informações sobre suas características físico-químicas e atividades biológicas ainda são escassas na literatura científica. Este estudo teve como objetivos a obtenção da mistura triterpênica α , β -amirenona e a avaliação dos seus efeitos hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade em modelos experimentais *in vivo*. Utilizando um processo simples, de elevado rendimento, a α e β -amirinas foi extraída, a partir da resina de breu (*Protium* sp.) e o composto binário α , β -amirenona foi sintetizado e submetido à caracterização físico-química por meio de diferentes técnicas, como cromatografia líquida, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), espectrometria de massa, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria de varredura diferencial, termogravimetria, termogravimetria derivada e espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier. Os efeitos *in vitro* de α , β -amirenona foram avaliados em relação à inibição das enzimas α -amilase, α -glucosidase, lipase e xantina oxidase. Foram avaliados também os efeitos anti-hiperglicêmicos, hipolipemiantes e antiobesidade em camundongos machos adultos das linhagens BALB/c e C57BL/6. Análises bioquímicas sanguíneas e histopatológicas foram realizadas nos animais submetidos ao experimento da obesidade. A mistura de α -amirenona e β -amirenona foi obtida de forma otimizada a partir de semi-síntese do seu precursor α e β -amirina, extraída diretamente do breu com solvente hexano. A mistura α e β -amirenona inibiu a enzima α -glucosidase em concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$, atingindo um índice de inibição de $96,59 \pm 0,52\%$. Para a lipase, em concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, obteve-se índice de inibição $82,99 \pm 1,51\%$, com valor de CI_{50} de $1,193 \pm 0,41 \text{ mg/mL}$. Os testes de α -amilase, α -glucosidase e da xantina oxidase apresentaram valores menores que 50% de atividade na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da hiperglicemia aguda induzida por maltose e sacarose, a mistura de α , β -amirenona a 25 mg/kg reduziu a glicemia pós-prandial mais do que a acarbose a 50 mg/kg ($p < 0,05$). Os animais tratados com α , β -amirenona apresentaram diminuição dos níveis de glicose plasmática na dose de 50mg/kg. A administração de α , β -amirenona, nas doses de 50 e 100mg/kg, reduziu os níveis plasmáticos de triglicérides nos animais submetidos à emulsão lipídica oral de modo mais marcante do que o padrão orlistate. No teste crônico de indução da obesidade, verificou-se uma redução do peso dos animais tratados com α, β -amirenona nas doses de 25 e 50mg/kg respectivamente. Este estudo apresentou evidências da ação da α , β -amirenona na redução da glicemia pós-prandial e na glicemia de animais após indução do diabetes e na redução do peso corporal. A α , β -amirenona, em sua ação antiobesidade, afeta principalmente os carboidratos e o metabolismo lipídico por mecanismos que incluem, por exemplo, a inibição das enzimas digestivas, não descartando outros mecanismos envolvidos. A mistura de α , β -amirenona demonstrou ser um ativo potencial para o tratamento ou prevenção das síndromes metabólicas, havendo necessidade de futuros estudos que esclareçam melhor alguns aspectos da sua atividade.

Palavras-chave: amirenona; atividade hipolipemiante, obesidade; hiperglicemia; breus amazônicos.

ABSTRACT

α -Amyrenone and β -amyrenone are triterpenoid isomers that occur naturally in various oleoresins of the Brazilian Amazon species *Protium* (Burseraceae). The mixture of α - and β -amyrenone can also be synthesised by oxidation from the principal components α and β -amyryns, obtained from the same oleoresins. However, information about its physicochemical properties and biological activity is poor in the scientific literature. The main objectives of this study were to obtain the triterpenic mixture α,β -amyrenone and to evaluate its hypolipemiant, hypoglicemiant and anti-obesity effects via *in vivo* tests. Using a simple, high-yield process and a commercially available mix (comercial resin) rich in α,β amyryns as a substrate, the binary mix α,β -amyrenone was synthesised and submitted to physio-chemical analysis using different techniques, including liquid chromatography and nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C), mass spectrometry, scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and derived thermogravimetry, and Fourier transform infrared spectroscopy. The *in vitro* effects of α,β -amyrenone were evaluated in relation to the inhibition of the enzymes α -amylase, α -glucosidase, lipase, and of an antioxidant enzyme, xanthine oxidase. Anti-hyperglycemic, hypolipemiant and anti-obesity effects on male adult mice of the BALB/c and C57BL/6 strains were evaluated. Bloodbiochemical and histopathological analysis were carried out on animals from obesity test. The mixture of α , β -amyrenone was obtained by optimization of semi-synthesis of its precursor α , β - amyryn, in a direct way from resin, using hexan as solvent. The mixture inhibited α -glucosidase enzyme at a concentration of 1.6 $\mu\text{g/mL}$, reaching an inhibition index of 96.59% (SD \pm 0.52) ($p < 0.05$). For lipase, at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, an inhibition index of 82.99 ± 1.51 was achieved, with a CI_{50} (mg/mL) value of 1.193 ± 0.41 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). The tests of α -amilase, α -glucosidase and of xanthine oxidase presented values less than 50% of inhibiting activity at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. In the evaluation of the profile of acute or episodic hyperglycemia induced by maltose and sucrose, a 25mg/kg mixture of α,β -amyrenone achieved a greater reduction of the post-prandial glycemiac peak in animals than acarbose at 50mg/kg ($p < 0.05$). In the test for induced diabetes, animals presented reduced levels of plasmatic glyucose with α,β -amyrenone at a concentration of 50mg/kg in comparison with animals from the standard (acarbose) group ($p < 0.05$). In 50 and 100mg/kg concentrations, α,β -amyrenone reduced the plasmatic levels of triglycerides to a more marked degree than the standard orlistat in animals submitted to oral lipid-based emulsion. In chronic tests for the induction of obesity, a reduction in weight was seen in animals treated with α,β -amyrenone in 25 and 50mg/kg concentrations respectively. This study brought evidences of lowering action of α,β -amyrenone on post prandial glicemia, induced diabetes and body weight. In its anti-obesity action, α,β -amyrenone mainly affects the carbohydrates and the lipid metabolism via mechanisms that include the inhibition of digestive enzymes. Mixture of α,β -amyrenone seemed a potential chemical for treatment or prevention of metabolic syndromes, but further studies are necessary in order to clarify some aspects of its activity.

Key words: amyrenone; hypolipemiant activity, obesity; hyperglycemia; Amazon resins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores associados à síndrome metabólica.....	25
Figura 2 – Estruturas químicas de α e β -amirenona	33
Figura 3 – Fluxograma das atividades.....	38
Figura 4 – Processo para obtenção e isolamento de substância majoritária $\alpha\beta$ -amirina a partir da resina do breu.....	42
Figura 5A – Equação química para a síntese dos derivados oxidados da mistura de α -amirina (R1 = H, R2 = CH3) e β -amirina (R1 = CH3, R2 = H). a) Clorocromato de Piridínio (PCC), CH ₂ Cl ₂	43
Figura 5B – Processo de purificação e síntese	44
Figura 6A: CLAE – pico de retenção da mistura α e β -amirenona	61
Figura 6B: CLAE – índice de pureza de α e β -amirenona	62
Figura 7 – CDD dos diferentes extratos	62
Figura 8 – CDD: A, B, C, D, E e F.....	63
Figura 9 – CDD do processo de oxidação α , β -amirina a α , β -amirenona	64
Figura 10 – Aspecto de α e β -amirenona	65
Figuras 11, 12 e 13 – Aspecto morfológico da α e β - amirenona em MEV	65
Figura 14 – DTA, DSC e TG/DTG para α e β - amirenona com uma velocidade de aquecimento de 10,0 ° C min ⁻¹	67
Figura 15 – Infravermelho por transformada Fourier da α , β amirenona.....	68
Figura 16 – CLAE de padrão α -amirina.....	69
Figura 17 – CLAE de padrão α -amirina.....	69
Figura 18 – Espectro de RMN de ¹ H de amirina	70
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C de amirina	71
Figuras 20 e 21 – Figuras 20 e 21: Dados do espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C de amirenona (A e C) e amirina (B e D).	73
Figura 22 – Espectrometria de Massa (EM).....	74
Figura 23 – Atividade inibitória (%) dos isômeros α , β - amirenona sobre a enzima α -glucosidase.....	75
Figura 24 – Efeito inibitório (%) dos isômeros α , β amirenona sobre a enzima lipase...76	76

Figura 25 – Atividade inibitória (%) dos isômeros α , β -amirenona sobre a enzima α -amilase	76
Figura 26 – Efeito da mistura α , β -amirenona nos níveis de glicemia após administração oral de maltose em camundongos Balb C.....	77
Figura 27 – Efeito da mistura α , β -amirenona nos níveis de glicemia após administração oral de sacarose em camundongos Balb C.	78
Figura 28 – Efeito da mistura α , β -amirenona nos níveis de glicemia após administração oral de amido em camundongos Balb C.	79
Figura 29 – Efeito da mistura α , β -amirenona após indução com emulsão de Scot.....	80
Figura 30 – Efeito da administração de α , β -amirenona na glicemia de camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina + nicotinamida.....	81
Figura 31 – Efeito de α , β amirenona no ganho de peso	83
Figura 32 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos corados com HE.....	87
Figuras 33 – Grupo basal: Fotomicrografia de cortes histológicos do rim de camundongos do grupo normal/ basal (não induzido e não tratado), corados com HE	89
Figura 34 – Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos do grupo tratado com α , β -amirenona 25mg, corados com HE.	90
Figura 35 – Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos do grupo tratado com α , β -amirirona 50mg, corados com HE.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações ocorridas em cada tipo de dislipidemia	22
Tabela 2: Gradiente % dos solventes em relação ao tempo	47
Tabela 3: Distribuição dos grupos experimentais.....	51
Tabela 4: Composição da ração modificada	52
Tabela 5: Composição centesimal	53
Tabela 6: Reagentes utilizados nas dosagens bioquímicas.....	56
Tabela 7: Análises estatísticas para o rendimento médio dos extratos de acordo com o tipo de solvente e método de extração.....	59
Tabela 8: Análises estatísticas para o rendimento médio do breu nas colunas de acordo com o tipo de solvente.....	60
Tabela 9: Avaliação do rendimento dos extratos de breu nas colunas de acordo com o tipo de tratamento	60
Tabela 10: Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de amirina	71
Tabela 11: Comparação das médias do consumo de água e ração em relação nos diferentes grupos (18 semanas).....	82
Tabela 12: Efeito da α,β -amirenona: comparação das médias dos testes bioquímicos em relação aos diferentes grupos.....	84

LISTA DE SÍMBOLOS SIGLAS E ABREVIACÕES

α – Alfa

AcOEt – Acetato de etila

β – Beta

CCA – Cromatografia em Coluna Aberta

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CI₅₀ – Concentração inibitória 50

δ – Delta

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

ELISA – Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay

F – fração

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada Fourier

δ – Deslocamento químico

H – Hexano

Hz – Hertz

INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

R_f – Fator de retenção

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

PCC – Clorocromato de Piridinio

TTOC – Teste de Tolerância Oral a Carboidratos

TTOT – Teste de Tolerância Oral a Triglicerídeos

XO – Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 DIABETES	19
2.2 DISLIPIDEMIA.....	20
2.3 OBESIDADE	23
2.4 SÍNDROME METABÓLICA	25
2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES E OBESIDADE.....	26
2.6 OBTENÇÃO DE BIOATIVOS DE BREUS AMAZÔNICOS	28
2.6.1 Triterpeno α e β -amirina	29
2.6.2 Triterpeno α e β - amirenona	32
2.6.3 Processo de semissíntese	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.2 ANIMAIS	39
4.3 MATERIAL BIOLÓGICO	39
4.4 OBTENÇÃO DA MISTURA α E β - AMIRENONA.....	39
4.4.1 Extração	39
4.4.2 Obtenção do extrato Bruto	40
4.4.2.1 Maceração.....	40
4.4.2.2 Sonicação.....	40
4.4.3 Cromatografia em coluna fase normal (CCFN) e Cromatografia em camada delgada (CCD)	40
4.4.4 Extração direta	41
4.5 PROCESSO DE OXIDAÇÃO.....	42
4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISÔMERO α E β - AMIRENONA ...	44
4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
4.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	45
4.6.3 Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG-DTG)	45

4.6.4 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR).....	46
4.6.5 Espectrometria de Massas (EM)	46
4.6.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
4.6.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	47
4.7 ENSAIOS ENZIMÁTICOS <i>IN VITRO</i>	47
4.7.1 Inibição da lipase	47
4.7.2 Inibição de α -amilase	48
4.7.3 Inibição de α -glucosidase	48
4.7.4 Xantina oxidase	48
4.8 TESTES AGUDOS E CRÔNICOS <i>IN VIVO</i>	49
4.8.1 Testes agudos	49
4.8.1.1 Teste de Tolerância Oral a Carboidratos (maltose, sacarose e amido)/TTOC	49
4.8.1.2 Teste de Tolerância Oral a Triglicérido (TTOT).....	50
4.8.2 Testes Crônicos	50
4.8.2.1 Indução experimental de diabetes por estreptozotocina + nicotinamida (Diabetes tipo II)	50
4.8.2.2 Indução experimental da obesidade	51
4.9 DIETA EXPERIMENTAL – DIETA COM RAÇÃO NORMAL E DIETA COM RAÇÃO MODIFICADA.....	52
4.9.1 Determinação da composição centesimal	53
4.9.2 Preparo da amostra para análise	53
4.9.3 Determinação da fração Umidade	54
4.9.4 Determinação da fração extrato etéreo	54
4.9.5 Determinação da fração Nitrogenada	54
4.9.6 Determinação da Fração Cinza.....	55
4.9.7 Determinação da Fração Glicídica	56
4.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	56
4.11 ANÁLISE DA TOXIDADE	57
4.12 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	57
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
5. RESULTADOS	59
5.1 OBTENÇÃO DA AMIRENONA.....	59
5.2 ANÁLISE DA PUREZA	61
5.3 SÍNTESE DA AMIRENONA A PARTIR DA AMIRINA.....	63

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE α , β -AMIRENONA.....	64
5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	64
5.4.2 Curvas de termogravimetria (TG) / termogravimetria derivada (DTG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria de exploratória diferencial (DSC).....	66
5.4.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada Fourier (FTIR).....	67
5.4.4 CLAE e RMN de α e β -amirina	68
5.4.5 α e β -amirenona	72
5.4.6 Espectrometria de Massas (EM)	73
5.5 TESTES ENZIMÁTICOS <i>IN VITRO</i>	74
5.5.1 Efeito de α , β -amirenona sobre as enzimas α -glucosidase, lipase, α -amilase e xantino-oxidase (XO)	74
5.6 TESTES <i>IN VIVO</i>	77
5.6.1 Efeitos de α e β -amirenona no teste oral de tolerância aos carboidratos (TOTC) maltose, sacarose e amido	77
5.6.2 Efeito da mistura de α e β - amirenona sobre a trigliceridemia após teste de tolerância oral.....	79
5.6.3 Efeito da mistura de α , β - amirenona sobre glicemia <i>in vivo</i>	80
5.6.4 Efeitos da mistura α , β -amirenona no peso corporal, consumo de ração e água em modelos induzidos de hiperlipidemia e obesidade.....	82
5.6.5 Dosagens bioquímicas	83
5.6.6 Análise da Toxicidade	84
6. DISCUSSÃO	91
7. CONCLUSÃO.....	98
8. REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO.....	111

1 INTRODUÇÃO

As hiperglicemias, dislipidemias e obesidade se constituem atualmente em graves problemas de saúde pública, pela alta prevalência na população, suas complicações crônicas, mortalidade, altos custos financeiros e sociais envolvidos no tratamento (ADA, 2015; IDF, 2013; JANEIRO et al., 2008). Tais achados também se constituem em fatores de risco presentes na síndrome metabólica, que é um transtorno complexo que envolve alterações nos níveis de pressão arterial (PA), triglicérides, colesterol HDL e glicemia de jejum, entre outros (SHIN et al., 2013; SPERETTA et al., 2014).

Muitas espécies pertencentes ao reino vegetal têm contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de compostos que possuem um largo espectro de propriedades biológicas. Outras têm sido estudadas cada vez mais pelo grande potencial no tratamento de doenças metabólicas, como o grupo dos terpenos presentes em um grande número de espécies vegetais, que engloba substâncias tais como lupeol, α -amirina, β -amirina, friedelina (GALLEGOS OLEA; ROQUE, 1990), α -amirenona e β -amirenona. A partir delas têm sido testados novos compostos com propriedades anti-inflamatórias, hipoglicemiantes, hipolipemiantes e antiobesidade (JANEIRO et al., 2008; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Pesquisas anteriores demonstraram claramente que o triterpeno pentacíclico α , β -amirina isolado de *Protium heptaphyllum* Aubl. March (Burseraceae) exerce efeitos anti-hiperglicêmico e hipolipemiante em modelos de diabetes (induzida por estreptozotocina) e hiperlipidemia (dieta hiperlipídica) em ratos, sendo extremamente relevante para pesquisa do diabetes experimental (SANTOS et al., 2012).

Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa BIOPHAR da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFAM verificou-se que triterpenos como α , β -amirina, α , β -amirenona, breína/maniladiol na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ inibiram a produção de Interleucina-6 (IL-6) (ALMEIDA, 2015). Santos et al. (2012) demonstraram que a α -amirina, bem como α ou β -amirina isoladas, apresentaram ações hipoglicemiante e hipolipemiante, e que compostos à base de plantas que contêm triterpenos são bem conhecidos para regular a glicose e o metabolismo dos lípidos, tendo papel positivo em distúrbios metabólicos.

Considerando o potencial da mistura α , β -amirenona no tratamento de distúrbios inflamatórios, ao mesmo tempo em que as evidências de seus efeitos em outras condições são escassas, foram propostos testes em outros contextos fisiopatológicos para avaliar melhor suas propriedades farmacológicas. Como os processos de testes *in vitro* e *in vivo* requerem

matéria-prima padronizada e a possibilidade de obtê-la em grande quantidade do produto natural é pequena, já que pelo conhecimento atual se utilizam, principalmente, as folhas, havia a necessidade de verificar quais processos poderiam facilitar a extração e o isolamento da mistura a partir de outros produtos derivados, como as resinas. Ainda assim permanecia uma lacuna no conhecimento sobre qual método seria mais adequado para trabalhar o isolamento da substância a partir do óleo-resina de *Protium* spp (breu). Portanto, não havia sido propostas nem testadas técnicas alternativas, sendo que neste trabalho pode-se dizer que houve uma otimização das técnicas para isolamento de maior quantidade do composto em estudo.

Dessa forma, no contexto de estudos que visam ao reconhecimento e uso de tratamentos derivados de recursos procedentes da biodiversidade amazônica, sempre é importante um questionamento sobre o potencial dos produtos da biodiversidade e derivados, que, guiado pelo modo tradicional, possa orientar pesquisas que contribuam para a validação do uso em outros contextos.

No presente estudo, por exemplo, tratou-se de verificar se os derivados (α , β -amirenona) de uma substância reconhecidamente ativa (α , β -amirina) compartilhavam propriedades hipolipemiante e hipoglicemiante, em maior ou menor grau, e se era válido extrapolar esses efeitos para uma ação antiobesidade, considerando aspectos da fisiopatologia da assim chamada síndrome metabólica, que também possui componentes inflamatórios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica complexa caracterizada por elevados níveis de glicemia e um transtorno de carboidratos, gorduras e proteínas (SEINO et al., 2010). A *International Diabetes Federation (IDF)* estimou que o número de pessoas com diabetes em todo o mundo, foi de 382 milhões (8,3% da população adulta) em 2013, e este número passará para 592 milhões (10% dos adultos) até o ano de 2035. A diabetes foi responsável por 11% do total de despesas globais de saúde por adulto (548 bilhões de dólares) e 5,1 milhões de mortes (IDF, 2013).

Dados da *American Diabetes Association (ADA)* destacam que o aumento anormal da glicose no sangue em diabéticos resulta em danos em longo prazo e disfunção de vários órgãos, incluindo os olhos, rins, nervos e vasos sanguíneos (ADA, 2015). Conseqüentemente, as pessoas com diabetes são mais propensas a apresentar lesões de retina, nefropatia, risco de úlceras nos pés, amputação de membros, acidente vascular cerebral, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual (STENESTRAND et al., 2010).

Essa doença metabólica crônica é classificada em dois tipos principais: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A DM1 associa-se a destruição de células β pancreáticas, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina. E a DM2, de acordo com suas fisiopatogênias, varia da predominância da deficiência na secreção de insulina à predominância de resistência à insulina (SBD, 2013). Há também diabetes em que ocorrem mutações específicas (SEINO et al., 2010). Alguns estudos relatam que 90% a 95% dos casos de diabetes são do tipo 2, uma doença que afeta um maior número de pessoas em países pobres (SMITH et al., 2011; EL-ABHAR ; SCHAALAN, 2014).

A DM1 é uma doença autoimune e uma das mais comuns neste grupo de doenças, com milhões de pessoas afetadas em todo o mundo. Ocorre em qualquer idade, mas comumente é diagnosticada da infância até os trinta anos. A etiologia da DM1 ainda não foi esclarecida, podendo envolver diferentes fatores, entre eles genéticos, desregulação imune e causas ambientais (BRESSON; HERRATH, 2007).

Atualmente são três os critérios aceitos para o diagnóstico de diabetes mellitus com utilização da glicemia: o quadro clínico (sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal) acrescido de glicemia casual $>200\text{mg/dL}$; glicemia de jejum $\geq 126\text{mg/dL}$; glicemia

de 2 horas pós-sobrecarga de 75g de glicose >200mg/dL. Por outro lado, existe um grupo intermediário de indivíduos em que os níveis de glicemia não preenchem os critérios para o diagnóstico de diabetes. Nesses casos foram consideradas duas categorias: glicemia de jejum alterada: valores entre 100 e 126mg/dL; tolerância à glicose diminuída: glicemia de 2h entre 140 e 199mg/dL.

Em 2009 foi proposta a utilização da hemoglobina glicada (HbA1c) como mais um critério de diagnóstico de diabetes mellitus. A justificativa foi de que tal medida avaliava o grau de exposição à glicemia durante o tempo determinado e que estes valores se mantinham estáveis após a coleta. Dessa forma, seria diagnóstico de diabetes um valor de HbA1c > 6,5% e indivíduos com alto risco para o desenvolvimento de diabetes aqueles com valores de HbA1c entre 5,7% e 6,4%. Todos esses parâmetros são recomendações atualizadas tanto nos consensos brasileiro quanto no americano (SBD, 2013; ADA, 2015). Geralmente o distúrbio ocorre na meia idade ou mais tarde. Entretanto, essa doença vem sendo diagnosticada cada vez mais em crianças e adolescentes (SBD, 2013; SBP, 2012).

Embora, atualmente, haja diversas classes de fármacos para o tratamento do diabetes, tais como a insulina, as sulfonilureias (clorpropamida 125 a 500mg, glibenclamida 2,5 a 20mg), as metiglinidas (repaglinida 0,5 a 16mg; nateglinida 120 a 360mg), as biguanidas (metformina 1.000 a 2.500mg), as glitazonas (pioglitazona 15 a 45mg), e mais recentemente os inibidores da alfa-glicosidase (acarbose 50 a 300mg) da Dipeptidil Peptidase (DPP-IV) gliptinas (sitagliptina 50 ou 100mg; saxagliptina 2,5 ou 5mg) e os miméticos e análogos do Glucagon Like Peptide 1 (GLP-1) (exenatida 5mcg e 10mcg; liraglutida 0,6mg, 1,2mg e 1,8mg), ainda há necessidade de se buscar novos fármacos para diminuir as complicações diabéticas (SBD, 2013).

2.2 DISLIPIDEMIA

Os principais lipídios para o ser humano são: ácidos graxos, colesterol, triglicérides (TG) e fosfolípidos (FL). Essas moléculas constituem a porção lipídica das lipoproteínas (LP) — forma de transporte dos lipídios na circulação sanguínea. A maioria dos ácidos graxos pode ser sintetizada pelo fígado, com exceção do ácido linoleico e de seu metabólito, o ácido araquidônico (ácidos graxos essenciais). A outra parte das LP é constituída de proteínas especiais, denominadas apolipoproteínas ou apoproteínas (apo). Essas têm as seguintes funções: a) transporte dos lipídios na corrente sanguínea; b) ligação com os receptores celulares; c) ativação de determinadas enzimas (KOOLMAN; RÖHM, 2013).

Dentre os lipídios, merecem destaque os triglicerídeos (TG), que têm o papel fisiológico de reserva de energia, e o colesterol, que é um componente da membrana celular e participa da síntese de ácidos biliares e de hormônios esteroides. Como os lipídios são moléculas hidrofóbicas, associam-se a determinadas proteínas (apoproteínas) formando complexos lipídicos solúveis, podendo assim ser transportados no plasma. Eles são divididos de acordo com sua densidade, característica conferida pela quantidade de apoproteínas e de triglicerídeos, em: quilomícrons; VLDL (*very low density lipoprotein* – lipoproteína de muito baixa densidade); IDL (*intermediate density lipoprotein* – proteína de densidade intermediária); LDL (*low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade); HDL (*high density lipoprotein* – lipoproteína de alta densidade) (ALVES, 2010).

A gordura proveniente da alimentação chega ao trato gastrointestinal e nesse local, após sofrer ativação pelos sais biliares, as lipases pancreáticas transformam-na em quilomícrons que atingem o sistema linfático e, através do ducto torácico, chegam à circulação. Dentro dela os quilomícrons sofrem a ação da lipase lipoproteica e podem ter seu conteúdo de triglicerídeos aproveitado pelos tecidos. Os quilomícrons remanescentes são captados pelo fígado e seus conteúdos de colesterol e triglicerídeos são utilizados para formar a VLDL. Sob a ação das lipases teciduais, a VLDL pode ser convertida em IDL, e se não for captada pelo fígado e continuar a sofrer ação das lipases, transformar-se-á em LDL. Por outro lado, a remoção do colesterol ocorre por um processo denominado transporte reverso de colesterol mediado pela HDL, que é fabricado pelo fígado (ALVES et al., 2010).

Alterações em qualquer etapa ou componente deste sistema, considerando tanto a função quanto defeito na síntese das lipoproteínas, têm como consequência mudanças no nível dos lipídios plasmáticos, que causam distúrbios denominados dislipidemias (ALVES et al., 2010). As dislipidemias são fatores de risco para doença cardiovascular e quando associadas ao diabetes mellitus aumentam de duas a quatro vezes o risco de desenvolvimento desta condição (SBC, 2013a e 2013b).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2013b), as dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas genotipicamente ou fenotipicamente. Genotipicamente as dislipidemias se dividem em monogênicas, nas quais ocorrem mutações em um só gene, e poligênicas, por associações de múltiplas mutações. As dislipidemias mais comuns são a hipercolesterolemia isolada ou em associação com hipertrigliceridemia e a hipertrigliceridemia com o HDL-colesterol baixo. Algumas doenças causam dislipidemias secundárias, como o diabetes mellitus e a síndrome metabólica, que estão associadas, particularmente, com hipertrigliceridemia e HDL-colesterol baixo. O hipotireoidismo,

síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hepatopatias colestáticas crônicas, obesidade, entre outras, são patologias que causam dislipidemias (PEREIRA, 2011; SBC, 2013b).

Pela classificação de Fredrikson, as dislipidemias primárias podem ser subdivididas de acordo com o tipo de lipoproteína predominante. A tabela 1 traz um resumo das alterações que ocorrem em cada um dos tipos de dislipidemia.

Tabela 1: Alterações ocorridas em cada tipo de dislipidemia

Tipo	Lipoproteínas plasmáticas predominantes	Lipídio plasmático predominante (mg/dL)	Aparência do plasma após refrigeração	Exemplo
I	Quilomícrons	Triglicérides (>1500)	Sobrenadante cremoso	Deficiência de LPL
IIa	LDL	Colesterol (>240)	Claro	Hiperlipidemia familiar
IIb	LDL e VLDL	Colesterol (>240) e triglicérides (200-500)	Geralmente claro	Hiperlipidemia familiar combinada
III	Remanescentes	Colesterol e triglicérides (>300)	Turvo	Disbetalipoproteinemia
IV	VLDL	Triglicérides (>300)	Turvo	Hipertrigliceridemia familiar
V	Quilomícrons e VLDL	Triglicérides (>1500)	Sobrenadante cremoso e resto turvo	Deficiência de apo-CII

Fonte: adaptado de Motta (2009) e Alves et al.(2010)

Atualmente, o tratamento das dislipidemias divide-se em não farmacológico e farmacológico. O primeiro inclui a terapia nutricional e mudanças de estilo de vida. A terapia nutricional depende da adesão à dieta, às correções no estilo de vida – perda de peso, atividade física e cessação do tabagismo – e, principalmente, da influência genética da dislipidemia em questão (CAMARGO et al., 2004; SBC, 2013b).

O tratamento farmacológico das dislipidemias apresentou, nas últimas décadas, avanços notáveis, obtidos com o desenvolvimento de hipolipemiantes, entre eles as estatinas, as resinas e a ezetimina, bem como outras classes (SBC, 2013). Hoje, a redução da LDL-C

por inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase ou estatinas ainda permanece sendo a terapia mais utilizada para reduzir o LDL-C e a incidência de eventos cardiovasculares. A ação das estatinas pode influenciar todo o conjunto das lipoproteínas circulantes. Estas também reduzem os triglicerídeos mediante o aumento da expressão de LDL-R e, conseqüentemente, a redução de lipoproteínas ricas em triglicérides do plasma.

2.3 OBESIDADE

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo excessivo de gordura que resulta no comprometimento da saúde. Segundo a OMS, uma pessoa com um IMC de 30 ou mais é geralmente considerada obesa e com um IMC igual ou superior a 25 é considerada com sobrepeso (WHO, 1999).

A prevalência da obesidade nos últimos anos vem apresentando um aumento significativo em vários países do mundo. Esse fato é preocupante, visto que o excesso de gordura corporal, em especial a abdominal, está relacionado diretamente a alterações do perfil lipídico, ao aumento da pressão arterial e à hiperinsulinemia, a fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas, como o diabetes melito tipo 2 e as doenças cardiovasculares (WHO, 1999; ABESO, 2010; HURT et al., 2010).

No Brasil, a prevalência de excesso de peso na população adulta residente em 26 capitais dos Estados brasileiros e no Distrito Federal aumentou de 43,2% em 2006 para 51,0% em 2012, um incremento anual médio calculado de 1,37% para o período. No mesmo período, a prevalência da obesidade na população adulta das 27 cidades cobertas sondadas pelo sistema VIGITEL aumentou de 11,6% para 17,4%, representando um incremento médio de 0,89% ao ano. Segundo esse estudo, os aumentos tenderam a ser maiores nas cidades das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do que nas cidades das regiões Sul e Sudeste (MALTA et al., 2014).

A obesidade é uma doença crônica e complexa, de etiologia multifatorial, e envolve fatores genéticos, hormonais, relacionados a dietas, entre outros. Atualmente, o principal fator indicado por pesquisadores que contribuiu para a obesidade no mundo foram as rápidas mudanças na dieta da população, com um aumento significativo no consumo de alimentos de origem animal, industrializados e com alto teor calórico. Em países como a Coreia, o consumo de gordura passou de 7,7g%, em 1970, a 20,3 g% em 2010 (LEE et al., 2013). Dessa forma, por apresentar um rápido aumento em sua prevalência nas últimas décadas, a obesidade está sendo considerada uma doença crônica e epidêmica, que está

relacionada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil.

