

## POTENCIAL AHIPERGLICEMIANTE *IN VITRO* DE ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA-DOCE (*Citrus aurantium* var. *dulcis*)

TAIANE MOTA CAMARGO<sup>1</sup>; MARJANA RADÜNZ<sup>2</sup>; ELIEZER ÁVILA GANDRA<sup>3</sup>; ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE<sup>3</sup>; ANDRÉ LUIZ RADÜNZ<sup>3</sup>; PATRÍCIA SILVA DIAZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PPGCTA – UFPel- taianemcamargo@gmail.com

<sup>2</sup> PPGCTA – UFPel- marjanaradunz@gmail.com

<sup>3</sup> CCQFA – UFPel – gandraea@hotmail.com

<sup>3</sup> PPGCTA – UFPel - elessandrad@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul – andre.radunz@uffs.edu.br

<sup>3</sup> CDTEc – UFPel – bilicadiaz@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A *Diabetes mellitus* (DM) é classificada como uma doença crônica não-transmissível, possuindo como principal consequência a hiperglicemia, que é resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Nos últimos anos, a DM tem se tornado um sério e crescente problema de saúde pública, sendo que a *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é a forma da doença prevalente, atingindo 300 milhões de indivíduos no mundo. Cerca de 20% dos adultos entre 65 e 76 anos já possuem diagnóstico de DM2. No Brasil, 9,7% das pessoas com mais de 35 anos são diabéticas (COBAS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Dentre as formas de tratamento da DM2 está a inibição das enzimas digestivas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase, enzimas que atuam no sistema digestório hidrolisando moléculas de glicose e amido. Quando o alimento é ingerido e parte destas enzimas estão inibidas, parte das moléculas não são quebradas, retardando assim a absorção e evitando o aumento brusco de glicose pós-prandial (após as refeições) no organismo. Existem muitos medicamentos inibidores de glicosidades no mercado, como por exemplo a acarbose, porém os mesmos ocasionam diversos efeitos colaterais, incluindo dores abdominais, flatulência e diarreia. Assim, se faz necessário o estudo de compostos bioativos presentes naturalmente em alimentos, que sejam capazes de promover este efeito inibitório, minimizando os efeitos adversos (YAMAGISHI et al., 2009; SALES et al., 2012; WEINERT et al., 2015)

O óleo essencial de laranja-doce é rico em compostos bioativos, com destaque para o limoneno, podendo ser um potencial inibidor destas enzimas digestivas. Estudos demonstram que o mesmo possui atividades antimicrobianas e antioxidantes, porém, são escassos os estudos que avaliem o potencial anti-hiperglicemiante, tornando assim importante o estudo deste parâmetro (ARAÚJO et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anti-hiperglicemiante *in vitro* do óleo essencial de laranja-doce, através capacidade de inibição das enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

### 2. METODOLOGIA

O óleo essencial de laranja-doce (CAS 8008-57-9, Ferquima, Brazil) foi obtido comercialmente. O mesmo foi previamente caracterizado quanto a sua

composição por cromatografia gasosa, possuindo em sua composição um composto majoritário, o D-limoneno (96%).

A avaliação do potencial de inibição da  $\alpha$ -amilase foi determinada de acordo com o método proposto por SATOH et al. (2015) com modificações. Para isto foram pipetados em microplacas de 96 poços, 60  $\mu$ L do óleo essencial de laranja-doce, 200  $\mu$ L de tampão fosfato (pH 7,0) e 50  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática (241,71 U mL<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, USA), e em seguida as placas foram incubadas por 5 minutos à 37 °C. Após, adicionou-se 250  $\mu$ L de amido solúvel como substrato e incubados por 15 minutos à 37 °C. Posteriormente a reação adicionou-se 50  $\mu$ L de ácido clorídrico 1 M. Por fim, adicionou-se 100  $\mu$ L da solução de iodo (0,005 M) + iodeto de potássio (0,005 M). A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA) a um comprimento de onda de 690 nm.

A determinação da atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase foi avaliada utilizando o procedimento descrito por VINHOLES et al. (2011) com modificações. Para isto, em microplacas de 96 poços foram adicionados 10  $\mu$ L de óleo essencial de laranja-doce em 50  $\mu$ L de substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo 3,25 mM (diluído em tampão fosfato pH 7,0). Em seguida adicionou-se de 50  $\mu$ L da enzima (9,37 U mL<sup>-1</sup> diluída em tampão fosfato, pH 7,0) e a placa foi incubada a 37 °C por 10 min. Por fim, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA) na absorbância de 405 nm.

O medicamento acarbose foi utilizado como controle nas análises de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), usando o teste de Tukey com intervalos de significância de 5%, no software Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase são apresentados na Tabela 1. Observa-se que o óleo essencial de laranja-doce possui uma elevada inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, e uma inibição inferior da  $\alpha$ -amilase.

