

## ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE DE DUAS CULTIVARES DE AMORA-PRETA (*Rubus* spp.)

PATRICK DIAS DAS NEVES<sup>1</sup>; TAIANE MOTA CAMARGO<sup>2</sup>; HELEN CRISTINA DOS SANTOS HACKBART<sup>2</sup>; MÁRCIA VIZZOTTO<sup>2</sup>; MARJANA RADÜNZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas– patrickdiasdasneves11@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas– taianemcamargo@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas– helenhackbart@gmail.com

<sup>2</sup>EMBRAPA Clima Temperado– marcia.vizzotto@embrapa.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas– marjanaradunz@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus tipo II (DMII) é uma doença crônica, não transmissível, com alto grau de morbimortalidade, e é caracterizada por um processo hiperglicêmico resultante de deformidades na secreção e/ou na ação da insulina (SBD, 2016). Atuando diretamente na modulação da DMII, as enzimas digestivas são responsáveis pelo metabolismo de compostos glicoconjugados, onde a  $\alpha$ -amilase promove a hidrólise de polissacarídeos e, a  $\alpha$ -glicosidase de dissacarídeos (YAMAGISHI et al., 2009).

A inibição parcial das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase pode ser uma alternativa promissora para o controle da DMII, pois promove o retardo da absorção da glicose no intestino. Hoje em dia, a Acarbose é um medicamento anti-hiperglicemiante disponível no mercado, e que atua na inibição destas enzimas, entretanto, este fármaco apresenta múltiplos efeitos adversos, entre eles, flatulência e distensão abdominal (JAIN & SARAF, 2010, OBOH et al., 2011; YIN et al., 2014). Neste sentido, são necessárias pesquisas que busquem alternativas naturais para a inibição destas enzimas, sem promover desconfortos gastrointestinais como o medicamento utilizado atualmente.

A amora-preta faz parte de um amplo grupo de plantas do gênero *Rubus*, que pertence à família Rosaceae, e são extensivamente investigadas devido as suas propriedades biológicas e fitoquímicas. Dentre seus constituintes, as amoreiras contêm o composto químico 1-desoxinojirimicina (DNJ), um alcalóide piperidina, conhecido por ser um iminoaçúcar, por conseguinte, um dos mais potentes inibidores da  $\alpha$ -glicosidase, além de ser rica em compostos fenólicos (ERUYGUR & DURALC, 2019). Tendo em vista que o chá de amoreiras é utilizado popularmente para prevenir e tratar a diabetes, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação anti-hiperglicemiante, de extratos etanólicos obtidos dos frutos de amora-preta, das cultivares Tupy e Xingú, e o fármaco Acarbose, utilizado como controle, frente às enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E PREPARO DOS EXTRATOS

Os frutos das cultivares Tupy e Xingú, foram obtidos durante o ciclo produtivo do ano de 2017, no campo experimental da Embrapa Clima Temperado (RS, Brasil). Após a coleta, os frutos foram higienizados em água corrente e armazenados em freezer (- 20°C). Para as análises, as amostras foram liofilizadas

(Liotop K108, Liobras SP) por 48 horas e pulverizadas utilizando moinho de bolas (MA 350, Marconi SP).

O extrato foi preparado em um dispersor digital (Ultra Turrax, IKA® T 18 D, Staufen, DE) utilizando etanol 98 %, em seguida, foram filtrados utilizando papel filtro qualitativo (Whatman™ Nº 4). Ao final, obteve-se dois extratos etanólicos distintos, amora-preta cultivar Tupy e amora-preta cultivar Xingú, com concentrações de 500 mg/mL (p/v) cada.

## 2.2 ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE

A atividade anti-hiperglicemiante frente à enzima  $\alpha$ -amilase foi determinada empregando o procedimento descrito por SATOH et al. (2015) com adaptações. Inicialmente, foram adicionados a microplaca de poliestireno de 96 poços, 15  $\mu$ L de extrato etanólico (500 mg/mL), 50  $\mu$ L de solução tampão fosfato (pH 7,0) e 12,5  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática (241,71 U/mL, Sigma-Aldrich, Missouri EUA), seguido de incubação durante 5 minutos a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 62,5  $\mu$ L de amido solúvel (substrato) e incubado por 15 minutos a 37°C, após este tempo, a reação foi interrompida adicionando 12,5  $\mu$ L de ácido clorídrico 1,0 M (Sigma-Aldrich, Missouri EUA). Para leitura das absorvâncias foi realizada a reação colorimétrica adicionando aos poços 25  $\mu$ L do reagente de Lugol (iodo 0,005 M; iodeto de potássio 0,005 M), previamente preparado, e por fim, realizada a leitura no comprimento de onda de 690 nm, utilizando espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Califórnia EUA). A aquisição e análise de dados das absorvâncias foi realizada utilizando o programa SoftMax® Pro 6 (Versão 6.3 Molecular Devices, Califórnia EUA). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A atividade anti-hiperglicemiante frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase foi determinada utilizando o procedimento descrito por VINHOLES et al. (2011) com adaptações. Inicialmente, foram adicionados a microplaca de poliestireno de 96 poços, 10  $\mu$ L de extrato etanólico (500 mg/mL) e 50  $\mu$ L de substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, diluído em tampão fosfato pH 7,0, (3,25 mM, Sigma-Aldrich, Missouri EUA). Logo, se adicionou 50  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -glicosidase, diluída em tampão fosfato pH 7,0 (9,37 U/mL, Sigma-Aldrich, Missouri EUA), seguido de incubação durante 10 minutos a 37 °C. Passados os 10 minutos foi realizada a leitura no comprimento de onda de 405 nm, utilizando espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Califórnia EUA). A aquisição e análise de dados das absorvâncias foi realizada utilizando o programa SoftMax® Pro 6 (Versão 6.3 Molecular Devices, Califórnia EUA). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

