



MAÍSA LAMOUNIER MAGALHÃES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO SUCO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DA LARANJA SANGUÍNEA MORO (*Citrus
sinensis* (L.) Osbeck)**

LAVRAS – MG

2019

MAÍSA LAMOUNIER MAGALHÃES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO SUCO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DA LARANJA SANGUÍNEA MORO (*Citrus
sinensis* (L.) Osbeck)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos e Processos Fermentativos, para a obtenção do título de Doutor.

Profª. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientador(a)
Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa (*in memoriam*)
Co-orientador(a)
Profª. Dra. Kalyinka Gabriella do Livramento
Coorientador(a)

LAVRAS – MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Magalhães, Maísa Lamounier.

Atividades biológicas do suco e do óleo essencial da laranja
sanguínea Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) / Maísa Lamounier
Magalhães. - 2019.

135 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Raimundo Vicente de Sousa, Kalynka
Gabriela do Livramento.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. produtos naturais. 2. metabólitos secundários. 3. cianidina-3-
glicosídeo. I. Cardoso, Maria das Graças. II. de Sousa, Raimundo
Vicente. III. do Livramento, Kalynka Gabriela. IV. Título.

MAÍSA LAMOUNIER MAGALHÃES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO SUCO E DO ÓLEO ESSENCIAL DA LARANJA
SANGUÍNEA MORO (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)**

**BIOLOGICAL ACTIVITIES OF JUICE AND ESSENTIAL OIL OF SANGUÍNEA
MORO ORANGE (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos e Processos Fermentativos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 8 de março de 2019.

Dr. David Lee Nelson UFVJM

Dr. Luis Roberto Batista UFLA

Dr. Fabiano Guimarães Silva IF - Goiano

Dr. Wilder Douglas Santiago UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientador(a)

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa (*in memoriam*)

Co-orientador(a)

Profa. Dra. Kalynka Gabriella do Livramento

Co-orientador(a)

LAVRAS – MG

2019

*“A você minha filha, Maria Virgínia, que trouxe luz para minha vida e me mostrou o mais
puro e verdadeiro amor”*,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e estar sempre presente em minha vida;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior 001 (Capes), pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos disponibilizados para a condução dos experimentos;

À minha querida orientadora, professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela generosidade em compartilhar seu enorme conhecimento e experiência, pela confiança em mim depositada, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por acreditar nesta pesquisa. Agradeço, também, pela amizade que construímos no decorrer desses anos;

Ao meu coorientador, professor Dr. Raimundo Vicente de Sousa (*in memoriam*), pela oportunidade de desenvolver parte deste projeto em seu laboratório, pelos aprendizados, críticas e sugestões frequentes;

À minha coorientadora Kalyinka, pela amizade, paciência e disponibilidade em auxiliar nas análises;

Aos meus pais, Altair e Rosângela, irmãs e sobrinhas (o), pelo apoio incondicional de sempre, por todo o amor e carinho e pela presença constante durante todos os momentos desta caminhada;

À minha irmã, Marina, que foi minha grande parceira neste projeto e que me inspirou a correr atrás dos meus sonhos. Essa conquista também é sua!

Ao meu esposo, Alysson, pela paciência nos momentos de ausência, pelo incentivo e apoio, para que eu chegasse até aqui. Te amo!

Aos colegas dos Laboratórios de Óleos essenciais e Cachaça, pelo prazer da convivência diária e pelo auxílio na condução do experimento;

A todos os membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas;

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), por ceder as laranjas sanguíneas da variedade Moro;

Ao Biotério da UFLA, pela oportunidade de executar o experimento animal, bem como a sua eutanásia;

Aos professores e técnicos dos Laboratórios de Patologia Clínica, Citologia e Histologia e Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Veterinária, do Laboratório Central de Biologia Molecular do Departamento de Química e do Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Alimentos da UFLA, por abrirem as portas para que eu executasse as análises do experimento animal;

À professora Marisa Ionta e ao colega Guilherme, do Laboratório de Biologia Animal Integrativa da Universidade Federal de Alfnas (Unifal) pela contribuição nas análises de atividade antitumoral, citotoxicidade e genotoxicidade;

Ao colega Sérgio, pelo auxílio nas análises estatísticas;

As colegas Marina, Tamires, Eduarda, Camila, Cyntia e Natália, pela parceria durante a condução do exaustivo experimento animal. Muito obrigada pelos cuidados diários com os animais e por estarem presentes do início ao fim. Sem vocês, eu não teria conseguido!

À colega Diana, pela amizade que construímos. Obrigada por estar presente nos momentos mais difíceis do experimento animal;

À minha prima Stella, por estar sempre presente em todos os momentos desta jornada;

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos transmitidos no decorrer deste curso, em especial ao prof. Dr. Luiz Carlos;

A todos os demais que não foram citados, mas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

A laranja sanguínea da variedade Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é caracterizada pela coloração vermelho intenso da polpa e se diferencia das demais sanguíneas devido aos elevados teores de antocianinas que possui, sendo essa uma importante forma de enriquecimento do fruto. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a ativação das antocianinas presentes na laranja Moro por meio de refrigeração, verificar alterações metabólicas de ratos obesos e diabéticos tratados com o suco da laranja Moro refrigerada e avaliar as propriedades antioxidante, antifúngica, antitumoral, citotóxica e genotóxica do óleo essencial extraído das cascas das laranjas Moro refrigeradas. As laranjas foram armazenadas por 60 dias à temperatura de 4 e 8 °C, analisadas periodicamente quanto aos teores de compostos bioativos, antioxidantes e em relação aos parâmetros de qualidade. Inicialmente, a obesidade foi induzida por 42 dias e, posteriormente, o *Diabetes Mellitus*. Após esse período, os animais foram tratados com o suco da laranja Moro por 28 dias. Durante todo o experimento, monitoraram-se a massa corporal, o consumo de água, ração e suco, índice de Lee e glicemia. Após a eutanásia, foram realizadas análises histopatológicas, histológicas, bioquímicas e enzimática. O óleo essencial das cascas da laranja Moro foi obtido por hidrodestilação por 2 horas e caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/DIC). A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e β -caroteno. O potencial antifúngico sobre *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus flavus* foi avaliado pelo teste de difusão em disco. A avaliação citotóxica e antitumoral foi realizada por viabilidade celular sobre as linhagens derivadas de fibroblastos e linhagens neoplásicas de adenocarcinomas de pulmão, mama e melanoma, respectivamente. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio Cometa sobre linhagens derivadas de fibroblastos. A partir de 40 dias de armazenamento, observou-se um teor crescente de antocianinas até o fim do período em temperatura de 8 °C. O armazenamento influenciou positivamente, com exceção da vitamina C, nos teores de compostos fenólicos e antioxidantes, mas alterou a cor, acidez e pH dos frutos; entretanto, não impossibilitou seu uso comercial. A ingestão do suco reverteu a maioria das anormalidades metabólicas exibidas pelos ratos obesos, como perfil bioquímico e massa corporal. Entretanto, não foram observadas melhoras nos animais diabéticos e diabéticos obesos, tornando inviável esse modelo de tratamento nessas categorias de ratos. O óleo essencial da laranja apresentou alto rendimento de extração e é constituído majoritariamente pelo monoterpene limoneno, não apresentando atividade antioxidante pelos métodos avaliados, mas exibiu efeito antifúngico com concentração mínima inibitória de 125 μ L mL⁻¹ para ambos os fungos. O óleo essencial apresentou atividade antitumoral sobre as linhagens de melanoma e ausência de efeito citotóxico e genotóxico nas concentrações avaliadas. A utilização da laranja Moro apresentou resultados positivos relacionados às atividades biológicas do suco e do óleo essencial, possibilitando o cultivo e comercialização no Brasil. Sugere-se novos estudos em humanos, testando a eficácia terapêutica do suco no combate à obesidade e novos estudos em matrizes alimentares e medicamentos, testando os efeitos do óleo essencial como conservante natural e no tratamento de câncer.

Palavras-chave: produtos naturais; cianidina-3-glicosídeo; síndrome metabólica; metabólitos secundários.

GENERAL ABSTRACT

The blood orange of the Moro variety (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) is characterized by an intense red coloration of the pulp and differs from the other blood oranges because of the high levels of anthocyanins that it possesses, this being an important form of enrichment of the fruit. In this study, the objective was to evaluate the activation of anthocyanins present in Moro oranges by means of refrigeration, to verify metabolic alterations of obese and diabetic rats treated with the juice from refrigerated Moro oranges and to evaluate the antioxidant, antifungal, antitumor, cytotoxic and genotoxic properties of the essential oil extracted from the peels of the refrigerated Moro oranges. The oranges were stored for 60 days at 4 and 8 °C, and analyzed periodically for the content of bioactive compounds and antioxidants and in relation to quality parameters. Initially, obesity was induced over 42 days and, later, Diabetes Mellitus. After this period, the animals were treated with Moro orange juice for 28 days. Throughout the experiment, body mass, water, feed and juice consumption, Lee's index and glycemia were monitored. After euthanasia, histopathological, histological, biochemical and enzymatic analyses were performed. The essential oil from the Moro orange peel was obtained by hydrodistillation during 2 hours, and it was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and gas chromatography with a flame ionization detector (GC/FID). The antioxidant activity was evaluated by the DPPH, ABTS and β -carotene methods. The antifungal potential against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus flavus* was evaluated by the disc diffusion test. The cytotoxic and antitumoral evaluation was performed by the determination of cell viability on the fibroblast-derived lineages and neoplastic lines of lung, breast and melanoma adenocarcinomas, respectively. Genotoxicity was assessed by the Comet assay on fibroblast-derived lines. After 40 days of storage, a higher anthocyanin content was observed until the end of the period at a temperature of 8 °C. The storage had a positive influence on the levels of phenolic compounds and antioxidants, except for vitamin C, but it altered the color, acidity and pH of the fruits. However, it did not make commercial use impossible. Juice intake reversed most of the metabolic abnormalities exhibited by obese rats, such as biochemical profile and body mass. However, no improvement was observed in diabetic and obese diabetic animals, making this model of treatment inviable in these categories of rats. A high extraction yield of the essential oil from the oranges was obtained, and it was composed mainly of monoterpene limonene. No antioxidant activity was observed using the evaluated methods, but antifungal effect with a minimum inhibitory concentration of 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ for both fungi was found. The essential oil had no antitumor activity on the melanoma lines and an absence of cytotoxic and genotoxic effect in the evaluated concentrations. Presented positive results related to the biological activities of juice and essential oil were obtained with the use of Moro oranges, making possible the cultivation and commercialization in Brazil. New human studies are being performed involving the testing of the therapeutic efficacy of the juice in combating obesity, and new studies in food matrices and drugs to test the effects of the essential oil as a natural preservative and for the treatment of cancer are being planned.

Keywords: natural products; cyanide-3-glycoside; metabolic syndrome; secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1. Representação esquemática da via biossintética dos flavonoides.....	18
Figura 2. Estruturas dos flavonoides	20
Figura 3. Fórmula estrutural das antocianidinas	21
Figura 4. Segregação da leptina no tecido adiposo e geração de saciedade.....	26
Figura 5. Resposta fisiológica normal do controle da glicemia	29
Figura 6. Representação esquemática de painel de biomarcadores em síndrome metabólica	33
Figura 7. Interação de adipocitocinas, citocinas e marcadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento da síndrome metabólica e suas complicações	35
Figura 8. Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários	36
Figura 9. Estrutura química do isopreno	37
Figura 10. Biossíntese dos terpenoides	38
Figura 11. Biossíntese dos fenilpropanoides	39
Figura 12. Estrutura química do limoneno	40
Figura 13. Esquema do ciclo celular de uma célula cancerosa	45
Figura 14. Mecanismos de ação preventivos e anticancerígenos de óleos essenciais	46
Figura 15. Estruturas moleculares dos corantes: a) MTT; b) MTS.....	51
Figura 16. Estrutura de um cometa com cabeça e cauda.....	52

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1. Average values of the parameters of quality of the oranges Moro stored at different temperatures and times. The medium followed by distinct letters between the temperatures of 4 °C and 8 °C differs each other by Tukey test ($p < 0.05$)	73
Figura 2. Average values of bioactive analyses of oranges Moro stored at different temperatures and times. The medium followed by distinct letters between the temperatures of 4 °C and 8 °C differ each other by Tukey test ($p < 0.05$).....	75
Figura 3. (A) Standards: 1 – gallic acid; 2 – catechin; 3 – chlorogenic acid; 4 – caffeic acid; 5 – vanillin; 6 – p-coumaric acid; 7 – feruli acid; 8 – m-cumaric acid; 9 – trans-cinnamic; 10 – routine. (B) Orange juice phenolic compounds Moro stored at 60 days at 8 °C using HPLC-DAD/UV-Vis.....	77
Figura 4. PC1 PC2 biplot graphix x loadings and scores obtained in the analysis of bioactive oranges Moro stored at different temperatures and times.	79

ARTIGO 2

Figura 1. Efeito do suco da laranja Moro sobre a massa corporal de ratos obesos, diabéticos ou ambos ao longo de dez semanas ⁽¹⁾ . * diferença significativa ($p < 0,05$)	93
Figura 2. Parâmetros relativos ao consumo de ração de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro ao longo de dez semanas.* diferença significativa ...	96
Figura 3. Parâmetros relativos ao consumo de água de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro ao longo de seis semanas.* diferença significativa ...	97
Figura 4. Parâmetros relativos ao consumo de suco da laranja Moro de ratos obesos, diabéticos ou ambos ao longo de quatro semanas. * diferença significativa.....	98
Figura 5. Parâmetros relativos à glicemia de ratos diabéticos e diabéticos e obesos.....	99
Figura 6. Parâmetros relativos à densidade dos tecidos adiposos retroperitoneal e perirenal de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro	102
Figura 7. Parâmetros relativos ao diâmetro dos tecidos adiposos retroperitoneal e perirenal de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro.....	102
Figura 8. Parâmetros relativos à área dos tecidos adiposos retroperitoneal e perirenal de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro.....	103

ARTIGO 3

Figura 1. Estruturas químicas dos componentes do óleo essencial da laranja Moro: (A) α -pineno; (B) sabineno; (C) mirceno; (D) limoneno	121
Figura 2. Estudo de citotoxicidade diante da linhagem CCD-1059Sk após tratamento por 48 horas com diferentes concentrações de óleo essencial da laranja Moro	123
Figura 3. Estudo de genotoxicidade diante da linhagem CCD-1059Sk após tratamento por 48 horas com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo essencial da laranja Moro.....	124
Figura 4. Viabilidade celular das linhagens A549, MCF-7 e HT-144, após tratamento por 48 horas com óleo essencial da laranja Moro.....	125

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1. Nome, efeito e mecanismos de ação dos componentes da laranja sanguínea	23
Tabela 2. Critérios para diagnóstico da síndrome metabólica.....	34

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 2

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.....	87
Tabela 2. Efeito do suco da laranja Moro sobre a massa corporal de ratos obesos, diabéticos ou ambos ⁽¹⁾	93
Tabela 3. Efeito do suco da laranja Moro sobre parâmetros bioquímicos e enzimáticos de ratos obesos, diabéticos ou ambos ⁽¹⁾	105