Hoje não existe nenhum tratamento farmacológico em longo prazo que não envolva mudança de estilo de vida. O tratamento da obesidade é complexo e multidisciplinar. Há várias opções de tratamento para a obesidade e/ou sobrepeso, que dependem do grau de excesso de peso, associado a uma maior gravidade da doença (ABESO, 2010). Medicamentos, dietas de valor calórico muito baixo e, às vezes, cirurgia nos graus II e III — as mudanças de estilo de vida por meio de aumento do conhecimento e técnicas cognitivo-comportamentais são ainda fundamentais. A escolha do tratamento deve basear-se na gravidade do problema e na presença de complicações associadas. Segundo a Abeso (2010), existem desde tratamentos dietéticos e terapia cognitivo-comportamental a tratamentos heterodoxos e suplementos nutricionais.

O ideal é que se estabeleça o grau de obesidade no qual se aceita a intervenção com medicamentos em cada população. Atualmente, os critérios aceitos e indicados pela DBO para utilização de medicamentos são: IMC de 30 kg/m² ou 25 kg/m² na presença de comorbidades e falha em perder peso com o tratamento não farmacológico. Até agora, existem cinco medicamentos registrados para tratar a obesidade no Brasil: dietilpropiona (anfepriamo), femproporex, mazindol, sibutramina e orlistate (ABESO, 2010).

Neste contexto, cresce o número de pesquisas que envolvem a utilização de extratos ou compostos isolados para o tratamento ou prevenção da obesidade, ganhando destaque estudos *in vivo* em ratos e camundongos. Em estudo de Weidner e colaboradores (2012), compostos derivados de leguminosas, denominados de *amorfrutins*, foram descritos como promissores com efeitos *in vivo* em camundongos C57BL quanto à resistência à insulina e à dieta com alto teor de gordura e obesidade.

Outro estudo recente investigou as propriedades antiobesidade de resina de *Protium heptaphyllum* e o possível mecanismo em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD). Os ratos tratados com uma mistura de triterpenos obtida da resina demonstraram reduções no peso corporal, no consumo de energia líquida e no acúmulo de gordura abdominal (CARVALHO et al., 2015). Dessa forma, foram observados efeitos promissores de extratos ou substâncias isoladas de produtos naturais para o tratamento de diferentes patologias, entre elas a obesidade.

2.4 SÍNDROME METABÓLICA

Considerada hoje como um dos grandes problemas de saúde pública por envolver diferentes fatores, a síndrome metabólica (SM) tem modificado suas definições ao longo do tempo. Segundo MULÈ (2014), que faz uma revisão sobre a evolução da conceituação, não há consenso sobre sua caracterização, mas os pontos em comum a descrevem como um transtorno complexo, envolvendo um conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes melito tipo 2 (DM2), incluindo a obesidade visceral, intolerância à glicose, pressão arterial elevada, triglicerídeos elevados e os níveis de colesterol de lipoproteína de alta densidade reduzidos (KASSI et al., 2011) como pode ser visto na figura abaixo.

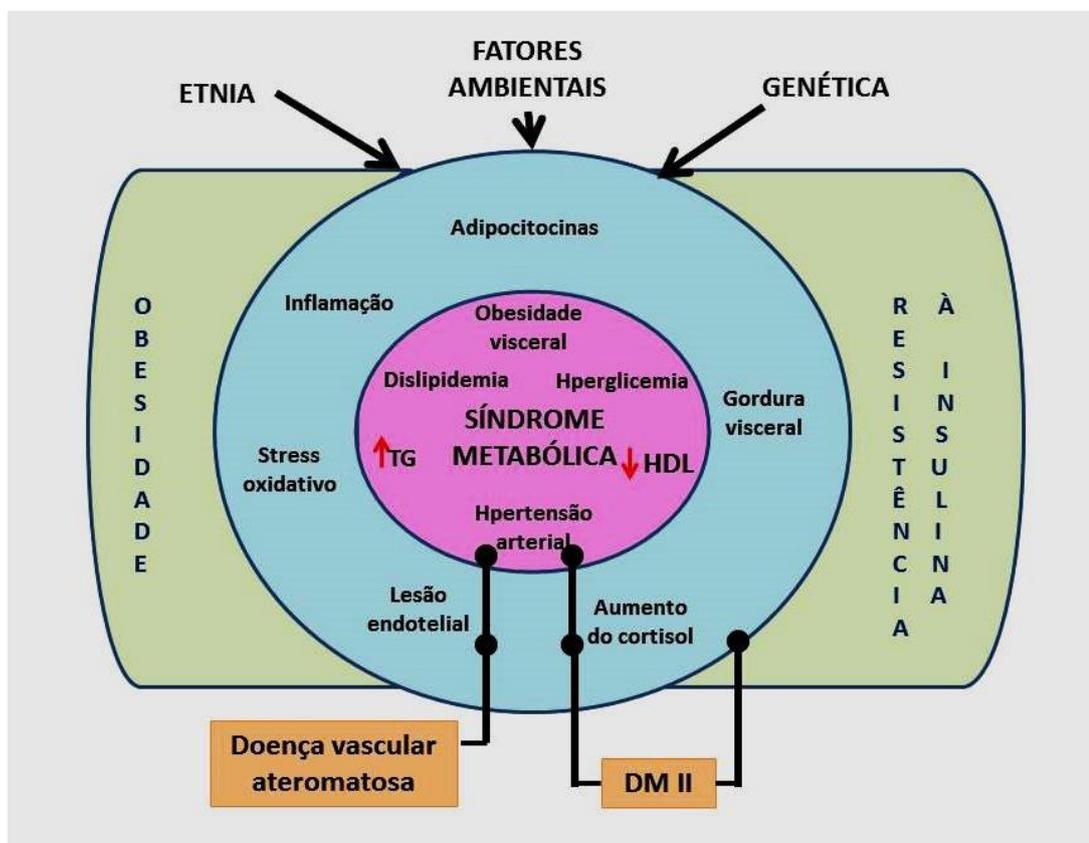


Figura 1: Fatores associados à síndrome metabólica
 Fonte: adaptado de <http://slideplayer.com.br/slide/388176/>

Uma observação importante é que há a corrente que recomenda, dentro da própria OMS, que a síndrome metabólica se restrinja mais a uma abordagem para estratificar riscos do que um diagnóstico, o que diminuiria a necessidade por escores mais complexos e

aumentaria a de esforços de educação em saúde e estrutura adequada para administrar os casos crescentes de DM e de doenças cardiovasculares (SIMMONS et al., 2009).

Em 2009, diversas sociedades científicas, em uma tentativa de unificar critérios discordantes entre as definições anteriores da SM, propuseram uma aceção mais homogênea em que constavam características comuns da síndrome. Constantes em todas as definições estão as medidas de pressão arterial (PA), de triglicérides, colesterol HDL e glicemia de jejum. A ampla utilização dessa aceção está recomendada, principalmente, porque fornece uma abordagem relativamente simples para a SM, empregando fatores de risco facilmente mensuráveis (ALBERTI et al., 2009).

Nesta definição a SM é diagnosticada quando, pelo menos, três ou mais dos seguintes aspectos estão presentes: PA \geq 130/85 mmHg (ou drogas para o tratamento da hipertensão), HDL $<$ 1,0 mmol/L (40 mg /dl) para o homem ou $<$ 1,3 mmol / L (50 mg/dL) em mulheres (ou drogas para o tratamento HDL reduzido); glicose em jejum \geq 5,6 mmol/L (100 mg/dL) (ou tratamento medicamentoso para glicose elevada); triglicéridos $>$ 1,7 mmol/L (150mg/dL) (ou tratamento medicamentoso para triglicéridos elevados); e circunferência da cintura $>$ 102 cm nos homens e $>$ 88 cm nas mulheres (MULÈ et al., 2014).

Independentemente da definição, observa-se que a prevalência de SM aumentou em todo o mundo, tornando-se uma condição clínica comum e um grande problema de saúde pública, com altos custos socioeconômicos em países com alta incidência de obesidade (CANTIELLO et al., 2014). Contudo, mesmo entre os indivíduos com peso corpóreo dentro da faixa da normalidade, a obesidade central pode elevar o risco de hipertensão arterial sistêmica (HAS), DM2, aterosclerose, elevação de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-6, IL 1 β e fator de necrose tumoral alfa) e de hormônios do tecido adiposo (lipase, estrogênio, adiponectina e insulina) entre outros agravos, como câncer de mama nas mulheres (LEE et al., 2013)

As características da SM variam entre os diferentes grupos étnicos em uma escala global e entre diferentes províncias de um mesmo país. No entanto, a prevalência global da SM aumentou (ZHANG et al., 2014).

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES E OBESIDADE

Muitas pesquisas nos últimos anos têm utilizado modelos experimentais que podem determinar, de maneira controlada, a ação e o papel de bioativos em doenças como a diabetes, obesidade, dislipidemia, o câncer, as infecções, entre outras e, desta maneira,

fornecer subsídios para a melhor compreensão da fisiopatologia e tratamento de tais patologias. A utilização de modelos animais tem o propósito de demonstrar os mecanismos e processos patológicos que podem ser extrapolados para outras espécies a fim de aprimorar a sua compreensão (CESARETTI; KOHIMANN, 2006; FAGUNDES; TAHA, 2004).

Alguns dos modelos experimentais relacionados à obesidade mais utilizados são os animais geneticamente modificados, os que utilizam a aplicação de glutamato e os que usam dietas hipercalóricas ou de cafeteria e as hiperlipídicas (CHU et al., 2013; FERNANDES et al., 2012; LA LEUR et al., 2014; MITTWEDE et al., 2013). A primeira alteração descrita foi uma mutação no cromossomo 6, que codifica o gene de síntese da leptina, o gene *ob*. Esse modelo geneticamente modificado é o mais utilizado. Nesses animais, os níveis de leptina apresentam-se reduzidos, com desenvolvimento de hiperfagia desencadeando a obesidade (CESARETTI; KOHIMANN, 2006; WILDING, 2001).

O modelo de rato OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*) é utilizado como modelo para DM2 e síndrome metabólica (NAGAI, et al., 2009; NAGAI; ITO, 2013) e é um exemplo poligênico de obesidade. Outros modelos que se enquadram nesta mesma categoria são os camundongos KK (diabetes moderado, obesidade, hiperinsulinemia e hiperplasia de células beta pancreática); o rato israelense, que quando alimentado com ração para roedores desenvolve obesidade, diabetes, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia; e o rato Goto-Kakizaki, que desenvolve hiperglicemia e hiperinsulinemia, principalmente na idade adulta (CESARETTI; KOHIMANN, 2006).

Os ratos Zucker também são oriundos de uma linhagem de cruzamentos seletivos para desenvolvimento da obesidade e DM2 a partir de oito semanas de idade. Nesse caso, a obesidade reproduzida é ocasionada por uma mutação que causa o bloqueio da leptina no receptor hipotalâmico, aumentando o apetite e, conseqüentemente, causando a obesidade. (OLTMAN et al., 2006). Com o passar do tempo, os animais desenvolvem aspectos semelhantes à síndrome metabólica humana, com quadro de obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia e aumento dos níveis de triglicérides (ARTINÃNO; CASTRO, 2009; STEPP et al., 2004).

Outro modelo em que a atividade adrenocortical está envolvida na produção de resistência à insulina é o da indução de obesidade pela administração neonatal de monoglutamato de sódio (modelo MSG), uma substância neurotóxica que, quando administrada no período neonatal de ratos, ainda com a barreira hematoencefálica não formada, determina lesão específica do hipotálamo, atingindo também os órgãos circunventriculares. Essas lesões com o passar da idade causam alterações na sinalização de

leptina e insulina, o que resulta em hiperleptinemia e hiperinsulinemia (NEGRÃO; LINICIO, 2000; DAWSON et al., 1997; DIEMEN et al., 2006; CESARETTI ; KOHIMANN, 2006). Fernandes et al.,(2012) demonstraram que o MSG na dose de 4mg/kg aplicado em repetidas porções em ratos neonatos com 2 a 10 dias de nascidos promoveu obesidade em 120 dias.

Os modelos de indução da obesidade em animais por meio da modificação da dieta geralmente envolvem aporte hipercalórico a partir de preparação de ração modificada acrescida de ingrediente como leite condensado, biscoitos e sacarose, que são misturados à ração comercial – esses modelos são denominados hipercalóricos pelo excesso de calorias ingeridas pelo animal (ESTADELLA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014), porém, quando acrescida de gordura suína ou outros óleos, a dieta denomina-se hiperlipídica (GILBERT et al., 2011). Essa tem alcançado resultados significativos quando empregada para reprodução de modelos experimentais para obesidade e doenças relacionadas à síndrome metabólica (SASIDHARAN et al., 2013).

Os modelos da linhagem BALB/c e C57Bl/6 são utilizados em pesquisas relacionadas ao diabetes, obesidade entre outras patologias. O BALB/c apresenta produção de plasmocitomas em resposta à injeção de óleo mineral com consequente produção de anticorpos monoclonais contra este. Tal linhagem tem sido muito utilizada em pesquisas do sistema imune por apresentar um perfil de citocinas de padrão Th2. O C57Bl/6 é a família de camundongos *inbred* mais utilizada. Essa linhagem apresenta animais de vida longa e com baixa susceptibilidade a tumores. Entretanto, possuem alta susceptibilidade à obesidade induzida por diabetes e aterosclerose, sendo mais sujeitos a fatores ambientais, o que a aproxima do processo fisiopatológico humano em que a obesidade geralmente induz o diabetes (KING, 2012; SURWIT, 1988). Assim o BALB/c é muito utilizado em pesquisas do sistema imune, porém sua resposta imune tem como perfil o padrão Th1.

2.6 OBTENÇÃO DE BIOATIVOS DE BREUS AMAZÔNICOS

Um dos problemas da aplicação de produtos naturais na indústria farmacêutica é a quantidade de matéria-prima e, conseqüentemente, da quantidade de substância que se consegue isolar e purificar para o uso na indústria farmacêutica, alimentícia ou cosmética. A obtenção de grande quantidade de substâncias ou extratos semipurificados para ensaios farmacológicos é, atualmente, uma das etapas essenciais para o estudo de plantas medicinais já conhecidas e de composição química definida. A Amazônia, com sua enorme biodiversidade, possui um grande potencial para produzir novos produtos e os breus

amazônicos apresentam características químicas e farmacológicas que instigam o isolamento dos componentes químicos bioativos.

A utilização de óleo-resina dos breus amazônicos possui enormes possibilidades econômicas e contempla uma grande variedade de propriedades farmacológicas. Nos relatos do uso de tais espécies na medicina popular, destacam-se os usos como cicatrizante, anti-inflamatório, analgésico, expectorante e antiulceroso. Da mesma forma, possuem aplicação industrial, sendo utilizadas em cosméticos e perfumes (RÜDIGER et al., 2007; LIMA et al., 2014). O óleo-resina é caracterizado pela presença de terpenoides, esteroides, cumarinas, flavonoides e lignanas, sendo a mistura triterpênica predominante na maioria deles.

Triterpenos são constituintes que têm despertado grande interesse nos últimos anos em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, são elas: anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antibacteriana, anticancerígena, anti-diurética, giardicida, anticâncer, anti-ansiedade, antidepressivo, potenciador de memória, antinociceptiva, neuroprotetor e outras ações no sistema nervoso central, assim como a inibidora da enzima acetilcolinesterase (BANDEIRA, 2007; BARBOSA FILHO, et al., 2006; MAHATO; KUNDU, 1994; PARMAR, et al., 2013; RODRIGUES, et al., 2015)

Os triterpenos apresentam ampla diversidade estrutural, podendo ser tetracíclicos ou pentacíclicos. As subclasses oleano, ursano e eufano são os tetracíclicos mais comumente encontrados nas espécies de breu, sendo considerados marcadores químicos do gênero (RÜDIGER et al., 2007). Os constituintes majoritários das resinas de *Protium* sp são os triterpenos pentacíclicos, α e β -amirina, que apresentam significativa atividade anti-inflamatória, antiartrítica e analgésica, respectivamente (OKOYE et al., 2014; MATOS et al., 2013; BANDEIRA et al., 2001; MIRANDA et al., 2000). Todavia, a maioria dessas atividades foram resultados de ensaios biológicos feitos, em sua maioria, em extratos.

Há uma tendência para o isolamento de substâncias para testes biológicos, mas alguns dos constituintes presentes estão em pequena quantidade, como no caso da α, β -amirenona. Dessa forma, há a necessidade de isolamento do composto majoritário, que no caso do breu é o isômero α e β -amirina.

2.6.1 Triterpeno α e β -amirina

Nas últimas décadas, as misturas de α , β -amirinas ou dos isômeros separados α -amirina ou β -amirina têm sido estudadas para atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, gastro e hepatoprotetora, antipruriginosa, anti-demência, ansiolítica e antidepressiva,

hipoglicemiante e hipolipemiante (MEDEIROS et al., 2007; OTUKI et al., 2005; OKOYE et al., 2014; MATOS et al., 2013; MELO et al., 2011; SHIH; CHERNG, 2014; BISKUP et al., 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2007; SANTOS et al., 2012). É importante mencionar alguns trabalhos que foram realizados com esses compostos (mistura ou isolados), a fim de demonstrar o potencial terapêutico.

A atividade anti-inflamatória e antiagregante plaquetária da mistura de α e β -amirina (isoladas de *Protium hepaphyllum*) foi evidenciada no modelo de inflamação epitelial induzida por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) em ratos. Neste trabalho foi observada inibição da inflamação por α e β -amirina, indicando potencialidade no desenvolvimento de um agente tópico no tratamento de doenças inflamatórias (MEDEIROS, 2007). Em outros estudos realizados com a mistura do triterpenos α e β -amirina, isolados da espécie *Protium kleinii*, constituinte majoritário, produziu uma inibição dose-relacionada do edema induzido por TPA, causado em orelha dos ratos com DI50= 0,55 e 0,31mg/orelha, respectivamente (OTUKI et al., 2005a).

Okoye et al. (2014) demonstraram atividade anti-inflamatória de β -amirina em modelos de edema de pata e de orelha em roedores. Matos e colaboradores (2013) relataram a redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL- β e quimiocina derivada de queratinócitos e aumento dos níveis de IL-4, que culminaram em melhora da colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) após a administração de α e β -amirina. O trabalho de Medeiros et al.(2007) avaliou que a ação em inflamação cutânea teria relação com a supressão da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) via inibição de proteinoquinases. Já em um modelo de pancreatite, a melhora da inflamação teve relação com a supressão de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 e na síntese de óxido nítrico (MELO et al., 2011).

Shih e Cherng (2014) demonstraram efeito protetor de β -amirina de *Euphorbia hirta* L. contra doenças vasculares inflamatórias crônicas, pelo controle da expressão de moléculas de adesão provenientes de células endoteliais, o que está associado ao desenvolvimento de aterosclerose.

Biskup et al. (2012) exploraram os efeitos da α -amirina de *Rhaponticum carthamoides* em linhagem de queratinócitos HaCaT quanto à capacidade de estimular proliferação celular e obtiveram bons resultados, mas o mesmo não ocorreu em relação à proteção destas células à radiação ultravioleta B (UVB).

A atividade antinociceptiva com redução de dor visceral foi observada pela mistura de α e β -amirina ao se utilizar o modelo de cistite hemorrágica induzida por

ciclofosfamida e inflamação por óleo de mostarda. Os resultados indicam a participação no sistema opióide e nos receptores vanilóides (TRPV1) na atividade antinociceptiva (LIMA-JUNIOR et al., 2007). Os estudos de Otuki e colaboradores (2005b) evidenciaram o efeito terapêutico da mistura de α , β -amirina em antinocicepção nos modelos inflamatórios de dor realizados em ratos. Os mecanismos de ação não são completamente compreendidos, mas isso parece envolver a inibição das rotas da proteína A-cinase e da proteína C-cinase.

Os resultados do trabalho de Holanda Pinto e colaboradores (2008) mostraram redução de dor orofacial induzida por formalina e capsaicina em um modelo murino, em parte por um mecanismo opioide periférico, assim como Oliveira e colaboradores (2005b) também encontraram, em modelo de dor visceral aguda, resultado semelhante quando induzida por capsaicina. Da Silva e colaboradores (2011) descreveram que α , β -amirina reduziram a hiperalgesia inflamatória persistente e neuropática em ratos por uma ativação direta dos receptores de canabinoides CB₁ e CB₂. Assim, de acordo com as evidências disponíveis, Chicca e colaboradores (2012) propuseram que a ação analgésica e anti-inflamatória da β -amirina tivesse relação com a inibição da degradação do endocanabinoide 2-araquidonoil glicerol (2-AG) sem interação direta com os receptores canabinoides, baseando-se ainda em modelos murinos persistentes de dor neuropática e inflamação.

O potencial hepatoprotetor da mistura de α e β -amirina, extraída do óleo-resina de *P. heptaphyllum*, foi evidenciado em testes de hepatotoxicidade em ratos e induzido por acetaminofeno. O pré-tratamento com administração de 50 e 100mg/Kg (i.p.) dessa mistura reduziu o estresse oxidativo e a formação de metabólitos tóxicos ao fígado, efeito provavelmente ligado à ação anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2005a). A mistura de α , β -amirina de *P. heptaphyllum* mostrou uma proteção máxima da lesão induzida por capsaicina em camundongos na dose de 100mg/kg. Além de doses maiores não serem mais efetivas, camundongos que tiveram os neurônios aferentes sensíveis à capsaicina não obtiveram o mesmo efeito, o que sugere um papel neuronal necessário da ação da referida mistura (OLIVEIRA et al., 2004b).

A mistura de α , β -amirina obtida do óleo-resina de *Protium heptaphyllum* foi avaliada em atividade antipruriginosa, demonstrada em modelo de prurido induzido por Dextran T40®. A aplicação da mistura de α , β -amirina (100 e 200mg/Kg) na superfície do corte mostrou grande eficiência no tratamento do prurido, podendo ser estudados meios para o uso clínico dessa mistura no prurido associado com alergia, dermatite e eczema (OLIVEIRA et al., 2004a).

Com interesse voltado para o déficit cognitivo associado à depleção de neurotransmissores colinérgicos, como na doença de Alzheimer, Park et al. (2014) demonstraram que, em déficit de aprendizado e memória induzidos por escopolamina em camundongos, eles foram antagonizados por uma administração única de α ou β -amirina. Além disso, a β -amirina (somente) inibiu a ação da acetilcolinesterase, o que potencializaria seu efeito.

O trabalho de Aragão e colaboradores (2006) evidenciou efeitos sedativos e ansiolíticos das α e β -amirinas que podem envolver uma ação em receptores benzodiazepínicos e um possível mecanismo noradrenérgico associado ao efeito antidepressivo também relatado.

Santos e colaboradores (2012) investigaram os efeitos de α , β -amirina, isolada a partir da resina de *P. heptaphyllum* no nível de açúcar no sangue e perfil lipídico em ratos normais diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) e em ratos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura (HFD). A α , β -amirina reduziu eficazmente os níveis elevados de glicose plasmática durante o teste de tolerância oral à glicose. O nível de insulina no plasma e a análise histopatológica do pâncreas revelou o efeito benéfico da α , β -amirina na preservação da integridade das células beta. Em ratos tratados por via oral com α , β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) ou fenofibrato (200 mg/kg), o aumento associado na DH-TC e TG no soro foi significativamente menor. O efeito hipocolesterolémico de α , β -amirina apareceu mais proeminente, a 100 mg/kg, com diminuições significativas das VLDL e colesterol LDL e uma elevação do colesterol HDL.

Dessa forma, a padronização para obtenção do isolamento, em maior escala, de α , β -amirenona ou de outros compostos, agrega valor às espécies, permitindo a utilização de bioativos para produção de novos produtos biotecnológicos e, também, para a validação científica necessária para a aplicação industrial. E, especificamente para o composto α , β -amirenona ou amirinona que se apresenta em baixa concentração em diferentes espécies do Gênero *Protium* sp e demais gêneros da família Burceracea, é necessário um processo de obtenção mais eficaz a fim de garantir uma maior quantidade para testes *in vivo*.

2.6.2 Triterpeno α e β - amirenona

Em estudos com óleo-resina, os triterpenos pentacíclicos hidroxilados na posição 3, α e β amirinas, bem como suas cetonas, α e β - amirenona (α e β -amirinona) (figura 2), são

mencionados em estudos com óleo-resina de *Protium* sp (SUSUNAGA, 1996; VIEIRA JUNIOR et al., 2005; RÜDIGER, 2008).

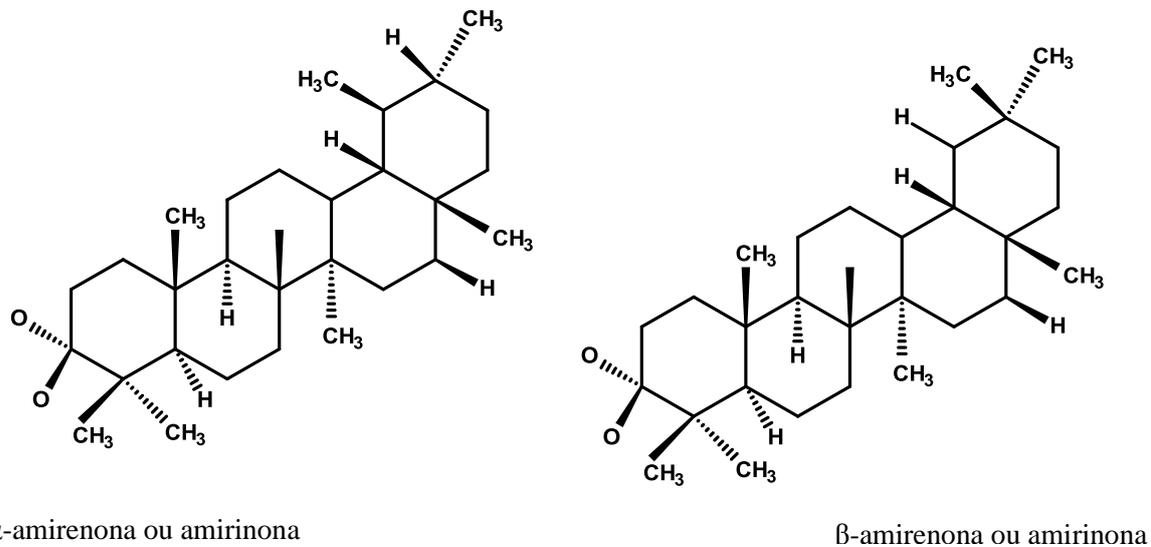


Figura 2 – Estruturas químicas de α e β -amirenona

O composto binário de α , β -amirenona, derivado triterpênico das séries ursano e oleanano, foi descrito em diferentes espécies vegetais, dentre elas: do Gênero *Protium*, *P. heptaphyllum*, *P. opacum* var. *opacum*, e *P. giganteum*; *Trattinnickia glaziovii* e *Trattinnickia peruviana* dentro da família Burseraceae (RÜDIGER, 2012; SIANI et al., 2012). Há outras espécies em que β -amirenona foi identificada: *Cissus quadrangulares* (BHUTANI, et al., 1984); *Tridax procumbens* (VERMA ; GUPTA, 1988); *Camellia sinensis* var. *sinensis*, (LING et al., 2010); *Beilschmiedia alloiophylla* (MOLLATAGHI et al., 2012); *Pistacia lentiscus* (resina), encontrada em resíduos arqueológicos (BRUNI e GUGLIELMI, 2014); *Beilschmiedia* sp; *Anacolosa pervilleana*; *Ficus microcarpa*; *Ficus pandurata* e *Cyclocarya paliurus* (BOURJOT et al., 2012).

Na espécie *Sedum lineare* Thunb foi identificada δ -amirenona [(13) (18)-Oleanen-3-ona], um composto triterpênico pentacíclico, e verificado efeito anti-inflamatório potente em diferentes modelos de inflamação em animais, como o edema de orelha induzido por xileno em orelha de rato, além de outros efeitos, como redução dos níveis de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE 2), interleucina-6 (IL-6) e de leucócitos na peritonite induzida por ácido acético, *in vivo*. Além disso, a IL-6, o TNF- α e a produção de NO foram diminuídos e os níveis de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) controlados. Esses resultados sugeriram que a δ -amirenona é um agente bioativo, o qual possui efeitos anti-inflamatórios potencialmente relevantes para a regulação da COX-2 (NIU et al., 2014). O extrato bruto metanólico de *B. alloiophylla* apresentou atividade relevando antiacetilcolinesterase (AChE),

anti α -glucosidade, enquanto que nos compostos presentes no extrato encontrado foi identificado β -amirenona (MOLLATAGHI et al., 2012).

Contudo, não foram encontrados estudos que relatam a avaliação dos efeitos na modulação da síndrome metabólica ou do efeito nas patologias relacionadas como a diabetes, dislipidemia e obesidade. Estudos recentes mencionam o efeito hipolipemiante e hipoglicemiante de frações de extratos que contêm uma mistura de triterpenos (SANTOS, et al, 2012; CARVALHO et al.,2015).

2.6.3 Processo de semissíntese

Considerando o relato na literatura de que pequenas modificações na estrutura de uma molécula poderiam inibir ou aumentar a sua eficácia, uma vez que alterações estruturais podem alterar a absorção, distribuição e excreção do composto (farmacocinética), bem como a especificidade da molécula para alguns alvos (farmacodinâmica); neste último caso, podemos encontrar uma substância mais eficaz com menos efeitos colaterais (SOLDI et al, 2008).

Para a obtenção de bioativos em maior escala, geralmente são realizadas sínteses ou semissínteses, o que contribui de forma significativa para aumentar a quantidade de compostos que não são majoritários na composição de produtos naturais.

Muitos compostos de plantas que estão sendo estudados são capazes de atuar no metabolismo de animais *in vivo*, como analgésicos, antifúngicos, bem como ter ação hipolipemiante e hipoglicemiante, entre outros. A segurança e eficácia desses compostos é um desafio para os pesquisadores (CARLINI et al, 2006; SOLDI, 2008; SANTOS, 2012). Na literatura, encontramos substâncias isoladas ou fitoterápicos sendo testadas para Alzheimer, câncer e doenças infecciosas como malária, leishmaniose, diabetes, obesidade, entre outras (CALCUL et al., 2012; COPP; PEARCE, 2007; HARVEY et al, 2015; IZUMI et al., 2011; KUO et al., 2009; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; SALEEM et al., 2010; VOLPATO et al., 2013; SANTOS, et al., 2012; CARVALHO, et al., 2015). Muitos destes bioativos ou fármacos são oriundos de protótipos advindos de produtos naturais, especialmente de plantas, que têm, ao longo dos anos, possibilitado a descoberta de inúmeras moléculas bioativas (SOLDI et al., 2008).

Nos últimos quinze anos houve um aumento significativo na síntese e semissíntese de triterpenos naturais e, principalmente, dos isômeros alfa e beta amirina. Estudos com derivados acetato apresentam-se em maior número, porém, atenção recente tem

sido dada a outros ésteres e alguns derivados oxidados. Várias dessas modificações moleculares têm sido produzidas pela reação da mistura dos triterpenos com anidridos ou cloretos orgânicos, em meio não aquoso e em temperatura ambiente ou refluxo. As oxidações têm sido feitas com oxidantes não orgânicos, normalmente contendo íons Cromo.

Existem algumas rotas de síntese total de α e β -amirina, assim como de semissíntese de alguns derivados, que são relativamente simples e possibilitam a obtenção de quantidades razoáveis dessas substâncias de forma rápida e de baixo custo. Tal fato, juntamente com suas características estruturais e atividades biológicas já evidenciadas, devem incentivar melhor investigação de suas propriedades farmacológicas por diferentes grupos de pesquisa.

