

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

PATRICK DIAS DAS NEVES¹; TAIANE MOTA CAMARGO²; HELEN CRISTINA DOS SANTOS HACKBART²; MÁRCIA VIZZOTTO²; MARJANA RADÜNZ³

¹*Universidade Federal de Pelotas– patrickdiasdasneves11@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas– taianemcamargo@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas– helenhackbart@gmail.com*

²*EMBRAPA Clima Temperado– marcia.vizzotto@embrapa.br*

³*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 α -amilase promove a hidrólise de polissacarídeos e, a α -glicosidase de dissacarídeos (YAMAGISHI et al., 2009).

A inibição parcial das enzimas α -amilase e α -glicosidase pode ser uma alternativa promissora para o controle da DMII, pois promove o retardamento 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 às suas propriedades biológicas e fitoquímicas. Dentre seus constituintes, as amoreiras contêm o composto químico 1-desoxinojirimicina (DNJ), um alcalóide piperidina, conhecido por ser um imino açúcar, por conseguinte, um dos mais potentes inibidores da α -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 α -amilase e α -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 lyophilizadas



(Liotor 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 α -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 μ L de extrato etanólico (500 mg/mL), 50 μ L de solução tampão fosfato (pH 7,0) e 12,5 μ L da enzima α -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 μ L de amido solúvel (substrato) e incubado por 15 minutos a 37°C, após este tempo, a reação foi interrompida adicionando 12,5 μ L de ácido clorídrico 1,0 M (Sigma-Aldrich, Missouri EUA). Para leitura das absorvâncias foi realizada a reação colorimétrica adicionando aos poços 25 μ 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 α -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 μ L de extrato etanólico (500 mg/mL) e 50 μ L de substrato p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo, diluído em tampão fosfato pH 7,0, (3,25 mM, Sigma-Aldrich, Missouri EUA). Logo, se adicionou 50 μ L da enzima α -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 α -amilase e α -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_{25}) dos extratos de amora-preta em relação às enzimas α -amilase, α -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_{25}) para a enzima alfa-amilase e 50% para atividade enzimática (IC_{50}) para alfa-glicosidase, estão ilustrados na Tabela 1. Observa-se que para cultivar Tupy a inibição da enzima α -amilase foi 7 vezes maior do que o fármaco controle, enquanto que a inibição da enzima α -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 α -amilase 32,7 vezes e da α -glicosidase 9,8 vezes menor que a Acarbose.

A comparação das diferentes cultivares e da Acarbose em relação a inibição da enzima α -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 α -glicosidase, em relação aos diferentes cultivares e a Acarbose, houve diferença significativa em todos os testes.

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

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

	IC_{25}	IC_{50}
	α -amilase (mg/mL)	α -glicosidase
Tupy	$1,0 \pm 0,16^{aAs}$	$301,6 \pm 2,9^{bAs}$
Xingú	$228,2 \pm 5,1^{aBs}$	$166,6 \pm 3,3^{bBs}$
Acarbose*	$7,1 \pm 0,22^{aAs}$	$16,9 \pm 0,9^{bCs}$

*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 α -amilase, apresentando melhores resultados do que o medicamento. Eruygur e Duralc (2019) relatam que essa propriedade das amoras-pretas está relacionada ao iminoacúcar 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 α -amilase e α -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, α -Amylase and α -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 α -Amylase and α -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. Inhibitoryeffect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal α -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. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3, p. 136-174, 2014.