

<b>Evento</b>	XXI FEIRA DE INICIAÇÃO À INOVAÇÃO E AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO – FINOVA/2012
<b>Ano</b>	2012
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Potencial dos extratos liofilizados de folhas de batata doce de polpa roxa (Ipomea batatas) no tratamento metabólico da obesidade
<b>Autores</b>	MAYCON ANTONIO DE CESARE Rossana Rosa Porto BOLÍVAR BERTOLDO BANDEIRA Maciel Alencar Bruxel
<b>Orientador</b>	PAULO IVO HOMEM DE BITTENCOURT JUNIOR

# Potencial dos extratos liofilizados de folhas de batata doce de polpa roxa (*Ipomea batatas*) no tratamento metabólico da obesidade

**Bolsista:** Maycon Antonio de Cesare

**Orientador:** Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

## Introdução

Doenças de natureza inflamatória vêm mostrando um grande crescimento na população geral. Com isso, estudos com produtos naturais ricos em antocianinas e polifenóis ganham uma força maior, pois têm a característica de poder combater essas inflamações. Folhas de batata doce de polpa roxa (*Ipomea batatas*) apresentam grandes quantidades destas substâncias antioxidantes, porém não vêm sendo utilizadas como produto comestível, nem mesmo na forma de extratos concentrados, pois sua extração deve ser feita em meio muito ácido (pH ~ 1) usando-se metanol como solvente, o que torna este tipo de extrato muito tóxico. Uma nova técnica desenvolvida pelo grupo tem mostrado muita eficiência e baixa toxicidade, pois é realizada com suco de limão que possui alto poder de extração e ao mesmo tempo protege as substâncias de interesse. Assim, propusemos desenvolver e, se possível, patentear a nova técnica visando seu uso para tratamento metabólico de obesidades e diabetes tipo I e II, que são doenças inflamatórias.

## Folha de Batata Roxa



Exsiccala das folhas de batata roxa (*Ipomea batatas*). A) Cultivar 1 conhecida como cultivar Porto alegre, contendo a batata com epiderme e polpa roxa. B) Cultivar 2 conhecida como cultivar casca roxa por possuir a batata com casca roxa mas polpa branca. C) Cultivar 4, também chamada de cultivar japonesa, tem a batata com epiderme branca e polpa variando de branca para roxa.

A batata roxa está no rank das mais importantes colheitas do mundo, pelo grande consumo de batata. Entretanto, as folhas não vêm sendo usadas com muita frequência<sup>1</sup>, exceto em alguns países da Ásia<sup>2</sup>. Seu uso pode ser estimulado no momento em que houver uma forma de administração melhor ou mais palatável do que a da própria folha, sendo essa a utilizada pelas poucas culturas que a consomem atualmente. As folhas, por serem ricas em antocianinas (grupo de moléculas que causam a cor roxa na folha e na batata) e polifenóis apresentam um grande efeito benéfico sobre a saúde.

## Antocianinas

Antocianinas (do grego anthos = flor ekianos = azul) são uma classe de moléculas pertencentes ao um grande grupo chamado flavonoides. Elas fornecem as cores vermelho, roxo e azul de certas frutas, vegetais e grãos, dando uma melhor visibilidade (a insetos e aves) aos alimentos e ajudando na proteção da planta. Os vários estudos em animais com antocianinas vêm descrevendo seus efeitos benéficos sobre a saúde, como, por exemplo, proteção contra hipercolesterolemia/aterosclerose<sup>4</sup>, obesidade e hiperglicemia<sup>5</sup>, além do efeito antitumoral<sup>6</sup> e antioxidante<sup>7</sup>, dando, assim força a novas formas e métodos de tratamentos com essas substâncias.

## Polifenóis

Pertencem a uma classe de metabólitos secundários de plantas. Possuem baixo peso molecular e alta

solubilidade em água e estão sendo nominadas como promotores de saúde<sup>8</sup>, devido á sua ampla e benéfica atuação no combate e prevenção de patologias. Os polifenóis são encontrados em diversas frutas, como por exemplo, na maçã<sup>8</sup>, uva<sup>9</sup>, laranja<sup>10</sup> e até mesmo no café<sup>11</sup>.