**Tabela 1.** Atividade anti-hiperglicemiante do óleo essencial de laranja-doce frente as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

Amostra	Inibição (%)	
	$\alpha$ -amilase	$\alpha$ -glicosidase
Laranja-doce	37.3Bb	95.4Aa
Acarbose*	70.7Aa	53.7Bb

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

\*Medicamento controle.

As enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase são consideradas como enzimas-chave no metabolismo dos açúcares. Os compostos bioativos podem atuar como inibidores de enzimas digestivas, e no caso da DM2, a inibição destas enzimas, principalmente a  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase, pode ser uma forma de tratamento e prevenção da doença. Estas enzimas atuam na absorção da glicose

nos enterócitos através de transportadores específicos, hidrolisando os carboidratos, para que estes sejam absorvidos na corrente sanguínea. A  $\alpha$ -amilase é responsável por hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da amilose e da amilopectina presentes no amido, e a  $\alpha$ -glicosidase é responsável pela hidrólise dos dissacarídeos, liberando duas moléculas de glicose para serem absorvidas na corrente sanguínea. Reduzir a quantidade de amido absorvida significa reduzir a quantidade de glicose absorvida no organismo, efeito este desejável para indivíduos portadores de DM2 (MELBY, et al., 2009; YAMAGISHI et al., 2009; WILLIAMSON, 2013).

Alguns autores relatam que uma inibição muito forte da  $\alpha$ -amilase pancreática pode ocasionar uma fermentação bacteriana dos carboidratos não digeríveis no cólon, efeito este indesejável, pois ocasiona efeitos adversos, como diarreia. Já uma inibição parcial ou total da  $\alpha$ -glicosidase reduz a taxa de digestão do amido e da sacarose, diminuindo a absorção das moléculas de glicose e frutose formadas, efeito este desejável para indivíduos portadores de DM2. Outro fator importante é que não é recomendável inibir totalmente as enzimas e evitar a absorção total de carboidratos, já que os mesmos são as principais fontes de energia no organismo (LEFEBVRE e SCHEEN, 1999; KIM et al., 2000; SOUZA, 2014). No presente estudo houve uma inibição moderada da  $\alpha$ -amilase (37,3%) e uma inibição forte da  $\alpha$ -glicosidase (95,4%), inibição esta maior que a inibição ocasionada pela acarbose, medicamento utilizado no tratamento da *diabetes mellitus* tipo 2, resultado este extremamente promissor considerando os parâmetros desejáveis de inibição, o que demonstra um potencial para que o mesmo seja utilizado, principalmente na indústria farmacêutica. Para isto, mais estudos são necessários, e a aplicação do mesmo *in vivo* pode comprovar tal eficácia.

#### 4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de laranja-doce mostrou ser um excelente inibidor das enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, apresentando uma inibição moderada da alfa-amilase e uma forte inibição da alfa-glicosidase, inibição esta mais forte do que a acarbose, medicamento utilizado no tratamento da doença. Estes resultados são muito interessantes e promissores no tratamento e prevenção da *diabetes mellitus* tipo 2. O mesmo possui potencial para ser utilizado na indústria farmacêutica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. S. F. et al. Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatin mixtures: Preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 143, p. 991-999, 2020.

COBAS, R. A. GOMES, M. B. Diabetes Mellitus. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, ano 9, 2010.

KIM, J. S.; KWON, C. S. SON, K. H. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2458-2461, 2000.

LEFEBVRE, P. J.; SCHEEN, A. J. Glucose metabolism and the postprandial state. **European journal of clinical investigation**, v. 29, p. 1-6, 1999.

MELBY, C; SCHMITH, S.; HICKEY, H. Alimentos funcionais, resistência insulínica e diabetes. IN: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos Funcionais. Viçosa: **Folha de Viçosa**, 2009, p. 159-184.

OLIVEIRA, P. P., FACHIN, S. M., TOZATTI, J., FERREIRA, M. C., & MARINHEIRO, L. P. F. Análise comparativa do risco de quedas entre pacientes com e sem diabetes mellitus tipo 2. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 58(2), 234-239, 2012.

SALES, P. M., SOUZA, P. M., SIMEONI, L. A., MAGALHÃES, P. O., SILVEIRA, D.  $\alpha$ -Amylase Inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 15 (1) 141-183, 2012.

SATOH, T. et al. 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.

SOUZA, R. L. A. Estudo da funcionalidade de espécies comestíveis do semiárido nordestino e estratégias para sua utilização como ingredientes para fins alimentícios. 2014. 145 f. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

VINHOLES, J. et al. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 454-462, 2011.

WEINERT, L. S; CAMARGO, E. G; SILVEIRO, S. P. Tratamento Medicamentoso da Hiperglicemia no Diabetes Mellitus Tipo 2. **Clinical & Biomedical Research**, v. 30, n. 4, 2015.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2013.

YAMAGISHI, S; MATSUI, T; UEDA, S; FUKAMI, K; OKUDA, S. Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. **Current Drug Metabolism**. n. 10, p. 159–163, 2009.