ARTIGO 3

Tabela 1. Composição química do óleo essencial da laranja Moro	121
Tabela 2. Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial da laranja Moro sobre os fungos filamentosos <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	126

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4CL	hidroxicinamoil CoA ligase
1O₂	oxigênio singlete
ACC	acetil-CoA-carboxilase
AdipoQ	adiponectina
AHA	American Heart Association
AKT	proteína quinase B
ALT	alanina aminotransferase
AMPK	adenosina monofosfato
ANS	antocianidina sintase
ApoB	apolipoproteína B
AST	aspartato aminotransferase
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
C3G	cianidina-3-glicosídeo
C4H	cinamato 4-hidroxilase
CDK7	quinase dependente de ciclina
GC/FID	cromatografia gasosa com detector por ionização de chama
GC/MS	cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
CHI	chalcona isomerizada
CHS	chalcona sintase
CM1	chorismato mutase
CMI	concentração mínima inibitória
COX-2	ciclo-oxigenase-2
CT	triglicerídeos
CytC	citocromo C
DCV	doença cardiovascular
DFR	di-hidroflavonol 4-redutase
DHF	di-hidroflavonóis
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DMAPP	dimetilalil difosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EGIR	grupo europeu para o estudo da resistência à insulina
EH	epóxido hidrolase
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
F30H	flavonoides 30-hidroxilase
F3050H	flavonoide 3050-hidroxilase
F3H	flavonona-3-hidroxilase
FLS	flavonol sintase
FoxO1	forkhead box O1
G6Pase	glucose-6-fosfatase
GLUT-4	transportador de glicose tipo 4
GGT	gama-glutamiltransferase
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HDL-c	lipoproteína de alta densidade
HIF-1α	fator induzido por hipóxia 1 α

HMG-CoA	redutase 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
HO[•]	radical hidroxila
HPLC	high performance liquid chromatography
HTN	hipertensão
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IMC	índice de massa corporal
IPP	isopentenil difosfato
IRS	substrato do receptor de insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LDL-c	lipoproteína de baixa densidade
Lep	leptina
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1
MDM2	minuto duplo de murino 2
MEA	agar extract malt
MMP	matriz metaloproteinase
MN	micronúcleo
mTOR	alvo mecanicista do fármaco rapamicina
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NAFLD/NASH	doença hepática gordurosa não alcoólica/esteato-hepatite não alcoólica
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III
O₂^{•-}	ânion superóxido
OTA	ocratoxina A
OxLDL	LDL oxidado
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio
PAL	fenilalanina amônia-liase
PAS	pressão arterial sistólica
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PG	prostaglandina
PKB	proteína quinase B
PON-1	paraoxonase
PPAR-γ	receptores ativados por proliferador de peroxissoma
pPDK1	proteína piruvato desidrogenase quinase 1
Pré-BNALM-6	sangue humano, leucemia, células pré-b
QR	quinona redutase
ROO[•]	radical peroxila
SM	síndrome metabólica
TGs	triglicerídeos
TNF-α	fator de necrose tumoral
TxA2	tromboxano A2
UCP2	proteína desacopladora mitocondrial 2
UFGT	UDP-glicose-flavonóide 3-O-glicosiltransferase
UGT	uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Laranja Moro	16
2.1.1	Componentes do suco da laranja Moro	19
2.1.2	Benefícios do suco da laranja Moro	22
2.1.2.1	Controle da obesidade	24
2.1.2.2	Controle do <i>Diabetes Mellitus</i>	27
2.1.2.3	Controle do perfil lipídico	31
2.1.2.4	Controle da síndrome metabólica.....	32
2.2	Metabólitos secundários vegetais	35
2.3	Óleos essenciais	36
2.3.1	Atividades biológicas dos óleos essenciais	41
2.3.1.1	Atividade antifúngica dos óleos essenciais	41
2.3.1.2	Atividade antitumoral dos óleos essenciais.....	43
2.3.1.3	Atividade antioxidante dos óleos essenciais	47
2.3.1.4	Atividade citotóxica dos óleos essenciais	50
2.3.1.5	Atividade genotóxica dos óleos essenciais.....	51
	REFERÊNCIAS	54
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	65
	ARTIGO 1. INFLUENCE OF COLD STORAGE ON THE BIOACTIVITY PROPERTIES AND THE QUALITY OF THE JUICE O MORO BLOOD ORANGE (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)	66
1	INTRODUÇÃO	67
2	MATERIAL E MÉTODOS	68
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4	CONCLUSÃO	79
5	REFERÊNCIAS	80
	ARTIGO 2. EFEITOS NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DE RATOS OBESOS E DIABÉTICOS TRATADOS COM SUCO DA LARANJA MORO (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)	83
1	INTRODUÇÃO	85
2	MATERIAL E MÉTODOS	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4	CONCLUSÃO	105
5	REFERÊNCIAS	106
	ARTIGO 3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DA LARANJA MORO (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)	111
1	INTRODUÇÃO	113
2	MATERIAL E MÉTODOS	114
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
4	CONCLUSÃO	129
5	REFERÊNCIAS	130

PRIMEIRA PARTE

Referencial Teórico

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de produtos naturais, fonte de substâncias bioativas capazes de melhorar as funções do organismo, tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Dentre essas fontes, destacam-se as frutas ricas em antioxidantes, que podem desempenhar um papel protetor diante de uma série de doenças. Enquadram-se nesse contexto as laranjas sanguíneas da variedade Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), por apresentarem grande potencial nutricional e mercadológico devido às propriedades biológicas que possuem na casca e no suco.

Essas laranjas vêm ganhando destaque mundial devido à sua rica composição química, que inclui ácidos orgânicos, carotenoides, vitaminas e especialmente elevados teores de antocianinas, que são as responsáveis pela coloração vermelho intenso da polpa e do suco. Em sinergismo, essas substâncias possuem expressiva ação antioxidante, além de atuarem no controle de doenças incluindo o perfil lipídico, glicemia, doenças cardiovasculares e o gerenciamento da massa corporal, por meio de alterações na expressão gênica.

Mas mesmo com os inúmeros benefícios, ainda não são comercializadas no Brasil, pelo fato de as concentrações de antocianinas sofrerem grande influência ambiental, em que o cultivo em países de clima frio é o mais adequado, sendo limitado para algumas regiões do mundo. Em contrapartida, estudos prévios têm demonstrado a possibilidade de incrementação desses pigmentos por meio do manejo pós-colheita e armazenamento em câmaras frias, e por meio de práticas culturais, mediante melhorias na aplicação de luz, utilizando porta-enxertos de nanotubo, sistemas de plantio adequados, orientação de fileira, treinamento adequado e sistemas de poda (AWAD; WAGENMAKERS; JAGER, 2001).

Apesar da escassez de estudos, é possível extrair das folhas e cascas da laranja Moro óleos essenciais, que são definidos pela *International Organization for Standardization* como produtos obtidos de uma planta ou das suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água) ou de pericarpos de frutos cítricos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado expressão (SIMÕES et al., 2007). Essas substâncias podem ser utilizadas como conservante natural em substituição aos sintéticos na indústria alimentícia e como modelo para a síntese de novas drogas na indústria farmacêutica, devido aos compostos terpênicos presentes em sua composição química.

Entretanto, mesmo com o avanço no conhecimento das potencialidades desses óleos, existem muitos aspectos relevantes para serem estudados, pois muitos constituintes químicos podem apresentar propriedades tóxicas, o que torna importante a sua ampla caracterização,

visando a uma melhor compreensão da sua ação em sistemas biológicos e possibilitando a indicação de aplicações seguras, tanto na saúde, quanto na alimentação humana.

Diante da importância que os citros representam na economia e na dieta dos brasileiros, bem como a intensa busca por substâncias naturais que possuem aplicações na saúde, neste trabalho objetivou-se avaliar se o armazenamento refrigerado foi capaz de ativar as antocianinas presentes na laranja Moro e verificar se o suco foi capaz de alterar os parâmetros metabólicos de ratos obesos, diabéticos ou ambos, por meio do gerenciamento da massa corporal, além de avaliar a caracterização química e os efeitos do óleo essencial extraído da casca sobre as atividades antitumoral, antifúngica, antioxidante, citotóxica e genotóxica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Laranja Moro

As laranjas podem ser divididas em dois grandes grupos, em razão da sua coloração: as douradas e as sanguíneas. As douradas são caracterizadas pela cor laranja da polpa e do suco, devido à presença de carotenoides. A esse grupo pertencem quase que a totalidade das laranjas comerciais cultivadas no mundo, incluindo as variedades de mesa (Bahia e Navel), variedades usadas para a extração de suco (Pêra, Valência e Natal), laranjas sem acidez (Lima e Serra d'água) e outras. Já as laranjas sanguíneas são caracterizadas pela coloração vermelho intenso da polpa e do suco, devido à presença de antocianinas. A esse grupo pertencem as variedades Moro, Tarocco e Sanguinello. São originárias da região Mediterrânea e têm sido cultivadas há vários séculos, principalmente na Itália, Espanha, Marrocos, Argélia e Tunísia. No Brasil, elas ainda não são comercializadas por ser um país de clima tropical (LATADO, 2008; SAUNT, 1990).

As laranjas sanguíneas são as únicas frutas cítricas que contêm antocianinas, compostos polifenólicos solúveis em água que proporcionam a coloração característica. Além de seu apelo estético, esses pigmentos desempenham papéis fisiológicos decisivos nas plantas, tais como protegê-las contra condições de estresse abiótico e infecções por patógenos (ZHANG; BUTELLI; MARTIN, 2014).

Das variedades de laranjas sanguíneas existentes, a Moro vem ganhando destaque por possuir elevados teores de antocianinas em sua composição, sendo essa uma importante forma

de enriquecimento da fruta. As principais antocianinas presentes no suco são a cianidina-3-glicosídeo (C3G) e cianidina-3-(6"-malonilglucósido). Estudos prévios demonstraram que as concentrações de antocianinas nessas laranjas são dependentes das práticas culturais, estágio de maturação, condições genéticas e sazonais, tempo de colheita e fatores fisiológicos. Além disso, podem sofrer influência ambiental, em que o cultivo em países de clima frio é o mais adequado, pois as baixas temperaturas aumentam e as altas reduzem o acúmulo de antocianinas (GROSSO et al., 2013; LO PIERO; LO CICERO; PUGLISI, 2014).

Pesquisadores sugerem que um determinado número de horas abaixo de 8 °C é essencial para induzir a biossíntese de antocianinas em laranjas sanguíneas e obter uma cor violácea, assumindo que uma ampla faixa de temperatura dia/noite durante maturação das frutas é o principal determinante do acúmulo de antocianinas. Essa dependência de frio limita geograficamente uma qualidade confiável na produção comercial de laranjas sanguíneas para apenas algumas regiões do mundo e é responsável pela produção de frutas com baixos ou nenhum teor de antocianinas em laranjas sanguíneas cultivadas em climas tropicais/subtropicais (BUTELLI et al., 2012; CRIFÒ et al., 2012).

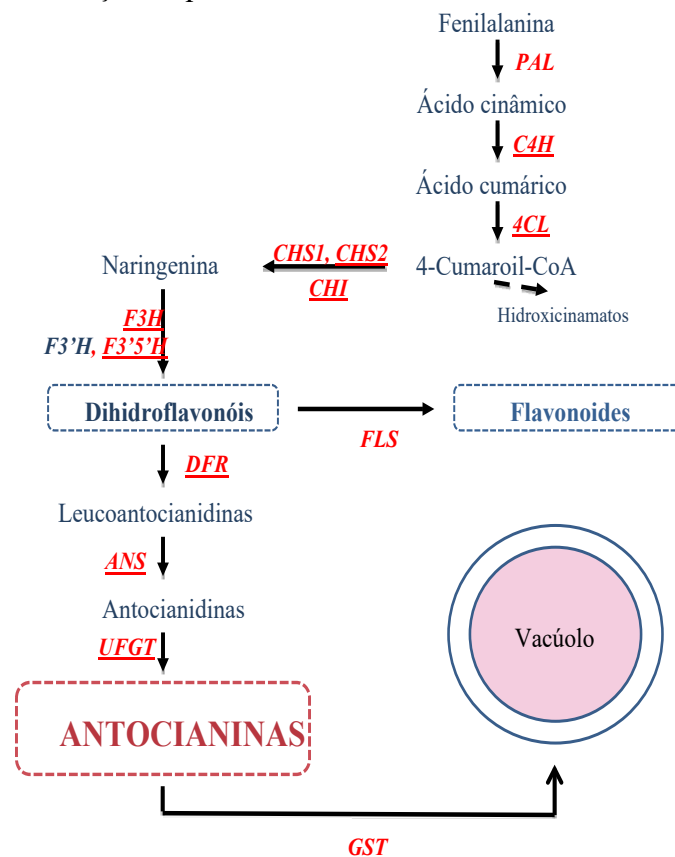
Em contrapartida, foi demonstrada a possibilidade de incrementação desses pigmentos por meio do manejo pós-colheita, pelo armazenamento em câmara fria, facilitando a comercialização em países de clima tropical. A relação entre o acúmulo de antocianinas e o armazenamento das frutas a temperaturas baixas foi determinada, concluindo que o teor máximo desses pigmentos é obtido após quarenta e cinco dias de armazenamento, a 8 °C (CARMONA et al., 2017; LATADO et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2018).

Carmona et al. (2017) descreveram a regulação molecular da produção de antocianinas em laranjas sanguíneas, e os genes que codificam a maioria das enzimas da via foram identificados e sua expressão analisada. As antocianinas são biossintetizadas via fenilalanina amônia-liase (PAL, que elimina o grupo amônio da fenilalanina precursora) na via geral dos fenilpropanoides, que compartilha a mesma regulação com síntese de flavonóis até a formação de di-hidroflavonóis (DHF) (Figura 1).

As etapas iniciais são controladas pelas enzimas cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-hidroxicinamoil CoA ligase (4CL), envolvidas na formação dos ácido cumárico e coumaroil e as enzimas chalcona sintase (CHS), chalcona isomerizada (CHI) e flavonona 3-hidroxilase (F3H), catalisando as etapas iniciais da produção de antocianinas para gerar a flavonona naringenina, que sofre diferentes hidroxilações catalisadas por flavonoides 30-hidroxilase (F30H) e/ou flavonoide 3050-hidroxilase (F3050H) para produzir DHF (Figura 1).

Em seguida, o caminho se ramifica para a síntese de flavonóis ou pela redução de DHF para leucoantocianidinas, sendo essas reações catalisadas pelas enzimas flavonol sintase (FLS) e di-hidroflavonol 4-redutase (DFR), respectivamente. Pela catálise da antocianidina sintase (ANS), as leucoantocianidinas incolores são oxidadas às antocianidinas, que são glicosiladas imediatamente pela UDP-glicose-flavonoide 3-O-glicosiltransferase (UFGT), para formar as antocianinas. A importação das antocianinas nos vacúolos das frutas é facilitada pela glutatona-S-transferases (GST) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da via biossintética dos flavonoides.



Fonte: Do autor (2019), adaptado de Carmona et al. (2017). Legenda: Enzimas em vermelhos são aquelas que participam da via, e aquelas em vermelho sublinhadas indicam enzimas com maior regulação durante o armazenamento a 9 °C do que a 4 °C.