## Extração de antocianinas e polifenóis

A extração normalmente é realizada com solventes orgânicos etanol, metanol, acetona, ácido acético entre outros<sup>12</sup>. Entretanto, o metanol é o que mostra maior eficiência na extração de antocianinas e polifenóis.

Então, para estimar a quantidade total desses metabólitos, as folhas foram separadas em roxas e verdes congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas para extração. Aproximadamente 0,1 g de amostras de quatro diferentes cultivares e cores de folhas de batata roxa foram pesadas e extraídas duas vezes com 1,00 mL de metanol a 80% (v/v) para polifenóis ou metanol HCl-1N 85% (v/v) para antocianinas. Após foram realizadas as dosagem de polifenol totais pelo método de Folin-Ciocalteu<sup>1</sup> (utilizando-se ácido gálico como padrão) e antocianinas totais, pelo método de diferencial de pH<sup>3</sup> e os valores estimados em termos de cloreto de cianidina. Os dados (abaixo) mostraram que a maior concentração de antocianinas está nas folhas roxas da cultivar 1 (coletadas na primavera – outubro).

Cultivar	Concentração em mg/100g folhas de batata roxa frescas							
	1		2		3		4	
Cor das folhas	Verde	Roxa	Verde	Roxa	Verde	Roxa	Verde	Roxa
Antocianina	0,79	20,33	0	2,5	0	7,91	0	6,49
Polifenóis	295,22	1.700,51	556,49	554,01	456,1	1.069,18	442,75	612,3

## Extração em suco de limão

A alta eficiência na extração com metanol apresenta um grande problema quando o extrato destinasse ao tratamento *in vivo*, pois é altamente tóxico. Para isso, devem ser realizadas outras operações de remoção do solvente e purificação o que aumenta a degradação das moléculas e o custo do processo, sendo esse o principal motivo do teste de um novo método de extração, utilizando como solvente água e suco de limão Taiti (*Citrus aurantifolia*) 1:10 (v/v), além do que o suco de limão possui uma grande variedade de substâncias antioxidante que devem ajudar na estabilidade do extrato.

Para testar-se a eficiência da extração em suco de limão em água 10% (v/v) foram realizadas quatro tipos de extrações (decoctos): (1) 0,3 g/mL extraída 1 vez por 10 min, (2) 0,3 g/mL extraída 1 vez por 15 min, (3) 0,6 g/mL extraída 2 vezes por 5 min cada, (4) 0,9 g/mL extraída 3 vezes por 2 min cada, todas elas a 100°C. Os tempos foram contados a partir da ebulição. A final, a concentração de 0,3 g de folha para 1 mL de suco de limão 10% é mantida. Folhas processadas folhas mistas (verdes e roxas), passando pelo processo de desintegração igual ao usado na extração com metanol, descrita a cima. Os resultados (abaixo) mostraram que a extração exaustiva (4) é mais eficiente para antocianinas, não mostrando diferença nos polifenóis.

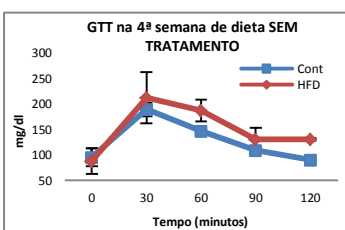
Extrações em suco de limão e água 1:10 de folhas de batata roxa frescas(mg/100g)				
Tipo da extração	(1)	(2)	(3)	(4)
Antocianinas	2,14	1,7	3,02	4,71
Polifenol	248,41	245,32	257,41	245,49

Após, os extratos foram secos por liofilização para evitar-se a degradação de moléculas sensíveis á temperatura,

como as antocianinas, obtendo assim o extrato seco que, após reconstituição, foi administrado aos animais (abaixo).