Há estudos que relatam a síntese de derivados da mistura de α , β -amirina ou de um dos isômeros obtidos de espécies vegetais que demonstraram rendimentos de 40 a 99%. Algumas modificações são relatadas para estes isômeros. As modificações estruturais são usualmente encontradas no C3, no qual se encontra uma hidroxila que tem seu hidrogênio facilmente substituído por outros grupamentos como as modificações já descritas para o acetato de α , β -amirina (ARAGÃO, et al., 2009; JOHANN et al. 2007; SOLDI et al, 2008); para benzoato de α , β -amirina (JOHANN et al, 2007; SOLDI et al, 2008); para benzoilglicinato de α -amirina (NARENDER et al, 2009); para carboxibenzoato de α , β -amirina (BARROS et al, 2011; JOHANN et al. 2007; SOLDI et al, 2008; NARENDER et al. 2009); para carboxiglutarato de α , β -amirina e Carboximaleinato de α , β -amirina (BARROS et al, 2011); para fenilacetato de α , β -amirina e palmitato de α , β -amirina (DÍAZ-RUIZ et al, 2012); e para oxidação do grupo hidroxila presente no C3, gerando a alfa e beta-amirenona ou amirinona (SOLDI et al, 2008).

Assim, compostos naturais que possuem uma estrutura química mais simples podem ser sintetizados ou semissintetizados em laboratório minimizando o problema das pequenas quantidades, em massa, de cada composto isolado da planta. A síntese e semissíntese de produtos naturais, hoje, é um caminho viável para a obtenção em maior escala de substâncias com potencial efeito biológico.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar as atividades hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade da mistura de α e β - amirenona obtida por processos otimizados.

3.2 ESPECÍFICOS

- Otimizar o processo para obtenção de cetonas triterpênicas de breus comerciais amazônicos;
- Caracterizar química e físico-quimicamente a mistura α e β - amirenona;
- Verificar atividades inibitórias *in vitro* sobre as enzimas lipase, α -glucosidade, α -amilase e xantina oxidase da substância;
- Estudar os efeitos hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade *in vivo* em fase aguda e crônica;
- Avaliar a toxicidade aguda e subaguda da substância por meio de testes bioquímicos e análises histopatológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As atividades experimentais foram organizadas em três etapas: a primeira consistiu na otimização do processo a fim de obter e purificar os isômeros α e β -amirina para posterior oxidação em α e β -amirenona. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais, dentro do grupo de pesquisa Química de Biomoléculas (Qbioma), coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas.

As análises de caracterização físico-química foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Ádley Antonini N. Lima do Departamento de Farmácia — UFRN Tecnologia: Biotecnologia Farmacêutica. A Ressonância Magnética Nuclear foi realizada no laboratório de química do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no laboratório de atividade biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM).

A segunda etapa ocorreu no laboratório de atividade biológica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas, coordenado pelo Prof. Dr. Emerson Silva Lima. Nesse laboratório foram executados os testes enzimáticos *in vitro*. A terceira etapa consistiu na realização dos testes *in vivo* (em camundongos). Essa etapa realizou-se na UFAM/FCF e outra parte foi desenvolvida no Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA). O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais desta instituição e teve sua aprovação no dia 22 de janeiro de 2015, sob o nº 014/2014. A figura 3 representa o fluxograma experimental geral do estudo.



Figura 3 – Fluxograma das atividades propostas no projeto de Tese.

4.2 ANIMAIS

Os testes *in vivo* foram realizados em duas linhagens de camundongos, sendo para os testes agudos os animais da espécie BALBc cedidos pelo Biotério do INPA, enquanto que C57BL/6 para o teste crônico. Todos os experimentos foram conduzidos dentro das normas éticas e o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), protocolo n.º 014/2014, e teve aprovação no dia 22 de janeiro de 2015(ver anexo).

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Uma quantidade de breu, 2 kg (resina de gênero *Protium* sp), foi adquirida por compra no mercado de Coari – AM. As amostras coletadas foram limpas de impurezas que estavam presentes nela, tais como resíduos minerais (areia e outros). Após o processo de limpeza, as amostras foram trituradas em cadinho de porcelana, identificadas e armazenadas em refrigerador até o procedimento de extração.

4.4 OBTENÇÃO DA MISTURA A E B- AMIRENONA

4.4.1 Extração

Para a obtenção da mistura de α e β - amirenona, foi necessária a otimização do processo para a extração em maior quantidade a partir do composto majoritário do breu (α , β -amirina). Com isso, foram realizados métodos de extração direta e dois métodos por extrato bruto: maceração e sonicação. Para cada método de obtenção do extrato houve variação na composição dos solventes: hexano, acetato de etila e etanol. Todos os extratos foram obtidos utilizando 3g e 10g de material da resina do breu comercial. Os extratos foram adquiridos por meio de nove (09) repetições para garantir a reprodutibilidade do experimento e a seleção da melhor metodologia que extraísse maior quantidade da mistura de α , β -amirina para posterior oxidação para α e β - amirenona.

4.4.2 Obtenção do extrato Bruto

4.4.2.1 Maceração

Foi realizada extração por maceração a frio por um período de sete dias em uma proporção de 1:10 (m/v) de material vegetal (breu) e solvente extrator (hexano, acetato de etila ou etanol) separadamente. Após o tempo de extração, o material foi submetido à filtração simples em filtro de papel e posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório sob a pressão reduzida, em seguida, foi transferido para frascos para obtenção dos rendimentos. Após a eliminação do solvente, o material foi separado para realização da coluna cromatográfica.

4.4.2.2 Sonicação

A extração por sonicação foi realizada em um aparelho de sonicação (Ultrasonic Cleaner, Unique) durante 20 minutos em uma proporção de 1:10 (m/v) de material vegetal e solvente extrator (hexano, acetato de etila, e etanol) separadamente. Após o tempo de extração, a solução foi submetida à filtração e evaporação, da mesma forma que na metodologia anterior.

4.4.3 Cromatografia em coluna fase normal (CCFN) e Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato bruto de todas as extrações (3g) foi cromatografado separadamente em sílicagel 60 (0,063-0,200 MM; 70-230 Mesh) utilizando como eluentes hexano, acetato de etila e metanol com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se nove frações de 250mL. As proporções foram: fração 1 (F1) – 100% de hexano; fração 2 (F2) – hex/ AcOEt 95:5 v/v; frações 3 e 4 (F3 e F4) – hex/AcOEt 90:10 v/v. Essas frações foram divididas em subfrações de 50mL cada (3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 e 4.1,4.2, 4.3, 4.4, 4.5, respectivamente); fração 5 (F5) – hex/AcOEt 80:20 v/v; fração 6 (F6) – hex/AcOEt 70:30 v/v; fração 7 (F7) – hex/AcOEt 50:50 v/v; fração 8(F8) – AcOEt 100%; e fração 9 – 100% de metanol. O fracionamento cromatográfico foi realizado em triplicata utilizando 3,0 g de extratos em AcOET, EtOh,

hexano em colunas com diâmetro de 3,5 cm e 85 cm de altura. A corrida cromatográfica foi em 20 cm de altura de sílica.

As frações foram reunidas conforme a similaridade que foi detectada por CCD e, posteriormente, elas foram purificadas, observando-se o cálculo do rendimento das frações.

A CCD foi realizada em placas de sílica com 5 cm de altura, início da corrida em 6 mm, tendo um percurso cromatográfico de 4 cm. A concentração das amostras foi 10 mg/ 1 mL, o solvente utilizado para as solubilizações em hexano/acetato na proporção 1:1(v/v). O eluente foi hex/AcOEt 9:1 v/v. Quanto à revelação, foi utilizada vanilina sulfúrica para visualização dos compostos triterpênicos.

4.4.4 Extração direta

Foram realizadas, no processo de extração direta, colunas cromatográficas abertas em fase normal. Em cada procedimento foi utilizado 30g de amostra triturada diretamente na coluna (3,5 de diâmetro interno e 85 cm de altura). A resina triturada foi submetida a uma filtração cromatográfica com sílica-gel 60 (0,063-0,200 MM; 70-230 Mesh). Os eluentes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. Neste processo foi realizado o mesmo procedimento utilizado para os extratos, considerando as frações e quantidade coletadas.

Para purificação das frações que apresentaram manchas com *R_f* características dos isômeros α e β -amirina, comparando com o padrão comercial (sigma cod), foram realizadas lavagens com os solventes acetona (PA) e metanol (PA) cinco vezes em cada solvente, em banho de ultrassom, por 10-15min. A cada lavagem, as amostras foram filtradas em papel de filtro analítico. As amostras foram secas e pesadas para verificar o rendimento (Figura 4). Após o processo foi realizado cromatografia em camada delgada (CCD). As amostras de α e β -amirinas purificadas foram utilizadas no processo de oxidação.

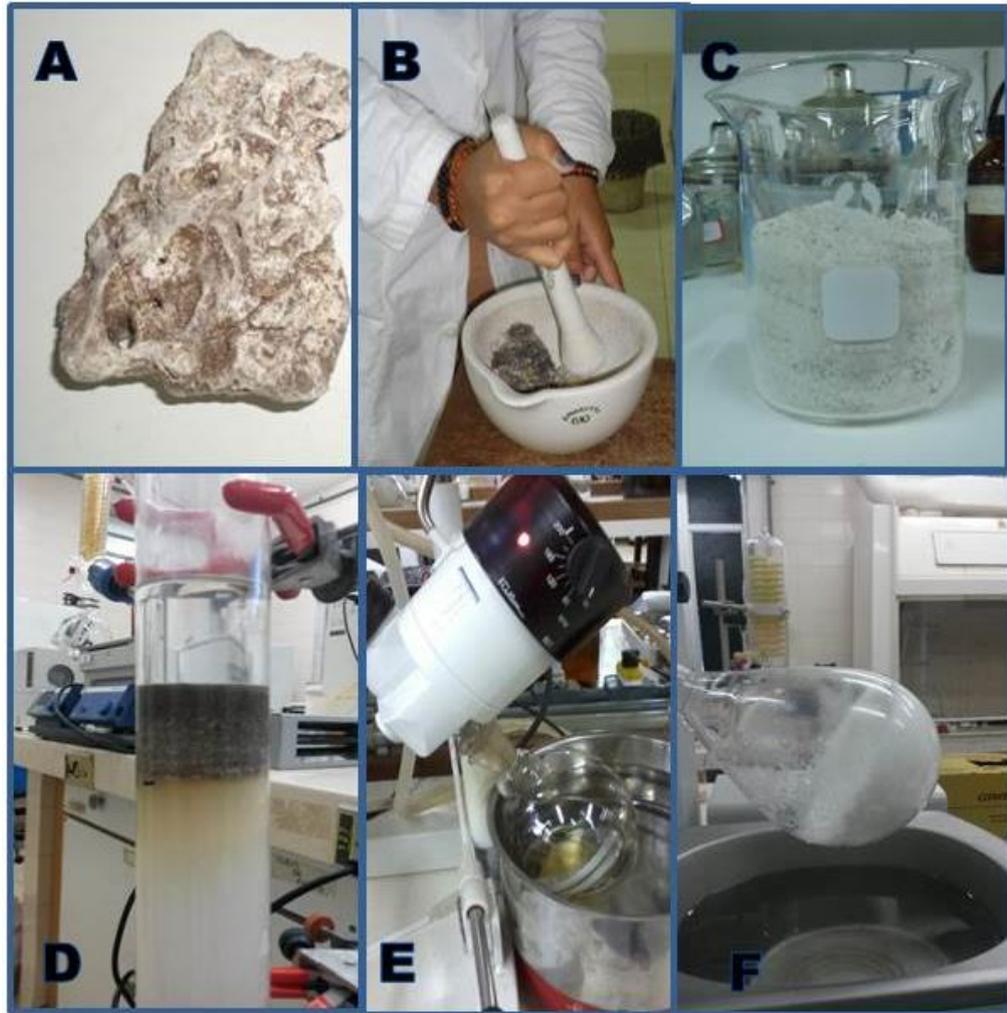


Figura 4: Processo para obtenção e isolamento de substância majoritária $\alpha\beta$ -amirina a partir da resina do breu. A: amostra de breu comercial; B: processo de trituração; C: amostra triturada; D: coluna cromatográfica utilizando a amostra diretamente na coluna; E: processo de rotaevaporação das frações; F: Fração 4 com presença de α , β -amirina .

4.5 PROCESSO DE OXIDAÇÃO

O derivado oxidado de α , β -amirina foi sintetizado conforme esquemas apresentados na figura 6. Para o processo de oxidação foi preparada uma solução contendo 1,0g de α , β -amirina em 30 mL de diclorometano. Foram adicionados 700mg de PCC (Clorocromato de Piridínio), de acordo com Soldi e colaboradores (2008). A solução foi mantida sob a agitação em temperatura ambiente até que todo o substrato fosse consumido. O processo de oxidação foi acompanhado por CCD nos tempos de 30, 40, 60, 120 min e 24 e 30 horas (durante o dia) até a verificação da completa síntese. Após a oxidação, adicionou-se à mistura éter etílico resultando na formação de um precipitado escuro, que foi lavado várias vezes com esse mesmo solvente. Essa solução de éter foi filtrada em coluna de sílica gel e o

eluato foi evaporado, obtendo-se, então, a mistura dos triterpenos α , β -amirenona. Ao final do processo, foi realizada Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando a mistura Hexano/AcOEt (95:5) como eluente e sílica como fase estacionária (Figuras 5A e 5B).

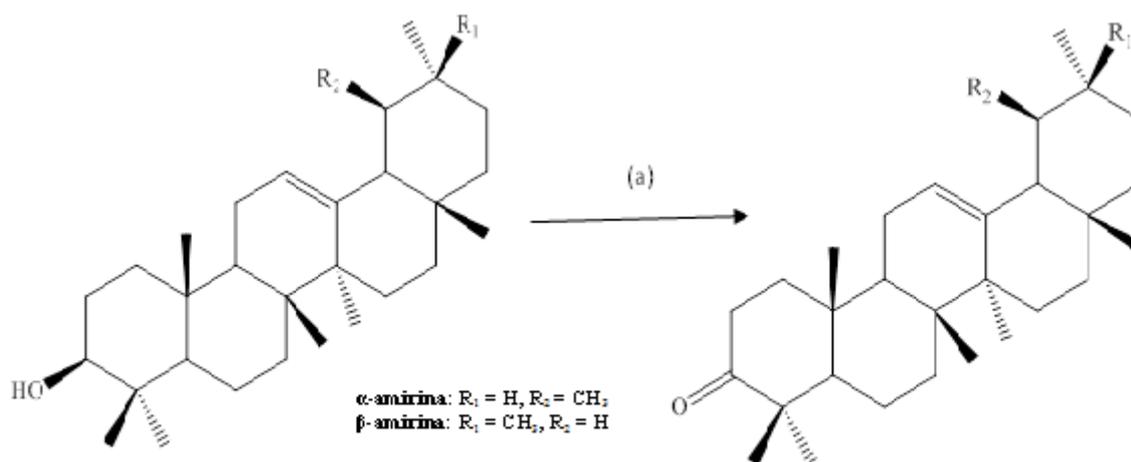


Figura 5A – Equação química para a síntese dos derivados oxidados da mistura de α -amirina ($R_1 = H, R_2 = CH_3$) e β -amirina ($R_1 = CH_3, R_2 = H$). a) Clorocromato de Piridinio (PCC), CH_2Cl_2 .



Figura 5B – Processo de purificação e síntese. A – lavagem de frações F3, F4 e F5; B – mistura de α , β -amirina; C – processo de síntese; D – filtração do eluato; E – Fração com amirenona; F e G – α , β -amirenona.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISÔMERO A E B AMIRENONA

Foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria e termogravimetria derivada (TG-DTG) e espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier. Tais testes estão sendo utilizados por centros de pesquisas, indústrias e universidades como importantes ferramentas de estudos, assim como para o desenvolvimento de novos produtos, o controle de qualidade, entre outras (IONASHIRO, 1980).

Neste estudo, é importante a caracterização porque pouco se sabe sobre as características físico-químicas da mistura de α , β -amirenona, o que pode permitir, por exemplo, a preparação de formulações farmacêuticas futuras.

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. É um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID, 2007).

A micrografia para análise morfológica da α , β amirenona foi registrada em 500X, 1000X e 2000X de ampliação pelo microscópio modelo *Hitachi Tabletop Microscope TM-3000*. Nele uma pequena quantidade de amostra foi colocada por meio da dupla-fita de carbono e submetida ao vácuo no equipamento. A micrografia foi realizada com uma voltagem de excitação de 15 kV.

4.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas usando equipamento DSC Q20 (TA instrument) sob a atmosfera dinâmica sintética de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹. Foi pesada 2 mg da amostra e colocada em um cadinho de alumínio selado hermético e não-hermético. As análises foram realizadas em intervalo de temperatura de 25 a 500°C, com razão de aquecimento (β) de 10.0°C min⁻¹. A célula de DSC foi previamente calibrada com índio ($PF = 156.6$ °C). As curvas obtidas receberam tratamento utilizando o *software* TA universal® visando caracterizar os eventos térmicos característicos das amostras.

4.6.3 Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG-DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas em um modelo TGA-60H. As condições empregadas para análise foram: cerca de 4 mg da amostra foi colocada em cadinho de alumina

aberta com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob a atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}), no intervalo de temperatura de $35 - 900^{\circ}\text{C}$. Os dados termoanalíticos foram analisados pelo *software* TA universal 2000.

4.6.4 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica da α , β amirenona foi realizada utilizando o equipamento IR Prestige-21. Foram preparadas pastilhas da substância em questão com brometo de potássio (KBr) em proporções adequadas, a partir da submissão da mistura a 10 toneladas em prensa hidráulica. A análise foi realizada na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com 15 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

4.6.5 Espectrometria de Massas (EM)

Espectros de ESI(+)-QTOF-MS e MS/MS das amirenonas foram adquiridos em um instrumento *Waters Synapt HDMSTM* no modo-*V reflectron*. As amostras para infusão direta foram preparadas na concentração de $1 \mu\text{M}$, utilizando uma mistura 1:9 de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ contendo 0,1% de ácido fórmico, e injetadas valendo-se da bomba do próprio espectrômetro em um vazão de $8 \mu\text{L/min}$. Os parâmetros de ionização foram: voltagem no capilar 3 kV, voltagem no cone extrator 30 V, temperatura de dessolvatação 150°C , temperatura da fonte 100°C , vazão de gás de dessolvatação 900 L/h , vazão de gás do cone 30 L/h , vazão do gás de colisão $1,5 \text{ mL/min}$ e pressão nas celas *Trap e Transfer* $0,05 \text{ mbar}$. A calibração foi feita com oligômeros de ácido fosfórico entre 90 e 2000 m/z . Para todos os experimentos de MS/MS de peptídeos, os espectros foram adquiridos manualmente por meio do aumento da energia de colisão em uma rampa de 6 a 40 eV , utilizando-se, para isso, de argônio como gás de colisão. O *software MassLynx v.4.1*. foi adotado para o tratamento dos dados.

4.6.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada para fase móvel gradiente de acetonitrila e água, uma adaptação da metodologia de Dias et al. (2011), com o tempo de corrida de 30 minutos e fluxo de $0,8 \text{ mL/min}$, como descrito na tabela 2.

Tabela 2: Gradiente % dos solventes em relação ao tempo

Tempo	Acetonitrila (%)	Água (%)
0.01	60	40
10.00	80	20
20.00	88	12
30.00	100	0

Fonte: Elaborada pela autora

Foi injetado 10 μ L da amostra para cada corrida e a coluna utilizada foi a da Luna 5u C18(2) 100 A 250x4,6 mm, marca *Phenomenex*. Os padrões de α , β -amirina utilizados foram da *Sigma Alderch* e como padrão da mistura de α e β - amirenona a amostra isolada de breu.

4.6.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para este teste foi utilizado o equipamento: Ressonância Magnética Nuclear de 300MHz; Modelo *Fourier 300*; marca *Bruker*; para solvente clorofórmio deuterado foram utilizados 550 μ L de solvente; tubo de RMN: 5mm.

4.7 ENSAIOS ENZIMÁTICOS *IN VITRO*

4.7.1 Inibição da lipase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Slanc et al. (2009), adaptada para este trabalho. A substância isolada foi diluída em dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), partindo de 1 mg/mL e seguindo-se em diluições seriadas. Adicionou-se 30 μ L do inibidor (neste caso α , β -amirenona, o diluente, o controle, o DMSO e o orlistate) na concentração de 1mg/mL. Posteriormente, adicionou-se 250 μ L da solução da enzima. Incubou-se por 5min a 37 °C. Após a adição do reativo de cor *p-nitrophenyl palmitate substrate* (PNP) e incubação, fez-se a primeira leitura dos testes em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) em absorbância de 405nm. Homogeneizou-se para evitar a

formação de duas fases. Incubou-se (20min – 40min, 37°C, 120 rpm) e acompanhou-se com leituras sucessivas até que a absorbância do controle alcançasse a faixa de 0,8-1,00 ±0,1. A segunda leitura foi feita após a incubação, momento em que as absorbâncias foram convertidas em % de inibição. Para o cálculo da CI₅₀ foi utilizado o programa *Origin*®, por análise de progressão não linear.

4.7.2 Inibição de α -amilase

Para o teste de α -amilase utilizou-se a metodologia de Subramaniam et al. (2008), com adaptações. A reação das substâncias diluída com a enzima foi feita em microplaca. Adicionou-se 30 μ L do inibidor na concentração de 1mg/mL. Incubou-se por 5 min (37°C), adicionou-se 170 do substrato (Amilase CNPG Liquiform). Fez-se, então, a primeira leitura em absorbância de 405nm. Foi homogeneizado e incubado a 37°C de 20-40 minutos, até que a absorbância do controle alcançasse 0,8-1,00 ± 0,1. A segunda leitura foi feita após a incubação em leitor de ELISA em absorbância de 405 nm. Os resultados foram expressos em % de inibição e a CI₅₀ foi calculada por meio da equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - (\text{abs final} - \text{Abs inicial amostra} / \text{Abs final} - \text{Abs inicial do controle}) \times 100.$$

4.7.3 Inibição de α -glucosidase

A atividade inibitória de α -glucosidase foi baseada na metodologia de Andrade-Cetto e colaboradores (2008). Este experimento envolveu as enzimas do extrato cetônico de intestino de mamífero e do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Com as substâncias diluídas fez-se a reação em microplaca com a solução de enzima preparada. Em seguida, obtiveram-se os valores das absorbâncias a 405 nm. Com a adição do reagente de cor, procederam-se leituras a cada 5 minutos, até o tempo de 30 minutos. Os valores obtidos em leitor de microplaca foram convertidos em percentual de inibição:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{Abs final} - \text{Abs inicial amostra} / \text{Abs final} - \text{Abs Inicial do controle}) * 100.$$

4.7.4 Xantina oxidase

Para a realização do teste, adotou-se o método segundo Berboucha (2010), com adaptações, a enzima Xantina Oxidase, obtida de micro-organismo da marca *Sigma-Aldrich* e kit enzimático colorimétrico de Ácido úrico (Uric Acid Liquicolor) da marca *Human do*

Brasil e como padrão Alupurinol. Utilizou-se uma microplaca de 96 poços e os testes foram realizados em triplicata. No poço controle adicionou-se 40µL de enzima e 30µL do diluente (DMSO). No poço teste adicionou-se 40µL da enzima e 30µL da substância na concentração de 1mg/mL. Aguardou-se por 5 minutos a temperatura de 30° C (100rpm). Após esse tempo, foi adicionado 80µL do R1 (xantina 600uM, Ácido Etilenodiamino (EDTA) 0,1Mm, hidroxilamina 0,2mM). Depois disso, incubou-se por 30 min a 37° C. Efetuou-se a leitura e, em seguida, adicionou-se 150µL do reagente para teste de ácido úrico. Incubou-se por 10 minutos e então se efetuou a leitura. Ela foi efetuada em um leitor de detecção multi-fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 320 nm e um comprimento de onda de emissão de 492 nm.

4.8 TESTES AGUDOS E CRÔNICOS *IN VIVO*

Para os Testes de Tolerância Oral a Carboidratos (TTOC), foram usados os açúcares (maltose, sacarose e amido), enquanto que no Teste de Tolerância Oral a Triglicerídeos (TTOT) os animais foram separados em 5 grupos de 6 (seis) camundongos da linhagem Balb C, fornecidos pelo Biotério do INPA. Os grupos foram separados e denominados em: grupo controle basal (GB); grupo controle positivo (CP); grupo padrão (GCP) e grupos testes (GTA50mg/Kg e GTA25mg/Kg de substância). Para os testes de indução da diabetes foram utilizados grupos de 6 animais, que pertenciam a mesma linhagem. Para o teste crônico da obesidade foram adquiridos animais C57BL/6, oriundos do Biotério da USP.

4.8.1 Testes agudos

4.8.1.1 Teste de Tolerância Oral a Carboidratos (maltose, sacarose e amido)/TTOC

O TTOC foi adaptado ao método utilizado por Santos e Colaboradores (2012). Os camundongos foram separados em cinco grupos compostos por seis animais cada (grupos descritos anteriormente), estando os animais padronizados com 18 ± 2 g de peso para os testes. Foram mantidos em jejum de 12h. Realizou-se uma primeira coleta de sangue da cauda nos animais de todos os grupos. Após isso foi administrada uma quantidade em µL (adequada para cada peso de animal) de 2g de carboidratos (maltose). Trinta (30) minutos depois foram administrados, respectivamente, por via oral (gavagem): nos grupos basal (GB) e grupo

controle positivo (CP), o veículo (3% de Kolliphor em soro fisiológico); no grupo padrão (GCP), 50mg/Kg de acarbose; nos grupos testes (GTA50mg e GTA25mg), a substância teste (α,β -amirenona). Após 30, 60 e 90 minutos da gavagem com as substâncias controle, padrão e testes foram realizadas novas coletas. As amostras de sangue de todos os grupos foram coletadas para medição de glicose no sangue utilizando glicosímetro digital Accu-Check (Roche Diagnósticos, Mannheim, Alemanha). O mesmo procedimento foi realizado para os açúcares (sacarose e amido), sendo testado somente a concentração de 50mg/Kg no grupo teste devido a quantidade de animais disponíveis.

4.8.1.2 Teste de Tolerância Oral a Triglicérido (TTOT)

Os animais foram submetidos à administração por via oral de substância hiperlipidêmica (óleo de fígado de bacalhau comercial/SCOTT ®) conforme indicam Adisakwattana e colaboradores (2010). Foi administrada uma dose de 200L e após 20 minutos foram administrados nos grupos testes (GT, n=6) a substância na concentração de 25, 50 e 100mg/Kg. No grupo padrão (GCP) foi administrada a substância orlistate de 50mg/Kg/peso. No grupo controle positivo (CP) foi administrado o veículo (Kolliphor 3% sigma em soro fisiológico). Amostras de sangue foram coletadas da cauda antes da ingestão (jejum) e após intervalo de 60, 120, 180 e 240 minutos. As dosagens foram determinadas utilizando um analisador automático e kit comercial *SIEMENS* (enzimático).

4.8.2 Testes Crônicos

4.8.2.1 Indução experimental de diabetes por estreptozotocina + nicotinamida (Diabetes tipo II)

A diabetes tipo II em camundongos foi induzida em animais machos normais. Os animais foram mantidos em jejum durante 10 horas (período diurno) e administrou-se por via intraperitoneal uma dose de nicotinamida (210 mg/Kg). Após 20 minutos, uma dose de estreptozotocina (STZ) a 180 mg/Kg de peso corporal preparado previamente em 0,1 M tampão citrato (pH 4,5) em um volume de 1mL/kg de peso corporal foi injetada (RAMIREZ-ESPINOSA, 2011). O diabetes foi confirmado após medir os níveis de glicose no sangue, determinados 96h após administração da STZ-nicotinamida com glicosímetro digital Accu-Check (Roche Diagnósticos, Mannheim, Alemanha). Foram considerados diabéticos os

animais com nível de glicose no sangue em jejum acima de 300 mg/dL e esses foram utilizados para o estudo. O tratamento começou assim que houve a confirmação do diabetes durante um período de 10 dias. A cada 03 (três) dias foram realizadas dosagens para medição da glicemia e pesagem. Após o tratamento foi realizada a eutanásia dos animais e os órgãos foram retirados para teste histológico.

4.8.2.2 Indução experimental da obesidade

Camundongos machos (35), com 28 dias, com $18g \pm 2$ de peso, foram ambientados inicialmente por uma semana, tendo livre acesso a ração padrão (*Presence*) e água *ad libitum*. Após esse período, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: dieta normal (ração padrão), dieta hipercalórica e hiperlipídica (ração modificada). Depois de 14^a semanas, os animais foram novamente separados aleatoriamente em 5 grupos, sendo: 1 grupo alimentado com ração padrão e 4 grupos alimentados com ração modificada. Com isso, deu-se início ao tratamento dos diferentes grupos, a saber:

Tabela 3: Distribuição dos grupos experimentais

Grupo experimental	Descrição do tratamento
GB (n=6)	Animais não obesos e tratados com veículo
CP (n=6)	Animais obesos e não tratados (somente administrado veículo)
GCP (n=6)	Animais obesos e tratados com padrão Orlistat 25mg/kg
GTA25 (n=6)	Animais obesos e tratados com α , β -amirenona 25mg/kg (diluído em veículo).
GTA50 (n=6)	Animais obesos e tratados com α , β -amirenona 50mg/kg (diluído em veículo).

Fonte: Elaborada pela autora.

O grupo controle positivo recebeu o mesmo veículo do grupo não obeso. A mistura de α , β -amirenona nas concentrações de 25 e 50mg foi diluída em veículo (Kolliphor 3% em soro fisiológico) preparado diariamente antes da gavagem. Semanalmente foi registrado o volume de água (ml/semana) e de ração (g/semana) consumidos por cada um dos grupos. O experimento teve duração de 19 semanas, no total, sendo 14 o período de indução e 04 semanas de tratamento. Ao final deste período os animais foram colocados em jejum de 10h, para coleta de amostras de sangue, e posteriormente foram eutanasiados sob a anestesia (Ketamin e Xilazina) para coleta do tecido adiposo visceral, fígado e rim. As amostras de

sangue foram coletadas em seringas contendo heparina, e o plasma foi utilizado para a análise de parâmetros bioquímicos por meio de kits específicos.

4.9 DIETA EXPERIMENTAL – DIETA COM RAÇÃO NORMAL E DIETA COM RAÇÃO MODIFICADA

Para a dieta normal foi utilizada a ração padrão (*Presence*) em ratos e camundongos para animais de laboratório. A dieta hipercalórica e hiperlipídica (ração modificada) composta de 33,08% de carboidratos, 33,76% de proteínas, 57, 48% de lipídios, assim como o implemento de outros constituintes (fibras, vitaminas, conservantes, minerais entre outros). Os ingredientes para a produção da ração modificada encontram-se na tabela 4 (cálculo com base nas informações prestadas pelo fabricante no rótulo da embalagem). Tanto a ração modificada e a dieta normal quanto a ração padrão foram substituídas a cada sete dias. O consumo alimentar dos animais foi aferido a cada sete dias subtraindo-se o peso das sobras do peso (g) do alimento e água (mL) dispensado. Esta dieta foi adaptada à dieta hipercalórica conhecida como dieta de cafeteria ou dieta ocidental, descrita por Estadella et al. e colaboradores (2004). Assim, realizou-se a análise da composição centesimal da ração modificada e comparada aos valores descritos pelo fabricante da ração padrão (*Presence*).

Tabela 4: Composição da ração modificada

Ingredientes	Quant. (g)	Med. Caseira	Kcal	Ptn (g)	CHO (g)	Lip (g)
Leite Condensado Nestlé caixa	60	3 col. Sopa	195	4,2	33	4,8
Leite em Pó Italac 400g sachê	78	6 col. Sopa	380,64	18,72	31,2	20,28
Banha de porco	30	3 col. Sopa	910	2,0	-	89
Chocolate branco em barras Galak	50	7 quadrad.	280	3,6	28	17,2
Creme de leite UHT Purelac caixa	30	3 col. Sopa	60	-	1,4	6
Total			1825,64	28,52	93,6	137,28

Fonte: Elaborada pela autora.