Dessa forma, foi sugerido por Lo Piero et al. (2005) e Grosso et al. (2013) que as enzimas citadas acima, envolvidas no metabolismo do fenilpropanoide, são ativadas pelas baixas temperaturas e as frutas submetidas ao estresse térmico produzem as antocianinas para se protegerem das condições ambientais desfavoráveis. Assim, a exposição a baixas temperaturas pode melhorar as propriedades nutricionais das laranjas sanguíneas.

Crifò et al. (2012) estudaram os efeitos da exposição de laranjas sanguíneas e comuns a baixa temperatura (4 °C × quinze dias). Os autores avaliaram o conteúdo de antocianina e a expressão de genes estruturais, a fim de verificar a via biosintética desse pigmento. Pelos resultados, verifica-se que os níveis de antocianina da fruta exposta ao frio aumentaram acentuadamente, alcançando, após seis dias de armazenamento, um valor oito vezes maior que o observado no tempo zero, sugerindo que frutas com atributos aprimorados relacionados à saúde podem ser obtidos nesse estágio de armazenamento. A análise da expressão gênica evidencia que a quantidade de transcritos de todos os genes considerados (CM1 - chorismato mutase, PAL, CHS, DFR, ANS, UFGT e GST) aumentou após três a seis dias de armazenamento a frio, confirmando dados anteriores e mostrando que a biossíntese de antocianinas é uma via regulada pelo frio. Comparando a expressão de genes envolvidos na biossíntese de antocianinas (PAL, DFR e UFGT) entre laranjas sanguíneas e comuns, verifica-se que eles não respondem ao frio em laranjas comuns. Além disso, pela análise do banco de dados, verificou-se que a proteína de codificação do fator de transcrição NAC, que está relacionada com defesa e estresse oxidativo que a planta sofre durante a exposição ao frio, é seletivamente induzida somente em laranjas sanguíneas.

2.1.1 Componentes do suco da laranja Moro

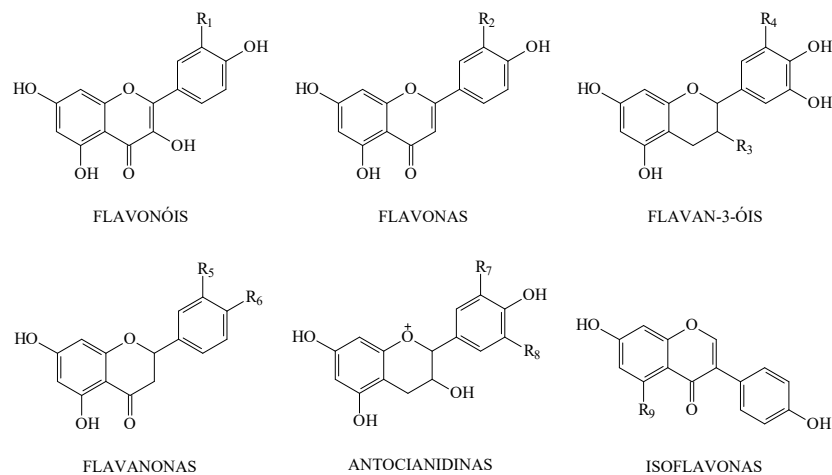
O suco da laranja Moro contém uma variedade de metabólitos que contribuem para o sabor e propriedades da fruta. Essas substâncias incluem açúcares (sacarose, frutose e glicose), ácidos orgânicos (cítrico, málico, isocítrico e hidroxicinâmicos), carotenoides (xantofilas e carotenos), vitaminas (C, A, B1, B6 e B3), compostos de sabor (ésteres, álcoois, cetonas, lactonas e hidrocarbonetos voláteis), polifenóis (flavonoides, como as antocianinas), entre outras. É importante ressaltar que o conteúdo dessas substâncias difere significativamente entre as cultivares e são também afetados pela maturação e fatores ambientais, como clima, solo e procedimentos agrícolas (MOLINU et al., 2016).

De todos os componentes presentes na laranja Moro, os polifenóis são os mais importantes e são os responsáveis pela coloração vermelho intenso característico da polpa e do suco. São metabólitos vegetais secundários representados por mais de 8.000 compostos naturais, amplamente distribuídos em muitos alimentos e bebida, podendo originar-se do intermediário comum fenilalanina ou do ácido chiquímico. As principais classes de polifenóis, baseadas em sua estrutura, são os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (ERDMAN; ORIA; PILLSBURY, 2012).

Essas substâncias amplamente divergentes, que exibem vários níveis de atividade antioxidante, compartilham um componente estrutural comum: um fenol ou um anel aromático, geralmente dois, com pelo menos um grupo hidroxila, que são ligados por uma ligação de três carbonos para formar uma unidade heterocíclica com seis unidades no anel (BAUMANN, 2010).

Os flavonoides são o grupo de polifenóis mais estudados. Eles são caracterizados por um esqueleto de quinze átomos de carbono, organizado como $C_6 - C_3 - C_6$, com diferentes substituições que compõem as diferentes subclasses (Figura 2). Mais de 4.000 flavonoides foram identificados e categorizados em sete subclasses, com base em sua estrutura: flavonóis (quercetina), flavonas (apigenina), flavanonas (hesperetina), flavan-3-óis (epicatequina), antocianinas (cianidina), polímeros (proantocianidinas) e isoflavonas (genisteína) (ERDMAN; ORIA; PILLSBURY, 2012).

Figura 2 - Estruturas de flavonoides.



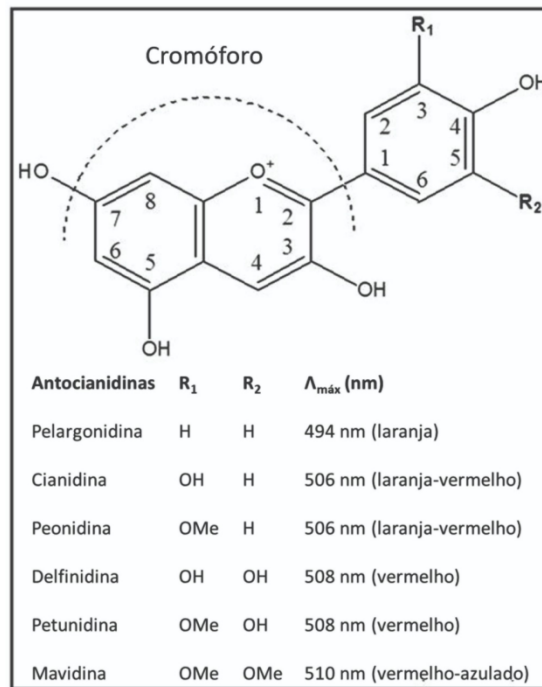
Fonte: Do autor (2019), adaptado de Birt e Jeffery (2013). Legenda: R₁ = H: campferol; R₁ = OH: quercetina; R₂ = H: apigenina; R₂ = OH: luteolina; R₃ = OH, R₄ = H: catequina; R₃ = galato, R₄ = OH: ácido gálico; R₃ = galato, R₄ = OH: epigalocatequina-3-galato; R₅ = H, R₆ = OH: naringenina; R₅ = OH, R₆ = OCH₃: hesperitina; R₇ = OH, R₈ = H: cianidina, R₇ = OCH₃, R₈ = OCH₃: malvidina; R₉ = H: daidzeína; R₉ = OH: genisteína.

Dos flavonoides existentes, as antocianinas (das palavras gregas anthos, flor e kianos, azul) vêm ganhando destaque devido às diversas propriedades biológicas que possuem. São pigmentos vegetais solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas, sendo responsáveis por uma grande variedade de cores observadas em flores, folhas, caules, raízes de plantas e frutos, como as laranjas sanguíneas (MACHADO, 2018).

As antocianinas são caracterizadas pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio), que são dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e

condensados por um oxigênio (Figura 3). A molécula da antocianina é constituída por dois ou três porções: uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos. Aproximadamente vinte e duas agliconas são conhecidas, das quais dezoito ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (WALLACE; GIUSTI, 2015).

Figura 3 – Fórmula estrutural das antocianidinas.



Fonte: Do autor (2019), adaptado de Wallace e Giusti (2015).

A cor de uma antocianina individual varia desde o vermelho (condição ácida) até o azul ou amarelo (condição alcalina). A coloração final apresentada pelo tecido vegetal, entretanto, depende de outros fatores, além do pH, tais como: luminosidade, concentração da antocianina dissolvida, presença de íons, açúcares e hormônios (AZZINI; GIACOMETTI; RUSSO, 2017).

Entre as muitas funções que possuem, está a atração de polinizadores de sementes, proteção contra danos provocados pela luz UV na folha, atuando como filtro e melhorando e regulando a fotossíntese. Apresentam também grande importância na dieta humana, podendo ser considerada como uma importante aliada na prevenção/retardamento de doenças cardiovasculares, do câncer e doenças neurodegenerativas, devido ao seu poder antioxidante,

atuando contra os radicais livres, apresentando propriedades farmacológicas e sendo utilizadas para fins terapêuticos (POJER et al., 2013).

Apesar de as antocianinas não serem nutrientes essenciais e nenhum distúrbio de deficiência ter sido associado à falta de consumo de antocianinas, estudiosos comprovam que quando ingeridas por meio da dieta podem promover a manutenção da saúde ao longo da vida. Não existe atualmente ingestão de referência dietética para antocianinas e muitos outros compostos bioativos na dieta nos Estados Unidos, Canadá ou União Européia. A China definiu atualmente um nível proposto específico de 50 mg/d (SOCIEDADE CHINESA DE NUTRIÇÃO, 2013). Embora as atuais recomendações de saúde pública para aumentar o consumo de frutas e verduras coloridas nos Estados Unidos sejam em grande parte impulsionadas pela necessidade de atender à ingestão de nutrientes essenciais de alimentos, recomendações de documentos políticos, como o *Dietary Guidelines for Americans* e grupos como o *National Fruit* e Aliança Vegetal também levam em conta a contribuição dos compostos bioativos da dieta, como as antocianinas (WALLACE; GIUSTI, 2015).

De acordo com pesquisas de Sebastian et al. (2015), a ingestão dietética de antocianinas foi estimada em $\sim 11,6 \pm 1,1$ mg/d para indivíduos com idade ≥ 20 anos. As mulheres, em média, tiveram uma maior ingestão diária ($12,6 \pm 1,5$ mg/d), em comparação com os homens ($10,5 \pm 0,8$ mg/d).

Em estudos com humanos, verificou-se que as antocianinas são rapidamente absorvidas, aparecendo na corrente sanguínea alguns minutos após o consumo. A absorção da antocianina pode começar logo na cavidade oral, onde podem ser absorvidas pelos tecidos que revestem a sua cavidade. São absorvidas também por todo o trato gastrointestinal, do estômago e do intestino. A degradação começa na cavidade oral e recentemente mostrou ser dependente da estrutura e mediada pela microbiota oral (KAMONPATAN et al., 2012).

2.1.2 Benefícios do suco da laranja Moro

Na literatura, relata-se que o suco da laranja Moro apresenta propriedades biológicas superiores em relação à laranja comum e devido às altas concentrações de compostos fitoquímicos com expressiva ação antioxidante, a ingestão do suco aumentou nos últimos anos, denotando influência benéfica na prevenção de diversas doenças, como as degenerativas, cardiovasculares, diabetes, câncer, melhora na resistência a insulina, efeito antiobesidade, entre outras (Tabela 1) (BARRECA et al., 2014; FABRONI et al., 2016).

Tabela 1 - Nome, efeito e mecanismos de ação dos componentes da laranja sanguínea.

Componentes	Efeito	Mecanismo de ação
Flavonoides (antocianina cianidina-3- glicosídeo)	Anti-inflamatório	Modula a secreção de apoB e colesterol celular, elevando o HDL-c e diminuindo o LDL-c.
	Antioxidante	Estimula NO sintase endotelial; normaliza marcadores de peroxidação lipídica; forma um complexo de copigmentação com cianidina-DNA; inibe a mutação reversa induzida por amins heterocíclicas em sistemas de ativação microssomal.
	Antiagregação	Inibe respostas mediadas por TxA2 e secreção de grânulos densos.
	Anticarcinogênico	Promove a apoptose em células humanas pré-B NALM-6 e células cancerígenas do cólon; inibe o HIF-1 α e expressão de VEGF no câncer de ovário e no câncer de pulmão. Inibe a COX-2 e MMPs nas células do carcinoma de pulmão, próstata e hepatocelular.
	Antiproliferativo	Inibe a proliferação de células de câncer de mama e indução de proliferação de testosterona; inibe a colonização pulmonar por células de melanoma e sarcoma; inibe a formação de novos vasos sanguíneos em células de câncer de mama.
	Antimutagênico	Inibe a atividade da tirosina quinase do EGFR.
Carotenoides	Antioxidante	Melhora a geração de óxido nítrico; reduz nitrito; estabiliza placas ateroscleróticas (devido a síntese de colágeno).
Vitamina C	Aumento do fluxo de ar	Reduz a afinidade da proteína apoB ligada a LDL-c por íons de metais de transição; extingue EROs e ERN, diminuindo sua biodisponibilidade no plasma; reduz o EROs potencialmente prejudicial, formando radicais livres de ascorbato estabilizados por ressonância e relativamente estáveis; atenua oxidação de LDL-c e proteção de células musculares lisas vasculares humanas contra apoptose.
	Antioxidante	Efeito na cascata de desintoxicação da fase II; inibe a superóxido dismutase e catalase; suprime a síntese de PG e a ciclooxigenase-2.
Ácido hidroxicinâmico	Antioxidante	Impede o aparecimento do tumor e protege as anormalidades bioquímicas e moleculares em mama, bolsa bucal, cólon e câncer de pele.
	Anticarcinogênico	Formação de um complexo de copigmentação com cianidina-DNA; inibi a mutação reversa induzida por amins heterocíclicas em sistemas de ativação microssomal.

Fonte: Grosso et al. (2013). Legenda: apoB: apolipoproteína B; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; TxA2: tromboxano A2; pré-B NALM-6: sangue humano, leucemia, células pré-b); HIF-1 α : fator induzido por hipóxia 1 α ; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; COX-2: ciclo-oxigenase-2; MMP: matriz metaloproteinase; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico; EROs: espécies reativas de oxigênio; ERN: espécies reativas de nitrogênio; PG: prostaglandinas.

2.1.2.1 Controle da obesidade

A Organização Mundial da Saúde define obesidade como a excessiva concentração de gordura que pode prejudicar a saúde do indivíduo. Portanto, o consumo de alimentos altamente energéticos e a falta de atividade física destacam-se por facilitarem o ganho de calorias e diminuírem o gasto de energia corporal, tornando a balança energética do indivíduo positiva e facilitando o acúmulo de gordura. Além disso, a obesidade pode apresentar outras causas, como fatores genéticos, metabólicos, ambientais, sociais, culturais, econômicos ou ainda estar relacionada a fatores demográficos (CARVALHO; BELÉM; ODA, 2017).