O fármaco Acarbose foi utilizado como controle nas análises de atividade anti-hiperglicemiante frente às enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, EUA). Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA com comparação de médias por meio do teste de Tukey a um nível de significância de 5% comparando as atividades (IC<sub>25</sub>) dos extratos de amora-preta em relação às enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e fármaco Acarbose. E os resultados para cada cultivar, Tupy e Xingú, separadamente foram submetidos à análise de variância ANOVA usando o teste t de Student a um nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da ação anti-hiperglicemiante, expressos em inibição de 25 % de atividade enzimática (IC<sub>25</sub>) para a enzima alfa-amilase e 50% para atividade enzimática (IC<sub>50</sub>) para alfa-glicosidase, estão ilustrados na Tabela 1. Observa-se que para cultivar Tupy a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase foi 7 vezes maior do que o fármaco controle, enquanto que a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foi 17,8 vezes menor do que a Acarbose. Para cultivar Xingú, a inibição de ambas enzimas foram inferiores ao fármaco, sendo a inibição da  $\alpha$ -amilase 32,7 vezes e da  $\alpha$ -glicosidase 9,8 vezes menor que a Acarbose.

A comparação das diferentes cultivares e da Acarbose em relação a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase, mostrou que não houve diferença significativa entre a cultivar Tupy e o controle (Acarbose), num intervalo de confiança de 95 %, enquanto que, para a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, em relação aos diferentes cultivares e a Acarbose, houve diferença significativa em todos os testes.

A comparação das inibições das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, realizadas pelo teste t-Student, apresentaram diferença significativa, em um intervalo de confiança de 95 %, para todos os testes realizados. A inibição da  $\alpha$ -amilase foi 2,4 vezes menor que a  $\alpha$ -glicosidase para o fármaco controle Acarbose. O mesmo perfil é observado na cultivar Tupy, onde a inibição da  $\alpha$ -amilase foi 300 vezes menor que a inibição da  $\alpha$ -glicosidase. No entanto, para a cultivar Xingú, a inibição da  $\alpha$ -amilase foi 1,4 vezes maior que a inibição da  $\alpha$ -glicosidase.

**Tabela 1.** Atividade anti-hiperglicemiante das cultivares de amora-preta (Tupy e Xingú) frente as enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

	IC <sub>25</sub>	IC <sub>50</sub>
	$\alpha$ -amilase (mg/MI)	$\alpha$ -glicosidase
Tupy	1,0 $\pm$ 0,16 <sup>aAs</sup>	301,6 $\pm$ 2,9 <sup>bAs</sup>
Xingú	228,2 $\pm$ 5,1 <sup>aBs</sup>	166,6 $\pm$ 3,3 <sup>bBs</sup>
Acarbose*	7,1 $\pm$ 0,22 <sup>aAs</sup>	16,9 $\pm$ 0,9 <sup>bCs</sup>

\*Médias aritméticas simples (n=3)  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras minúsculas na linha diferem entre si, comparando as enzimas, e, diferentes letras maiúsculas na coluna diferem entre si, comparando as cultivares e a Acarbose, pelo teste de Tukey (p<0,05).

\*s (significativo) pelo teste t-Student (p<0,05) comparando as enzimas em cada cultivar.

Sendo assim, a cultivar Tupy mostrou-se promissora para a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase, apresentando melhores resultados do que o medicamento. Eruygu e Duralc (2019) relatam que essa propriedade das amoras-pretas está relacionada ao iminoaçúcar 1-desoxinojirimicina (DNJ), sendo este forte inibidor destas enzimas.

### 4. CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos de amora-preta, das cultivares Tupy e Xingú, mostraram-se eficazes na atividade anti-hiperglicemiante frente as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ERUYGUR, N.; DURAL, E. Determination of 1-Deoxynojirimycin by a developed and validated HPLC-FLD method and assessment of In-vitro antioxidant,  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity in mulberry varieties from Turkey. **Phytomedicine**, v. 53, p. 234–242, 2019.

JAIN, S.; SARAF, S. Type 2 diabetes mellitus – its global prevalence and therapeutic strategies. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 4, p. 48–56, 2010.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A. O.; FALOYE, Y. M. Effect of Combination on the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activities *In Vitro*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1152–1158, 2011.

SATOH, T.; IGARASHI, M.; YAMADA, S.; TAKAHASHI, N.; WATANABE, K. Inhibitory effect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 147–155, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015 – 2016). Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>.

VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, P. B.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; PINHO, P. G. D.; FERRERES, F. *In vitro* studies to assess the antidiabetic, anticholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 454–462, 2011.

YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3, p. 136-174, 2014.