A cada 15 dias, a ração modificada foi preparada manualmente e seca em estufa a 50° C, durante um período de 12h. Na preparação, utilizou-se como base a ração padrão *Presence*, que foi moída e adicionada aos ingredientes da tabela 3, sendo preparados na forma de peletes. A composição centesimal da ração preparada foi realizada no laboratório de

alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFAM, pelo professor Fabricio Rolim, e os resultados encontram-se descritos na tabela 5. O cálculo realizado considerou 100g da amostra analisada. Para evitar auto-oxidação dos componentes gordos, a ração foi armazenada a 2-8 ° C. Como controle, utilizou-se a ração *Presence* para ratos e camundongos com composição em umidade (max) 130,00g/kg; proteína bruta(min) 230,00g/kg; extrato etéreo (min) 40,00 g/kg; fibra bruta (máx) 50,00g/kg; matéria mineral (máx) 100,00g/kg; cálcio(min) 12,00g/kg; cálcio (máx) 13,00g/kg; fósforo (min) 8.500,00mg/kg de acordo com especificação do fabricante.

Tabela 5: Composição centesimal

Frações	Integral
Umidade (%)	7,07
Lipídios (%)	15,33
Proteínas (%)	7,36
Cinza (%)	3,23
Carboidratos (“Nifext”)	67,01

Composição centesimal g/100g da amostra de ração utilizada para indução de ganho de peso nos animais.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.9.1 Determinação da composição centesimal

A determinação das frações umidade, extrato etéreo, nitrogenada, cinzas e nifext da ração utilizada para induzir ganho de peso nos animais foi realizada de acordo com as normas do instituto Adolfo Lutz 4° edição (IAL, 2008).

4.9.2 Preparo da amostra para análise

A preparação da amostra de ração para a realização da composição centesimal consistiu no procedimento analítico no qual a amostra foi convertida em um material homogêneo, isto é: trituração prévia. A amostra de ração foi triturada em liquidificador e armazenada em frasco devidamente vedado em um dessecador à temperatura ambiente.

4.9.3 Determinação da fração Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico com o emprego de calor, o qual se baseia na perda de peso do material quando submetido a aquecimento de 105°C, até atingir peso constante. Secou-se as cápsulas vazias em estufa a 105°C por uma hora, após isso elas foram transferidas para um dessecador para que esfriassem por 30 minutos. As cápsulas foram pesadas e seus pesos foram anotados. Pesou-se uma alíquota de aproximadamente 5 g da amostra homogeneizada na cápsula. Anotou-se o peso da cápsula + amostra. Levou-se à estufa regulada a 105°C por 2 horas e, em seguida, as cápsulas foram transferidas para o dessecador. Deixou-se esfriar e pesou-se. Colocaram-se novamente as cápsulas na estufa e efetuaram-se as operações de aquecimento e pesagem até obter peso constante.

4.9.4 Determinação da fração extrato etéreo

Para a obtenção do extrato etéreo, foi utilizado o método de Soxhlet (gravimétrico), baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter etílico, ou na quantidade de material solubilizado pelo solvente. Pesou-se 2 gramas de material dessecado, transferiu-se quantitativamente para o cartucho de Soxhlet e cobriu-se a amostra no cartucho com algodão. Extraíu-se em aparelho de Soxhlet com éter etílico, utilizando copo de alumínio de fundo chato (250 ml) previamente dessecado e tarado. Extraíu-se por mais ou menos 4 horas. Evaporou-se o solvente e colocou-se o copo com o resíduo em estufa a 105°C. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Os resultados foram expressos em g/100 g de ração. A determinação da fração extrato etérea foi calculada pela equação abaixo:

$$\text{Lipídios \% p/p} = 100 \times N / P$$

Onde:

N = nº de g de lipídios [(copo+extrato) – (Peso do copo)]

P = nº de g da amostra

4.9.5 Determinação da fração Nitrogenada

A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl. Pesou-se quantitativamente em tubo de digestão (semimicro Kjeldahl) aproximadamente 0,2 g de amostra e acrescentou-se a mistura catalisadora mais o ácido sulfúrico (2 g de catalisador + 5

ml de H₂SO₄). Colocaram-se os tubos em bloco digestor, aqueceu-se inicialmente a 50°C e aumentou-se a temperatura de 50°C a cada 15 minutos até atingir 400°C. Digeriu-se até que o conteúdo dos tubos estivesse transparente, de cor verde-azulado, e a partir daí aqueceu-se mais 30 minutos. Deixou-se esfriar os tubos e adicionou-se com cuidado aproximadamente 10 ml de água destilada por tubo. Colocou-se o tubo já diluído no destilador, neutralizou-se com NaOH 50%. Recolheu-se o destilado em *erlenmeyer* com ácido bórico 2% com indicador misto (10 ml de ácido bórico com indicador misto e 15/20 ml de NaOH 50%). Recolheu-se 150 ml do destilado e, por fim, titulou-se o destilado usando 0,1N até que o indicador virasse da cor verde para lilás, o que dá um pH próximo de 4,5. Os resultados foram expressos em g/100 g de ração, empregando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio em proteína. A determinação da fração nitrogenada foi calculada pela equação abaixo:

$$\% N = (V_a - V_b) \times N \times f \times 0,014 \times 100/PA$$

Onde:

% P = % N x Fator de conversão (6,25)

V_a = Volume de HCl gasto na titulação com a amostra.

V_b = Volume de HCl gasto na titulação com o branco.

N = Normalidade de HCl

f = Fator da solução de HCl

PA = Peso da amostra

4.9.6 Determinação da Fração Cinza

Pesou-se 5g da amostra já dessecada em uma cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Incinerou-se em bico de Bunsen, aos poucos, até formação de carvão. Transferiu-se para a mufla regulada a 550°C. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente e pesou-se. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Os resultados foram expressos em g/100 g de ração. A determinação da fração cinza foi calculada pela equação abaixo:

$$\text{Cinzas \% p/p} = 100 \times N/P$$

Onde:

N = n° de g de cinzas [(Cadinho+cinza) – (Peso do cadinho)]

P = n° de g da amostra [(Cadinho+amostra) – (Peso do cadinho)]

4.9.7 Determinação da Fração Glicídica

Foi realizada pela diferença da soma das quatro determinações por 100, ou seja, somaram-se os resultados das cinco frações e subtraiu-se de 100.

4.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas foram realizadas no aparelho *Dade Behring dimension RLmax* a partir do soro dos animais coletados ao final do tratamento. Os níveis séricos de Colesterol total (CT), Triglicerídeos (TG), Glicose (Glic), Uréia (UR), Creatinina (CR), transaminases (Aspartato Transferase/AST), (Alanina Transferase/ALT) e Cretina kinase (CK) foram quantificados por kits específicos (SIEMENS) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de insulina, leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 6 (IL6), malondialdeído (MDA), óxido nítrico (ON), xantina oxidase (XO), alantoína LDL-c, HDL-c, ácido úrico albumina e proteínas totais não foram realizados devido a quantidade insuficiente de soro. As dosagens foram determinadas utilizando analisador automático citado acima e kits comerciais disponíveis na tabela 6.

Tabela 6: Reagentes utilizados nas dosagens bioquímicas séricas dos animais ao final do tratamento.

PARÂMETRO BIOQUÍMICO	MARCA/KIT	TIPO DE REAÇÃO
GLIC (MG/DL)	SIEMENS	Enzimático
COL (MG/DL)	SIEMENS	Enzimático
TRIG (MG/DL)	SIEMENS	Enzimático
AST(U/L)	SIEMENS	Cinético
ALT(U/L)	SIEMENS	Cinético
URE (MG/DL)	SIEMENS	Enzimático
CR (MG/DL)	SIEMENS	Colorimétrico
CK(U/L)	SIEMENS	Cinético

Fonte: Elaborada pela autora.

4.11 ANÁLISE DA TOXIDADE

Para a avaliação da toxicidade aguda *in vivo*, os testes foram conduzidos de acordo com as diretrizes constantes no Protocolo 423, utilizando o método de classes descrito nas diretrizes (OECD, 2002), observando-se também os itens descritos no “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” da ANVISA, publicado pela Resolução RE 90/04 (BRASIL, 2004).

4.12 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Os animais foram submetidos à abertura ampla da cavidade abdominal até a exposição dos órgãos internos. Coletaram-se todos os órgãos da cavidade abdominal, entretanto, para esta pesquisa utilizou-se somente o rim direito, o fígado e o tecido adiposo. Os demais órgãos foram armazenados adequadamente para estudos posteriores.

Os órgãos (rim direito, fígado e tecido adiposo) foram armazenados em formol tamponado 10% e processados no laboratório de histologia funcional/UFAM, coordenado pelo professor Dr. José Fernando Marques Barcellos. Para as análises histológicas os órgãos foram processados para confecção das lâminas e corados com hematoxilina-eosina. A análise das lâminas foi realizada utilizando-se microscopia óptica. Os procedimentos foram realizados pela pesquisadora e acompanhados pelas técnicas Rosilene Ribeiro Campos e Maiza Ferreira da Cunha e pela estagiária Mayla Silva Leão Ferreira.

A avaliação histopatológica do rim e do fígado envolveu a observação de possíveis lesões microscópicas ou alterações morfológicas como inflamação e esteatose. As análises histomorfométricas foram realizadas com uso de um sistema de captura e análise de imagens, constituído por microscópio binocular com câmera acoplada.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar o efeito do tipo de extração e do solvente na porcentagem de rendimento dos extratos de breu, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) baseada em um delineamento de experimento fatorial, utilizando o fator método de extração nos níveis maceração e sonicação e o fator solvente nos níveis hexano, acetato de etila e etanol.

Os dados foram apresentados por meio de gráficos (*Interval plot e Boxplot*), em que se calculou a média, desvio-padrão (Dp.) e Intervalo de Confiança ao nível de 95% (IC95%)

para os dados que apresentaram distribuição normal por meio do teste de *Shapiro-Wilk* e homogeneidade entre as variâncias por meio do teste de *Bartlett's*. No caso da rejeição da hipótese de normalidade ou homogeneidade entre as variâncias optou-se por calcular a mediana.

Nos dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias foram aplicados os testes da Análise de Variância (ANOVA) e *Tukey*. Já nos casos de rejeição da hipótese de normalidade optou-se por utilizar os testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis* ou *Wilcoxon* (VIEIRA, 2004). O nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DA AMIRENONA

A partir de 2kg de breu comercial (resina) foi otimizado o procedimento para obtenção da mistura de α , β -amirenona. Para o processo foram utilizados solventes e métodos diferentes. O método direto, no qual se utilizou amostra de breu comercial somente triturada e posta diretamente em coluna cromatográfica para o isolamento da substância majoritária α , β -amirina, foi escolhido por apresentar um melhor rendimento em relação aos demais métodos como os descritos a seguir.

Para verificar o rendimento dos extratos e colunas, nove medidas de rendimentos foram consideradas em cada tratamento ou nível do experimento. O teste estatístico demonstrou ser o acetato de etila o melhor solvente para extração tanto no método de maceração como no de sonicação, respectivamente 81,41% e 77,77%, não sendo significativa a diferença entre os métodos. O segundo melhor solvente foi o etanol, exibindo 72,24% na maceração e 45,96% na sonicação A. Já na sonicação em hexano foi o que apresentou o menor rendimento (Tabela 7).

Tabela 7: Análises estatísticas para o rendimento médio dos extratos de acordo com o tipo de solvente e método de extração.

Tratamento (solvente: método)	% médio de rendimento	Desvio padrão (variação %*)	Significância Estatística**
AcOEt: MACERAÇÃO	81,41	3,72 (4,57%)	A
AcOEt: SONICAÇÃO	77,77	3,42 (4,39%)	Ab
EtOH: MACERAÇÃO	72,24	10,72 (14,83%)	B
EtOH:SONICAÇÃO	45,94	2,41 (5,24%)	C
Hexano: MACERAÇÃO	25,87	5,34 (20,74%)	D
Hexano: SONICAÇÃO	17,86	3,57 (19,99%)	E

*coeficiente de variação; ** para letras diferentes, os tratamentos diferem entre si de forma significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pela autora.

O mesmo delineamento foi utilizado para avaliar o rendimento das frações das colunas em que foi identificada a substância de interesse. Em seguida, o tratamento com melhor rendimento na identificação da substância de interesse foi comparado com o rendimento obtido por meio das colunas de breu puro. Observou-se que o acetato é o melhor solvente para se obter maior rendimento. A análise de variância para o rendimento do extrato

mostrou que o tipo de solvente, o método de extração e a interação solvente x método de extração afetam significativamente o rendimento do breu nos extratos (valor $P < 0.05$). O maior percentual médio de rendimento foi obtido usando o solvente acetato com a técnica de extração maceração (tabela 7).

A análise de variância para o rendimento obtido nas colunas mostrou que apenas o tipo de solvente afeta, significativamente (valor $P < 0.05$), o rendimento da resina do breu na identificação da substância de interesse. A maior percentagem de rendimento foi obtida usando o solvente hexano, conforme pode ser visto na Tabela 8.

Tabela 8: Análises estatísticas para o rendimento médio do breu nas colunas de acordo com o tipo de solvente

Tratamento (solvente)	% médio de rendimento	Desvio padrão (variação %*)	Significância Estatística**
Hexano	37,91	± 5,35 (14,13%)	A
Acetato	26,50	± 6,70 (25,27%)	B
Etanol	21,59	± 4,81 (22,26%)	B

*coeficiente de variação; ** para letras diferentes, os tratamentos diferem entre si de forma significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o maior percentual de rendimento nas colunas para identificação da substância foi obtido utilizando o solvente hexano, realizou-se, então, um teste de comparação de médias deste rendimento entre os tratamentos hexano: maceração e sonicação com o rendimento obtido nas colunas por meio do breu puro. Assim, com esta comparação foi constatado que não há diferença significativa entre o rendimento obtido nas colunas utilizando o hexano e o breu puro (ver tabela 9).

Tabela 9: Avaliação do rendimento dos extratos de breu nas colunas de acordo com o tipo de tratamento

Tratamento	% médio de rendimento	Desvio padrão (variação %*)	Significância Estatística**
Hexano: maceração	38,16	± 2,06 (5,40%)	A
Hexano: sonicação	37,67	± 8,21 (21,79%)	A
Breu puro	32,05	± 2,40 (7,50%)	A

*coeficiente de variação; ** para letras diferentes, os tratamentos diferem entre si de forma significativa ao nível de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, observou-se que na fase de extração as amostras de extrato obtidas em acetato de etila apresentaram maior rendimento. Entretanto, verificou-se nas colunas das frações em hexano maior rendimento da substância isolada nas frações F3 e F4. Quanto ao método direto, esse apresentou um rendimento médio de 34%. Contudo, a substância não apresentava a pureza das frações oriundas dos demais extratos, precisando de um tratamento posterior.

5.2 ANÁLISE DA PUREZA

Na cromatografia líquida de alta eficiência observou-se o pico para a mistura de α , β -amirenona com o tempo de retenção de 11,024 minutos, mediado por um índice do pico de pureza apresentando um valor de 0,996605.

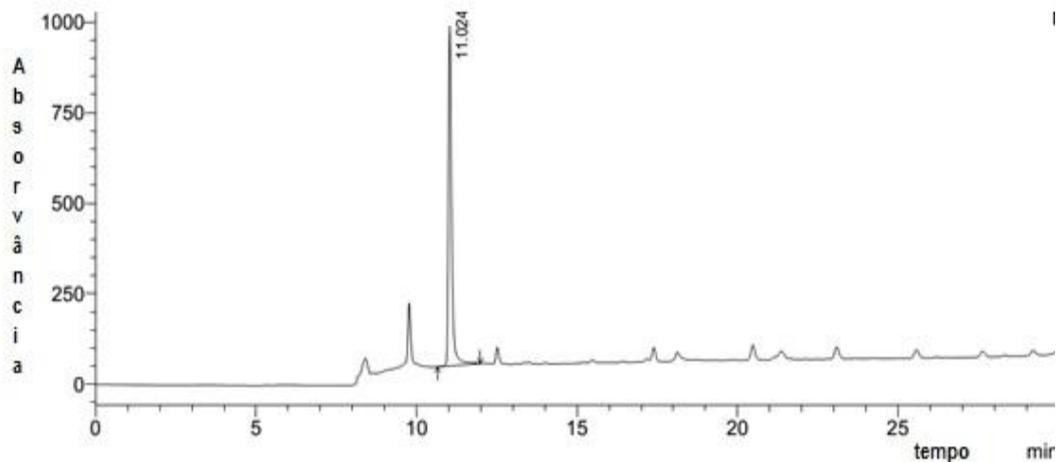


Figura 6A – CLAE: pico de retenção da mistura α e β -amirenona

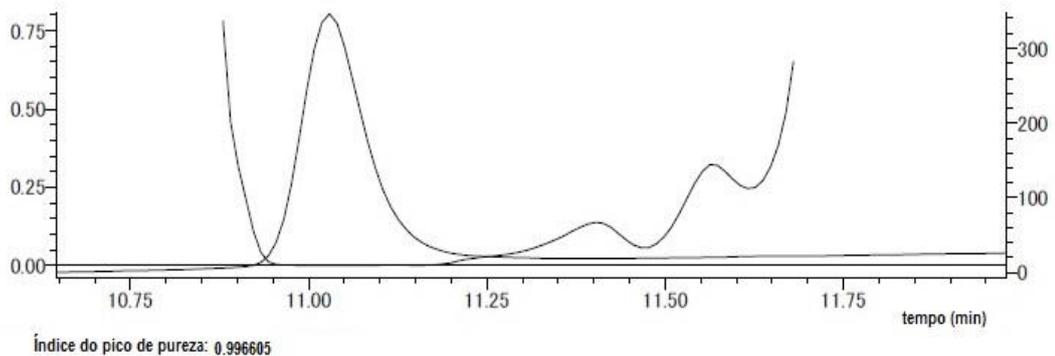


Figura 6B: CLAE - índice de pureza de α e β -amirenona

As análises por CCD das amostras de cada extrato possibilitaram a observação de diferentes manchas. Em comparação com padrão de α - e β -amirina, foi possível observar que algumas frações apresentavam bandas com o mesmo R_f do padrão comercial em um sistema de eluição hexano/acetato de etila (9:1) ($R_f = 0,41$), indicando a possibilidade de ser a mesma substância nos diferentes extratos (Figura 7). Observou-se que todos os extratos apresentam a substância padrão (α e β -amirina). Verificou-se somente uma pequena diferença em relação ao extrato em etanol, que apresentou uma quantidade maior de manchas na parte superior, indicando substâncias menos polares.

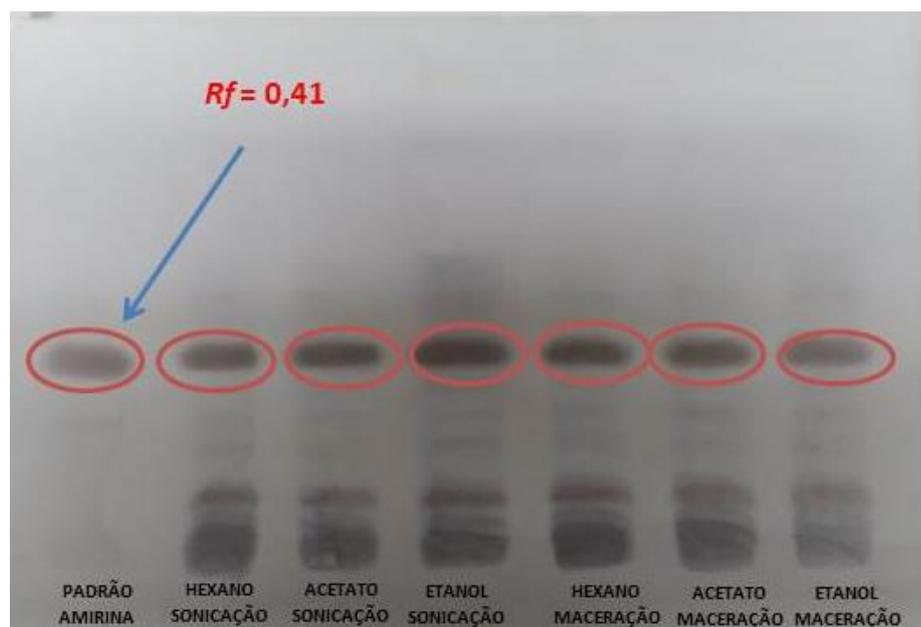


Figura 7: CCD dos diferentes extratos. Os extratos em hexano, acetato de etila e etanol, macerados e sonicados, foram eluídos em solventes na proporção 9:1 hex/acetato e revelados com vanilina sulfúrica em placas de sílica de 6 cm de altura por 10 cm de comprimento. As amostras foram comparadas ao padrão de amirina da sigma.

Fonte: Rosilene Ferreira

Os resultados das CCD das frações das colunas demonstram que as frações 3 e 4 apresentaram manchas características do padrão de amirinas. Após avaliação das CCD, as frações puras foram reunidas e aquelas que apresentavam características semelhantes foram agrupadas para o processo de purificação por lavagem descrito anteriormente.

O padrão das manchas encontradas nas diferentes frações revela a presença da substância de interesse nas frações 3 e 4 das colunas de etanol e hexano, aparentemente puras (Figura 8).

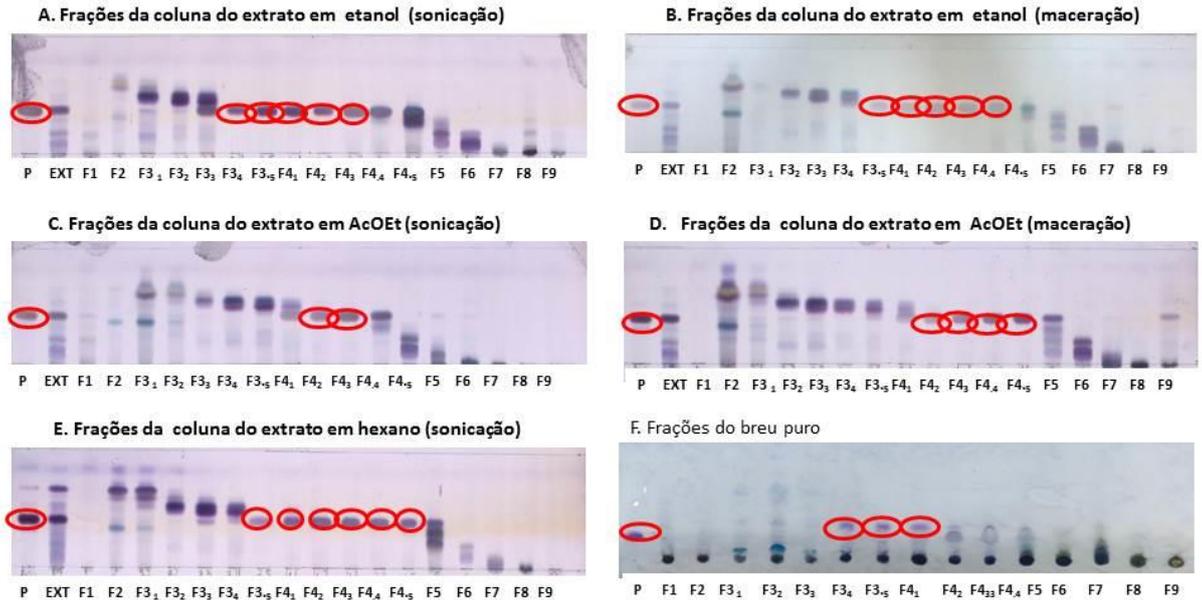


Figura 8 – CCD: A. frações da coluna de extrato em etanol (sonicação); B. frações da coluna de extrato em etanol (maceração); C. frações da coluna de extrato em AcOEt (sonicação); D. frações da coluna de extrato em AcOEt (maceração); E. frações da coluna de extrato em hexano (sonicação); F. frações da coluna de breu. As placas foram eluídas em solventes na proporção 9:1 e reveladas com vanilina sulfúrica. Foram ainda comparadas ao padrão de amirina da sigma.

Fonte: Priscila Duarte/Rosilene Ferreira

5.3 SÍNTESE DA AMIRENONA A PARTIR DA AMIRINA

As amostras de α e β -amirinas purificadas foram utilizadas no processo de semissíntese. Ele baseou-se na metodologia de Soldi e Colaboradores (2008). Para 1g de α , β -amirina obteve-se valores médios de 76 % de rendimento em cada processo. Foram realizados nove processos de oxidação, com a obtenção de 6,40g dos isômeros α e β -amirenona.

Todos os processos de oxidação foram acompanhados por CCD com eluentes hexano/acetato de etila (9,5/0,5) e revelados em vanilina sulfúrica (Figura 8), observando-se que a total oxidação da amostra ocorreu no tempo de 1620 min ou 27h.

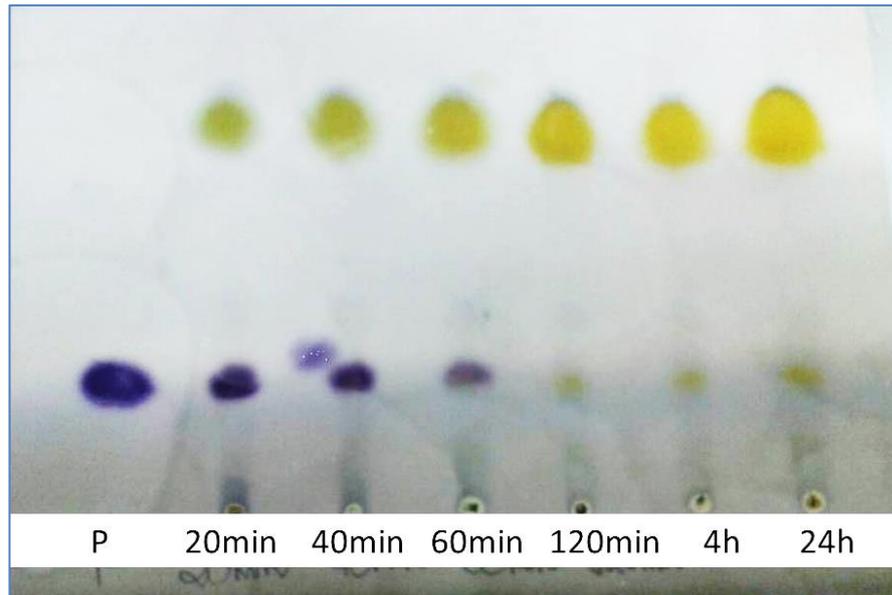


Figura 9: CCD do processo de oxidação de α , β -amirina a α , β -amirenona. Processo acompanhado durante 24h. A placa de 6 cm de altura por 10cm de comprimento foi eluída em hexano/acetado na proporção 9,5/0,5 e revelada com vanilina sulfúrica.

Fonte: Rosilene Ferreira

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE A, B-AMIRENONA

Após a síntese, a mistura de α , β -amirenona foi submetida a caracterização físico-química utilizando diferentes técnicas, tais como: microscopia eletrônica de varredura, calorimetria de varredura diferencial, termogravimetria e termogravimetria derivada, e espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier, cromatografia líquida de alta eficiência, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), espectrometria de massa, que serão apresentadas a seguir.

5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A mistura de α , β -amirenona apresenta-se com aspecto de pó branco, com arranjos e tamanhos irregulares e consistentes (Figura 10). O aspecto morfológico da α , β -amirenona foi visto em diferentes ampliações (500X, 1000X e 2000X). As micrografias revelaram partículas porosas com arranjos de sistemas cristalinos com formas e tamanhos irregulares, o que possivelmente acarreta em sua baixa solubilidade aquosa, que foi verificada em experimentos prévios (Figuras 11, 12, 13).

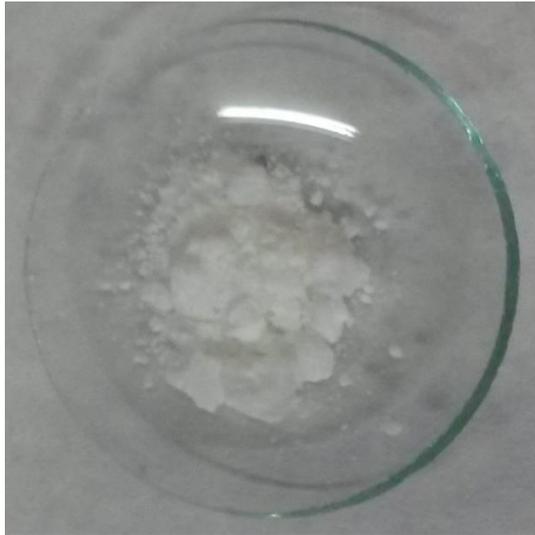
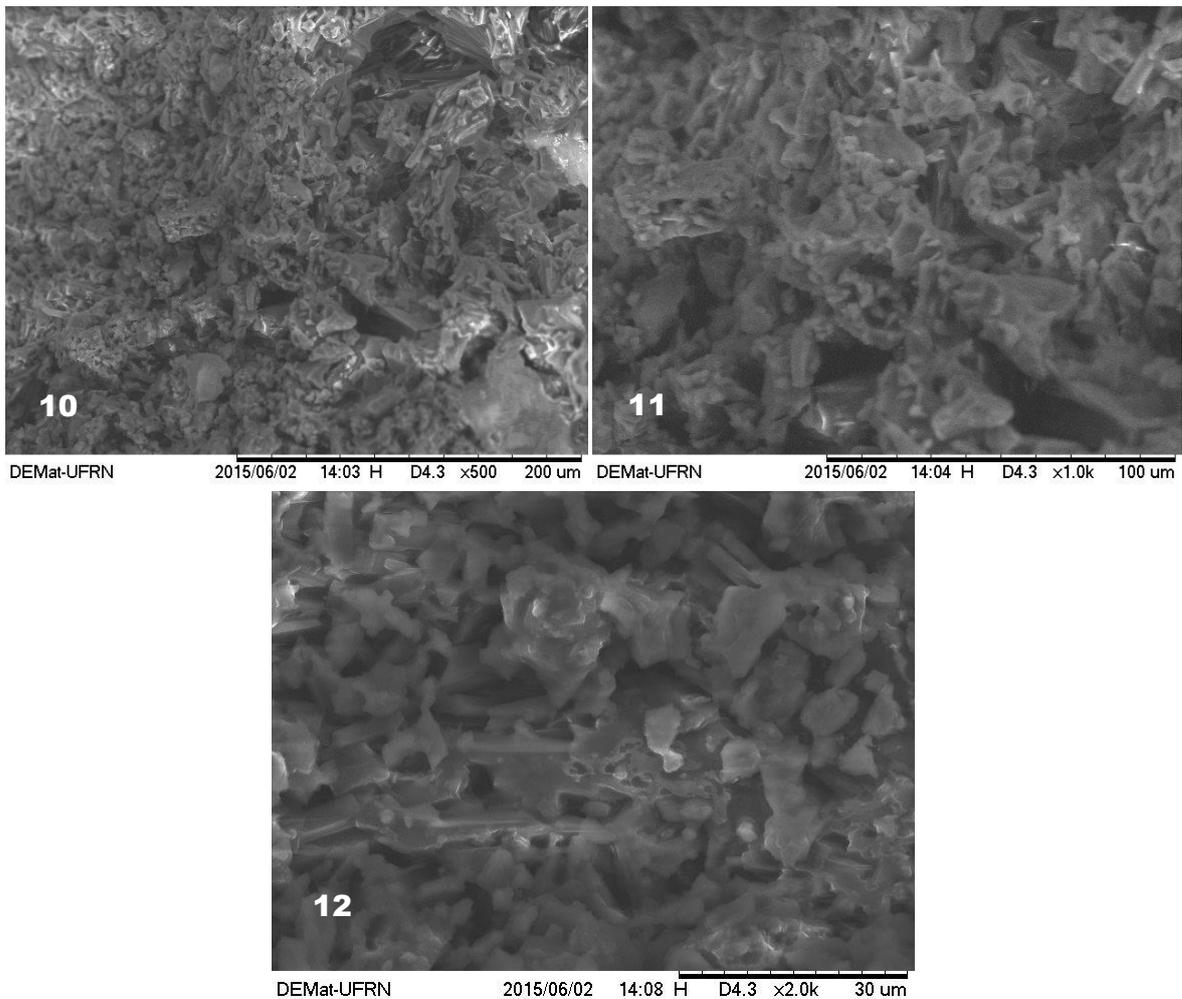


Figura 10: aspecto de α , β -amirrenona



Figuras 11, 12 e 13 – Aspecto morfológico da α , β -amirrenona em MEV.