### Modelo de camundongos obesos

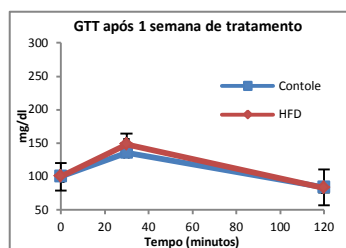
Camundongos machos **B6-129SF2/J** (The Jackson Laboratory) com 4 semanas de idade foram distribuídos em dois grupos: HFD (dieta de alta gordura), que foram tratados com ração com alto teor de gordura (preparada com a ração Nuvital CR1 enriquecida com banha de porco, caseína, pó-tetra (mistura de pó de osso, pó de ostra, pó de carne e pó de sangue, com aproximadamente 2,36 kJ/g) e Aminomix (suplementação de aminoácidos e vitaminas, da FIRMA Forte Vetnil), ajustada para que 58% das calorias sejam em gordura, 22% em proteína e níveis de sais minerais e vitaminas se mantenham) e o controles, tratados com ração Nuvital CR1. Os animais, ao longo do tratamento, não mostraram muita diferença de consumo calórico por peso (grupo controle: 35,17±1,14 e HFD: 32,90±0,96 kJ/dia/10g).



Na 4ª semana de dieta, um GTT (teste de tolerância à glicose) foi realizado para avaliar a capacidade de utilização de glicose. Observou-se que, no grupo HFD, a queda da glicemia é mais

lenta do que a do controle, o que caracteriza o início de um quadro de diabetes tipo 2.

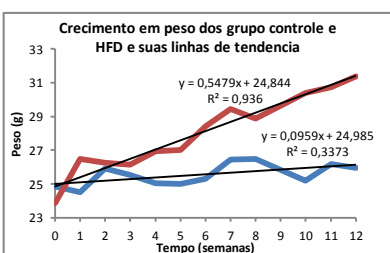
Após as quatro semanas de dieta, os grupos continuaram recebendo suas rações, mas começaram a receber tratamento, por gavagem gástrica, com o extrato de folhas de batata roxa em suco de limão liofilizado e reconstituído com água Milli-Q no mesmo volume inicial. O extrato, após reconstituição possuía 9,19 µg/mL de antocianinas e 1,02 mg/mL de polifenóis. Como a dose administrada foi de 300 µL por dia, cada animal recebeu



2,76 µg de antocianinas e 306 µg de polifenóis por dia. Depois de uma semana de tratamento, foi realizado novamente um GTT e, ao compararem-se os dois, mesmo que com poucos dias de tratamento e dose

relativamente baixa, verificou-se uma melhora na captação de glicose.

Outros camundongos continuaram submetidos à dieta. Na 12ª semanas o consumo calórico não mostrou grande diferença (controle 25,10±0,67 e HFD 24,01±0,84 kJ/dia/10g). Entretanto, o crescimento em peso dos animais

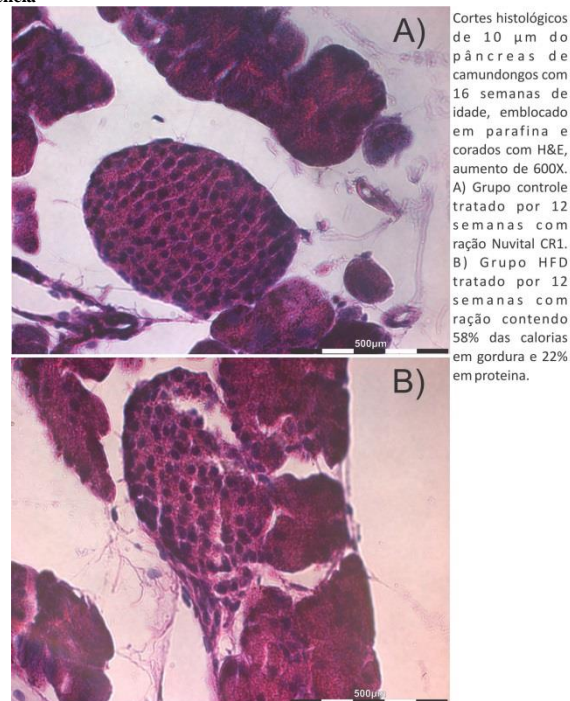


mostrou grande diferença: o grupo HFD engorda cerca de 6 vezes mais rápido, do que o grupo controle (figura ao lado). Ao final das 12 semanas de tratamento, os