A obesidade é considerada um fator de risco para outras complicações, como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e alguns cânceres. Por isso, é bem reconhecida como uma das principais comorbidades em todo o mundo e sua prevalência está aumentando. Em 2016, 39% dos homens e mulheres com mais de 18 anos tinham excesso de massa corporal e 11% dos homens e 15% das mulheres eram obesos. Assim, quase 2 bilhões de adultos em todo o mundo estavam com excesso de massa corporal e, desses, mais de 6 bilhões eram obesos. Tanto o excesso de massa corporal como a obesidade mostraram um aumento acentuado nas últimas 4 décadas (ANNO, 2016; DUNCAN et al., 2012; WHO, 2016)

Vigitel (2018) indicou que no Brasil a obesidade é uma realidade que atinge 18,9% da população e o sobrepeso, mais da metade (54%). Esses dois índices mostram que mais de 70% da população está com excesso de massa corporal. Entre os jovens, a obesidade aumentou 110% no período de 2007 a 2017, sendo esse índice quase o dobro da média nas demais faixas etárias (60%). O crescimento foi menor nas faixas de 45 a 54 anos (45%), 55 a 64 anos (26%) e acima de 65 anos (26%). No mesmo período, o sobrepeso foi ampliado em 26,8%. Esse movimento foi maior também entre os mais jovens (56%), seguidos pelas faixas de 25 a 34 anos (33%), 35 a 44 anos (25%) e 65 anos ou mais (14%).

As definições de sobrepeso e obesidade são baseadas na razão entre a massa corporal do indivíduo dada em quilogramas (kg) e sua altura ao quadrado (m²). Essas medidas são usadas para calcular o índice de massa corporal (IMC) e a interpretação é baseada em agrupamentos de status de massa corporal, como baixo peso, peso saudável, sobrepeso e obesidade, que são ajustados para idade e sexo. Para os adultos acima de 20 anos, os números estão correlacionados às mesmas designações de status de peso; por exemplo, um IMC entre 25,0 e 29,9 equivale ao sobrepeso e 30,0 e acima com obesidade. A obesidade mórbida (também conhecida como obesidade extrema) é definida como um IMC de 40,0 ou superior (LINHARES et al., 2012).

O armazenamento de gordura ocorre em um órgão endócrino conhecido como tecido adiposo. O excesso de gordura é armazenado nos adipócitos (principal constituinte do tecido adiposo) sob a forma de triglicerídeos em um processo denominado lipogênese. Aos poucos, o tecido adiposo vai crescendo, aumentando em tamanho e em número de adipócitos. Assim, a massa corporal em gordura do indivíduo começa a aumentar excessivamente, caracterizando a obesidade (PINTO, 2014).

Além das funções de armazenamento de energia, síntese de triglicerídeos e oxidação de ácidos graxos para obtenção de energia, através da lipólise, os adipócitos são capazes de sintetizar e segregar proteínas chamadas adipocitocinas, que são capazes de atuar sobre diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos e sua produção pode ser regulada por estímulos inflamatórios e mediante condições de hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, encontrando-se alteradas em quadros de obesidade e síndrome metabólica (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Existem vários tipos de adipocitocinas, sendo a leptina e adiponectina as mais abundantes. A adiponectina, hormônio peptídico com 224 aminoácidos, possui dois receptores: o receptor 1 e o receptor 2. Eles são encontrados em maior quantidade no músculo estriado esquelético e no fígado, respectivamente (AHIMA, 2011).

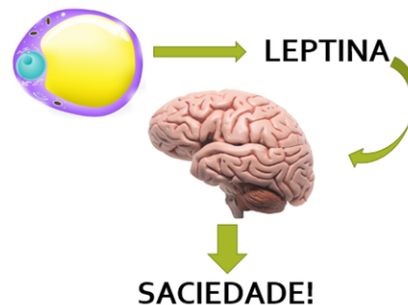
O receptor 1, que atua no músculo, fosforila algumas enzimas, ativando a proteína quinase, ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e inativando a acetil-CoA-carboxilase (ACC). A enzima ACC produz o malonil-CoA e inibe a oxidação de ácidos graxos. Logo, a AMPK aumenta a oxidação dos ácidos graxos e a captação da glicose. Já o receptor 2, presente em sua maioria no fígado, mostrou que a ativação da AMPK nesse órgão inibe a gliconeogênese e aumenta a oxidação de ácidos graxos. A falta desses receptores no organismo pode levar ao acúmulo de lipídios no fígado e músculo, induzir a inflamação e aumentar a resistência à insulina. Já a sua presença pode atuar no controle da ingestão alimentar, homeostase energética, proteção contra aterosclerose e o aumento da sensibilidade à insulina, ocasionando a redução da massa corporal (AHIMA, 2011).

A leptina é um hormônio peptídico composto por 167 aminoácidos expresso e secretado pelos adipócitos, especialmente pelo tecido adiposo branco, podendo ser produzido também nos músculos, glândulas mamárias, cardiomiócitos e placenta em mulheres grávidas. Sob condições fisiológicas normais, possui capacidade de reduzir o apetite, aumentar o gasto energético, melhorar as funções do sistema nervoso simpático, facilitar a utilização de glicose e melhorar sensibilidade à insulina. Atua nos receptores do hipotálamo, que envia uma

mensagem para o metabolismo diminuir a fome e aumentar o gasto energético, gerando saciedade (Figura 4) (DONG, 2014).

As concentrações de leptina são influenciadas pela adiposidade do indivíduo, fatores hormonais e nutricionais. Como ela é produzida pelo tecido adiposo, há uma maior quantidade circulante em indivíduos obesos e esse nível elevado, que deveria agir controlando a saciedade, deixa de agir, criando uma resistência periférica à leptina, atribuída a alterações nos receptores ou a uma deficiência em seu sistema de transporte, aumentando a fome (PAGANO; SPINEDI; GAGLIARDINO, 2017; PIRES, 2015).

Figura 4 - Segregação da leptina no tecido adiposo e geração de saciedade.



Fonte: Pagano, Spinedi e Gagliardino (2017).

Estratégias de prevenção e tratamento para a obesidade têm sido incentivadas como planos dietéticos individualizados, contemplando uma dieta balanceada, habilitação do indivíduo, tornando-o capaz de conhecer, organizar e controlar sua alimentação, mantendo sua rotina diária, incentivo a prática de atividades físicas, tratamento medicamentoso prescrito por profissional da saúde habilitado para tal e acompanhamento psicossocial.

Além dessas estratégias, pesquisas envolvendo a regulação das adipocitocinas mediante a intervenção nutricional têm sido importantes para a criação de tratamentos para o controle da obesidade. Estudos realizados com ratos obesos que ingeriram o suco da laranja Moro evidenciaram a regulação das disfunções dos adipócitos normalizando a hipertrofia dos adipócitos e ocasionando a redução da massa corporal (FABRONI et al., 2016; CARDILE; GRAZIANO; VENDITTI, 2015; LEE et al., 2017; TITTA et al., 2010).

Para os autores Guo et al. (2008) Titta et al. (2010) e Tsuda (2008) é o sinergismo entre a ação antioxidante da antocianina C3G com os demais compostos presentes na laranja Moro que contribui para a regulação das disfunções e redução acentuada no tamanho dos adipócitos pela diminuição do acúmulo de lipídeos e aumento da sensibilidade à insulina. Essa alteração nos adipócitos ocorre porque o suco modula genes envolvidos no metabolismo

dos lipídios, incluindo o adipoQ (adiponectina), lep (leptina), Acil-CoA sintetase, proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2) e lipase lipoprotéica (LPL), além de contribuir para o controle da expressão da proteína transportadora de ácidos graxos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ), que também está envolvida na captação de lipídeos pelos adipócitos. É pela regulação da expressão gênica que ocorre a redução dos lipídeos nos adipócitos e triglicerídeos no músculo e fígado, reduzindo a resistência à insulina. Esse efeito é consequência do aumento de moléculas envolvidas na metabolização de ácidos graxos e na dissipação de energia muscular.

O gene UCP2 é expresso no tecido adiposo e em uma variedade de órgãos, como cérebro, estômago, fígado, coração e pulmão. Além de atuar no desacoplamento da respiração pelo transporte de próton e na termorregulação, importante papel tem sido apontado no metabolismo lipídico, na resistência à insulina, na utilização de glicose, na regulação de espécies reativas de oxigênio e na imunidade mediada por macrófagos (DENG et al., 2012).

Kučera et al. (2011), estudando três grupos de ratos (alimentados com dieta padrão, médio e alto teor de gordura) durante seis semanas, encontraram maior expressão de UCP2 nos grupos alimentados com teor médio e alto teor de gordura. Os autores acreditam que o aumento da expressão da UCP2 se deve ao seu papel contra a elevada formação de ERO.

2.1.2.2 Controle do *Diabetes Mellitus*

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), o *diabetes Mellitus* (DM) não é uma única doença, mas, sim, um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é decorrente da falta total ou parcial da secreção de insulina, assim como resistência a esse hormônio. Sua prevalência tem aumentado drasticamente nos últimos anos, visto que comorbidades, como dislipidemias, hipertensão, obesidade proveniente do sedentarismo e ingestão alimentar excessiva podem resultar no acometimento do DM (ISLAN, 2011).

O DM destaca-se, atualmente, como uma importante causa de morbidade e mortalidade. Estimativas globais indicaram que 425 milhões de pessoas viviam com a doença em 2017, no mundo, e em 2045, esse número poderá chegar a 629 milhões. O Brasil contou em 2017 com 12,5 milhões de casos, afetando entre 8% a 9% da população adulta (20-79 anos), ocupando o quarto lugar entre os dez países com o maior número de DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (2017) mostra também que, em 2017, a mortalidade relacionada ao DM no mundo foi de 4 milhões. Na América do Sul e México, foram 209.717 mil adultos (20-79 anos) que morreram, representando 11% de todas as causas de morte. Cerca de 44,9% dessas mortes aconteceram com indivíduos com menos de 60 anos de idade e metade aconteceu no Brasil. Gastos em saúde decorrentes do DM totalizam 29,3 bilhões, com tendência a aumentar em 30% até 2045.

O envelhecimento da população, a crescente prevalência da obesidade e do sedentarismo, e os processos de urbanização são considerados os principais fatores responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do DM em todo o mundo. Esse cenário tem gerado altos custos sociais e financeiros ao paciente e ao sistema de saúde. Rosa et al. (2014) estimaram que o DM chegou a responder por 12% do total de hospitalizações não relacionadas a gestações e por até 15,4% dos custos hospitalares do Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro no período de 2008 a 2010 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; MOURA et al., 2012).

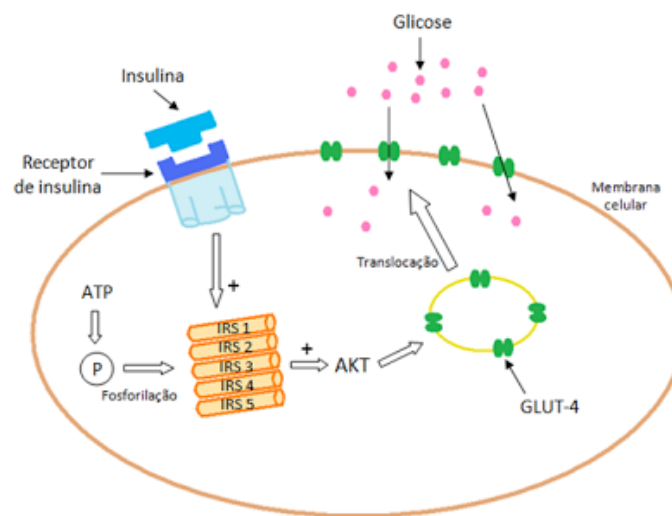
As complicações do DM podem levar a danos na retina, problemas cardíacos, alterações metabólicas, lentidão em cicatrização, insuficiência renal, lesões e infecções nos pés, entre outros. Já os sintomas do DM manifestam-se por disfunções fisiológicas, tais como poliúria, polidipsia, perda de massa corporal, polifagia e cansaço, ou por complicações agudas, como a cetoacidose diabética. Adicionalmente, esses pacientes apresentam um aumento da incidência da doença aterosclerótica cardiovascular, arterial periférica e doença vascular cerebral (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

Para entender o funcionamento do DM no organismo, é necessário compreender a resposta fisiológica normal do controle da glicemia: o carboidrato ingerido pelo indivíduo é quebrado na boca pela enzima amilase salivar e, no intestino delgado, pela enzima amilase pancreática. Após essa quebra, a glicose segue para a corrente sanguínea e é encaminhada, em seguida, para o tecido adiposo ou muscular. Como a molécula de glicose não possui afinidade com os lipídios localizados na membrana da célula e nem é pequena o suficiente para atravessar os canais proteicos da membrana, ela precisa da ajuda do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para conseguir ser encaminhada e, então, absorvida pela célula (CARVALHO, 2017).

O GLUT-4 está localizado no interior da célula, e precisa se deslocar até a membrana para conseguir executar o seu papel de transportar a glicose para dentro da célula. Esse deslocamento ocorre da seguinte forma: quando a glicose começa a circular na corrente sanguínea, é encaminhada ao pâncreas e as células beta pancreáticas identificam os níveis

elevados de glicose e liberam o hormônio insulina, que tem a função de se ligar a receptores IRS (substrato do receptor de insulina) e ativar uma cascata de reações. Esses receptores são proteínas que, ao serem fosforiladas, ativam uma sequência de proteínas, entre elas a AKT (proteína quinase B), que ativa vesículas intracelulares que contêm o GLUT-4. Essas vesículas realizam uma translocação: a membrana vesicular se funde na plasmática, exteriorizando o GLUT-4, que transporta a glicose para o interior da célula (Figura 5) (CARVALHO, 2017).

Figura 5 - Resposta fisiológica normal do controle da glicemia.



Fonte: Gobbi e Balbinotti, 2013.

Existem dois tipos de DM: o tipo 1 e tipo 2. Em indivíduos portadores de DM tipo 1, a resposta fisiológica da glicose é diferente. A glicose que está na corrente sanguínea é transportada ao pâncreas, que devido a uma deficiência no sistema imunológico, responde não produzindo insulina, mas produzindo anticorpos como mecanismo de defesa, que destroem as células beta pancreáticas. Essa deficiência ocorre devido a fatores ambientais, genéticos e hereditários. Dessa forma, como o pâncreas perde a capacidade de produzir insulina, o GLUT-4 não é mais translocado para a membrana, sendo necessário o uso de insulina exógena para que a glicose possa ser absorvida (CARVALHO, 2017).

No DM tipo 2, que está ligado à obesidade, a resposta fisiológica ocorre da seguinte forma: a glicose que circula na corrente sanguínea é transportada ao pâncreas, onde as células beta pancreáticas liberam a insulina, que faz o seu papel. Porém, quando a insulina se liga aos receptores na membrana da célula, a cascata de reações é impedida de acontecer devido à presença de adipocitocinas que estão desreguladas no tecido adiposo e muscular de indivíduos

obesos, não ativando, assim, o GLUT-4. Dessa forma, os níveis de glicose na corrente sanguínea continuam elevados e as células beta pancreáticas respondem a esse excesso, liberando mais insulina que também não consegue ser absorvida, gerando um quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia. Esse excesso de insulina atua no hipotálamo aumentando a atividade do sistema nervoso simpático, com consequente aumento do volume sanguíneo, do débito cardíaco e da retenção de sódio e água, levando a um aumento da pressão arterial que pode levar ao aumento da hipertensão arterial (CARVALHO, 2017).