5.4.2 Curvas de termogravimetria (TG) / termogravimetria derivada (DTG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria de exploratória diferencial (DSC)

As curvas de termogravimetria (TG)/termogravimetria derivada (DTG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria de varrimento diferencial (DSC) da α , β -amirenona são mostradas na Figura 14. A curva TG mostra um único passo de perda de massa de aproximadamente 95%. A curva DTA mostra dois eventos endotérmicos representados por picos descendentes. O evento físico que não envolve perda de massa é demonstrado apenas na curva DTA. Assim, a análise utilizando a associação de ambas às técnicas termoanalíticas é importante para a caracterização da amostra estudada.

Analisando as curvas mostradas na Figura 14, observou-se que na curva TG, a α , β -amirenona é termicamente estável até uma temperatura de 235 °C. A decomposição de α , β -amirenona ocorre entre 235 °C e 265 °C e é visualizada como um único passo na curva TG. Esse evento é indicado pelo pico no DTG a 327 °C, ponto em que a massa muda mais rapidamente. A área do pico DTG é diretamente proporcional à variação da massa da amostra, e o valor encontrado para α , β -amirenona foi de 2,720 mg, correspondendo a 95% de perda de massa.

Entre 78 °C e 115 °C ocorre um evento endotérmico que corresponde ao ponto de fusão α , β -amirenona, no qual não há evidência de perda de massa pelo TG, mas a indicação de que o evento físico de mudança do estado sólido para o estado líquido ocorre, confirmando, portanto, a cristalinidade natural da α , β -amirenona. Após o evento de fusão, observa-se um segundo evento endotérmico no DTA, entre 295 °C e 363 °C, o que corresponde à perda de massa de α , β -amirenona, tendo sido confirmado por TG.

As curvas DSC mostraram-se semelhantes às curvas DTA. O primeiro evento endotérmico em DSC representa o intervalo de fusão de α , β -amirenona. O evento tem uma temperatura inicial de 81 °C, uma ponta de 122 °C e uma temperatura máxima de pico de 107 °C. O valor de entalpia gerado no evento foi de -24 J/g. O segundo evento endotérmico está relacionado com a perda de massa de α , β -amirenona, que teve uma temperatura de início de 242 °C, uma ponta de 320 °C e uma temperatura máxima de pico de 278 °C. A entalpia gerada no evento foi -392 J/g.

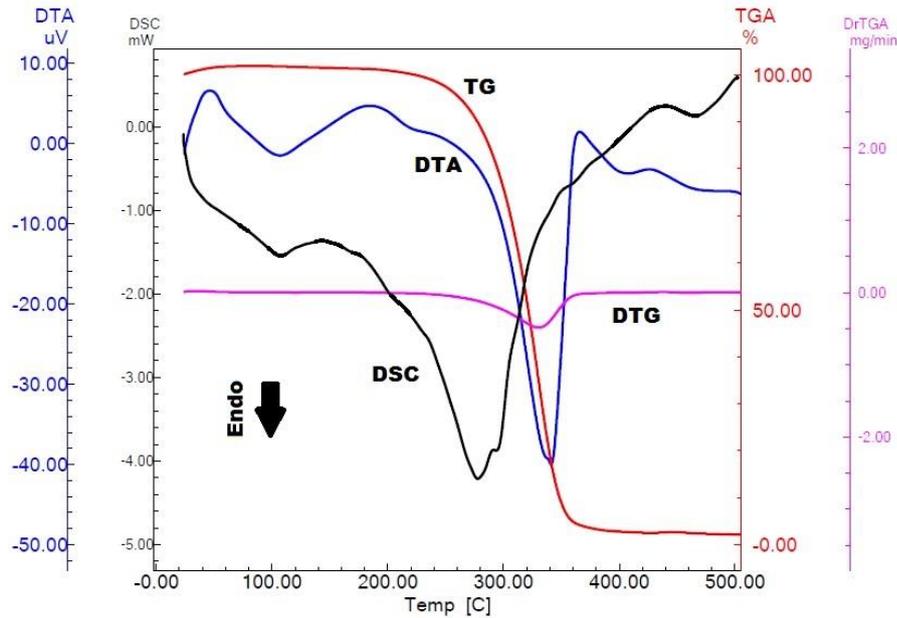


Figura 14 – DTA, DSC e TG/DTG para α , β -amirrenona com uma velocidade de aquecimento de $10,0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

5.4.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada Fourier (FTIR)

Com o espectro obtido da α , β -amirrenona, verificou-se uma banda referente às vibrações de estiramento e dobramento da ligação C(=O)-C entre $1100\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$. A vibração de estiramento da ligação C=O se mostra intensa em 1705 cm^{-1} . Também é verificada uma banda de maior intensidade entre $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, associada às vibrações de deformação axial dos átomos de hidrogênio ligados a carbono, sendo característica de ligações C-H em cadeias cíclicas. Por conseguinte, se observa grande similaridade com a sua estrutura, visto que a maior parte é composta por cadeias cíclicas. Duas bandas intensas em 1450 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} referem-se às vibrações de dobramento das ligações C-H dos grupos metileno e metila, respectivamente (Figura 15).

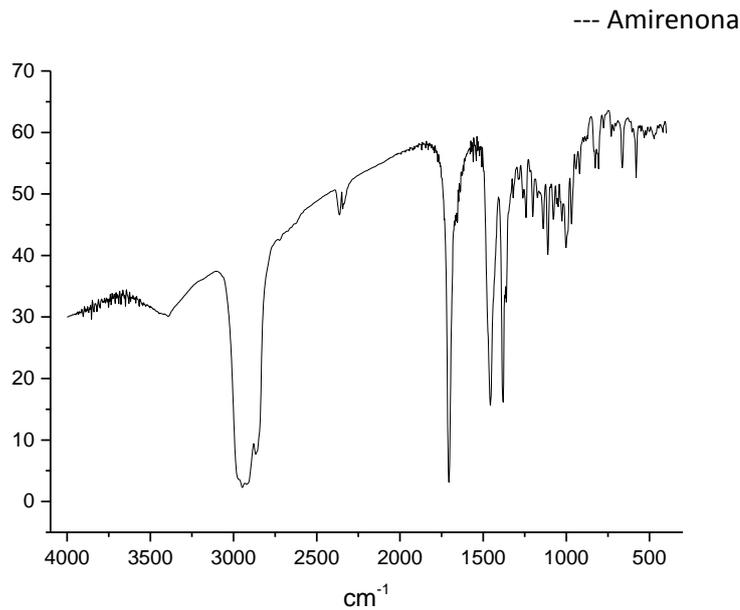


Figura 15 – Infravermelho por transformada Fourier da α , β amirenona

5.4.4 CLAE, RMN e MS-MS de α e β -amirina

As placas cromatográficas indicaram a presença de apenas uma mancha característica, demonstrando que havia total ou quase ausência de contaminantes na amostra. Em seguida, as amostras foram submetidas à espectrometria de massa, na qual se pôde observar o pico característico da amirina, com m/z de 426 $[M]^+$ e fragmentação de 218.

Na cromatografia líquida de alta eficiência observou-se o pico de padrão da amirina, com tempo de retenção de 9,660 e 11,141 min, respectivamente para alfa e beta. Tais resultados aproximam-se dos valores encontrados em análises cromatográficas separadas, como descritos no trabalho de Dias, Hamerski e Pinto (2011), com a separação desses dois constituintes por CLAE (Figuras 16 e 17). Esses padrões serviram para posterior comparação com a mistura de α , β amirina isolada.

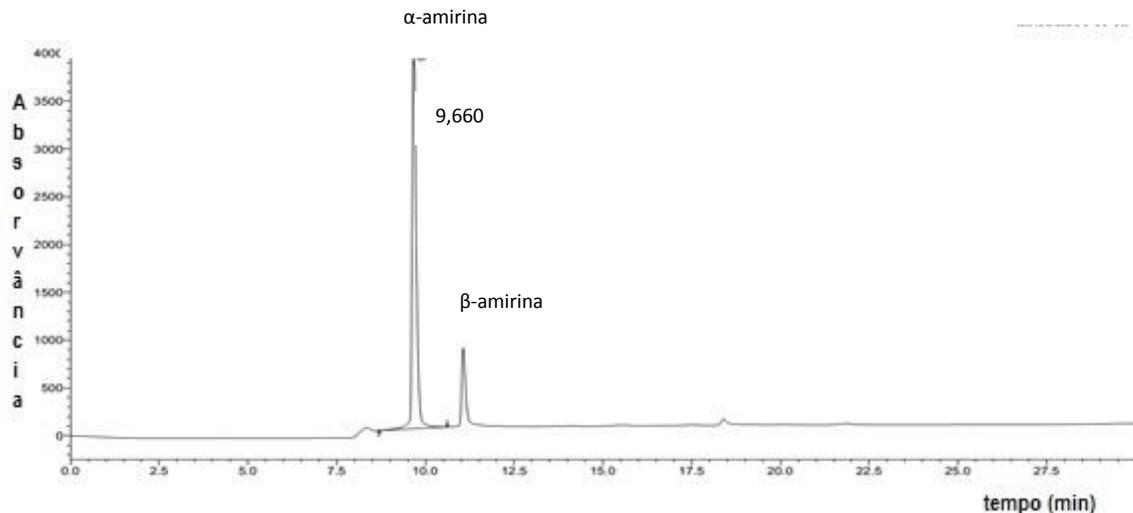


Figura 16 – CLAE de padrão α -amirina.

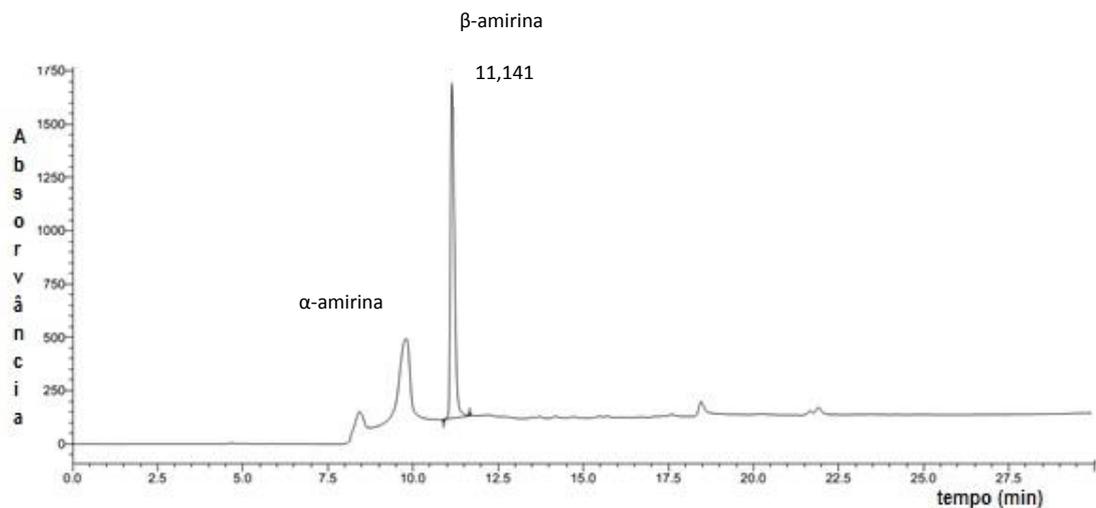


Figura 17 – CLAE de padrão de β -amirina

Posteriormente, a estrutura foi confirmada por meio de ressonância magnética nuclear (RMN). Essa é uma técnica instrumental muito utilizada para determinar a estrutura de substâncias, auxiliando na identificação do esqueleto carbono-hidrogênio. Ela não só torna possível identificar a funcionalidade de um carbono específico, mas também permite determinar com o que os carbonos vizinhos se parecem e, em muitos casos, pode ser utilizada para determinar a estrutura inteira da molécula.

A caracterização estrutural de um produto obtido por meio de reações simples e bem conhecidas, em que o substrato pode ser transformado apenas em poucas posições da molécula, torna-se mais simples do que a caracterização de um produto natural isolado diretamente da fonte vegetal.

A identificação do triterpeno amirina é largamente descrita na literatura devido às sínteses para obtenção de seus derivados. Assim, por meio da análise de deslocamentos

químicos dos sinais presentes na região de carbonos olefínicos e de hidrogênios característicos, torna-se possível a confirmação da estrutura. Analisada concomitantemente com os dados de espectrometria de massa e cromatografia utilizando amostra padrão, ela resulta praticamente inequívoca com a elucidação da substância isolada e o produto da síntese obtida.

A análise nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C apresentou sinais característicos de triterpenos do esqueleto oleano. Nos espectros expandidos de RMN de ^1H (Figura 18) podem ser observados os deslocamentos de amirina. Verificou-se em δ 3,23 dupletos correspondentes aos carbonos carbinólicos característicos de triterpenoides do tipo 3 β -OH, e dois tripletos em δ 5,14 e 5,18, correspondentes à ligação CH de olefinas.

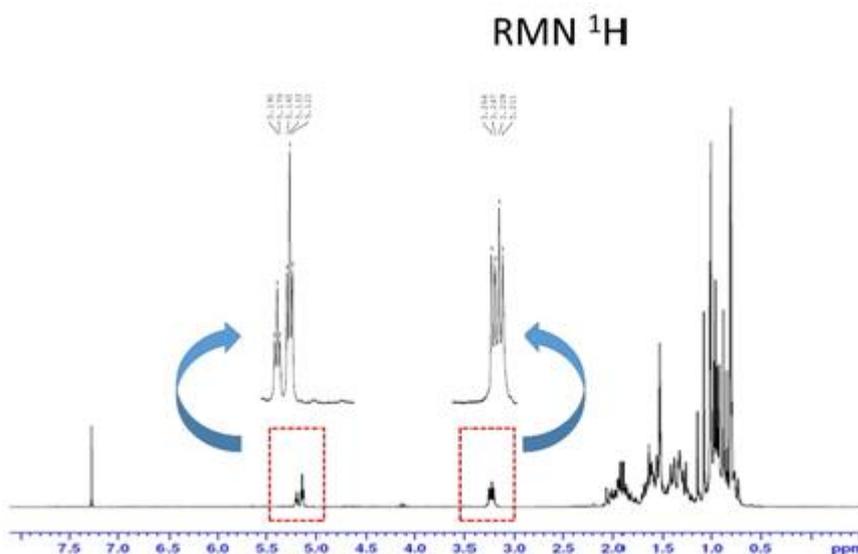


Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H de amirina.

A análise seguiu-se com a obtenção de espectros de RMN ^{13}C . Foram encontrados 30 sinais característicos: sinais do carbono sp^2 não hidrogenado (C-13) em δ 145,2 e do carbono C-12 em δ 121,7 ppm, o que correspondia à ligação dupla entre os carbonos da beta-amirina, além dos deslocamentos em 124,40 e 139,50, referentes à ligação dupla dos carbonos C-12 e C-13 da alfa-amirina, característicos da mistura triterpênica de alfa e beta amirina (Figura 19).

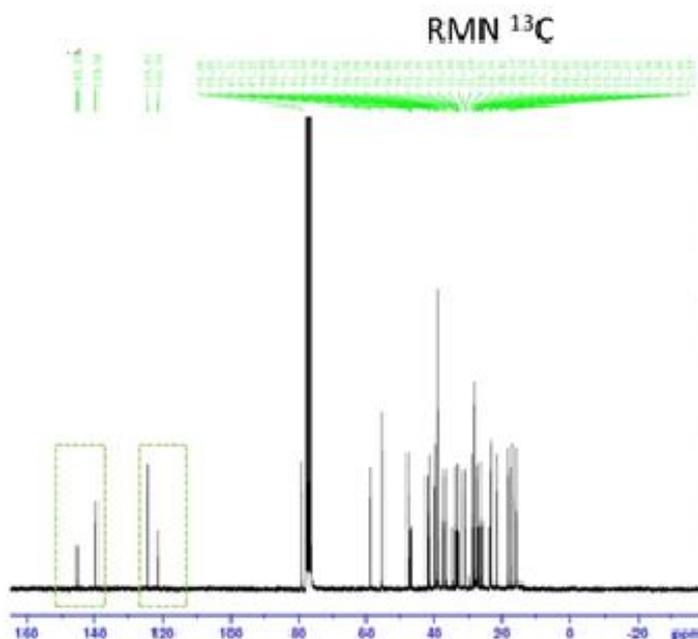


Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C de amirina.

Os deslocamentos obtidos em comparação com os relatados na literatura permitiram a confirmação da mistura triterpênica de alfa e beta amirina, de acordo com diversos trabalhos (MAHATO; KUNDU, 1994; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011). Os deslocamentos de RMN ^1H e RMN ^{13}C (ppm) podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10: Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de amirina

(continua)

Carbono	δ (ppm) RMN ^1H	Literatura	δ (ppm) RMN ^{13}C	Literatura
1		1,59	38,7	38,7
2		1,98	27,2	27,3
3	3,23 (dd)	3,15 (dd)	79,0	79,0
4	0,71		38,6	38,8
5	1,55	0,68 (d)	55,1	55,3
6			18,36	18,5
7			32,6	32,8
8			39,6	38,8

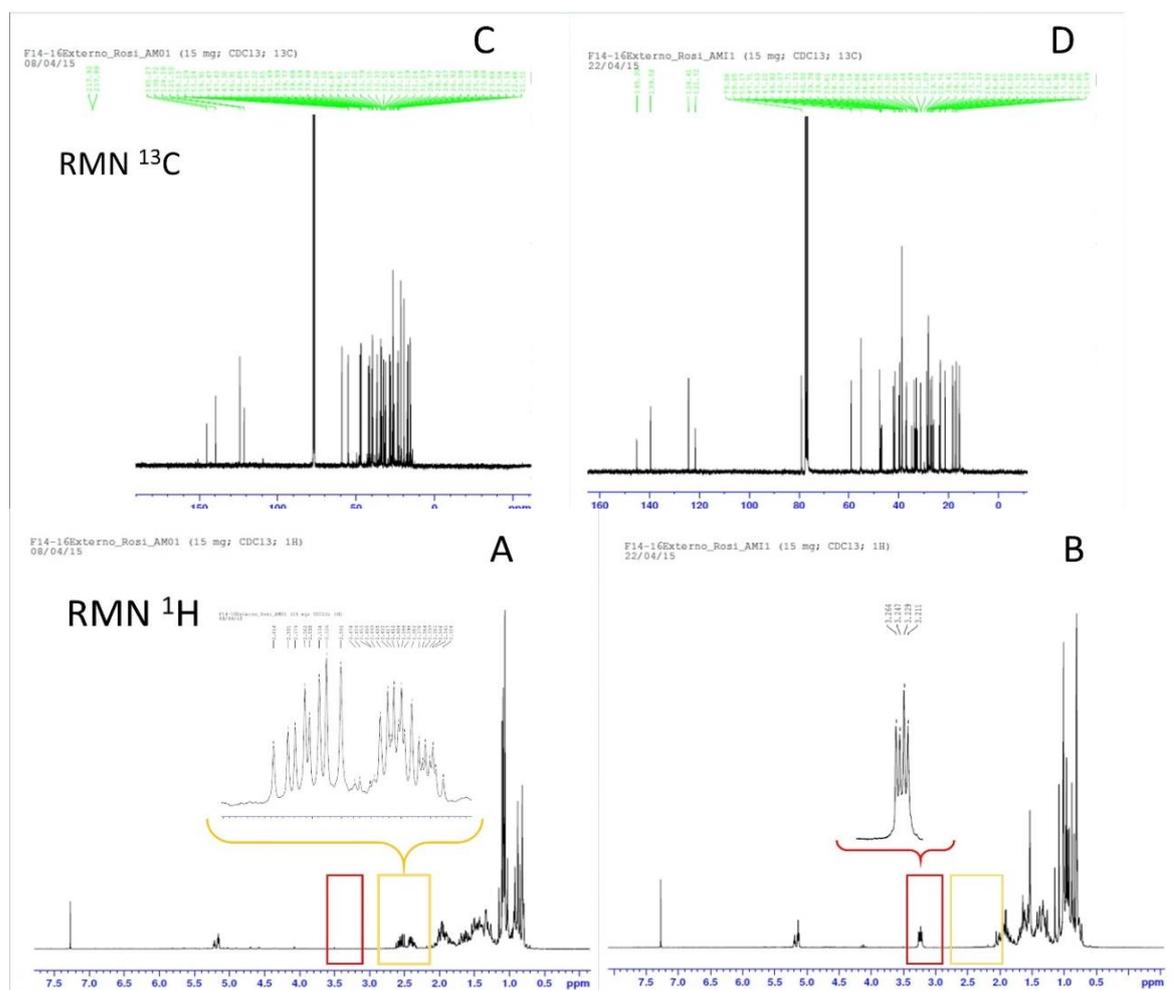
9			47,6	47,7
10			38,7	37,6
11		23,5	23,6	23,6
12	5,14 (t)	5,12 (t)	121,7	121,8
13			145,2	145,1
14			41,7	41,8
15	1,90	1,89(td)	26,1	26,2
16	1,69	1,70 (td)	27,2	27,0
17		32,5	32,5	32,5
18		1,98	47,2	47,4
19	1,91	1,93 (m)	46,8	46,9
20			31,1	31,1
21		1,19	34,7	34,8
22	1,84	1,85 (m)	37,1	37,2
23	0,78	0,77 (s)	28,1	28,2
24	0,91	0,90 (s)	15,5	15,5
25	0,73	0,73 (s)	15,6	15,6
26	0,96	0,93 (s)	16,8	16,9
27	1,14	1,19 (s)	26,1	26,0
28	1,07	1,07 (s)	28,4	28,4
29	0,88	0,87 (s)	33,3	33,3
30	0,84	0,80 (s)	23,7	23,7

Fonte: Mahato e Kundu, 1994; Dias, Hamerski e Pinto, 2011.

5.4.5 α e β -amirenona

Após a síntese, em que a mistura α , β -amirina foi submetida a modificações estruturais sobre o grupo OH em C3 e oxidação do carbono 11, foram observados os sinais

característicos da oxidação, tanto na análise de deslocamento de ^1H pela ausência dos carbonos carbonílicos em δ 3,23 e pela detecção de deslocamentos em δ 2,25, (Figuras 20 e 21), quanto pelo similar perfil de deslocamento de RMN ^{13}C , comprovando a eficiência da metodologia de síntese.



Figuras 20 e 21: Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de amirenona (A e C) e amirina (B e D).

5.4.6 Espectrometria de Massas (EM)

A mistura de α , β -amirenona, analisada por massa de ionização por electropulverização, mostrou que o pico do ião molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 465 é consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}$ de acordo com o espectro de massa (Figura 22).

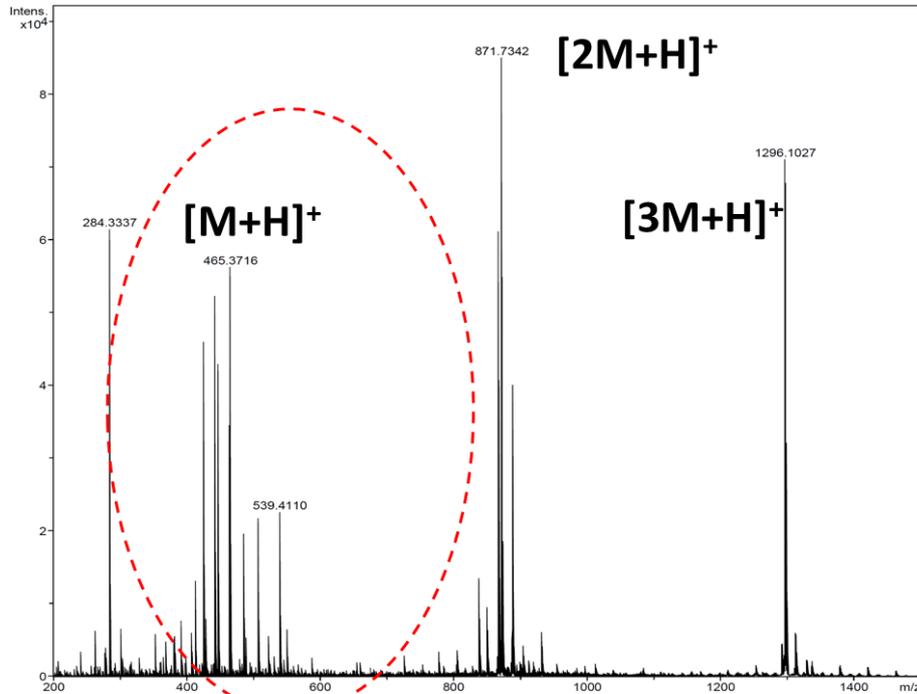


Figura 22 – Espectrometria de Massas (EM)

5.5 TESTES ENZIMÁTICOS *IN VITRO*

Os ensaios biológicos possibilitaram a determinação da atividade inibitória das substâncias referentes a três enzimas importantes em processos metabólicos e patológicos. Foram determinados os ensaios inibitórios da lipase, α -amilase e α -glucosidase *in vitro* para a mistura binária α , β -amirenona.

5.5.1 Efeito de α , β -amirenona sobre as enzimas α -glucosidase, lipase, α -amilase e xantino-oxidase (XO)

Os resultados referentes ao cálculo de inibição para as enzimas α -glucosidase em comparação com o padrão arcabose mostram que, numa concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$, a amostra em estudo inibiu $96,5\% \pm 0,5$, enquanto que o padrão inibiu 51,5% numa concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando uma maior atividade de α , β -amirenona (Figura 23). Na análise estatística utilizou-se o *two-way* ANOVA, $p < 0,0001$, o que indica a significância do teste. Para os testes realizados com enzima de extrato cetônico de intestino de mamífero, o índice de inibição foi de $35,6\% \pm 0,46$ na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Como o índice de inibição foi menor que 50%, a curva para esse teste não foi realizada. Os dados analisados em teste *t* demonstraram valor de 0,0002.

Verificou-se que a mistura de α e β -amirenona obteve um percentual significativo de inibição (%) para lipase, por apresentar capacidade inibitória significativa, ou seja, maior que 80%. Determinou-se a concentração de inibição de 50% de atividade da enzima (CI_{50}), calculada por meio do programa Origin®, a partir de uma análise de progressão não-linear. Por conta desta análise, a competitividade inibitória da lipase resultou em um valor de CI_{50} (mg/mL) de $1,193 \pm 0,41$ (Figura 24)

α -glucosidade

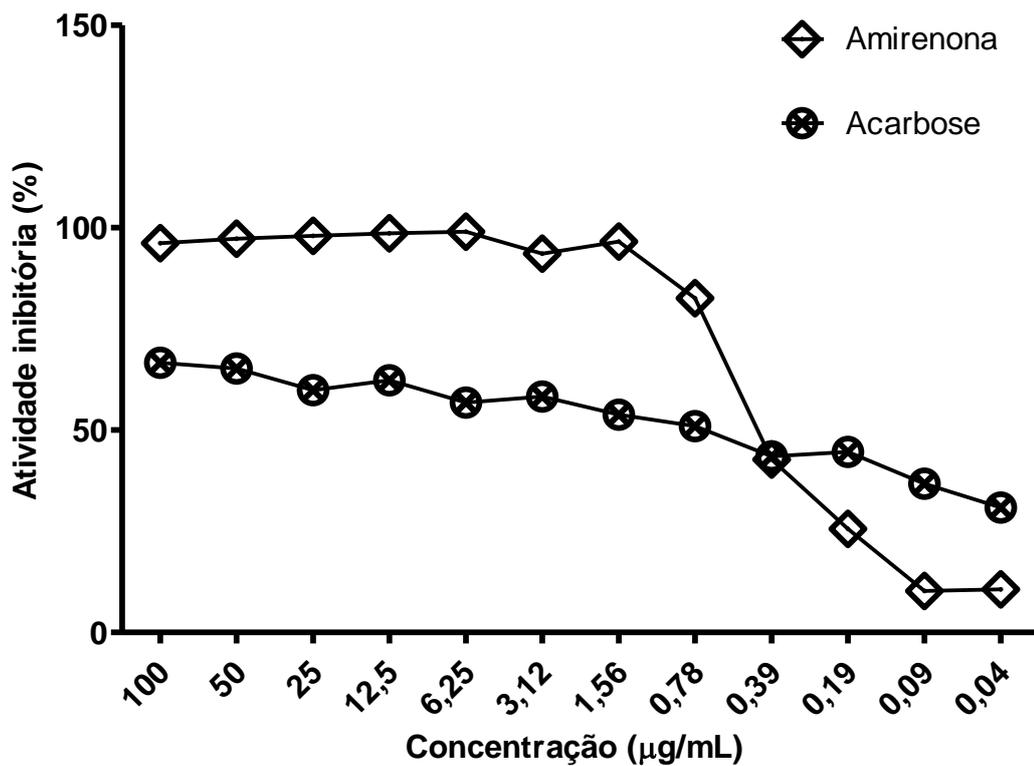


Figura 23: Atividade inibitória (%) dos isômeros α , β - amirenona sobre a enzima α -glucosidase. Os dados analisados no teste t demonstraram valor de 0,0002.

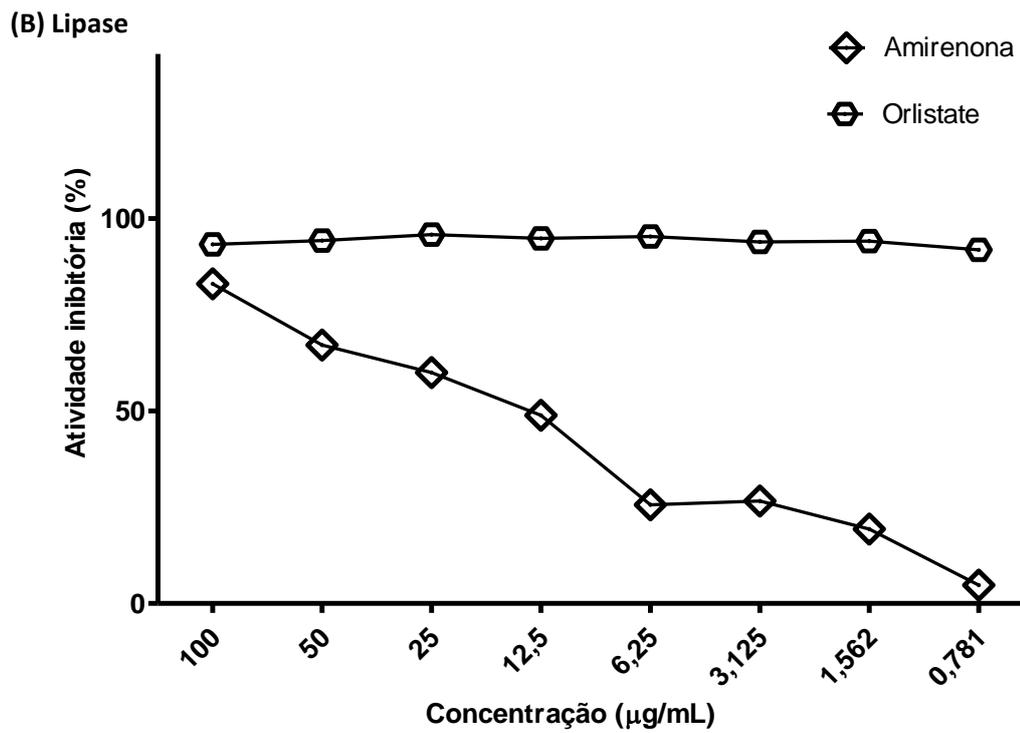


Figura 24 – Efeito inibitório (%) dos isômeros α , β amirenona sobre a enzima lipase.