camundongos foram submetidos a jejum de 12 h seguido de medida da glicemia; controles: 4,28±0,11 e HFD: 8,58±0,47 mmol/L. Isso indica, um aumento de ~ 96% da glicose sanguínea. Os animais foram mortos, as gorduras retiradas e pesadas, camundongo controle que pesava 24,51 g tinha

0,2338 g de gordura epididimal e 0,0319 g de retroperitoneal; camundongo HFD pensava 34,67 g tendo 1,0242 g de gordura epididimal e 0,3570 g da retroperitoneal. Também foi retirado o pâncreas para histologia visando análise estrutural das ilhotas de Langerhans, podendo-se verificar modificações típicas da obesidade, como deposição de amilóide, fibrose e infiltração de gordura<sup>13</sup>. O tecido foi retirado, fixado com paraformaldeído, desidratado e emblocado em parafina para ser cortado em micrótomo (10 µm) e corados com Hematoxilina e Eosina para microscopia óptica 600x.

### Referencia



- 1: Isabel S. Carvalho, Teresa Cavaco, Lara M. Carvalho, Paula Duque, Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves, *Food Chemistry* Pages 384-390.
- 2: Chen CM, Li SC, Chen CY, Au HK, Shih CK, Hsu CY, Liu JF. Constituents in purple sweet potato leaves inhibit in vitro angiogenesis with opposite effects ex vivo. *Nutrition*.
- 3: Farah S. Hosseinian, Wende Li, Trust Beta, Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat, *Food Chemistry* 916-924.
- 4: Wang, Yun; Yuhua Zhang.; Xiaoming Wang.; Yan Liu.; Min Xia., "Supplementation with Cyanidin-3-O-[Beta]-Glucoside Protects against Hypercholesterolemia-Mediated Endothelial Dysfunction and Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice1-3." *The Journal of Nutrition*. American Society for Nutritional Sciences. 2012. *HighBeam Research*. 13 Aug. 2012.
- 5: Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr*. 2125-30.
- 6: Eugenio Butelli, Lucilla Titta, Marco Giorgio, Hans-Peter Mock, Andrea Matros, Silke Peterrek, Elio G. W. M. Schijlen, Robert D. Hall, Arnaud G. Bovy, Jie Luo, and Cathie Martin. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, 1301-1308.
- 7: Han KH, Matsumoto A, Shimada K, Sekikawa M, Fukushima M. Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344 rats fed a cholesterol-rich diet. *Br J Nutr*. 914-21.
- 8: Maria Ceymann, Eva Arrigoni, Hans Schärer, Anna Bozzi Nising, Richard F. Hurrell, Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile, *Journal of Food Composition and Analysis*, 128-135.
- 9: Jissy K. Jacob, Fatima Hakimuddin, Gopinadhan Paliyath, Helen Fisher, Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines, *Food Research International* 419-428.
- 10: Hasim Kelebek, Ahmet Canbas, Serkan Selli, Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey, *Food Chemistry* 1710-1716.
- 11: 1: Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol* 187-98.
- 12: V.D. Truong, Z. Hu, R.L. Thompson, G.C. Yencho, K.V. Pecota, Pressurized liquid extraction and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato genotypes, *Journal of Food Composition and Analysis* 96-103.
- 13: Zhao HL, Lai FM, Tong PC, Zhong DR, Yang D, Tomlinson B, Chan JC. Prevalence and clinicopathological characteristics of islet amyloid in chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2759-66.