Nesses casos, a utilização de agentes hipoglicemiantes orais torna-se frequentemente necessária, podendo-se fazer ou não uso da insulina. Medidas simples, que auxiliem no controle da obesidade, também podem reduzir o índice glicêmico, auxiliando, consequentemente, no combate ao DM tipo 2.

Nishimura, Manabe e Nagai (2009) sugerem que a C3G presente no suco da laranja Moro pode reduzir os níveis de glicose em indivíduos com DM tipo 2, pela regulação das adipocitocinas relacionadas à obesidade que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento da resistência à insulina (adipoQ, lep, TNF- α , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)), que bloqueiam a sinalização da insulina em vários tecidos. Posteriormente, Li et al. (2015) e Valenza et al. (2018) mostraram que a C3G têm uma potente atividade antiinflamatória e a sub-regulação das adipocitocinas pode contribuir para a melhoria da resistência à insulina.

Guo et al. (2012) avaliaram em seus estudos se a C3G melhoraria a inflamação associada à obesidade e aos distúrbios metabólicos, como resistência à insulina e esteatose hepática em camundongos machos e obesos que foram alimentados com dieta hiperlipídica por doze semanas e camundongos machos e geneticamente diabéticos, em que ambos os modelos receberam suplementação dietética com C3G (0,2%) por cinco semanas. Foi descoberto que C3G reduziu os níveis de glicose em jejum e melhorou significativamente a sensibilidade à insulina nos dois modelos estudados, em comparação com controles não suplementados. No tecido adiposo branco, os níveis de RNA mensageiro e as concentrações séricas de adipocitocinas (TNF- α , IL-6 e MCP-1) também foram reduzidos, assim como a infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Concomitantemente, o conteúdo de triglicerídeos hepáticos e a esteatose também foi reduzido. Além disso, o tratamento com C3G diminuiu a ativação da proteína JNK (c-Jun N-terminal quinase) e promoveu a fosforilação e a exclusão nuclear da proteína FoxO1 (forkhead box O1) por meio da realimentação. Esses resultados indicam claramente que a C3G possui uma potência significativa nos efeitos antidiabéticos, modulando a via de sinalização do FoxO1 e JNK e as adipocitocinas relacionadas.

2.1.2.3 Controle do perfil lipídico

Os lipídios, representados pelos fosfolipídios, colesterol, triglicerídeos (TGs) e ácidos graxos, são considerados essenciais para o corpo humano, seja por formarem a estrutura básica das membranas celulares, seja por serem precursores dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D, atuando na fluidez das membranas celulares e na ativação de enzimas aí situadas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

O transporte e a solubilização dos lipídios na circulação sanguínea são realizados pelas lipoproteínas, que são compostas de proteína e lipídio. Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: a) as ricas em TGs, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa, de origem hepática, e b) as ricas em colesterol, formando partículas de LDL-c e HDL-c (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Em muitas situações, as concentrações desses lipídeos e/ou lipoproteínas não estão em quantidades normais no corpo humano, ocorrendo dislipidemia. Estudar o perfil lipídico (determinações bioquímicas do Colesterol Total – CT, HDL-c, TGs e do LDL-c), após jejum de 12 horas, tem sido uma atividade de grande valia, haja vista que as pesquisas já realizadas, de correlação entre a morfologia das artérias, obtidas em autópsias e os fatores de risco cardiovascular têm demonstrado que a dislipidemia é um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose em idades posteriores da vida, assim como para o desenvolvimento de outros agravos de saúde, como a síndrome metabólica e DM tipo 2 (CARRERAS; ORDOÑEZ, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Lima et al. (2012) evidenciaram que o mecanismo sinérgico da laranja Moro, além de auxiliar no gerenciamento da massa corporal, auxilia na redução dos TGs e do CT. Segundo os autores, as flavanonas são as responsáveis pelo efeito hipolipidêmico encontrado no suco de laranja sanguínea, pois, devido à diminuição da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-methylglutaril-CoA redutase), enzima fundamental na síntese do colesterol, possuem a capacidade de reduzir o conteúdo de colesterol hepático e a sua esterificação, aumentando a atividade dos receptores de LDL-c, que são responsáveis pela captação das lipoproteínas ricas em colesterol do plasma, diminuindo suas concentrações.

Resultados semelhantes foram verificados em outros estudos. Salamone, Volti e Titta (2012) analisaram o efeito do consumo do suco da laranja Moro cultivada na região do Mediterrâneo sobre a esteatose hepática em camundongos com obesidade induzida por dieta e

constatarem, pelas análises bioquímicas, que os animais obesos que beberam suco tiveram também redução nos níveis de CT (33,3%) e TGs (37,5%).

Além disso, essa melhora no perfil bioquímico pode estar relacionada com a redução da massa corporal que o suco da laranja Moro proporciona, pois estudos clínicos têm mostrado que a perda de massa corporal causa diminuição do colesterol plasmático, ao passo que o aumento da circunferência da cintura e a obesidade estão associados com altos níveis plasmáticos de CT e TGs (ALBARELLO et al., 2017; TONETTA et al., 2017).

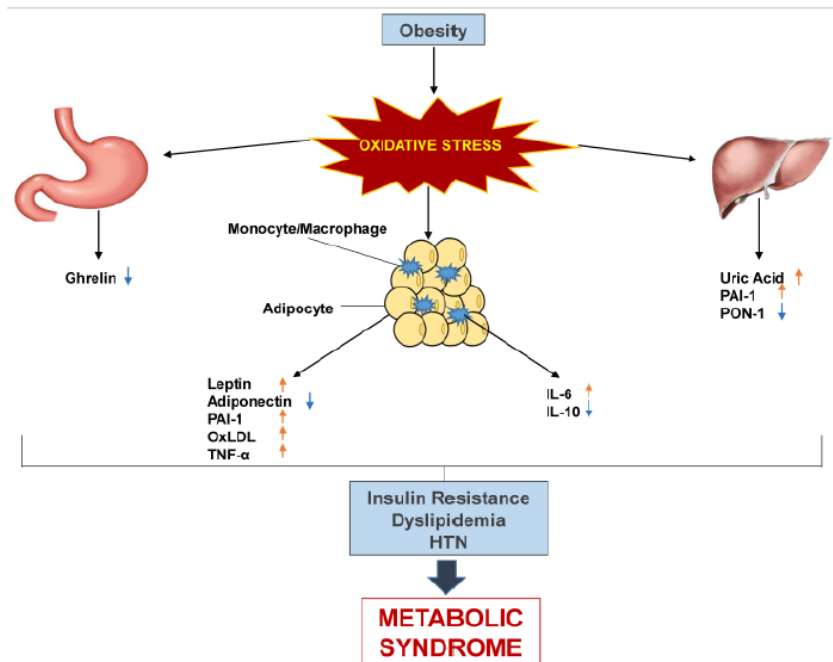
2.1.2.4 Controle da síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM) é um grupo de doenças metabólicas que confere a um indivíduo um aumento substancial de doenças cardiovasculares (DCV), doença coronariana, acidente vascular cerebral, disfunção vascular e mortalidade por todas essas causas, com risco aproximadamente duas vezes maior do que aqueles sem a síndrome (FORD, 2004).

Enquanto a patogênese da SM não é bem compreendida, a obesidade e a resistência à insulina são reconhecidas como fatores causadores. Pesquisadores sugerem que o estresse oxidativo causado pela obesidade está ligado a uma inflamação crônica de baixo grau, sendo responsável, em parte, pelo desregulamento da secreção de adipocitocinas, que contribui para a SM. No geral, o estresse oxidativo sistêmico promove a inflamação, resulta em disfunção endotelial e alteração no metabolismo lipídico, afetando a sensibilidade à insulina (Figura 6) (FORD, 2004).

As adipocitocinas leptina, inibidoras do ativador do plasminogênio (PAI-1), LDL oxidado (OxLDL), TNF- α , IL-6 e ácido úrico, têm se mostrado elevados em indivíduos com SM em diferentes populações. Por outro lado, a adiponectina, grelina, interleucina-10 (IL-10) e paraoxonase (PON-1) têm se mostrado diminuídas (FURUKAWA et al., 2004).

Figura 6 - Representação esquemática de painel de biomarcadores em síndrome metabólica.



Fonte: Srikanthan, Shapiro e Sodhi (2016).

Diversas organizações diferentes delinearam critérios para o diagnóstico, designando valores para a obesidade (circunferência da cintura ou IMC), níveis de triglicérides, níveis de HDL-c, hipertensão, hiperglicemia, e às vezes, albumina de urina ou albumina: razão creatinina (Tabela 2). Baseado em critérios da *American Heart Association* (AHA), quase 35% dos adultos do EUA e 50% dos idosos com mais de 60 anos possuem SM. Independentemente de quais critérios são usados, a principal preocupação é a detecção de potenciais complicações cardiovasculares e a intervenção precoce (AGUILAR et al., 2015; ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2006; GRUNDY et al., 2006).

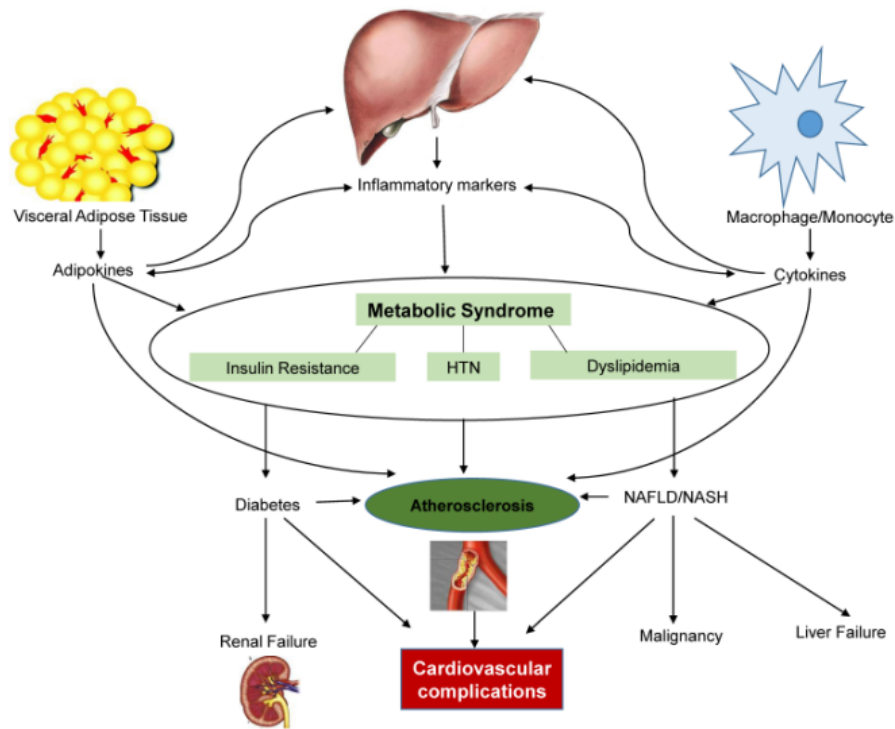
Embora os relatórios do *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) e do *World Health Organization* (WHO) tenham identificado a DCV como o principal problema acarretado pela SM, a maioria dos indivíduos que possuem a síndrome terá também resistência à insulina, o que pode resultar em surgimento do DM tipo 2 (Figura 7). Uma vez que o diabetes se torna clinicamente aparente, o risco de DCV aumenta nitidamente. Além de DCV e DM tipo 2, indivíduos com SM são aparentemente mais suscetíveis a outras condições, incluindo a síndrome dos ovários policísticos, fígado gorduroso, cálculos biliares de colesterol, asma, distúrbios do sono, e algumas formas de câncer, como mama, pancreático, colorretal e próstata (BHANDARI et al., 2014; GRUNDY et al., 2004).

Tabela 2 - Critérios para diagnóstico da síndrome metabólica.

	IDF (obesidade + >2)	AHA (>3)	NCEP ATP III (>3)	WHO (resistência a insulina/diabetes + >2)	EGIR (hiperinsulinemia + >2)
Obesidade	IMC>30kg/m ² ou específico cintura de gênero e etnia cortes de circunferência	Circunferência da cintura para machos>40in, fêmeas>35in	Circunferência da cintura para homens >40in, mulheres>35in	Relação cintura/ quadril>0,9 em homens e >0,85 em mulheres ou IMC>30kg m ²	Circunferência da cintura para machos>94cm, fêmeas>80cm
Triglicerídeos	>150mg/dL ou tratamento de essa anormalidade lipídica	> 150mg/dL ou tratamento desta anormalidade lipídica	>150mg/dL ou tratamento desta anormalidade lipídica	>150mg/dL	>177mg/dL
HDL-c	<40mg/dL em homens e <50mg/dL em mulheres ou tratamento específico para este lipídio anormalidade	<40mg/dL em homens e <50mg/dL em mulheres ou tratamento para essa anormalidade lipídica	<40mg/ dL em homens e <50mg/dL em mulheres ou tratamento para essa anormalidade lipídica	<35mg/dL em homens e <39mg/dL em mulheres	< 39mg/dL
Hipertensão	PAS>130 ou PAD>85 mmHg ou tratamento de hipertensão diagnosticada	PA>130/85mm Hg ou tomando medicação para hipertensão	PAS>130 ou PAD>8mmHg ou tomar medicação para hipertensão	>140/90 mmHg	>140/90 mmHg ou tomando medicação para hipertensão
Hiperglicemia	Glicemia de jejum>100mg/dL ou anteriormente DM tipo 2 diagnosticada	Glicose em jejum>100mg/ dL ou tomar remédio para alta glicose	Glicose em jejum>100mg/ dL ou tomar remédio para alta glicose	Resistência à insulina necessária	Resistência à insulina necessária (plasma insulina > 75 th %)
Outros				Albumina na urina>20µg/min ou Albumina: taxa de creatinina> 30 mg/g	

Fonte: Srikanthan, Shapiro e Sodhi (2016). Legenda: IDF - Federação Internacional de Diabetes; EGIR - Grupo Europeu para o Estudo da Resistência à Insulina; PAS - Pressão Arterial Sistólica; PAD - Pressão Arterial Diastólica; PA - Pressão Arterial.

Figura 7 - Interação de adipocitocinas, citocinas e marcadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento da síndrome metabólica e suas complicações.



Fonte: Srikanthan, Shapiro e Sodhi (2016). Legenda: HTN-Hipertensão, NAFLD/NASH - doença hepática gordurosa não alcoólica/esteato-hepatite não alcoólica.