Na Figura 25 observa-se a atividade inibitória de α -amilase, em que o índice obtido para esta enzima foi de $25,01\% \pm 1,53$, valor abaixo de 50% de inibição para uma concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, não sendo realizada a curva para CI_{50} .

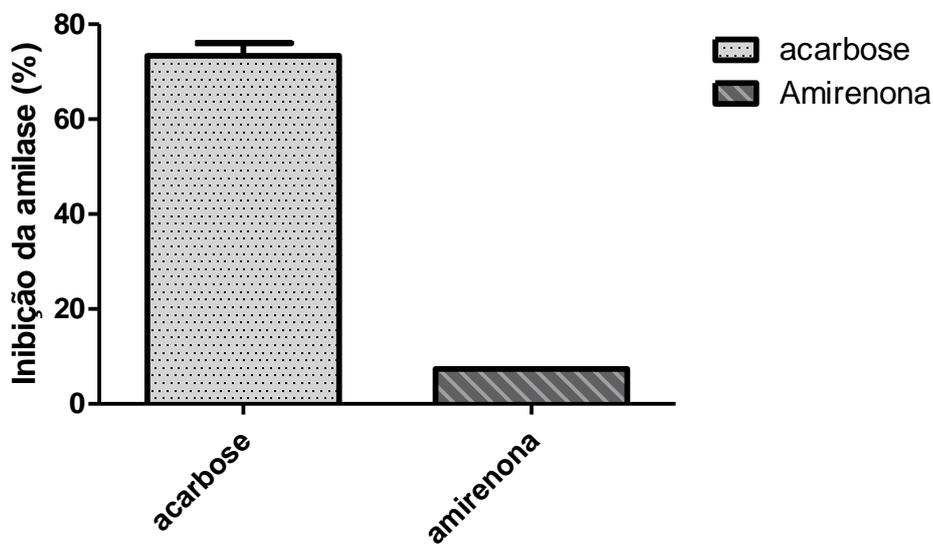


Figura 25 – Atividade inibitória (%) dos isômeros α , β -amirenona sobre a enzima α -amilase.

Nos testes para XO, não foi verificado índice de atividade maior que 50%. O valor de inibição foi de $38,57\% \pm 1,8$ em relação ao padrão alopurinol, sendo verificado um índice de inibição de $77,47\% \pm 0,7$; $CI_{50} 2,4\mu\text{g/mL} \pm 0,026$.

5.6 TESTES *IN VIVO*

5.6.1 Efeitos de α e β -amirenona no teste oral de tolerância aos carboidratos (TOTC) maltose, sacarose e amido

A α e β -amirenona foi capaz de reduzir a glicemia em animais normais após sobrecarga de carboidratos. Os resultados do TOTC (maltose, sacarose e amido) estão relacionados com as figuras 26, 27 e 28 (respectivamente maltose, sacarose e amido).

Observou-se que antes da administração do carboidrato, no tempo 0 min, não houve diferença nos níveis de glicose entre os grupos. Porém, ao se administrar carboidrato (maltose), esse elevou a glicemia dos animais nos tempos de 30 min ($164,83 \pm 13,79\text{mg/dL}$); 60 min ($128,00 \pm 14,32\text{mg/dL}$) p e 90min ($124,1 \pm 15,21\text{mg/dL}$).

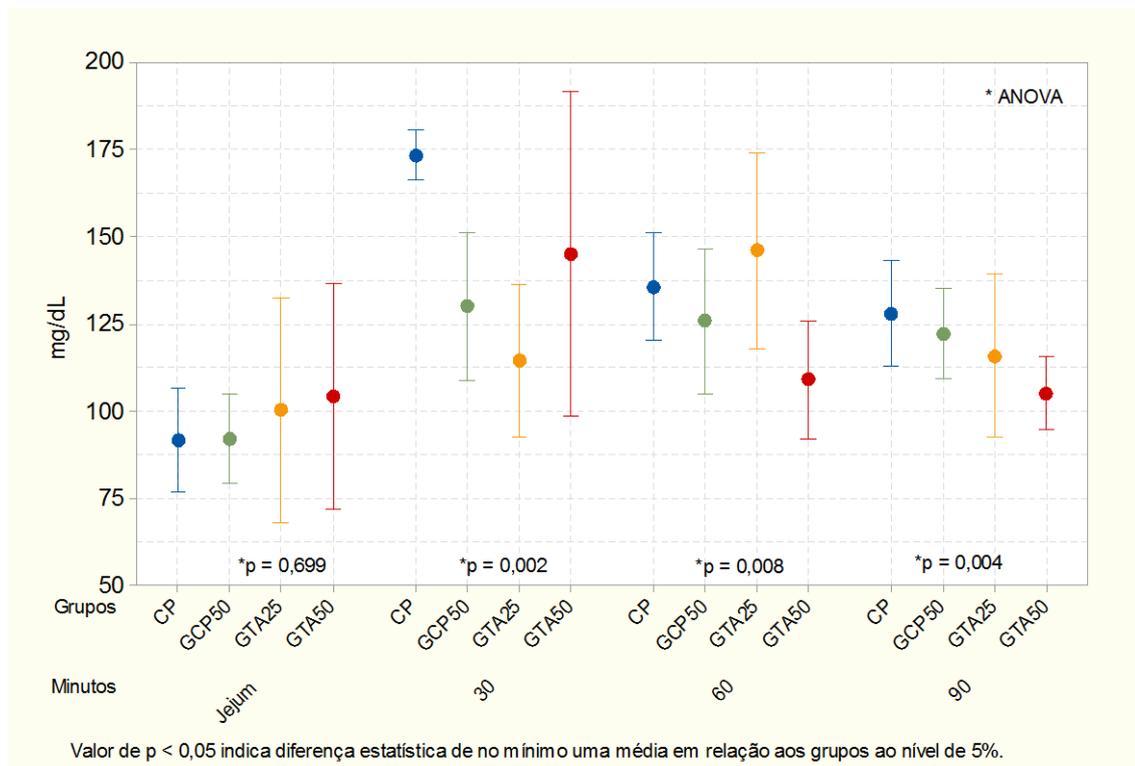


Figura 26: Efeito da mistura α , β -amirenona nos níveis de glicemia após administração oral de maltose em camundongos Balb C. CP (grupo controle positivo/veículo); GCP50mg/kg (acarbose 50mg/kg); GTA50mg/kg de alfa e beta-amirenona;

Considerando os níveis glicêmicos dos animais nos diferentes grupos, verificou-se que no tempo de 30 min a dose de 25mg/kg da mistura de α , β -amirenona foi capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue ($114 \pm 17,50$ mg/dL), quando comparada aos valores obtidos com α , β -amirenona 50mg/kg ($145 \pm 33,64$ mg/dL), o padrão acarbose 50mg/kg ($130 \pm 17,01$ mg/dL) (Glucobay 50mg ® BAYER) e o controle positivo ($173,40 \pm 5,78$ mg/dL). Mas após 60 min da administração da maltose, as doses de α , β -amirenona 50mg/Kg e padrão acarbose 50mg/Kg ficaram equivalentes e reduziram a glicemia dos animais testados ($109 \pm 12,22$ mg/dL e $121,08 \pm 15,60$ mg/dL, respectivamente). Na concentração de 25mg/kg, em 60 min percebeu-se um aumento nos níveis de glicose ($146 \pm 22,58$ mg/dL) comparando-se ao padrão e teste na concentração de 50mg/kg, mostrando um $p < 0,05$ verso grupo controle positivo (CP). Nos demais tempos, 60 e 90 minutos, a α , β -amirenona (25 e 50mg/kg) não demonstrou redução nos níveis de glicose em relação ao grupo controle positivo, tratado apenas com o veículo (kolliphor3% em soro fisiológico), nem em relação ao grupo padrão (acarbose 50mg/kg).

Na figura 31, observando o tempo de 30 min após a ingestão da solução de sacarose, podemos perceber que as doses administradas da mistura α , β -amirenona (50mg/kg) e acarbose (50mg/Kg) foram capazes de reduzir os níveis de glicose para $126,8 \pm 13,58$ mg/dL e $116,6 \pm 19,76$ mg/dL, respectivamente, quando comparados ao controle positivo ($165,3 \pm 33,02$ mg/dL) $p < 0,05$.

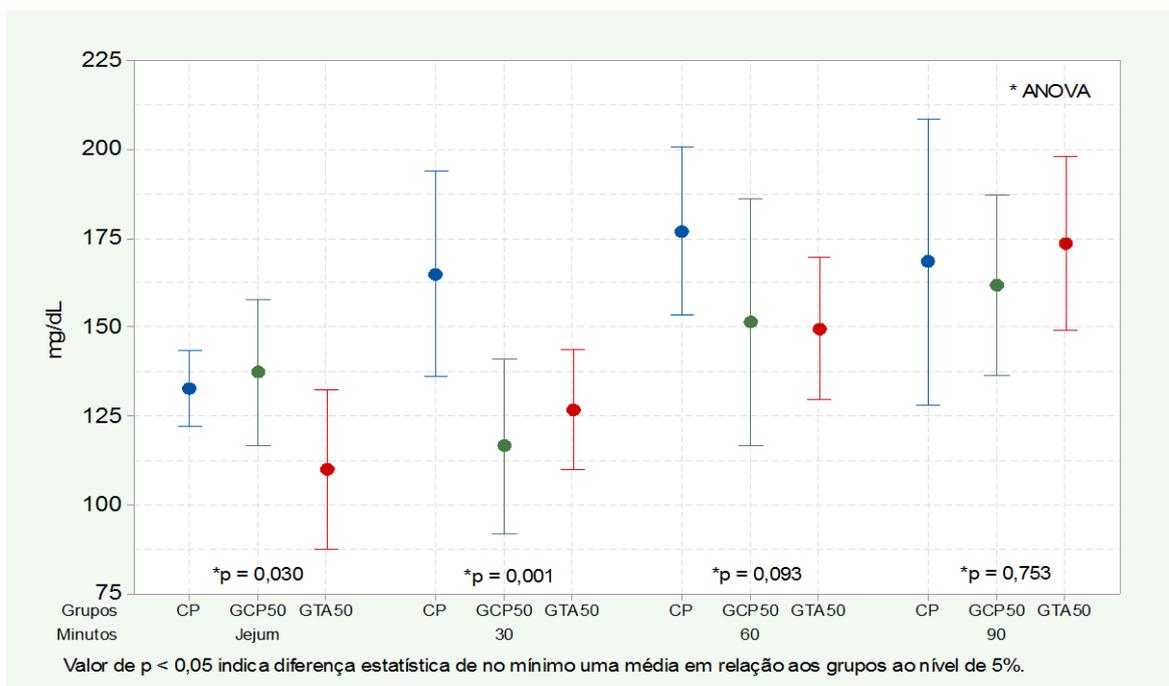


Figura 27 – Efeito da mistura α , β -amirenona nos níveis de glicemia após administração oral de sacarose em camundongos Balb C. CP (grupo controle positivo/veículo); GCP50mg/kg (acarbose 50mg/kg); GTA50mg/kg de alfa e beta-amirenona;

Observando todos os tempos após a administração do amido, verifica-se que nenhuma dose, seja da mistura α , β -amirenona (50mg/kg), seja da acarbose (50mg/kg), foi capaz de reduzir os níveis de glicose desses animais, considerando os valores do controle positivo (30 min, 132,33 \pm 33,02; 60min, 174,00 \pm 25,12; 90min, 163,67 \pm 43,02mg/dL), em que o $p > 0,5$.

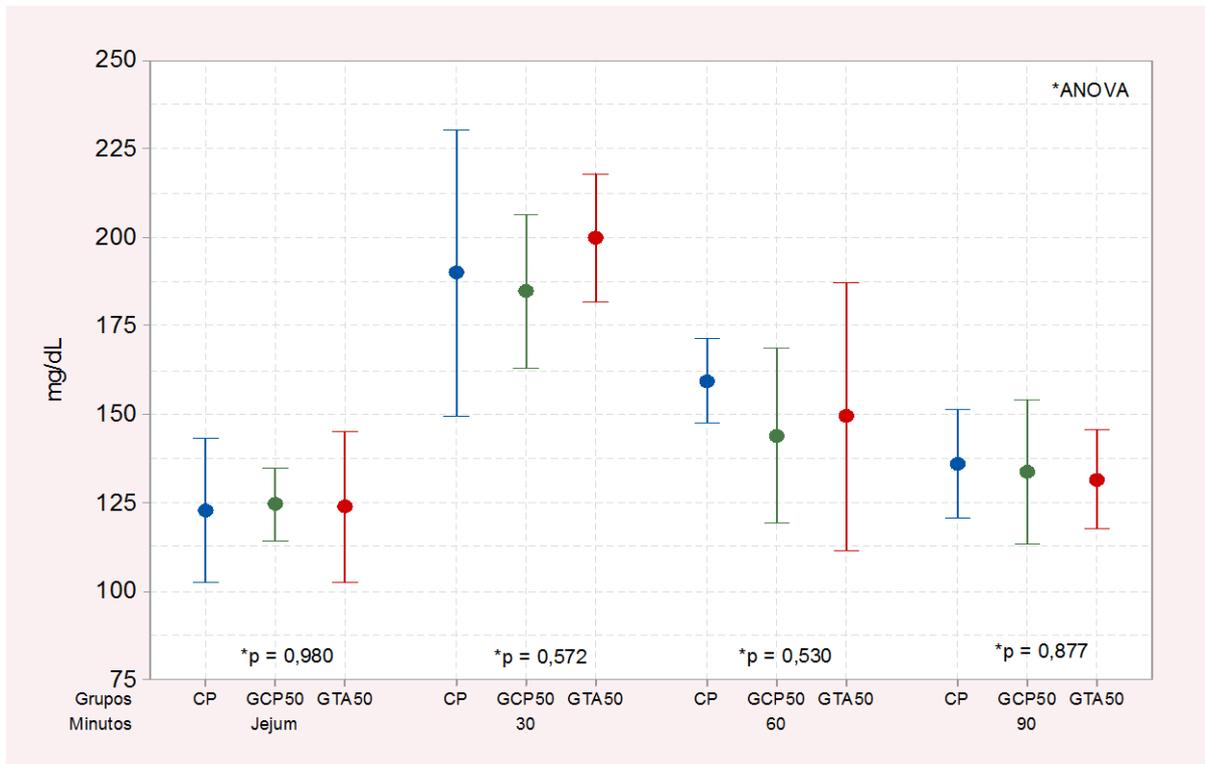


Figura 28 – Efeito da mistura α , β -amirenona nos níveis de glicemia após administração oral de amido em camundongos Balb C. CP (grupo controle positivo/veículo); GCP50mg/kg (acarbose 50mg/kg); GTA50mg/kg de alfa e beta-amirenona;

5.6.2 Efeito da mistura de α e β - amirenona sobre a trigliceridemia após teste de tolerância oral

Os resultados do tratamento da mistura de α e β - amirenona sobre triglicerídeos em camundongos Balb C submetidos aos modelos de indução aguda por emulsão hiperlipídica estão descritos na Figura 29. A administração da emulsão comercial hiperlipídica induziu um aumento significativo dos triglicerídeos no tempo de 30min em comparação com a média do tempo 0 dos diferentes grupos (120,7 \pm 9,06mg/dL). O grupo tratado com veículo, controle positivo (CP), alcançou um índice nos níveis séricos de triglicerídeos de 252,2 \pm 2,77mg/dL; a mistura α e β -amirenona 25mg/kg, de 241,7 \pm 4,4mg/dL;

a amirenona 50mg/kg, de $191,9 \pm 3,1$ mg/dL e 100mg/kg 181 mg/dL $\pm 22,9$ mg/dL. Observa-se que a dose de 50mg/kg da mistura de α , β -amirenona foi capaz de reduzir os níveis os triglicerídeos nos tempos: 30 min, para $191,9 \pm 3,1$ mg/dL; 60 min, para $187,9 \pm 4,2$ mg/dL; 120min, para $176,1 \pm 1,3$ mg/dL e 180 min, para $121,85 \pm 2,4$ mg/dL; praticamente voltando para o valor normal do tempo 0, também quando comparado ao veículo, com $p < 0,05$.

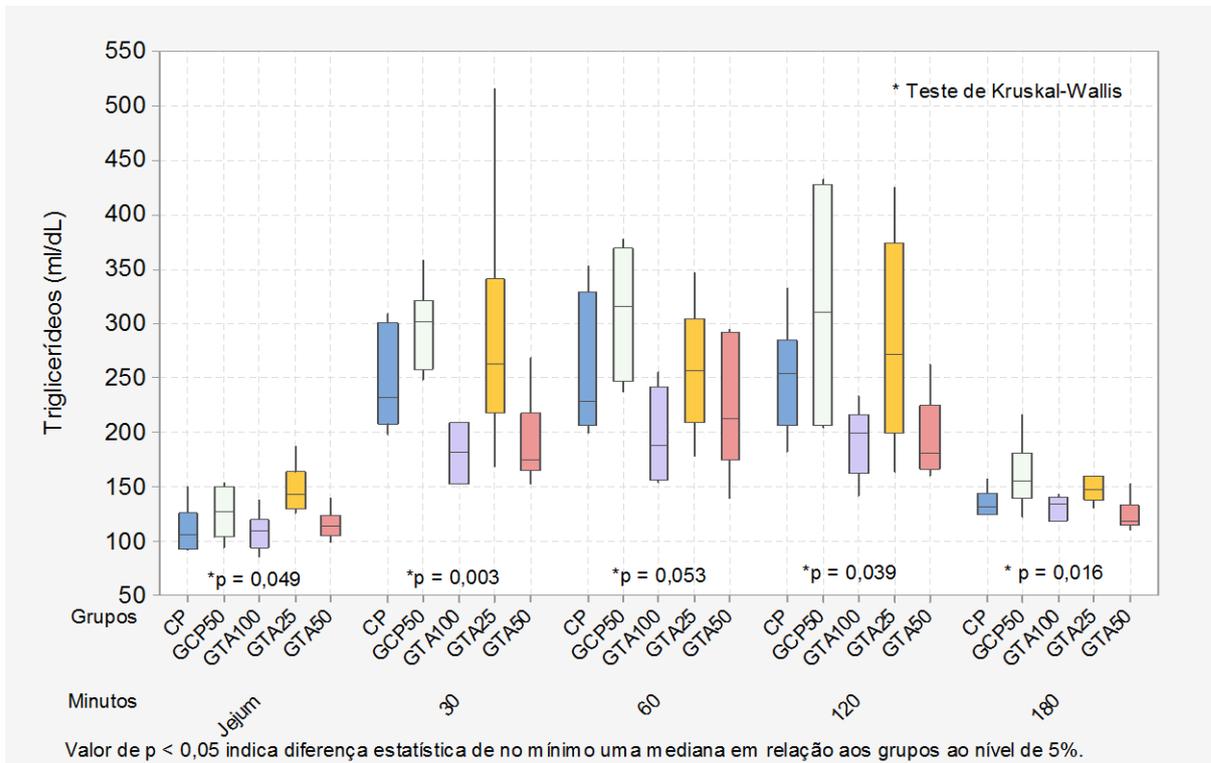


Figura 29 – Efeito da mistura α , β -amirenona após indução com emulsão de Scot®. Comparação das medianas do teste de tolerância oral a triglicerídeos em relação aos diferentes grupos durante 180 minutos. CP (grupo controle positivo/veículo); GCP50mg/kg (orlistat); CTA25mg/kg ; CTA50mg/kg e CTA100de alfa e beta-amirenona;

5.6.3 Efeito da mistura de α, β - amirenona sobre glicemia *in vivo*

Os animais diabéticos, os quais foram tratados com α , β -amirenona durante nove dias após a indução com estreptozotocida e nicotinamia, reduziram os níveis plasmáticos de glicose quando comparados aos animais de controle positivo (CP) que receberam somente o veículo.

Após 72h da indução, todos os animais diabéticos tratados apresentaram um aumento de glicemia ($p < 0,05$). Os valores evoluíram da seguinte forma pelos grupos: veículo, de $421,5 \pm 29,5$ mg/dL para $505 \pm 57,1$ mg/dL; α e β - amirenona, de 25mg/kg $416 \pm 17,7$ mg/dL para $458 \pm 58,0$ mg/dL; α e β - amirenona 50mg/kg, de $406,7 \pm 17,5$ mg/dL para $519,6 \pm 25,7$. Em

comparação, no grupo padrão acarbose, 50mg/kg foi de $449,2 \pm 59,1$ mg/dL para $241,2 \pm 45,9$ mg/dL, e no controle normal, de $149,2 \pm 9,1$ mg/dL para $141,4 \pm 10,6$ mg/dL.

No 6º dia, α e β -amirenona nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg reduziu os valores de $458 \pm 58,0$ mg/dL para $140 \pm 50,6$ mg/dL e de $519,6 \pm 25,7$ mg/dL para $187,7 \pm 42,7$ mg/dL, respectivamente, o que foi significativo comparando com o veículo (de $505 \pm 57,1$ mg/dL para $478,0 \pm 47,6$ mg/dL), assim como com o grupo que recebeu arcabose 50mg/kg (de $241,2 \pm 45,9$ mg/dL), que também sofreu redução para $198,5 \pm 16,5$ mg/dL.

Um resultado semelhante foi observado no 9º dia, quando a mistura de α e β -amirenona nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg mantiveram o resultado significativo de diminuição da glicose do 6º dia (de $140 \pm 50,6$ mg/dL para $140,25$ mg/dL e de $187,7 \pm 42,7$ mg/dL para $187,6 \pm 44,2$ mg/dL, respectivamente), quando comparados com o veículo (de $478,0 \pm 36,3$ para $434,3 \pm 36,3$ mg/dL) e arcabose 50mg/kg, que apresentou um aumento da glicose sanguínea de $198,5 \pm 16,5$ mg/dL para $257,6 \pm 88,6$ mg/dL. Esses resultados podem ser observados na Figura 30.

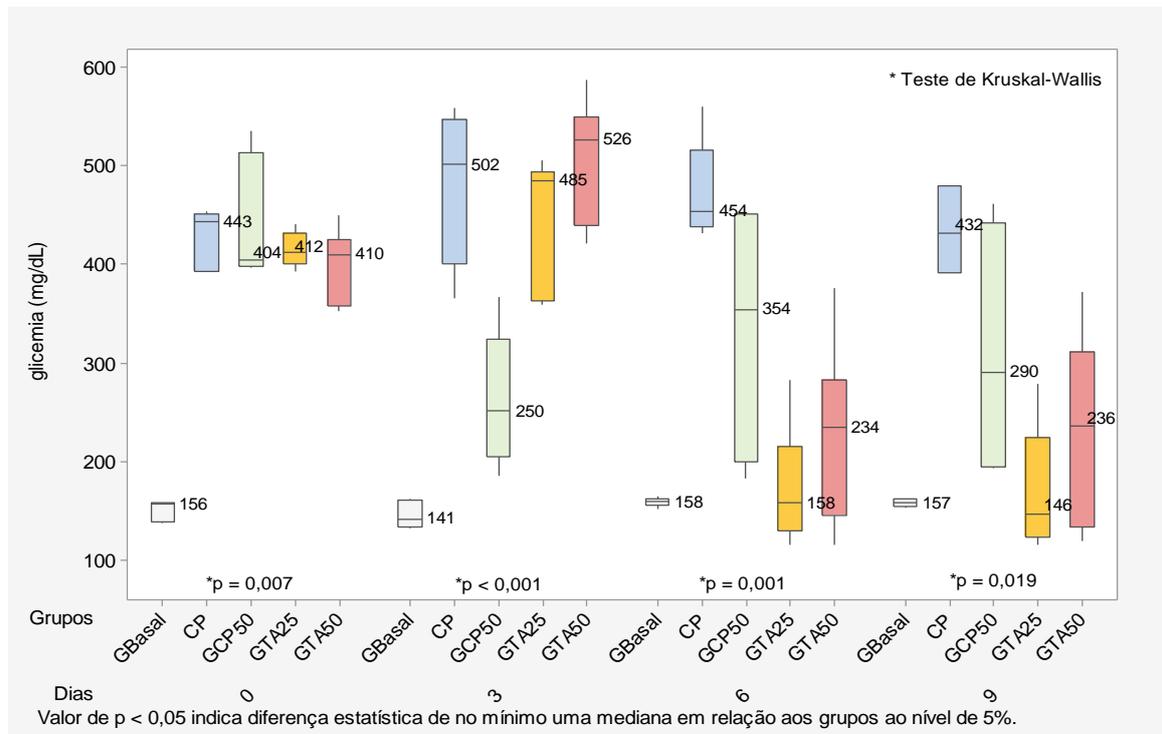


Figura 30 – Efeito da administração de α , β -amirenona na glicemia de camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina + nicotinamida. Após 72h da administração (180mg/kg;210mg/kg, i.p.), camundongos com glicemia superior a 300mg/dL foram separados e separados em grupos (n=8). Os camundongos não diabéticos receberam, por via oral, 200 μ L de veículo (Soro fisiológico + Kolliphor 3%).

5.6.4 Efeitos da mistura α - β -amirenona no peso corporal, consumo de ração e água em modelos induzidos de hiperlipidemia e obesidade

Os animais C57BL/6 foram alimentados durante 18 semanas com ração hiperlipídica e hipercalórica e tratados com α - β -amirenona (25 e 50mg/kg) e orlistate (25mg/kg) e com ração padrão grupo basal. Nesse período, o consumo total de água e ração dos diferentes grupos foi medido (Tabela 11). Observou-se aumento do consumo de água no grupo GTA50mg/kg em relação à média de consumo total de água dos demais grupos. Quanto ao consumo de ração, não se verificou diferenças significativas quando avaliado o consumo total.

Tabela 11: Comparação das médias do consumo de água e ração em relação nos diferentes grupos (18 semanas)

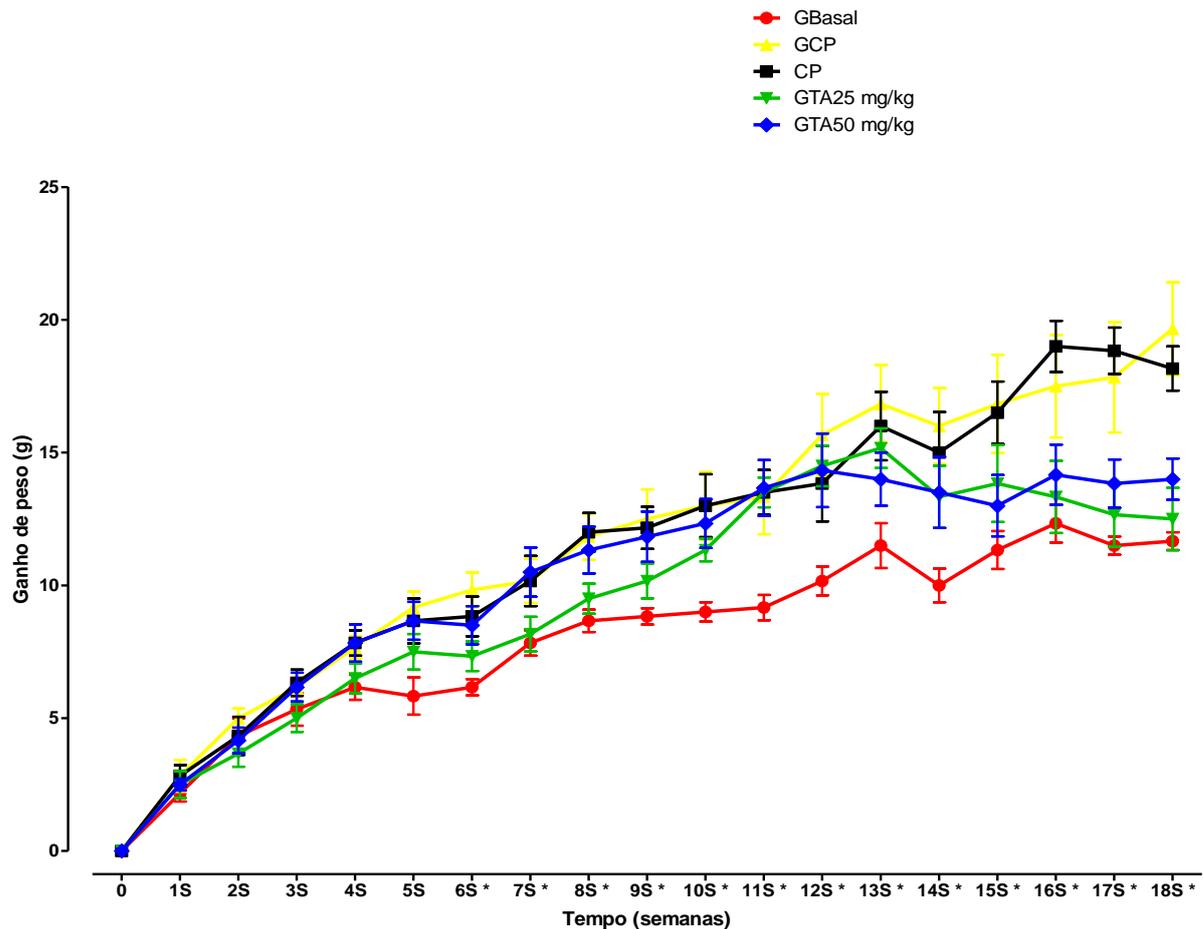
Sem	Grupo Basal		CP		CGP		GTA 25mg/kg		GTA50mg/kg	
	Ág(mL)	Raç(g)	Ág(mL)	Raç(g)	Ág(mL)	Raç(g)	Ág(mL)	Raç(g)	Ág(mL)	Raç(g)
Me	128,9	96,4	146,6	89,9	130,7	91,3	129,9	88,9	164,7	87,2
Dp	±66,6	±37,6	±75,2	±36,7	±67,8	±37,6	±71,5	±35,8	±80,0	±34,5

Média do consumo total de ração e água nos diferentes grupos: grupo basal-GB; ração modificada- (dieta hipercalórica/grupos: GCP(veículo), CP(olistate 25mg/kg), CTA25mg e CTA50mg (α , β -amirenona 25 e 50mg/kg, respectivamente).

Fonte: Elaborada pela autora.

No que se refere ao peso dos animais no início do experimento, não foram encontradas diferenças significativas entre os animais de todos os grupos. Na 14ª semana, com o peso corporal aumentado significativamente entre os grupos alimentados com a ração modificada em relação ao grupo alimentado com ração padrão (35,7±2,1g; 27,0±0,9g respectivamente), foi iniciado o tratamento dos diferentes grupos induzidos com orlistate 25mg/kg; amirenona 25mg e 50mg/kg; controle positivo e basal (soro fisiológico e Kolliphor 3%).

Ao final da 18ª semana, após quatro semanas de tratamento, verificou-se que houve uma diminuição no ganho de peso dos animais reduzindo significativamente o peso corporal do grupo tratado com α e β -amirenona 25mg/kg (35,5g±2,1g para 32, 8±2,8 ou 7,6% de perda de peso) quando comparado com o grupo GCP (33,2±2,79g para 36,8±3,5g ou 9,7% de ganho de peso) e com o grupo CP (33,5±3,7g para 36,7±2,3 ou 8,7% de ganho de peso), bem como com o grupo α e β -amirenona 50mg/kg (31,8±3,8g para 32,3±2,7g ou 1,2% de ganho) (Figura 31).



* Indica diferença estatística de no mínimo uma mediana em relação ao nível de 5% (Teste de Kruskal-Wallis)
 Figura 31 – Efeitos dos tratamentos com α , β -amirrenona nos grupos teste com dose 25mg/kg e 50mg/kg (GT); Grupo padrão Orlistat 25mg (GCP); grupo controle positivo (CP); grupo ração normal (GB) sobre o ganho de peso em camundongos alimentados com dietas experimentais durante 18 semanas. (GB= grupo basal): dieta normal; dieta rica em gordura GT, GP.

5.6.5 Dosagens bioquímicas

Ao final do tratamento foi coletado sangue dos animais para as dosagens bioquímicas. Observou-se que a indução da obesidade por dieta hipercalórica e hiperlipídica foi capaz de promover aumento nos níveis plasmáticos dos parâmetros de glicose, colesterol e triglicerídeos nos diferentes grupos submetidos à dieta hiperlipídica e hipercalórica. Um aumento foi percebido nos níveis de glicemia do grupo CP ($128,7 \pm 4,8$ mg/dL), colesterol total ($115,3 \pm 13,7$) e triglicerídeos quando comparado aos demais grupos, bem como no teste de AST, mostrado na tabela 12.

Tabela 12: Efeito da α , β -amirenona: comparação das médias dos testes bioquímicos em relação aos diferentes grupos.

Variáveis	Grupos										
	CP		GBasal		GCP25		GTA25		GTA50		p
	Me	Dp	Me	Dp	Me	Dp	Me	Dp	Me	Dp	
Glicose (mg/dL)	128,7 ^a	4,8	96,8 ^b	9,3	95,7 ^b	12,3	106,2 ^b	16,1	106,0 ^b	7,8	
Colesterol (mg/dL)	115,3 ^a	13,8	83,2 ^b	4,1	126,5 ^a	13,5	106,7 ^a	14,9	118,1 ^a	13,4	<0,001*
Triglicerídeos (mg/dL)	87,3 ^a	23,9	43,3 ^b	7,8	61,3 ^b	8,9	40,3 ^b	3,8	41,5 ^b	7,2	<0,001*
Ureia (mg/dL)	55,2 ^{ab}	4,3	34,7 ^b	12,2	49,3 ^{ab}	10,9	54,5 ^{ab}	6,8	63,3 ^a	22,4	0,011*
Creatinina (mg/dL)	0,55	0,3	0,50	0,3	0,73	0,3	0,58	0,2	0,85	0,3	0,421*
ALT (U/L)											
Q ₁ - Med - Q ₃	23 - 25 ^{ab} - 33	36 - 57 ^a - 65		27 - 30 ^{ab} - 54		26 - 33 ^{ab} - 38		17 - 19 ^b - 28		0,014**	
AST (U/L)											
Q ₁ - Med - Q ₃	117-230-317	67-90-124		69-134-156		67-93-102		62-87-103		0,063**	

Me = Média; Dp = Desvio-padrão; Med = Mediana; Q_i = Quartis; *ANOVA; ** *Kruskal-Wallis*.

Letras distintas indicam diferença estatística das médias em relação aos diferentes grupos ao nível de 5% de significância. Os camundongos foram separados em grupos (n=6), sendo GB= grupo Basal; CP= grupo controle positivo (veículo); GTA50= grupo α , β -amirenona dose 50mg/kg; GTA25 grupo α , β -amirenona dose 25mg/kg; GCP = grupo padrão (orlistate 25mg/kg). Na 18ª semana, após jejum de 8h, com animais anestesiados, foi coletado sangue por punção cardíaca para análise de glicemia colesterol total, Triglicerídeo, AST, ALT, ureia, creatinina.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.6 Análise da Toxicidade

Para o teste de toxicidade, considerou-se o experimento sugerido pela OECD 423 (2001), o método de classes. A concentração inicial da dose foi de 300 mg/kg. Como nesta dose um dos 12 (doze) camundongos tratados durante o estudo foi a óbito, não foi realizado o experimento com a dose de 2000mg/kg. Apesar do óbito, não foram observados sinais de perda da massa corporal, inibição do crescimento, alterações comportamentais e clínicas graves.

Durante o experimento, percebeu-se aumento significativo de peso em todos os animais sem acréscimo do consumo de ração. Após os 12 dias de tratamento, verificaram-se

ganho de massa em todos os grupos e não houve diferenças significativas entre as massas médias finais. No 12º dia após o tratamento, observou-se o aumento do tamanho das fezes, mas logo depois voltaram ao normal.

Quanto ao consumo de água e alimentos, nenhuma alteração foi detectada. Foi registrado aumento do consumo de água e ração para animais tratados com α , β -amirenona e controle de maneira semelhante. Segundo relatório, houve alterações da cor nos rins de 5 dos camundongos tratados (coloração mais pálida) e do fígado de 2 dos camundongos tratados. De acordo ainda com o documento, houve toxicidade e por essa razão não foi realizada a administração da dose de 2000mg/kg.

Durante todo o experimento da indução da obesidade, os animais dos diferentes grupos foram observados com relação aos aspectos externos (pelo, olhos, órgão genitais). Antes de iniciar o tratamento na 8ª semana, um dos animais do grupo basal (alimentado com ração padrão) apresentou um nódulo próximo ao testículo que o levou a perda de peso e posterior óbito. Um dos animais do grupo tratado com orlistate 25mg/kg de peso apresentou ferimento no ânus, na 16ª semana, mas que não evoluiu à gravidade até a 18ª. Nenhum dos animais tratados com α e β -amirenona apresentaram alterações em aspectos externos já mencionados.

Também foram realizadas análises histológicas com intuito de verificar possíveis alterações/sinais de toxicidade presentes nos animais dos diferentes grupos induzidos ou não. Ao final do experimento da obesidade, todos os camundongos foram eutanasiados e deles foram retirados os órgãos da cavidade abdominal e colocados em formol a 10% para processamento do fígado e rim (direito) posteriormente.

O fígado mostra estrutura morfológica semelhante à apresentada por outros mamíferos, como observado em lâminas hepáticas de animais do grupo controle normal/basal (GB). Em análise histopatológica, este grupo não apresentou dano. O fígado saudável apresenta hepatócitos poligonais com núcleos centrais muito evidentes. Os hepatócitos são dispostos em cordões espessos de células rodeados por células epiteliais sinusoidais e macrófagos denominados de células de Kupffer (Figura 32A).

O grupo tratado com α , β -amirenona 50mg apresentou degeneração gordurosa, núcleos picnóticos, células de Kupffer ativadas e alguns hepatócitos binucleados (Figura 32 B). O grupo tratado com α , β -amirenona 25mg (GTA25mg/kg) também mostrou degeneração gordurosa moderada. Células apoptóticas e hepatócitos binucleados puderam ser encontrados em torno da veia central (Figura 32C).

O grupo padrão (GCP) tratado com orlistate 25mg/kg apresentou intensa vacuolização do citoplasma, esteatose, degeneração celular e núcleos picnóticos (Figura 32D).

Os animais sob dietas hiperlipídica e hipercalórica não tratados (CP) apresentaram hiper celularidade nos cordões dos hepatócitos, áreas de degeneração celular e apoptose. Os hepatócitos binucleados também foram frequentes (Figura 32E).

Nenhuma perda de arquitetura hepática e infiltração intensa de células inflamatórias foram evidentes. Pequenos vacúolos apareceram no citoplasma celular e posteriormente se fundiram para formar um vacúolo maior. Como consequência, os vacúolos celulares forçaram o citoplasma e os núcleos para a periferia da célula. A maioria dos hepatócitos alterados apresentou degeneração citoplasmática acompanhada de alteração de forma e tamanho, perdendo sua forma poliédrica característica e frequentemente mostrando hipertrofia.

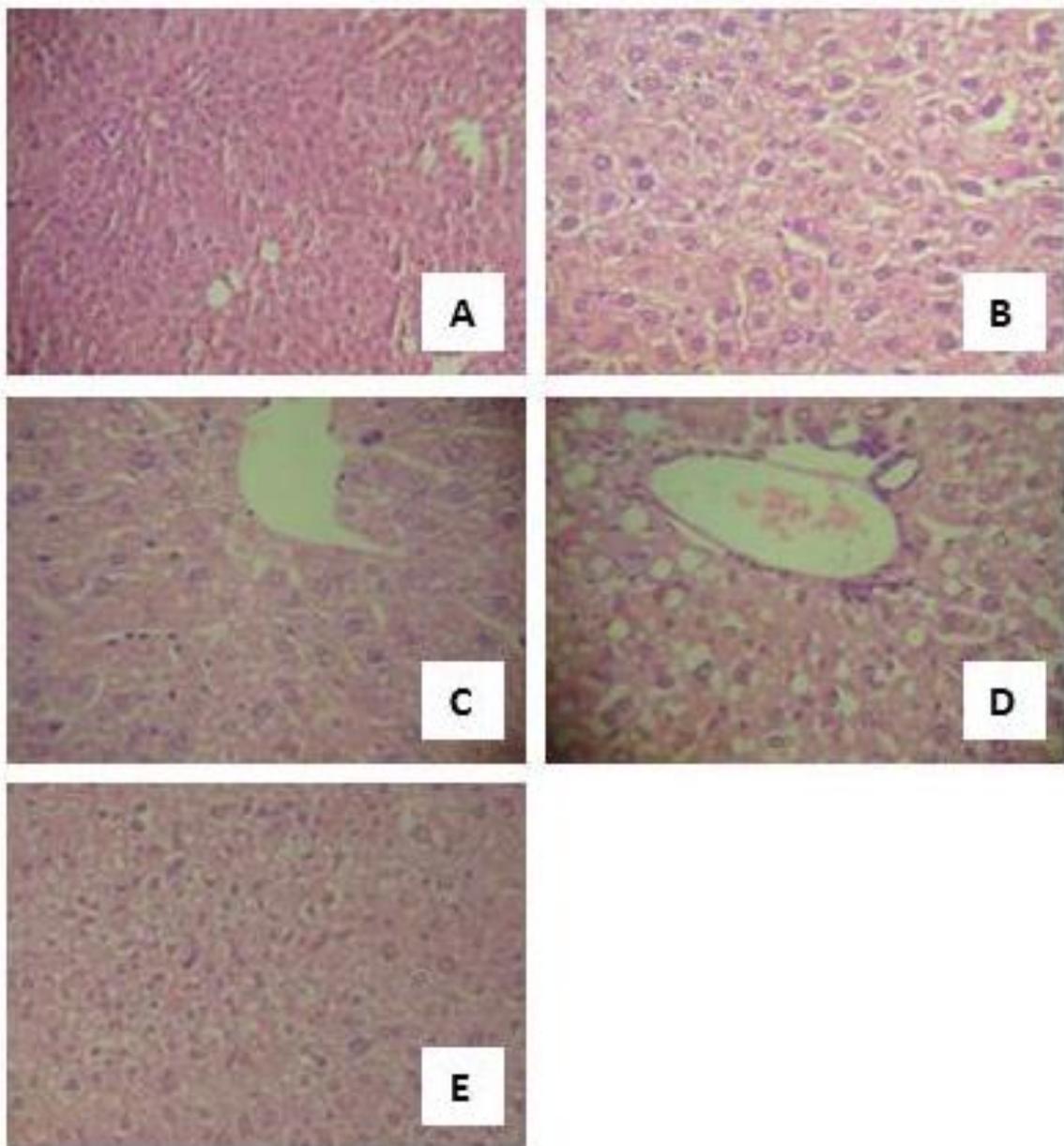


Figura 32 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos corados com HE. A – Animal 2 (foto 416). Estrutura hepática com cordões de hepatócitos poligonal com núcleos centrais muito proeminentes. Aumento: 24x. B - Grupo tratado com α , β -amirenona 50mg/kg, coloração HE. Degeneração celular, células apoptóticas, células de Kupffer e hepatócitos binucleados. Animal 6 (foto 385) 40x. C – Grupo tratado com α , β -amirenona 25mg/kg, coloração HE. Cordões de hepatócitos, pouca degeneração celular. Células em apoptose e hepatócitos binucleados. Aumento: 96x. Animal 3 (foto 215). Grupo padrão (tratado com orlistate), coloração HE. D – Animal 3 (foto 70). Esteatose, cordões de hepatócitos, degeneração celular, núcleos picnóticos. Aumento: 96x. E– Grupo induzido com dieta hiperlipídica e hipercalórica não tratado. Coloração HE. Cordões de hepatócitos com hiper celularidade, áreas de degeneração celular e apoptose. Hepatócitos binucleados – Animal 5 (foto 555). Aumento: 40x.

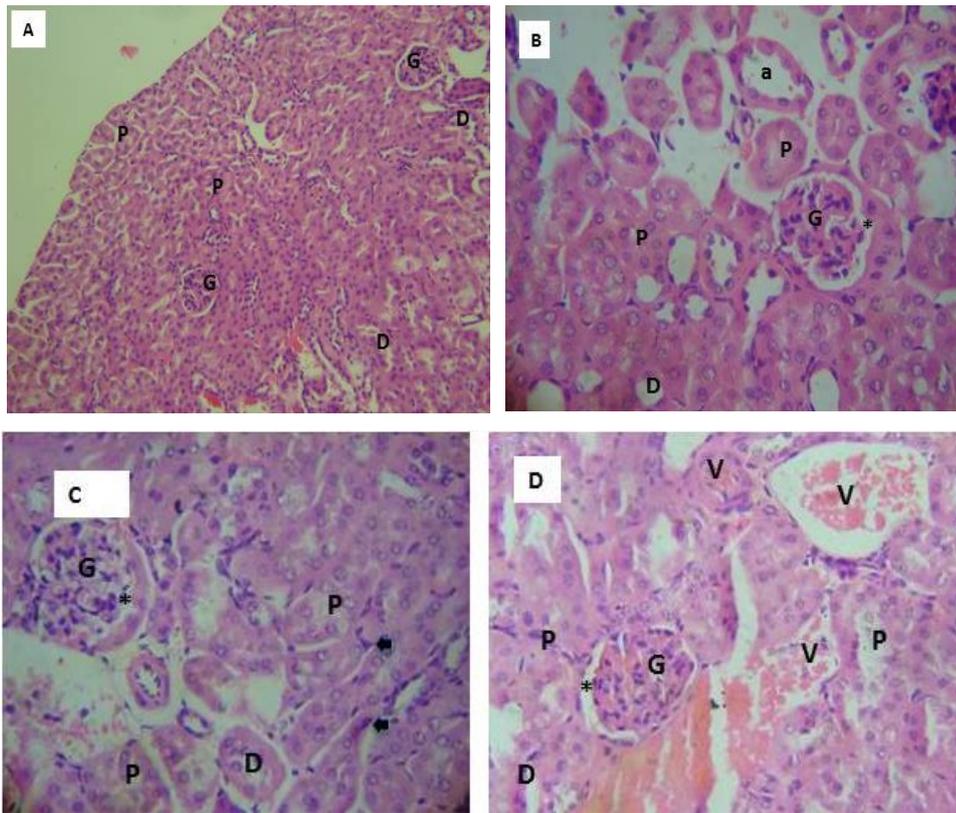
O rim dos camundongos de controle normal (GB) apresentou arquitetura natural de glomérulos renais com cápsula de Bowman intacta. Os túbulos renais incluíam túbulos contorcidos proximais, alinhados por grandes células piramidais com borda em escova e túbulos contorcidos distais alinhados por células cúbicas (Figura 33A).

Os rins do grupo controle positivo (CP) hipercalórico e hiperlipídico (HH) apresentaram degeneração vacuolar. Os túbulos renais em poucas áreas tornaram-se vacuolados e perderam a borda em escova. O espaço de Bowman diminuiu (Figura 33B). Também em dois animais do grupo de tratamento dieta hipercalórica e hiperlipídica houve perda de arquitetura celular associada à necrose glomerular e tubulo-intersticial caracterizada por degeneração hidrópica dos glomérulos.

O grupo padrão (GCP) tratado com orlistate 25mg/kg apresentou alterações estruturais histológicas no glomérulo (G) e nos túbulos contorneados proximais (P), e também nos túbulos contornados distais (D). Rim de camundongos tratados com orlistate mostram degeneração e hiper celularidade dos glomérulos (G). Uma infiltração túbulo-intersticial de linfócitos e macrófagos e os túbulos renais tornaram-se vacuolados e perderam suas bordas de escova (D; P). As congestões foram detectadas perto de áreas necróticas (Fig 33C e D).

Os rins de camundongos tratados com amirenona 25mg/kg apresentaram alterações estruturais histológicas no glomérulo (G), nos túbulos contorcidos proximais (P) e também nos túbulos contorcidos distais (D). Neste grupo observou-se degeneração celular e hiper celularidade dos glomérulos e túbulos. Os túbulos renais tornaram-se vacuolados e perderam suas bordas da escova (D ; P). As congestões foram detectadas perto de áreas necróticas (Fig 34). Geralmente há pouco infiltrado linfocítico associado à necrose (não presente em todos os animais amostrados neste grupo). A necrose pode ser vista como um componente da inflamação aguda. O tecido era muito eosinofílico.

Já os rins dos animais do grupo tratado com 50 mg/kg de α , β -amirenona (GTA50mg) apresentaram menos alterações na estrutura histológica no glomérulo (G), nos túbulos contorcidos proximais (P) e ainda nos túbulos contorcidos distais (D) (Fig 35). Os rins de camundongos tratados com Amirenona 50mg/kg mostram menos degeneração celular e hiper celularidade quando comparados ao grupo amirenona 25mg/kg. Os túbulos renais tornaram-se vacuolados (P; D), enquanto que o lúmen diminuiu. A arquitetura das alças de Henle foram preservadas.



Figuras 33 – Grupo basal: Fotomicrografia de cortes histológicos do rim de camundongos do grupo normal/basal (não induzido e não tratado), corados com HE. **A.** Animal 1 – (foto 40x1075 Ex1G5R) 40x. O rim mostrou a arquitetura normal do glomérulo renal (G) com a cápsula intacta de Bowman. Os túbulos contornados proximais são revestidos por células piramidais com borda de escova (P) e túbulos distal enrolados e alinhados por células cuboidais (D). **Grupo CP: B.** Animal 6 – (foto 734) 96x. Áreas com degeneração celular vacuolar, glomérulos renais (G) com diminuição no espaço de Bowman (*), preservação dos glomérulos renais, TCP (P) e TCD (D) íntegros, material não eosinofílico. Adelgaçamento em algumas áreas tubulares (a). **Grupo Padrão C. Animal 3** – (foto 795) 96x. Arquitetura parcialmente preservada. TCP (P) e TCD (D) com degeneração vacuolar e glomérulos (G) com diminuição do espaço de Bowman (*). Infiltrado inflamatório presente (). **D-** Animal 5-(foto 834) 40x. Túbulos TCP e TCD degenerados e vasos congestos (V).

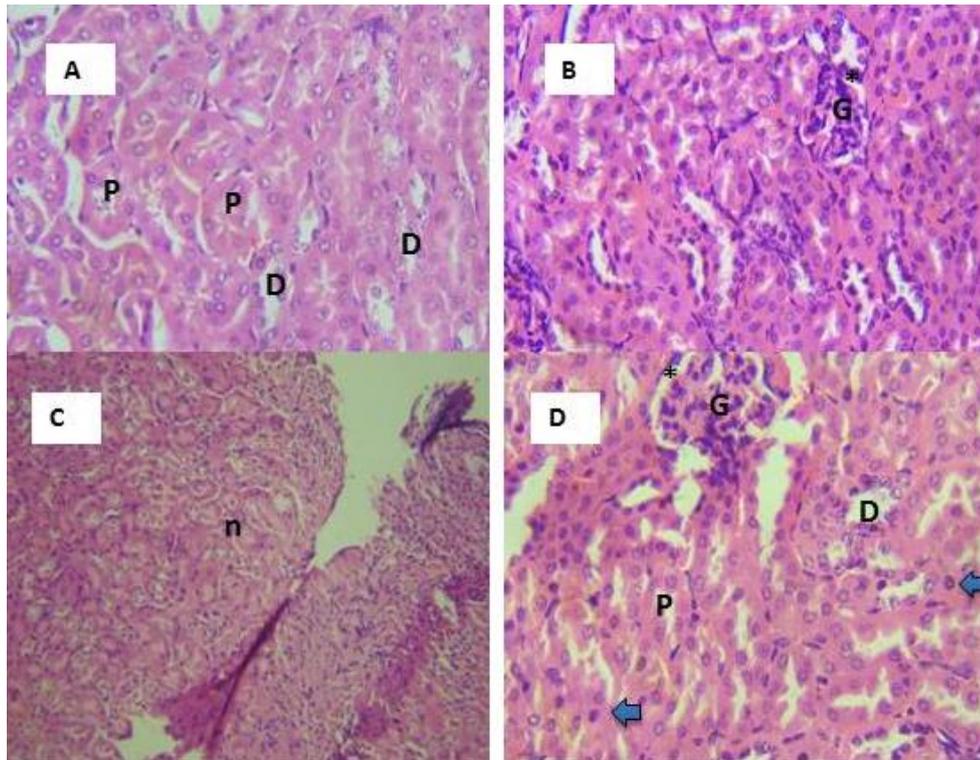


Figura 34. Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos do grupo tratado com α , β -amirrenona 25mg, corados com HE. A – Animal 1 (foto 855) 40x. Área com túbulos renais contorcidos proximal e distal (P, D) de arquitetura normal. B – Animal 3 (foto 897) 40x. Diminuição do espaço de Bowman (*), degeneração celular dos túbulos (P, D) e dos glomérulos renais (G) e hiper celularidade e eosinofilia tecidual. C – Animal 4 (foto 914) 10x. Áreas em necrose (n), degeneração celular, capilares congestos e vacuolização. D – Animal 5 (foto 939) 10x. Arquitetura ainda preservada dos túbulos, mas com degeneração, diminuição do espaço de Bowman (*) e núcleos picnóticos ().

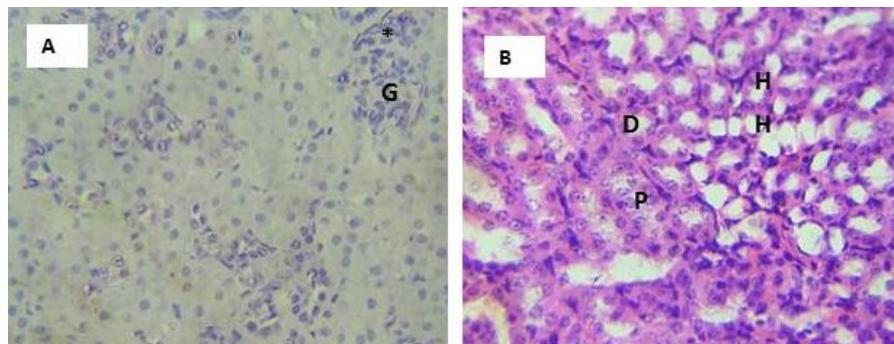


Figura 35. Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos do grupo tratado com α , β -amirirrona 50mg, corados com HE. A – Animal 1 (foto 976) 40x. Diminuição do espaço de Bowman (*) glomerular (G), degeneração celular do Túbulo contorcido proximal (P) e Túbulo contorcido distal (D). Lumem dos túbulos diminuídos. B – Animal 4 (foto 1024) 40x. Áreas de túbulos contorcidos (P e D) e Alças de Henle (H) preservadas, degeneração e vacuolização celular, e eosinofilia tecidual.

6. DISCUSSÃO

O impacto atual das complicações do diabetes mellitus, associado ou não à obesidade, compondo a síndrome metabólica, foi o mote deste estudo, acrescido da necessidade de se manter pesquisas em atividade que busquem potenciais tratamentos mais abrangentes, do ponto de vista farmacológico, e mais confortáveis para o organismo afetado. Já se tem consciência de que produtos naturais possuem essas características latentes, partindo-se da constatação de que é justamente a complexidade de sua composição que os torna mais completos, com atividades por vezes sinérgicas muito úteis, pois há patologias que também são multissistêmicas, como as consideradas neste trabalho atual, e que pediriam uma intervenção em mais de um setor orgânico ou via metabólica. Substâncias individuais sintéticas tendem a não ter esse perfil, mas extratos de plantas ou seus derivados têm demonstrado resultados em testes que extrapolam o efeito de substâncias isoladas desses materiais.

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos a partir de vegetais, microrganismos ou até animais (esponjas), visando o isolamento de seus constituintes químicos, como também para obtenção em maior escala. Neste estudo foram selecionados os métodos de maceração e sonicação para obter os extratos. Para isolar o constituinte majoritário, foram utilizadas colunas cromatográficas dos extratos e do breu puro. Dessa forma, foram analisados os rendimentos dos extratos em diferentes solventes, das colunas e CCD tanto dos extratos como das frações das colunas, o que permitiu identificar o melhor método e solvente para obter um maior rendimento de α , β -amirenona.

No caso da α , β - amirenona, era necessário estabelecer procedimentos que facilitassem sua obtenção com fins de realização do estudo, por se tratar de uma mistura minoritária em espécies do gênero *Protium* (SIANI, et al 2012; RUDIGER, 2012). A mistura majoritária α , β -amirina destaca-se por um maior volume de estudos iniciais sobre efeitos anti-inflamatórios, provavelmente por ter uma extração mais viável, não necessariamente com a separação dos isômeros α e β , só recentemente relatada por Haidar et al. (2014).

Ainda assim, estudos que utilizaram a resina de *Protium heptaphyllum*, a exemplo de Vieira Junior e colaboradores (2005), obtiveram rendimento aproximado de 3% da mistura de α , β -amirina, denotando dificuldades técnicas inclusive para obter a mistura majoritária, dependendo da espécie. Em *P. heptaphyllum*, espécie com maior número de estudos, a concentração dos triterpenos α - e β -amirina descrita era de 18 a 20 % (SILVA et al., 2009). Essa quantidade total de α - e β -amirina também apresenta variação em processos de

isolamento, com obtenção da mistura de em um rendimento entre 7 e 45 % (MAIA et al., 2000; VIEIRA JUNIOR et al., 2005; SUSUNAGA et al., 2001). Rudiger (2012) verificou que o valor médio de α -amirenona foi de 8,3%, com variação de 1,2% para *Protium opacum* var. *opacum* a 29,0 % para *P. giganteum* var. *giganteum*, respectivamente. Como também os triterpenos carbonílicos, α - e β -amirona (α , β -amirenona) não foram observados para a espécie *P. cf. ferrugineum*, e β -amirona não foi detectado em *P. gallosum* (RÜDIGER, 2012). Siani e colaboradores (2012) relataram uma variação de 2,0% (*Protium icicariba*) a 21,5% (*Trattinnickia rhoifolia*) para α -amirenona e de 1,7% (*Protium opacum*) a 16,9% (*T. rhoifolia*) para β -amirenona.

Desta forma, o processo de isolamento e semissíntese α , β -amirenona descrito na metodologia do trabalho procurou ser um facilitador para pesquisas envolvendo a mistura em questão. A descrição físico-química da mistura foi um importante avanço, neste estudo, tendo em vista ter sido caracterizada pela primeira vez nesta pesquisa. A caracterização da α , β -amirenona influencia diretamente no conhecimento de sua dissolução e, conseqüentemente, de sua biodisponibilidade, devido ao fato de a sua disposição cristalina diminuir a superfície de contato do fármaco e interferir com a penetração do solvente, o que pode reduzir a sua solubilidade (BRANDÃO et al., 2008). De acordo com o conceito de pó cristalino, esses sólidos são caracterizados por possuir estruturas tridimensionais que são capazes de difracionar os raios X e apresentar um ponto de fusão bem definido (SHARMA, et al., 2013).

Foi possível observar os picos de difração que caracterizam a substância como uma rede cristalina, na qual foram observados reflexos cristalinos intensos e sobrepostos em torno de 13° a 15°. Essas características podem resultar em sua baixa solubilidade aquosa observada em experimentos qualitativos anteriores, que mostraram que 1 mg de α , β -amirenona foi adicionado em quantidades crescentes de água, começando de 1 mL até 1000 mL. Verificou-se que, mesmo com adição de água, não se observou solubilização da α , β -amirenona, caracterizando-a como substância insolúvel em água. A α , β -amirenona, em comparação com α , β -amirina, outro triterpeno, apresenta um perfil cristalino menor, menos reflexos cristalinos e melhor solubilidade aquoso.

No estudo atual, os testes enzimáticos *in vitro* para α -glucosidase, lipase, α -amilase e xantino oxidase demonstraram maior inibição para α -glucosidase e lipase, enquanto menor inibição para α -amilase e xantino oxidase. A α -glucosidase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrou uma porcentagem de inibição maior que 90% observado também para a mistura de α , β -amirina isolada de *Protium heptaphyllum* (RÜDIGER, 2009).

Outro estudo realizado com extrato em acetato de etila de raízes de *Salacia hainanensis* testou os triterpenoides 2b, 3b-dihidroxilup-20 (29) -eno [C1], 30-hidroxi-D: A-friedo-olean-1-en-3-ona [C2] e 24,25,26- tri-hidroxitirucall-7-en-3-ona [C3] juntamente com três compostos (olibanumol J [C4], 21a-hidroxi-D: A-friedo-olean-3-ona [composto 5] e 29-hidroxi-D: A-friedo-olean-3-ona [C6]. Estes demonstraram atividade inibitória eficaz de α -glucosidase maior que o controle positivo (acarbose, CI_{50} 1,02 mM) (HUANG, 2012). Já Yu e colaboradores (2014) avaliando compostos triterpênicos isolados da mesma espécie, e tendo como controle a acarbose, obtiveram também significativa inibição.

Neste estudo a inibição da lipase apresentou-se menor quando comparada ao padrão orlistate. Alguns estudos com compostos triterpênicos dos grupos lupano e oleano relatam ações inibitórias da lipase, o que pode prevenir aumento do peso corporal (LIU et al., 2008; GUO et al., 2009). Um estudo realizado com o ácido carnósico, diterpeno isolado do extrato metanólico das folhas de *Salvia officinalis*, demonstrou uma atividade inibitória da lipase pancreática com um valor de CI_{50} de 12 mg/mL (NINOMIYA et al., 2004).

Os resultados para α -amilase e α -glucosidade (enzima de intestino de mamífero) apresentaram inibição abaixo do esperado. Tal fator pode ser explicado porque a α -amilase tem ação complementar ao efeito inibitório da α -glucosidase, já que ambas exercem uma digestão incompleta dos carboidratos dentro do intestino (YANG et al., 2012).

Berboucha et al. (2010) relataram que extratos de folha de *Pistacia lentiscus* exibiram inibição muito forte da atividade de XO, sendo a da fração da partição em hexano de $72,74 \pm 2,63\%$, e a da partição em clorofórmio de $68,9 \pm 3,8\%$, sendo o padrão utilizado o alopurinol $100 \mu\text{g/mL}$. Os autores também ressaltam que os estudos disponíveis sobre a atividade inibitória da XO nas plantas em questão são raros, o que dificulta as comparações.

O direcionamento para o uso das enzimas α -glucosidase, α -amilase, lipase e xantino-oxidase neste estudo, assim como em outros que avaliam efeitos antidiabético e antiobesidade, baseia-se nas evidências de que tais proteínas são alvos terapêuticos de medicamentos atualmente em uso (como os inibidores de α -glucosidase), ou que novas substâncias que modulem o metabolismo digestivo de carboidratos ou lipídios (α -amilase, lipase), ou o estresse oxidativo (indicado pela xantino-oxidase), possam ser utilizados como fármacos.

Considerando que havia relatos de ação hipoglicemiante e hipolipemiante de outro triterpeno, a α , β -amirina (SANTOS et al., 2012), além da resina de *Protium heptaphyllum* no todo, e que os mesmos estudos e outros admitiam lacunas no conhecimento das características químicas e mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, decidiu-se por avaliar também se

a mistura α , β - amirenona possuía este perfil. Liu e colaboradores (2014) enfatizam no seu trabalho, como neste caso, que se poderia seguir o princípio de que a estrutura determina a função. Deste modo, metodologia semelhante à de estudos correntes sobre ação antidiabética e antiobesidade foi seguida, com foco na atividade da mistura frente a enzimas digestivas envolvidas no metabolismo de lipídios e glicídios, a saber, α -glucosidase, α -amilase, lipase, e uma enzima associada ao estresse oxidativo, a xantino-oxidase.