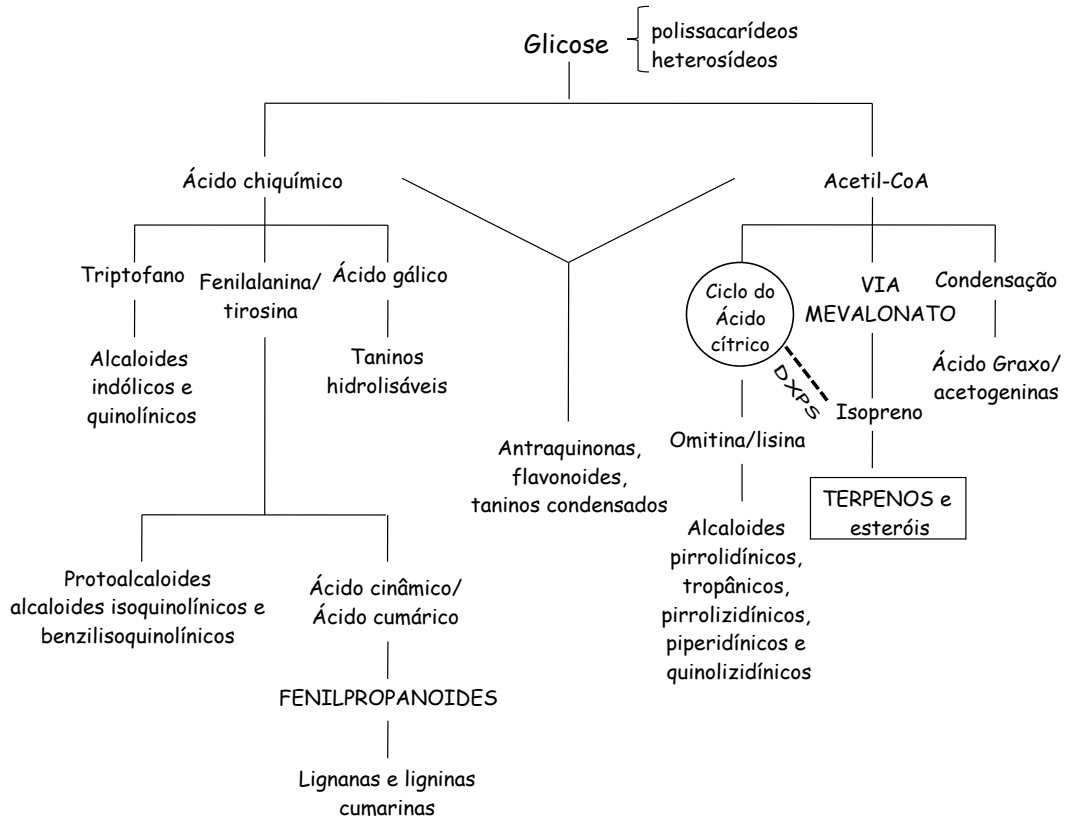
2.2 Metabólitos secundários vegetais

Ao conjunto das transformações das moléculas orgânicas que ocorrem nas células vivas, catalisadas por enzimas específicas, tendo como função suprir o organismo de energia, renovar suas moléculas e garantir a continuidade do estado organizado, dá-se a designação de metabolismo. A presença dessas enzimas específicas propicia uma determinada orientação a essas transformações, designando-as de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados e degradados são chamados de metabólitos e são divididos em primários e secundários. Nos compostos primários se enquadram os carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras substâncias importantes que participam da nutrição e dos processos metabólicos vitais à manutenção da vida do organismo (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários possuem características específicas e, apesar de estarem presentes em pequenas quantidades, asseguram vantagens para a sobrevivência, garantindo a perpetuação da espécie. Entre eles, citam-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (que podem ser divididos em terpenos e fenilpropanoides), sendo

originados do metabolismo da glicose, a partir da via do ácido chiquímico ou do acetato (acetil-coA) (Figura 8) (BRAZ-FILHO, 2010).

Figura 8 - Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários.



Fonte: Simões et al. (2007).

2.3 Óleos essenciais

De acordo com a *International Organization for Standardization*, óleos essenciais são definidos como produtos obtidos de uma planta ou de suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água); ou de pericarpos de frutas cítricas, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado expressão (SIMÕES et al., 2007).

São misturas complexas de compostos químicos de origem vegetal, voláteis, lipofílicos, geralmente odoríferos, líquidos e raramente coloridos, variando em intensidade e composição, de acordo com a espécie, genética e fatores ambientais. São formados pelas vias do ácido chiquímico ou acetato e podem estar presentes em diversos órgãos das plantas, como flores, folhas, caule, galhos, sementes, frutos, raízes e cascas (BAKKALI et al., 2008).

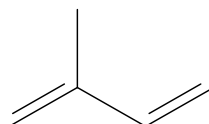
Os óleos essenciais são sintetizados em diferentes estruturas secretoras, como em canais oleíferos, pelos glandulares, bolsas lisígenas e células parenquimáticas diferenciadas, em que a secreção é formada em glândulas endógenas que, eventualmente, se rompem e liberam substâncias na cavidade dessas estruturas. Exercem as funções de autodefesa e de atração de polinizadores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os óleos essenciais apresentam pouca solubilidade em água e solubilidade em solventes apolares. São instáveis na presença de luz, calor, umidade, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras e metais, sofrendo inúmeras reações de degradação. Podem conter de vinte a sessenta componentes diferentes em sua constituição, sendo, na maioria das vezes, caracterizados por dois ou três componentes majoritários (20 a 70%), comparados aos outros componentes que estão presentes em quantidades mínimas (SOUZA et al., 2012).

De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção desses óleos pode ser influenciada por fatores genéticos (específicos para cada espécie) e por fatores ambientais que são dependentes de temperatura, altitude, idade da planta, aspectos fitossanitários, micro e macronutrientes, luz, água, composição atmosférica, radiação UV, índice pluviométrico e sazonalidade. Procedimentos como secagem da planta e tipo de adubação também podem afetar a composição química e o rendimento. E, provavelmente, essa influência ocorre por essas substâncias representarem uma interface química entre as plantas e o ambiente.

A estrutura química das moléculas dos óleos essenciais é composta por uma mistura complexa de derivados de terpenos e fenilpropanoides. Os terpenos, também conhecidos como terpenoides (quando apresentam oxigênio em sua composição), constituem a maior classe de produtos naturais, representando cerca de 90% da composição química dos óleos essenciais. São sintetizados a partir da unidade isoprênica (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 9) que, por sua vez, origina-se do ácido mevalônico, sendo ativo no citosol ou da via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), sendo ativo nos plastídeos (SIMÕES et al., 2007).

Figura 9 – Estrutura química do isopreno.



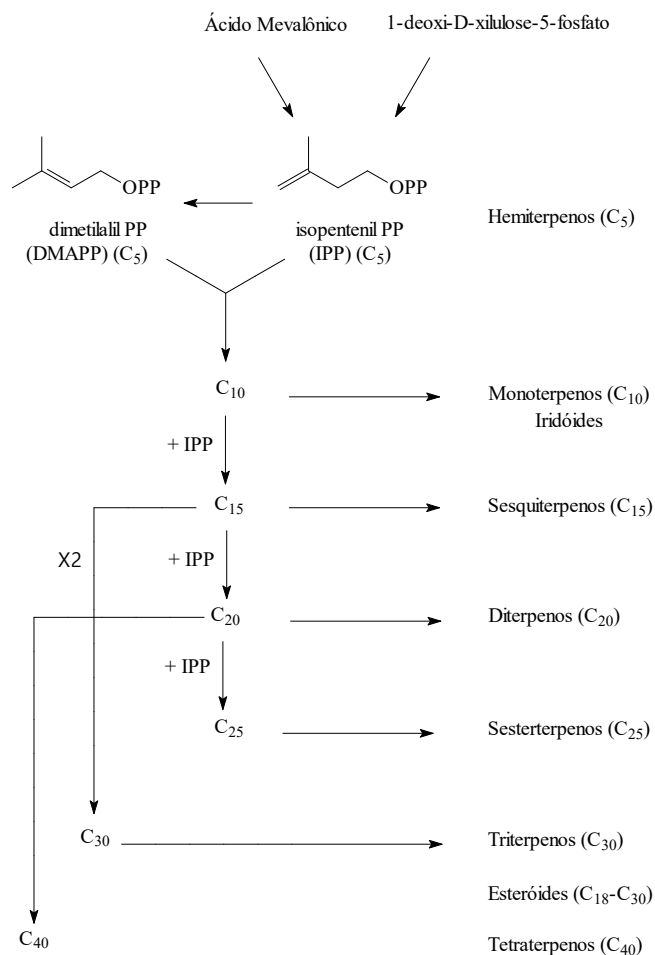
Fonte: Do autor (2019).

Os componentes dos óleos essenciais são classificados pelo número de unidade isoprênica que possuem. Um monoterpreno (C₁₀) é constituído por duas unidades de isopreno,

um sesquiterpeno (C15) por três unidades de isopreno, um diterpeno (C20) por quatro unidades de isopreno, e assim por diante (Figura 10). As unidades de isopreno podem ser ligadas de forma a originar cadeias lineares ou moléculas cíclicas (BAKKALI et al., 2008).

O ácido mevalônico é desidratado e pirofosforilado, produzindo o isopentenil difosfato (IPP), que é transformado por meio de reações de isomerização em dimetilalil difosfato (DMAPP) (unidades isoprênicas bioquimicamente ativas). Já pela via do intermediário DXPS, é originado o 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, cujas sucessivas reações formam o IPP e o DMAPP. Pela condensação das unidades pentacarbonadas formadas (IPP e DMAPP), ocorre a síntese dos outros compostos terpênicos (DEWICK et al., 2002).

Figura 10 - Biossíntese dos terpenoides.

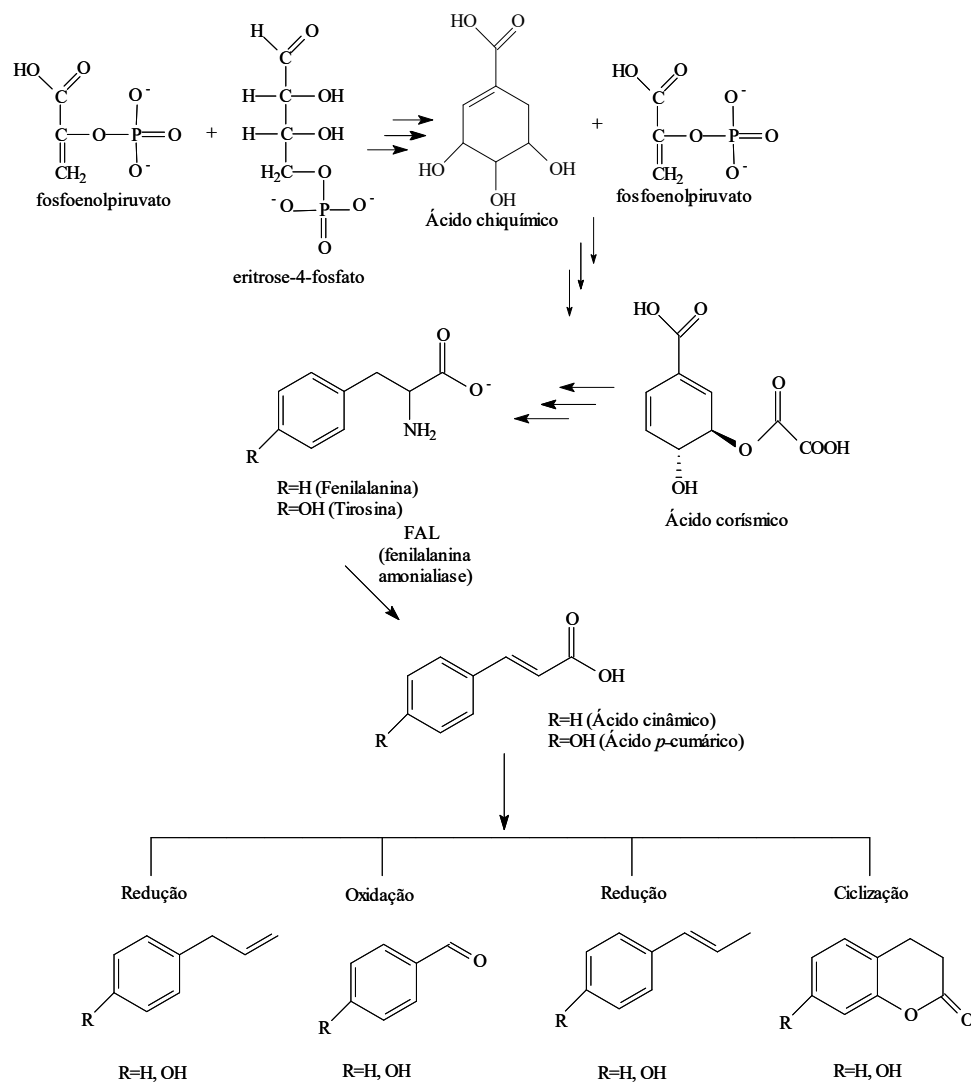


Fonte: Do autor (2019), adaptado de Dewick et al. (2002).

Os fenilpropanoides são caracterizados estruturalmente por apresentarem um anel benzênico com uma cadeia lateral composta por três carbonos, com uma dupla ligação, podendo apresentar uma hidroxila na posição *para*, conter em suas estruturas outros grupos

funcionais oxigenados e como precursor o ácido chiquímico, que é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. A junção de uma molécula do ácido chiquímico e de uma fosfoenolpiruvato dá origem ao ácido corísmico, responsável por gerar aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), resulta na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Assim, os fenilpropanoides são formados pelas reações de redução, oxidação e ciclização desses ácidos (Figura 11) (SIMÕES et al., 2007).

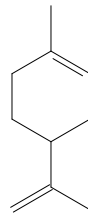
Figura 11 - Biossíntese dos fenilpropanoides.



Fonte: Do autor (2019), adaptado de Simões et al. (2007).

Os óleos essenciais de citros constituem-se de uma mistura de diversos compostos, contendo terpenos e compostos não voláteis, dos quais o limoneno (monoterpeno cíclico) (Figura 12) pode estar presente em mais de 90%. As frutas cítricas mais conhecidas pertencentes a esse gênero das quais se extraem os óleos essenciais são o limão (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) e laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck).

Figura 12 - Estrutura química do limoneno.



Fonte: do autor, 2019.

O mercado global de óleos essenciais tem crescido constantemente nos últimos anos, com previsão de atingir US \$ 11,19 bilhões até 2022 e uma taxa de crescimento anual de 8,8% de 2017 a 2022. A demanda por esses produtos está crescendo e incentivando os fabricantes a aumentarem a produção. A mudança na direção dos cuidados preventivos, aliada à melhoria do padrão de vida entre os consumidores, são os principais fatores que impulsionam o mercado. Além disso, os casos crescentes de depressão e transtornos de ansiedade são vistos também como contribuintes para a crescente demanda (WOOD, 2017).

Entre os óleos essenciais produzidos, os de laranja, oriundos de subprodutos da indústria de sucos, representaram a maior participação de mercado em 2017. O Brasil se destaca como um dos maiores produtores, mas apesar dessa alta produtividade, o país apresenta muitos problemas, como falhas no padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor a um quadro que não prospera (WOOD, 2017).

Das laranjas comercializadas mundialmente, as sanguíneas da variedade Moro vêm ganhando destaque, por apresentarem grande potencial nutricional e mercadológico. Mas apesar dessa expansão, estudos envolvendo a extração do óleo essencial da casca dessas laranjas ainda são escassos, precisando ser incentivados devido ao alto valor agregado envolvido, pois podem apresentar novas propriedades biológicas, além de possibilitar o

aproveitamento dos subprodutos gerados na fabricação dos sucos, contribuindo para a redução da poluição ambiental (FABRONI et al., 2016).