A glicemia é o principal exame utilizado na prática diária para avaliar defeitos no metabolismo dos carboidratos, seja como sinalizador de resistência insulínica, seja como diagnóstico do diabetes mellitus, ambos fortemente associados à obesidade e síndrome metabólica (ALVES et al., 2010; KASSI et al., 2011). O pico de glicemia pós-prandial é um importante alvo terapêutico atual, pois aumenta o risco cardiovascular devido a um estado pró-trombótico (ALVES et al., 2010; SBD, 2013).

O presente estudo mostrou que a mistura α,β - amirenona em diferentes concentrações reduziu os níveis de glicemia pós-prandial nos animais submetidos aos testes de tolerância oral à maltose e sacarose, praticamente igualando-se depois ao padrão acarbose. Essa foi a avaliação do perfil da hiperglicemia aguda ou episódica. A vantagem teórica da mistura seria maior para esta meta de tratamento. No desafio agudo com amido, no entanto, não houve diferença nos valores de glicemia pós-prandial nem com a mistura, nem com acarbose, o que poderia ser analisado da seguinte maneira: por ser um carboidrato mais complexo, a carga de glicose liberada é maior após ser metabolizado.

Santos e colaboradores (2012) e Frota (2011) demonstram que uma substância similar, da qual α , β -amirenona foi derivada, a α , β -amirina, apresenta resultado semelhante em teste de tolerância oral à glicose realizado em condições similares a este, porém com um efeito mais pronunciado nos momentos de 60 e 90 minutos após a gavagem com o açúcar, nesse caso, a própria glicose.

Os animais com diabetes induzido por estreptozotocina e nicotinamida apresentaram diminuição dos níveis de glicose plasmática após tratamento com α,β -amirenona em comparação com acarbose. Santos e colaboradores (2012) demonstraram que a mistura α,β - amirina de *Protium heptaphyllum* teve efeito hipoglicemiante e protetor das ilhotas pancreáticas em camundongos em doses de até 100mg/kg, quando comparado ao padrão glibenclamida, porém sem ocorrência de hipoglicemia, comum com o uso do fármaco. No entanto, como na pesquisa atual, não apresentaram esclarecimentos sobre o mecanismo de ação da mistura, mas sugeriram que a ação possa se dar não apenas por um mecanismo. Alguns estudos demonstraram que os triterpenos, em especial os pentacíclicos, podem ter

propriedades sensibilizadoras da insulina, podendo ser também este um caminho para explicar o efeito hipoglicemiante da amirenona (RAMIREZ ESPINOSA, 2011).

Em teste agudo de sobrecarga com solução hiperlipídica, bem como após indução da obesidade por dieta hipercalórica e hiperlipídica durante 18 semanas, em camundongos BC57L, a α , β -amirenona foi capaz de diminuir os níveis séricos de triglicerídeos e o peso dos animais nas doses testadas. As dosagens de lipídios (colesterol e triglicerídeos) procuraram definir o grau de desequilíbrio do metabolismo destes elementos no organismo, cujo aumento sérico reflete um aumento global, particularmente deletério para os compartimentos hepático e muscular, levando à piora da função e a um estado pró-inflamatório que aumenta o risco de eventos cardiovasculares (ALVES et al., 2010; MOTTA et al., 2009).

Em teste crônico tendo como padrão o orlistate, Carvalho e colaboradores (2015) demonstraram o mesmo efeito com a mistura triterpênica da resina extraída com metano/diclorometano (4:1) de *Protium heptaphyllum*. Santos et al. (2012), com a mistura α , β -amirina obtida da mesma espécie, relataram também efeitos positivos tanto nos níveis séricos de colesterol quanto nos de triglicerídeos, na dose ótima de 100mg/kg, frente ao padrão fenofibrato.

A obesidade, entendida como desequilíbrio multifatorial, mas de fundo inflamatório, foi abordada neste estudo considerando raciocínio apresentado também em trabalhos de Carvalho et al. (2015, 2017) que, utilizando respectivamente tanto a resina como a mistura α , β -amirina de *P. heptaphyllum*, observaram redução de peso, de gordura abdominal e de marcadores inflamatórios em camundongos tratados frente à sibutramina. No nível celular, houve redução do volume dos adipócitos, enquanto que no molecular ocorreu modulação positiva dos hormônios leptina e grelina. No estudo corrente, a mistura α , β -amirenona nas concentrações de 25 e 50mg reduziu o peso corporal durante o tratamento de quatro semanas, frente ao padrão orlistate.

Tal resultado pode estar relacionado à inibição das enzimas digestivas (α -glucosidade e lipase) que a α , β -amirenona promoveu *in vitro* neste estudo. A inibição da digestão e absorção de nutrientes está relacionada a essas enzimas, sendo este um dos mecanismos utilizados para a determinação do potencial de bioativos como agentes potenciais antiobesidade (MARRELLI et al., 2013). A α , β -amirenona neste estudo também reduziu o nível glicêmico após sobrecarga de carboidratos (maltose e sacarose), ou seja, interferindo na digestão destes últimos, influenciando na absorção de açúcar e diminuindo as calorias derivadas de carboidratos, conseqüentemente a não captação de glicose pelos adipócito o que pode impedir a síntese e acúmulo de triacilgliceróis (GRUPTA et al., 2014).

A diminuição do peso, neste estudo, pode estar relacionada a outras atividades não estudadas, àquelas relacionadas às ações anti-inflamatórias já relatadas para outros compostos triterpênicos estruturalmente relacionados (OKOYE et al., 2014; MELO, et al., 2011).

Tendo em mente a escassez de trabalhos que testem as mudanças no padrão glicêmico e lipídico de modelos animais por triterpenos de *Protium* spp, cabe citar artigos que apontam o mesmo efeito de grupos químicos próximos e derivados sintéticos e semissintéticos, que poderiam ser extrapolados para tentar explicar a ação das amirinas e amironas, levando-se em conta a similaridade entre essas estruturas. Estudos anteriores que usaram triterpenos pentacíclicos como o ácido ursólico e oleanólico em camundongos submetidos à dieta hipercalórica demonstraram a redução significativa de parâmetros físicos e bioquímicos (CASTELLANO et al., 2013; DE MELO et al., 2009; NARENDER et al., 2009; RAO et al., 2011).

A análise bioquímica no presente estudo teve como objetivo complementar a visão de que se devem analisar as alterações decorrentes da obesidade e do diabetes de modo integrado, já que são processos sistêmicos e que influenciam um ao outro (ALVES et al., 2010). A escolha dos parâmetros deu-se por sua importância reconhecida tanto no diagnóstico das condições supracitadas como de suas complicações; e as dosagens priorizadas foram: glicemia, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina e transaminases. No caso das três últimas, têm por objetivo levantar possíveis lesões já instaladas nos rins ou no fígado, tanto reversíveis como irreversíveis (insuficiência renal decorrente do diabetes; esteatose hepática associada à obesidade e hiperlipidemia) (MOTTA et al., 2009).

O estudo da toxicidade baseou-se nos seguintes parâmetros: medidas de classes 300mg/kg, análise das dosagens séricas antes e depois dos tratamentos propostos, e avaliação descritiva e qualitativa das lesões encontradas em órgãos selecionados após o sacrifício dos animais. A análise histológica exposta no trabalho teve como objetivo estabelecer que o modelo animal utilizado (C57BL) tinha sido o mais adequado para atingir o estado crônico de obesidade e que estas alterações orgânicas pudessem ilustrar os padrões de adoecimento dos animais extrapoláveis para o homem.

Os órgãos avaliados com mais detalhes foram o fígado e os rins. O fígado em camundongos obesos mostrou achados mais próximos do curso natural da esteatose hepática não alcoólica no homem, que é seguida por um processo inflamatório com liberação de enzimas e estresse oxidativo, que favorecem degeneração de hepatócitos, fibrose e carcinogênese, concordando com Nakamura & Terauchi (2013). Ressalva-se que nos camundongos não há geralmente desenvolvimento de cirrose nestes quadros, e ela tampouco é

um pré-requisito para o surgimento de lesões neoplásicas (NAKAMURA; TERAUCHI, 2013).

Os rins apresentaram como mais destacada alteração degeneração vacuola e infiltração de células inflamatórias com hiperplasia de células dos glomérulos, discordante do padrão mais comum de patologia renal associada ao diabetes no homem, que é o de proliferação mesangial, presente também no modelo murino mais adequado para este fim, o C57BLKS/J (SHARMA, 2003).

Ao se descrever os achados histológicos, não houve dados suficientes para inferir se os padrões de lesão não seriam efeitos também das substâncias em teste, principalmente porque os critérios de toxicidade (OECD, 2002), na prática, utilizam dados clínicos que nem sempre manifestam efeitos fisiológicos de concentrações teoricamente efetivas frente ao alvo primário do tratamento, ou de doses não máximas.

Deve-se considerar, neste sentido, que se trabalhou com uma abordagem ainda em desenvolvimento, já que, apesar de a dieta hiperlipídica ser um método amplamente difundido, ainda carece de padronização (HEYDEMANN, 2016). Outra crítica pertinente é o fato de que nem todas as linhagens compartilham o mesmo padrão de lesão orgânica para a mesma patologia, o que leva a uma necessidade de se ter bem claros os objetivos da análise para direcionar o uso de um determinado modelo animal em um estudo.

Os camundongos C57BL, por exemplo, são mais resistentes ao diabetes induzido por estreptozotocina e a lesões renais associadas comparando-se com a linhagem C57BLKS/J que carrega a mutação *db/db* (SHARMA et al, 2003). Os achados histológicos, neste contexto, podem ser por vezes confundidos entre resultados do uso das substâncias teste e as complicações da própria doença. Pelas dificuldades técnicas de obtenção de animais para experimento, foi estabelecido o uso da mesma linhagem para testes com a mistura e para a avaliação histológica.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo com a α , β -amirenona possibilitaram o reconhecimento de ser a substância teste um potencial bioativo promissor para estudos envolvendo distúrbios do metabolismo dos lipídeos e carboidratos, talvez por mecanismos que envolvam a inibição das enzimas digestivas ou outros também envolvidos principalmente aqueles relacionados às vias inflamatórias, por exemplo. Entretanto, investigações mais detalhadas que incluam mecanismos moleculares da ação hipoglicemiante, hipolipemiante e antiobesidade são necessárias para elucidar a ação mais efetiva desta mistura.

7. CONCLUSÃO

- Obteve-se a mistura triterpênica α , β -amirenona a partir da semissíntese da substância majoritária α , β -amirina oriunda da resina de *Protium* spp com rendimento de 70% a partir da amostra do breu. Análises físico-químicas confirmaram a natureza cristalina da α , β -amirenona, a qual apresentou baixa solubilidade aquosa.
- A mistura α , β -amirenona agiu sobre a absorção de carboidratos e das gorduras por meio da inibição da α -glucosidase e lipase, respectivamente, sendo esse um possível mecanismo de sua ação hipoglicemiante.
- A mistura de α , β -amirenona apresentou atividade anti-hiperglicemiante no teste de tolerância oral a carboidratos, utilizando a maltose e sacarose. Entretanto, não demonstrou ação quando utilizado o amido como indutor da glicemia.
- Camundongos diabéticos quando tratados com α , β -amirenona apresentaram diminuição dos níveis de glicose plasmática. A α , β -amirenona reduziu os níveis plasmáticos de triglicerídeos nos animais submetidos à emulsão lipídica oral de modo mais marcante do que o padrão orlistate.
- Verificou-se uma redução do peso corporal de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com α , β - amirenona após 4 semanas de tratamento.
- O tratamento com a mistura α , β -amirenona não demonstrou toxicidade evidente por meio da avaliação da atividade enzimática da ALT e AST, contudo foram observadas alterações provocadas pela dieta hipercalórica no fígado e rim evidenciadas pelas análises histológicas, o que foi atenuado pelo tratamento com α , β -amirenona.
- A mistura α , β -amirenona demonstrou ser eficaz no tratamento das alterações metabólicas induzidas pelo aumento da adiposidade, com possível potencial hipoglicemiante e hipolipemiante, ou mesmo como agente nutracêutico para o tratamento de alterações metabólicas associadas à obesidade.

8. REFERÊNCIAS

- ADISAKWATTANA, Lipid-Lowering mechanisms of grape seed extract (*Vitis vinifera* L) and its antihyperlipidemic activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.20, p. 2113-2120, 2010.
- ALBERTI, K.G.M.M. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart Lung and Blood Institute; American Heart Association; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 20, p. 1640-1645, 2009.
- ALMEIDA, P.D.O. et al. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. doi: 10.1155/2015/293768.
- ALVES, P.C.C. et al. (eds.). **Bases moleculares em clínica médica**. São Paulo: Atheneu, 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care in diabetes – 2015. **Diabetes Care**, vol. 38, supl. 1, p.S1-S2, 2015.
- ANDRADE-CETTO, A. Alpha glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p.27-32, 2008.
- ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, ANVISA: 2010.
- ARAGÃO, G.F et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol. 85, p. 827-34, 2006.
- ARAGÃO, G.F. et al. Evidence for excitatory and inhibitory amino acids participation in the neuropharmacological activity of alpha- and beta-amyrin acetate. **The Open Pharmacology Journal**, v.3, p. 9-16, 2009.
- ARTIÑANO, A. A.; CASTRO, M.M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1246–1253, 2009. doi:10.1017/S0007114509990729.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA – ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010. 3. ed. Itapevi, São Paulo: **AC Farmacêutica**, 2010.
- BANDEIRA, P.N. et al. Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 33, 2001.
- BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; SANTOS, H. S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.204-208, 2007.

BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.6, n.2, p.258-285, 2006.

BARROS, F. W.A et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic; Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1268–1276, 2011. doi:10.1016/j.bmc.2010.12.016

BERBOUCHA, M. et al. Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n.4, p. 896-904, 2010.

BISKUP, E. et al. Triterpenoid α -amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. **Acta Biochimica Polonica**, v.59, n. 2, p. 255-260, 2012.

BOURJOT, M. et al. Chemical constituents of *Anacolosia pervilleana* and their antiviral activities. **Fitoterapia**. v.83, n.6, p. 1076-1080, 2012.

BRASIL. **Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (DOU 18.03.04)** – Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BRESSON, D.; HERRATH, M. Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes: to combine or not to combine? **Autoimmunity Reviews**, v.6 (supl.), p. 315-322, 2007.

BRUNI, S.; GUGLIELMI, V. Identification of archaeological triterpenic resins by the non-separative techniques FTIR and ^{13}C NMR: the case of *Pistacia* resin (mastic) in comparison with frankincense. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 121, p. 613-622, 2014.

BUTHANI, K.K. et al. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. **Phytochemistry**, v. 23, n.2, p.407-410, 1984.

CALCUL, L. et al. Natural products as a rich source of tau-targeting drugs for Alzheimer's disease. **Future Medicinal Chemistry**, v.4, n.13, p.1751-1761, 2012.

CAMARGO, E. G.; SILVEIRO, S. P.; GROSS, J. L. Síndrome metabólica. In: Programa de atualização em clínica médica (PROCLIM)/Organizado pela Sociedade Brasileira de Clínica Médica; diretor Alfredo Pusch Kubiak.-Porto Alegre: **Artmed/Panamericana Editora**, 2004.

CANTIELLO, F. et al. Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological outcomes of bladder cancer: a systematic review. **International Journal of Urology**, 2014. doi: 10.1111/iju.12644.

CARLINI, EA, et al. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 690-695, 2006.

CARVALHO, K.M.M.B et al. Amyrins from *Protium heptaphyllum* reduce high-fat diet-induced obesity in mice via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory responses. **Planta Medica**, v. 83, p. 285-291. doi: 10.1055/s-0042-114222.

CARVALHO, K.M.M.B. et al. The resin from *Protium heptaphyllum* prevents high-fat diet-induced obesity in mice: scientific evidence and potential mechanisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. doi: 10.1155/2015/106157.

CASTELLANO, J.M. et al. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. **Diabetes**, v. 62, p. 1791-1799, 2013. doi:10.2337/db12-1215.

CAVALLI, V. L. et al. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos para modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CESARETTI, M.L. R; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia** v.50 n. 2, 2006.doi: 10.1590/S0004-27302006000200005.

CHICCA, A., MARAZZI, J., GERTSCH, J. The antinociceptive triterpene α -amyrin inhibits 2- arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**, p .1476-5381, 2012.

CHU, H.F. et al. Variations in the efficacy of resistant maltodextrin on body fat reduction in rats fed a high-fat diet. **Molecular Nutrition ; Food Research**, v.54, n.1, p. 1004-1013, 2013.

COPP, B. R.; PEARCE, A N. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Natural Product Reports**, v. 24, n. p. 278–297, 2007.

DAWSON, R. et al. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **American Journal of Physiology**, v. 273, n.1,p. 2002-2006, 1997.

DA SILVA, K.A. et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v. 152, n.8, p.1872-1887, 2011.

DEDAVID, B. A. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007.

DE MELO, C.L. et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic terpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. **J. Agric. Food Chem**, v.57, n.19, p. 8776-8781, 2009.

DIAS, M. O. et al. Separação semipreparativa de α , β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.34, n.4, p.704-706, 2011.

- DÍAZ-RUIZ, G. et al. Growth inhibition of *Streptococcus* from the oral cavity by α -amyrin esters. **Molecules**, v.17, p.12603-12611, 2012. doi:10.3390/molecules171112603
- DIEMEN, V.V et al. Experimental model to induced obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.6, n.21, p.425-429, 2006.
- EL-ABHAR, H; SCHAALAN, M.F. Phytoterapy in diabetes: review on potential mechanistic perspectives. **World Journal of Diabetes**, v.5, n.2, p. 176-197, 2014.
- ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hiperlipidic diet on lipid metabolismo of sedentary and exercised rats. **Nutrition**. V.20, p.218–224, 2004.
- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M.O. O modelo animal de doença: critério de escolha e espécie de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.
- FERNANDES, G.S et al. Glutamat induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2012.
- FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n.2, 2006.
- FROTA, J. T. Avaliação das atividades hipoglicemiante e hipolipidêmica da mistura de α , β -amirina, triterpenos pentacíclicos isolados do *protium heptaphyllum*, em camundongos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- GALLEGOS OLEA, R. S; ROQUE, N. A. Análise de misturas de triterpenos por ^{13}C NMR. **Química Nova**, v.13, p.278-281, 1990.
- GAO, D. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait in alloxan-induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.23, n.9, p.1257-1262, 2009. doi: 10.1002/ptr.2603.
- GILBERT, E. R. et al. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v.2011, p.01-12, 2011. doi:10.1155/2011/416254.
- GUPTA, M.; SHARMA, P.; NATH, A. K. Purification of a novel α -amylase inhibitor from local Himalayan bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds with activity towards bruchid pests and human salivary amylase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1286-1293, 2014.
- Haidar, S. et al. Lipase mediated separation of triterpene structural isomers, α - and β -amyrin. **Tetraedron Letters**, v. 55, p. 3122-3125, 2014. doi:10.1016/j.tetlet.2014.04.015.
- HALPERN, A et al. Metabolic syndrome, dislipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.2, n. 55, 2010.
- HARVEY, A. L. et al. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HEYDEMANN, A. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016. doi: 10.1155/2016/2902351.

HIGGINS, P. et al. The potential for xanthine oxidase inhibition in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular disease. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, 2009. doi:10.1155/2009/282059.

HOLANDA PINTO, S.A. et al. Antinoceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin, **Phytomedicine**, v. 15, 630–634, 2008.

HURT, R.T. et al. The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. **Gastroenterology & Hepatology**, v.6, n.12, p.780-792, 2010.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF diabetes atlas**. 6. ed. Brussels, Belgium: IDF, 2013.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural product reports**, v. 28, n. 4, p. 809–23, 2011.

JANEIRO, D. I. et al.,. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 (supl.), p.724-732, 2008.

JEONG, Y. T. et al. An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals. **Neuron**, v.79, p.725–737, 2013. doi:10.1016/j.neuron.2013.06.025.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of the amyryl derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.148–153, 2007. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02162.x

KASSI, E. et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC Medicine**, v.9, n.48, 2011.

KING, A.J.F. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, v.166, p.877-894, 2012. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.

KOOLMAN, J. ; RÖHM, K. **Bioquímica: texto e atlas**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

KUO, R.-Y. et al. Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. **Natural product reports**, v. 26, p. 1321–1344, 2009.

LA LEUR, S.E et al. The snacking rat as model of human obesity: effects of a free choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. **International Journal of Obesity**. Londres, v. 38, n5, p.643-649, 2014.

- LAZARIN-BIDÓIA, D. et al. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 60, p. 17–28, 2013.
- LEE, H. et al. Obesity, inflammation and diet. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 143-152, 2013.
- LIMA, E.M. et al. Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin – chemical composition and cytotoxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p.399-407, 2014. doi: 10.1016/j.bjp.2014.06.003.
- LIMA-JÚNIOR, R.C.P. et al. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α,β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K⁺ ATP channels. **Inflammation Research**, v.56, p.487-494, 2007.
- LING, T. New triterpenoids and other constituents from a special microbial-fermented tea - Fuzhuan brick tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.8, p. 4945-4950, 2010. doi:10.1021/jf9043524.
- LIU, W. et al. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of *Sarcandra glabra* polysaccharide in type 2 diabetic mice. **Food & Function**, v.5, p. 2850-2860, 2014. doi: 10.1039/c4fo00430b.
- MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P.C. NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1517-1575, 1994.
- MAHATO, S.B. & SEN, S. Advances in triterpenoid research. **Phytochemistry**, v. 44, p.1185-1236, 1997.
- MALTA, D.C et al. Evolução anual da prevalência de excesso de peso e obesidade em adultos nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal entre 2006 e 2012. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.17, supl.1, p. 267-276, 2014. doi: 10.1590/1809-4503201400050021.
- MARLON, M. et al. Ácido úrico como fator de risco para doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 1, p. 3-8, 2011.
- MARRELLI, M. et al. Inhibition of key enzymes linked to obesity by preparations from mediterranean dietary Plants: effects on α -amylase and pancreatic lipase activities. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 340-346, 2013.
- MATOS, I.B. et al. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. **Molecular Immunology**, v. 54, p 482-492, 2013.
- MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, n. 559, p. 227-235, 2007.

MELO, C.M. et al. Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research**, v. 60, p. 673-681, 2011. doi: 10.1007/s00011-011-0321-x.

MIRANDA, A.L., et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v.66, p.284–6, 2000.

MITTWEDE, P.N. et al. A novel experimental model of orthopedic trauma with acute kidney injury in obese Zucker rats. **Physiological Reports, Amsterdam**, v.1, n.5.01-08, 2013.

MOLLATAGHI, A. et al. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. **Fitoterapia**, v. 83, p. 298-302, 2012.

MOSA, R.A et al. *In vivo* antihyperglycemic activity of a lanosteryl triterpene from *Protorhus longifolia*. **Molecules**, v.20, p. 13374-13383, 2015. doi: 10.3390/molecules200713374.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**.5.ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MULÈ, G. et al. Metabolic syndrome in hypertensive patients: An unholy alliance. **World Journal of Cardiology**, v.6, n.9, p.890-907, 2014.

NAGAI, N.; ITO, Y. Therapeutic effects of sericin on diabetic keratopathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 6. p. 282-289, 2013.

NAGAI, N. et al. Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in otsuka long-evans Tokushima fatty rats as a model of human type 2 diabetes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, n.9, p.1594-1599, 2009.

NAKAMURA, A.; TERAUCHI, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, 2013. doi: 10.3390/ijms141121240.

NARENDER, T. et al. Synthesis of α -amyrin derivatives and their *in vivo* antihyperglycemic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1215–1222, 2009. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.011

NEGRÃO, A.B. & LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologista & Metabolismo**. São Paulo, v. 44, n.3, p. 205-214, 2000.

NINOMIYA, K. et al. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n.8, p.1943-6, 2004. doi:10.1016/j.bmcl.2004.01.091.

NIU, X. et al. δ -amyrone, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, exhibits anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* mice. **International Immunopharmacology**, v. 21, p.112-118, 2014.

OECD. Test no. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris: **OECD Publishing**, 2002. doi: 10.1787/9789264071001-en.

OKOYE, N.N et al. Beta-amyrin and alfa-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. **Pharmaceutical Biology**, v.52, n.11, p. 1478-86, 2014.

OLIVEIRA, C. et al. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptina and triglycerides. *Peptides*. **New York**. v. 51, p. 46-53, 2014.

OLIVEIRA, F.A. et al. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 98, n.1-2, p.103-108, 2005a.

OLIVEIRA, F.A. et al. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sciences**, v. 77, n.23, p. 2942-52, 2005b.

OLIVEIRA, F.A. et al. Pentacyclic triterpenoids, α - and β -amyrin, suppress the scratching behavior in mouse model of pruritus. **Pharmacology, Biochemical and Behavior**, v.78, n.4, p.719-725, 2004a.

OLIVEIRA, F.A. et al. Gastroprotective effect of the mixture of α and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v. 70, n.8, p.780-82, 2004b.

OLTMAN, C. L. et al. Progression of coronary and mesenteric: vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v.291, H1780–H1787, 2006. doi:10.1152/ajpheart.01297.2005.

OTUKI, M.F. et al. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α - e β -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v.507, n.1-3, p.253-259, 2005a.

OTUKI, M.F. et al. Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, n.1, 2005b. doi:10.1124/jpet.104.071779.

PARK S. J. et al. Amyrin attenuates scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**.v.37, n.7, p. 1207–1213, 2014.

PARMAR, S.K. Neuropharmacological effects of triterpenoids. **Phytopharmacology**, v.4, n.2, p. 354-372, 2013.

PEREIRA, R. A relação entre dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2. **Cadernos UniFoA**, n.17, 2011.

RAMIREZ-ESPINOSA, J.J. et al. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTPe1B: in vitro, in silico, and in vivo approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2243-2251, 2011. doi:10.1016/j.ejmech.2011.03.005.

RAO, V. S. et al. Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from *Sambucus australis*, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p.1375-1382, 2011.

RODRIGUES, V.G. et al. *Salacia crassifolia* (Celastraceae): chemical constituents and antimicrobial activity. **Quim. Nova**, v. 38, N. 2, 237-242, 2015. doi:10.5935/0100-4042.20150001.

ROSA, V. D. et al. Nível de ácido úrico como biomarcador diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n.1, supl, p. 159-168, 2015. doi:10.5433/1679-0367.2014v35n2p159.

RÜDIGER, A. L. **Estudo fitoquímico do óleo-resina exsudado de espécies de Burseraceae**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil: UFAM, 2008.

RÜDIGER, A. L. **Estudo fitoquímico e citotóxico de oleorresinas de Burseraceae**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil: UFAM, 2012.

RÜDIGER, A.L. et al. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Review**, v.1, p.93-104, 2007.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238–254, 2010.

SANTOS, F. A. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in health and disease**, v.11, p.98, 2012.

SASIDHARAN, S.R. et al. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. **BioMed Research International**, p.1-9, 2013.

SEINO, Y. et al. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. The Committee of the Japan Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Investigation**, v.1, n.5, 2010.

SHIN, J.A et al. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretation and usefulness. **Journal of Diabetes Investigation**, v.4, n.4, 2013.

SHIH, M.F., CHERNG, J.Y. Reduction of adhesion molecule production and alteration of eNOS and endothelin-1 mRNA expression in endothelium by *Euphorbia hirta* L. through its beneficial β -amyrin molecule. **Molecules**, vol 19, p. 10534- 10545, 2014.

SILVA, A. S. R. da et al. Exercise intensity, inflammatory signaling and insulin resistance in obese rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. Hagerstown, v.42, n. 12, p. 2180-2188, 2010.

SIMMONS, R.K et al. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. **Diabetologia**, 2009. doi: 10.1007/500125-009-1620-4.

SHARMA, K.; MCCUE, P.; DUNN, S. R. Diabetic kidney disease in the *db/db* mouse. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v.284, p. 1138-1144, 2003. doi: 10.1152/ajprenal.00315.2002.

SHARMA, V.K.; MAZUMDAR, B. Feasibility and characterization of gummy exudates of *Cochlospermum religiosum* as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**.v. 50,p. 776–786,2013.

SIANI, A. C. Chemical composition of south american burseraceae non-volatile oleoresins and preliminary solubility assessment of their commercial blend. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 529–539, 2012. doi: 10.1002/pca.2351.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT,S.; LUNDER, M.; JANES, D. STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytother. Res.** 2009, v.23, 874–877.

SMITH, B.T. et al. Life-Course Socioeconomic Position and Type 2 Diabetes Mellitus The Framingham Offspring Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 4, doi: 10.1093/aje/kwq379.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA- SBC. I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n.1, supl.3, p.1-40, 2013a.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA- SBC. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.4, supl.1, p.1-22, 2013b.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES-SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: **AC Farmacêutica**, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA-SBP. Departamento de Nutrologia. **Obesidade na infância e adolescência: manual de orientação**. 2.ed. São Paulo: SBP, 2012.

SOLDI, C. et al. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3377-3386, 2008.

SPERETTA, G.F. et al. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista HUPE**, v.13, n.1, p. 61-69, 2014.

SOUZA, P.M. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Brasília, Brasil: UnB, 2011.

STENESTRAND, U. et al. Safety and efficacy of drug-eluting vs. bare metal stents in patients with diabetes mellitus: longterm follow-up in the Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry (SCAAR). **European Heart Journal**, v.31, p. 177–186, 2010. doi:10.1093/eurheartj/ehp424.

STEPP, D.W. et al. Low-flow vascular remodeling in the metabolic syndrome X. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 286, p. H964–H970, 2004. doi: 10.1152/ajpheart.00836.2003.

SUBRAMANIAN, R et al. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n.2, p. 391-398, 2008.

SUSUNAGA, G. S. **Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade do Amazonas. Manaus, Brasil: UFAM, 1996.

SURWIT, R. S; KUHN, C. M.; COCHRANE, C.; J.A. MCCUBBIN, FEINGLOS, M. N. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. **Diabetes**, v. 37, n.9, p. 1163-1167, 1988. doi:10.2337/diab.37.9.1163

VERMA, R.K; GUPTA, M.M. Lipid constituents of *Tridax procumbens*. **Phytochemistry**, v. 27, n.2, p.459-463, 1988.

VIEIRA JUNIOR, G.M et al. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v.28, n.2, p.183-187, 2005.

VIEIRA, Sonia – **Bioestatística, Tópicos Avançados** – Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

VOLPATO, H. et al. The effects of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4- tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* are mediated by mitochondrial dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–7, 2013. doi: 10.1155/2013/874367.

WEIDNER, C. et al. Amorfrutins are potente antidiabetic dietary natural products. **Proceedings of National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 109, n.19, 2012.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. **WHO technical report series 894**. Geneva, Switzerland: WHO, 1999.

WILDING, J.P. Leptin and the control of obesity. **Current Opinion in Pharmacology**, Londres, v.1, n. 6, p. 656-661, 2001.

YANG, Z. et al. Bioassay-guided screening and isolation of α -glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*. **Food Chemistry**, v.131, p. 617–625, 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.040.

YU, M. H. et al. Triterpenoids and α -glucosidase inhibitory constituents from *Salacia hainanensis*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 143-148, 2014. doi:10.1016/j.fitote.2014.07.016.

ZHANG, X. et al. Association between diabetes mellitus with metabolic syndrome and diabetic microangiopathy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.8, p. 1867-1873, 2014. doi:10.3892/etm.2014.1992.

ZHANG, B. et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**, v.172, 2015. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.144.

ANEXO

Certificado de aprovação no. 014/2014 CEUA/UFAM



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

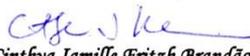


UFAM

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 014/2014-CEUA/UFAM, intitulado como “Atividade hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade dos tripéris α e β amirona isolados a partir de *Protium* sp” sob responsabilidade de **Rosilene Gomes da Silva Ferreira** sob orientação do Prof. Dr Emerson Silva Lima está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFAM) em Reunião ocorrida em 22/01/2015.

Manaus, 23 de janeiro de 2015.


Profa. Dra. Cinthya Lamille Fritzh Brandão de Oliveira
Presidente da CEUA/UFAM