2.3.1 Atividades biológicas dos óleos essenciais

Durante muito tempo, os óleos essenciais foram valorizados apenas pelo aroma e sabor que propiciavam aos alimentos e bebidas. Atualmente, eles têm recebido um interesse terapêutico renovado, ganhado destaque como produtos naturais e sendo aceitos pelos consumidores, por não conferirem riscos à saúde. Dessa forma, passaram a ter mais foco nas indústrias alimentícia, farmacêutica e agrônômica, devido às inúmeras propriedades multifuncionais que possuem, incluindo as atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, inseticida, alelopática, antiparasitária, anti-inflamatória, entre outras (CAMARGO et al., 2017; CEOLE; CARDOSO; SOARES, 2017; DE ANDRADE et al., 2018; DOSOKY; SETZER, 2018; MIRANDA et al., 2016; POMA et al., 2018; REZENDE et al., 2017; SALES et al., 2017; SANTIAGO et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018; VILLAMIZAR et al., 2017).

Mais de três mil óleos essenciais foram descritos, dos quais cerca de um décimo são relevantes para as indústrias. As atividades biológicas desses compostos estão relacionadas com as suas estruturas químicas, principalmente aquelas que possuem grupos hidroxila ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons disponíveis para serem doados. Entretanto, a grande variação no perfil químico significa uma grande diversidade nos mecanismos de ação e alvos moleculares (SHARIFI-RAD et al., 2017).

É possível ressaltar que os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais nem sempre são os responsáveis pelas propriedades que eles possuem. Houghton et al. (2007) demonstraram que, pela análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais, não é possível afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica em estudo. Assim, o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou a um sinergismo entre os compostos existentes no óleo.

2.3.1.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

O controle de fungos por meio da utilização de óleos essenciais é de extrema importância, pois muitos desses microrganismos podem atuar como deterioradores de produtos alimentícios, incluindo grãos, cereais, leguminosas, frutas e vegetais, pela produção de

micotoxinas, tornando os alimentos impróprios para consumo, podendo afetar negativamente seu valor nutricional (PANDEY et al., 2016).

Durante o armazenamento de alimentos, a deterioração é um problema crônico em países de clima quente e úmido. Segundo o *Food and Agriculture Organization*, os fungos e seus metabólitos tóxicos podem produzir perdas de até 25% do total das commodities agrícolas em todo o mundo. Assim, durante o armazenamento e transporte, a prevenção do crescimento de fungos mediante a aplicação de biofilmes, embalagens ativas e conservantes naturais elaborados, a partir de óleos essenciais, pode ser uma abordagem econômica para combater essas perdas (PEREIRA et al., 2014).

A fim de se comprovar a atividade antifúngica dos óleos essenciais, diversos trabalhos foram realizados. Kedia et al. (2015) sugeriram que essa atividade pode estar relacionada às características hidrofóbica e lipofílica dos óleos essenciais, que, em consequência disso, atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, interrompem a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios e interagem com as enzimas e proteínas da membrana responsáveis pela biossíntese do ergosterol, produzindo um fluxo de prótons para o exterior da célula que rompem a sua organização, ocasionando um desequilíbrio na permeabilidade que reflete um vazamento do conteúdo celular, culminando na morte do fungo. Além disso, nas células eucarióticas, os óleos essenciais têm sido capazes de despolarizar a membrana mitocondrial, afetando o ciclo iônico do Ca^{++} e reduzindo o gradiente de pH (BAKKALI et al., 2008).

Tais afirmações podem ser comprovadas no trabalho de Lucas et al. (2012), que demonstraram alterações nas membranas das células fúngicas de *Pseudocercospora griseola*, quando tratadas com óleo essencial de *C. citratus*. Foram observados danos ultraestruturais nas células dos conídios, com condensação no citoplasma, fusão dos vacúolos, alterações na estrutura mitocondrial interna, lise de organelas membranosas, ruptura da membrana plasmática e da parede celular.

Santiago et al. (2017) estudaram o efeito dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* e *Backhousia citriodora* sobre a síntese de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* isolados de uvas. A atividade toxigênica dos óleos essenciais (31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi avaliada pela inibição da produção de OTA pelos fungos estudados, sendo a quantificação da toxina realizada por HPLC. Os autores observaram que a produção de OTA foi dependente das espécies de fungos, da temperatura de incubação e da presença dos óleos essenciais. Em testes realizados a 15 °C, os óleos causaram redução na síntese de OTA, que variou de 57,60 a 76,93% e de

54,78 a 98,68% para os fungos *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. A 25 °C, as reduções variaram de 38,66 a 75,93% e de 17,94 a 71,79% para os respectivos fungos. Pelo estudo, conclui-se que os produtos naturais podem ser potenciais agentes de biocontrole contra a contaminação por OTA nos alimentos.

2.3.1.2 Atividade antitumoral dos óleos essenciais

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, conhecida como metástase (INCA, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a primeira causa de morte em países desenvolvidos e sua incidência só cresce pelo mundo. Dados recentes estimam que em 2018 ocorreram 18,1 milhões de novos casos da doença e 9,6 milhões de mortes em sua decorrência. O estudo aponta que um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres terão câncer durante a vida e um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres vão morrer da doença (GLOBOCAN, 2018).

O aumento do número de casos de câncer se deve a múltiplos fatores, entre eles o crescimento e o envelhecimento da população e o aumento de causas ligadas ao desenvolvimento econômico. Em economias em crescimento, os pesquisadores observam uma mudança no padrão de incidência de cânceres, com redução do número de casos de tumores relacionados a infecções e condições de pobreza e aumento do caso de tumores mais ligados à vida urbana, típicos de países desenvolvidos. Por outro lado, o número de pessoas que estarão vivas dentro do período de cinco anos após o diagnóstico do câncer é estimado em 43,8 milhões. Há cinco anos, quando a última edição do estudo foi publicada, eram 32 milhões de pessoas nessa situação (GLOBOCAN, 2018).

As estimativas apontam que o Brasil tenha somado em 559 mil novos casos de câncer, com 243 mil mortes, em 2018. Até 2040, é esperado ainda um aumento de 78,5% dos casos,

um dos maiores entre as principais economias mundiais. Hoje, o câncer de mama é o mais frequente no país, com 85,6 mil casos, 15,3% do total. Em segundo, lugar vem o de próstata, com 84,9 mil. Essas estatísticas apoiam a necessidade de novas drogas quimioterápicas nos próximos anos (GLOBOCAN, 2018).

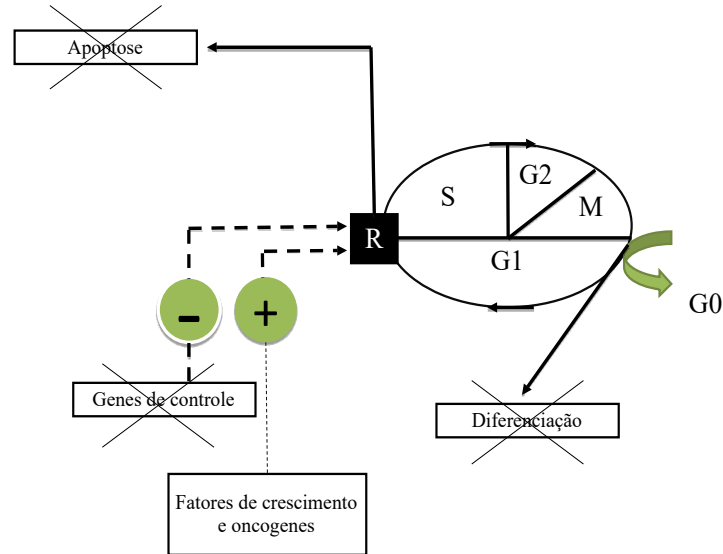
A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados a diversos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos, como má alimentação, cigarro, ingestão de bebidas alcoólicas, sedentarismo, estresse, poluição ambiental, exposição a raios solares, radiação ultravioleta, entre outros. Sugere-se que o estresse oxidativo, inflamação crônica e câncer estejam relacionados (PRADO, 2014; REUTER et al., 2010).

Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles interfere no ciclo celular (Figura 13). A célula que não está replicando apresenta-se na fase G₀. Nessa fase, o DNA apresenta-se muito envelado, com atividade nuclear baixa. Esse estágio pode ser modificado para a fase G₁, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S (DE ROBERTIS; HIB, 2014).

Nas fases G₁ e S, existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, ao passo que os controles de retroalimentação (“feedback”) são inibidores da multiplicação celular. Esses controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que detêm a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado. Outro mecanismo regulador é a apoptose (morte celular programada), que provoca a morte da célula em detrimento da possibilidade de a célula tornar-se alterada, podendo levar ao câncer (DE ROBERTIS; HIB, 2014).

Na fase G₂, há a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específico da espécie), como a produção do fuso mitótico que é feita na fase M. Após a divisão do material nuclear, há a citocinese (separação da célula-mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular (retorna à fase G₀). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G₀); assim, passa da fase M para nova fase G₁, multiplicando-se rapidamente (DE ROBERTIS; HIB, 2014).

Figura 13 - Esquema do ciclo celular de uma célula cancerosa.



Fonte: Do autor (2019), adaptado de De Robertis e Hib (2014).

Os estágios da carcinogênese requerem diferentes abordagens quimioterápicas, devido à natureza evolutiva do câncer, que levam a alterações na sensibilidade à terapia. A progressão tumoral está associada à instabilidade genômica, pelo do acúmulo de mutações para fatores envolvidos na proliferação celular, apoptose e reparo de DNA. As drogas quimioterápicas agem no estágio de promoção, de maneira que incluem a inibição da proliferação celular, o aumento da taxa de morte celular e a indução da diferenciação de células tumorais (FERGUSON; CHEN; COLLINS, 2015).

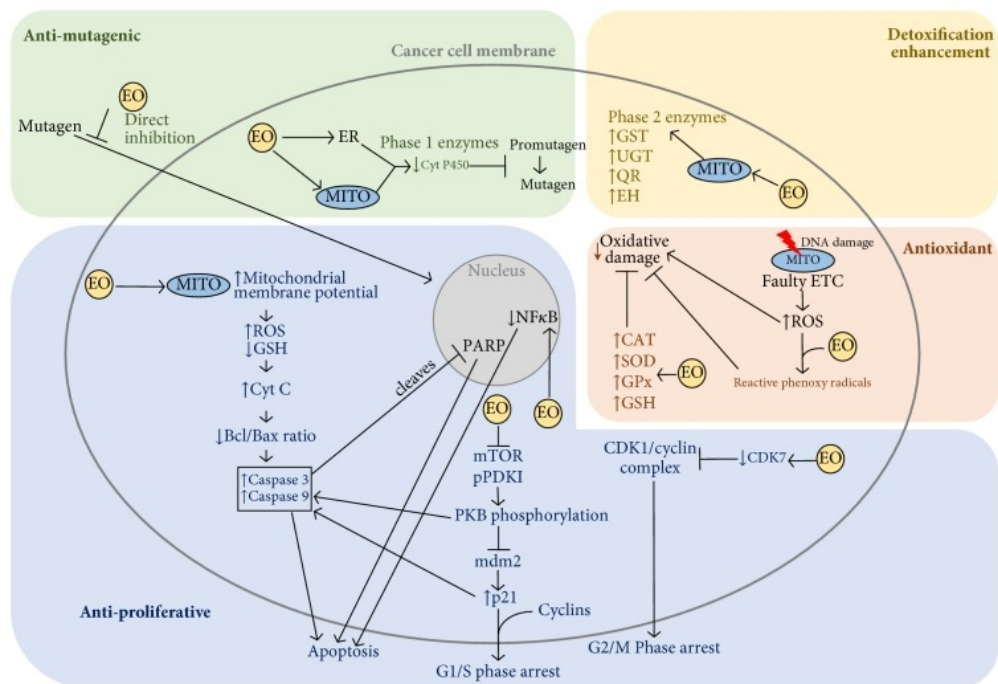
As drogas quimioterápicas convencionais são mais citotóxicas para as células cancerígenas devido à sua maior taxa de divisão celular; no entanto, devido a esse mecanismo de ação, há problemas com a especificidade de células tumorais e citotoxicidade associada a células saudáveis. Os efeitos colaterais subsequentes no paciente podem dificultar a recuperação e até mesmo provar ser fatal (BLOWMAN et al., 2018).

A administração combinada de produtos naturais e drogas quimioterápicas convencionais é uma via potencial para a solução desse problema, fornecendo o agente altamente citotóxico especificamente às células cancerígenas. A atividade antiproliferativa dos óleos essenciais vem ganhando destaque pelos mecanismos preventivos, além de atuarem na própria célula tumoral estabelecida e na interação com o microambiente, podendo inibir diretamente a entrada de mutagênicos na célula, diminuindo as enzimas da fase I, como CytC (citocromo C) e aumentando as enzimas da fase II, como a GST e UGT (uridina 5'-difosfo-

glucuronosiltransferase), QR (quinona redutase) e EH (epóxido hidrolase), para uma desintoxicação melhorada da célula (Figura 14) (CHARI, 2008; SITAREK et al., 2017).

Os óleos essenciais suprimem o mTOR (alvo mecanicista do fármaco rapamicina) e a pPDK1 (proteína piruvato desidrogenase quinase 1), causando desfosforilação da proteína PKB (proteína quinase B), que atua duplamente para iniciar a atividade da protease caspase e desativar a proteína reguladora MDM2 (minuto duplo de murino 2), aumentando a proteína p21 (proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular) para iniciar uma maior atividade de caspase, resultando em apoptose. A p21 aumentada induz à parada do ciclo celular na fase G1/S. Os óleos essenciais diminuem a proteína CDK7 (quinase dependente de ciclina), bloqueando o complexo CDK1/ciclina e causando também parada do ciclo celular na fase G2/M (SITAREK et al., 2017).

Figura 14 - Mecanismos de ação preventivos e anticancerígenos de óleos essenciais.



Fonte: Sitarek et al. (2017). Legenda: CytP450: citocromo P450; CytC: citocromo C; GST: glutiona-S-transferase; UGT: uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase; QR: quinona redutase; EH: epóxido hidrolase; ROS: espécies reativas de oxigênio; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutiona peroxidase; GSH: glutiona reduzida; Bcl: linfoma das células-B2; Bax: proteína X associada ao linfoma das células-B2; PARP: poli ADP ribose polimerase; mTOR: alvo mecanicista do fármaco rapamicina; pPDK1: proteína piruvato desidrogenase quinase 1; PKB: proteína quinase B; mdm2: minuto duplo de murino 2; p21: proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular; G1/S: fases do ciclo celular; CDK: quinase dependente de ciclina; G2/M: fases do ciclo celular; ER: retículo endoplasmático; ETC: cadeia de transporte de elétrons; MITO: mitocôndrias; NF κ B: nuclear fator κ B.

Kapur et al. (2016) mostraram que o citral, uma mistura isomérica de neral e geranial, inibe a proliferação celular e o crescimento do tumor, aumentando os níveis intracelulares de radicais de oxigênio e, conseqüentemente, induzindo estresse oxidativo, levando à redução da proliferação de células cancerígenas e resultando em morte celular. Anteriormente, Nakamura et al. (2003), pesquisando o óleo essencial de *Melissa officinalis*, observaram que ele inibiu as enzimas da fase II de uma maneira dependente da dose. O mecanismo de ação do citral é devido ao seu componente geranial.

Russo et al. (2016) investigaram as composições qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Sálvia officinalis* e sua atividade biológica contra células de melanoma humano e os mecanismos anticancerígenos envolvidos, como integridade da membrana celular, fragmentação do DNA genômico e atividade da caspase-3. Os autores relataram que todos os óleos essenciais que foram capazes de diminuir o crescimento de células cancerígenas induzindo morte celular apoptótica. Essas atividades foram associadas a seus constituintes, que incluem predominantemente sesquiterpenos, particularmente sesquiterpenos oxigenados como óxido de cariofileno.

Girola et al. (2015) testaram as propriedades antitumorais do canfeno isolado do óleo essencial de *Piper cernuum* em células de melanoma. O estudo demonstrou que esse composto foi capaz de induzir a apoptose pela ativação da via da caspase-3, bem como ativar a sinalização de estresse do retículo endoplasmático.

Oliveira et al. (2015) verificaram a atividade antitumoral *in vitro* de óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *Callistemon viminalis* pela técnica de hidrodestilação. A atividade antitumoral foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), utilizando diferentes linhagens celulares derivadas de tumores humanos (mama, pulmão, glioblastoma e melanoma). Os principais constituintes das folhas e flores foram o 1,8-cineol, α -pinene e α -terpineol. A atividade citotóxica foi observada apenas nas culturas de melanoma (HT144). Culturas tratadas por 48 h com óleos essenciais de folhas e flores ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram a viabilidade em 40% e 25%, respectivamente. A atividade antiproliferativa dos óleos das folhas foi mais pronunciada que o das flores nas células derivadas do melanoma.

2.3.1.3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Muitos óleos essenciais têm exibido resultados promissores como agentes antioxidantes, apresentando atividades no controle de radicais livres, de substâncias oxidantes

e na inibição de peroxidação lipídica, promovendo a substituição ou fazendo associações com os antioxidantes sintéticos, com conseqüente redução dos efeitos negativos à saúde (GOMES et al., 2016; SANTIAGO, 2015; TEIXEIRA, 2016).

Os radicais livres são definidos como qualquer molécula capaz de permanecer com um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, sendo assim altamente instáveis e reativos. Eles são formados pelas reações químicas de oxirredução. A molécula que sofre oxidação perde elétron para a molécula que sofre redução, a qual ganha elétrons. Tanto o ganho como a perda de elétrons pode gerar um desemparelhamento dos elétrons de uma molécula, tornando-a um radical livre (LIOCHEV, 2013).

As moléculas que perderam elétrons tendem a atacar outras moléculas que estão à sua volta, na tentativa de sequestrar elétrons e atingir uma estabilidade. Essa ação pode gerar uma reação em cadeia, pois a molécula que foi “roubada” passa a ser um radical livre e tende a fazer o mesmo com outra molécula e assim por diante. Esse excesso de radicais livres no organismo pode danificar a membrana e a estrutura da célula, podendo causar morte celular (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).

O elétron livre que caracteriza o radical pode estar centrado em diferentes átomos: hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), carbono (C), enxofre (S) ou átomos de metais de transição (Fe, Cu). As EROs referem-se aos radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), o radical peroxila (ROO^{\bullet}) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Uma vez produzidas, a maior parte das EROs é removida pelas defesas antioxidantes da célula, que incluem enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase) e moléculas não enzimáticas (vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis, os oligoelementos e os polifenóis). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (COTINGUIBA et al., 2013).

Antioxidantes são moléculas que podem neutralizar os radicais livres, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição não pareada do radical. As moléculas antioxidantes podem reagir diretamente com os radicais reativos e destruí-los, enquanto eles podem se tornar novos radicais livres que são menos ativos, mais duradouros e menos perigosos que os radicais que eles neutralizaram. Esses antioxidantes podem ajudar a proteger os danos celulares do estresse oxidativo e também reduzir o risco de doenças crônicas. Outra

importante função dos antioxidantes é regular as enzimas relacionadas às EROs (CAMBRUSSI et al., 2018).

Antioxidantes sintéticos, tais como butil-hidroxi-anisol (BHA) e 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos para retardar a oxidação de lipídios. No entanto, esses antioxidantes não são preferidos devido a preocupações toxicológicas. Assim, mais interesses se concentraram na identificação de produtos vegetais, como os óleos essenciais, para uso como suplementos antioxidantes (LUIZ; SILVA; ZERMIANI, 2017).

A fim de se determinar a capacidade antioxidante *in vitro* de substâncias antioxidantes, diferentes métodos são aplicados devido aos diferentes tipos de radicais livres gerados e às suas distintas formas de atuação nos organismos vivos. Dentre esses métodos, destacam-se os baseados na estabilização de radicais (ABTS, DPPH, hidroxil, ORAC); complexação de metais (redução do molibdênio e poder redutor - FRAP) e inibição da peroxidação lipídica (TBARS, oxidação do LDL e cooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico), lipossomas, acetilcolinesterase, entre outros.

Miranda et al. (2016) avaliaram as propriedades antioxidantes de óleos essenciais de folhas frescas de *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Tithonia diversifolia*, *Ambrosia polystachya*, *Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia*, pelas metodologias do consumo do radical DPPH e pela inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Todos os óleos essenciais avaliados pela metodologia do sequestro do radical DPPH não apresentaram IC50 significativos, provavelmente pelo elevado conteúdo de terpenos. Empregando a metodologia do β -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais de *T. diversifolia* e *H. coronarium* não apresentaram atividades significativas e os de *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *A. polystachya*, e *B. dracunculifolia* apresentaram IC50 superiores a maior concentração avaliada.

Rezende et al. (2017) estudaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* e *Foeniculum vulgare*, extraídos por hidrodestilação, caracterizados e quantificados por CG/MS (cromatografia gasosa com espectrômetro de massa) e CG/FID (cromatografia gasosa com detector por ionização de chama). Os principais componentes do óleo essencial de *M. piperita* (carvona e limoneno), *C. citratus* (geranial, neral e mirceno), *R. officinalis* (1,8-cineol, cânfora e α -pineno), *P. boldus* (formão de α -terpinila, p-cimeno e 1,8-cineol) e *F. vulgare* (metil chavicol, limoneno e fenchona) foram identificados. Os óleos foram testados quanto à atividade antioxidante empregando os métodos DPPH, ABTS, β -caroteno/ácido linoléico,

radical hidroxil e redução do molibdênio. Todos os óleos essenciais testados apresentaram baixo ou nenhum efeito antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoléico. Foi observada atividade antioxidante pelo método hidroxil no óleo essencial de *M. piperita*, apresentando resultados maiores do que o padrão manitol utilizado. No método de redução de molibdênio, os óleos essenciais de *C. citratus* e *P. boldus* foram mais eficazes.

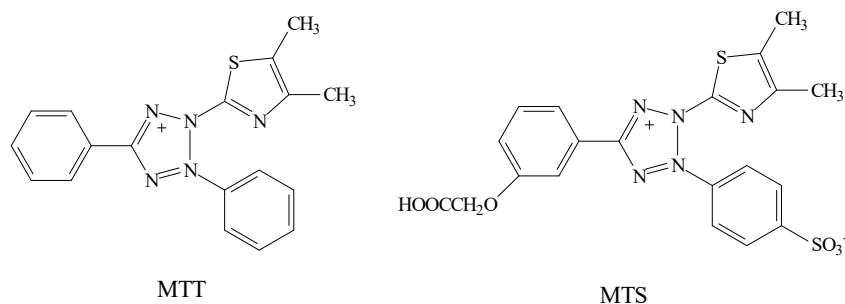
2.3.1.4 Atividade citotóxica dos óleos essenciais

Com o aprimoramento das culturas celulares, foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de linhagens celulares oriundas de tumores humanos e murinos. Atualmente, são utilizadas diversas linhagens, como a MCF7 (adenocarcinoma de mama), Jurkat (leucemia linfoblástica T), HepG2 (hepatocarcinoma), HT-29 (tumor de intestino), J774-A1 (macrófago murino), Hela (câncer cervical), H7144 (melanoma), A549 (adenocarcinoma de pulmão), entre outras. Além das linhagens neoplásicas utilizadas para verificar a seletividade da droga, utilizam-se linhagens normais, como a VERO e CCD-1059Sk (obtidas de fibroblastos derivados de pele humana) (ANBARLOU et al., 2015; GOLFAKHRABADI et al., 2015; MAHMOUDVAND et al., 2015; TAHERKHANI, 2015).

Os métodos colorimétricos que quantificam a proliferação celular em cultura mais conhecidos são aqueles que se utilizam corantes, como o MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio e o MTS (Figura 15). O MTT é um sal amarelo que é reduzido pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial, resultando em um sal de formazan de cor púrpura. Essa redução ocorre somente em células vivas. Dessa maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura, que é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados. A desvantagem é a necessidade do uso de solventes orgânicos, como o DMSO ou o álcool isopropílico, para dissolver os cristais de formazan que são insolúveis em água (NOZAKI et al., 2012).

O corante MTS é reduzido da mesma forma que o MTT pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a formação de cristais de formazan. A diferença é que os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário (NOZAKI et al., 2012).

Figura 15 - Estruturas moleculares dos corantes: a) MTT; b) MTS.



Fonte: Do autor (2019).

A triagem *in vitro* sobre células tumorais ou normais de diversas linhagens possibilita a análise de várias amostras simultaneamente e representa uma metodologia mais simples que os ensaios *in vivo*, além de reduzir o uso de animais em experimentos. Dessa forma, as amostras que inibem seletivamente a proliferação celular são selecionadas para determinação da eficácia, seletividade e mecanismo de ação do composto, em um espectro mais amplo de linhagens (COSTA-LOTUFO et al., 2010; NEIDLE; THURSTON, 2005).

Oukerrou et al. (2017) investigaram o efeito citotóxico do óleo essencial de folhas secas de *Lippia citriodora* colhidas em diferentes regiões do Marrocos. Esse efeito foi avaliado diante da linhagem celular de mastocitoma murino (P815), utilizando o ensaio MTT. Pelos resultados, demonstrou-se que o óleo essencial exibiu atividade citotóxica sobre a linhagem P815, com valores de IC₅₀ variando de 7,75 a 13,25 µg mL⁻¹. Essa citotoxicidade rapidamente se iniciou e aumentou de um modo dependente da dose e do tempo. Os autores concluíram que o óleo essencial estudado induziu a apoptose na linhagem celular estudada.

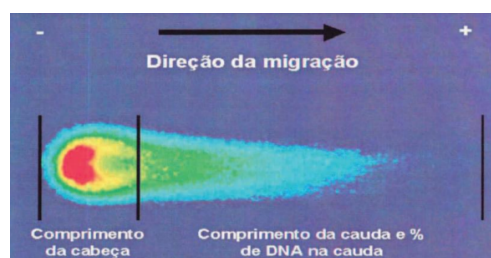
2.3.1.5 Atividade genotóxica dos óleos essenciais

Os organismos vivos estão habitualmente expostos a substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares, induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos, afetando processos vitais, como a duplicação, a transcrição gênica e alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular e, por causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (COSTA; MENK 2000).

Algumas substâncias naturais podem apresentar essas características; por isso, a avaliação da genotoxicidade de óleos essenciais representa um papel importante no desenvolvimento de novos produtos, devendo ser realizada nos estágios iniciais desse desenvolvimento, a fim de auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas.

Os principais testes *in vitro* utilizados para a detecção da genotoxicidade de óleos essenciais são os ensaios de Ames, Micronúcleos e o Cometa. O ensaio Cometa ou *Single Cell Gel (SCG) Assay* é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia. Nessa metodologia, inicialmente as células obtidas de um ser vivo são embebidas em uma solução contendo gel de agarose e lise. Após esse processo, as membranas celulares sofrem um processo de lise e suas proteínas nucleares são extraídas. Como o DNA possui mais peso que os outros componentes que restaram, ele tende a ficar retido em uma estrutura conhecida como nucleóide (conjunto de alças enoveladas de DNA que não possuem histonas e que ficam aderidas a matriz nuclear remanescente). Essas células, então, são submetidas a uma corrida em gel de eletroforese, o que faz com que o DNA (possui cargas elétricas negativas) fragmentado livre migre em direção ao polo positivo e se afaste do núcleo principal, formando, assim, a cauda e dando à célula a aparência de um cometa com cabeça (região nuclear) e cauda (constituída pelos fragmentos de DNA). Os cometas formados por meio da corrida eletroforética podem, então, ser corados e analisados por microscopia de fluorescência usando corantes fluorescentes como brometo de etídio, iodeto de propídio e *Syber Green*, ou podem ser analisados em microscopia óptica usando corantes como nitrato de prata ou Giemsa. Na Figura 16 está representada a estrutura de um cometa com a cabeça e cauda (BARROS, 2013; OLIVEIRA, 2014; SANTOS, 2015; SINGH et al., 1988).

Figura 16 - Estrutura de um cometa com cabeça e cauda.



Fonte: Oliveira (2014).

Nesse ensaio, a avaliação do DNA fragmentado é medida pela corrida desses fragmentos na eletroforese, com posterior análise da cabeça e cauda do cometa formado, sendo que, quanto maior quantidade de quebras de DNA, maior será extensão da migração do DNA lesado. A análise dos cometas pode ser feita visualmente e automatizada utilizando-se softwares específicos para essa finalidade. Durante a análise dos cometas, as células normais (células que não possuem dano detectável no DNA) apresentam núcleo redondo, ao passo que

as células que possuem danos detectáveis no DNA apresentam uma cauda constituída por fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (CARMO, 2009; MENEZES, 2011).

Ruiz-Pérez et al. (2016) realizaram a avaliação genotóxica de óleos essenciais de *Citrus sinensis* e *Citrus latifolia* que foram extraídos da casca pela técnica de hidrodestilação. Os principais componentes determinados pela GC-MS foram o *d*-limoneno e α -mirceno em *Citrus sinensis* e *d*-limoneno, β -thujona, β -pineno e γ -terpineno em *Citrus latifolia*. A avaliação genotóxica foi feita pelo teste de Ames, em que nenhum dos óleos induziu mutações pontuais. A citometria de fluxo foi utilizada para medir a toxicidade em células epiteliais orais humanas. Observaram que a espécie *Citrus sinensis* não foi citotóxica e *Citrus latifolia* foi tóxica em 21,8 μ g.

A fim de cumprir os requisitos da Autoridade Europeia para a segurança dos alimentos, Llana-Ruiz-Cabello et al. (2018) administraram óleo essencial de *Origanum vulgare* 50, 100 ou 200 mg/kg de massa corporal durante noventa dias em ratos Wistar e determinaram o potencial genotóxico usando os testes do Micronúcleo (MN) e Cometa. O MN foi realizado em células da medula óssea e ensaios Cometas foram conduzidos em células do estômago, fígado e sangue. O principal composto detectado no estudo analítico do óleo essencial foi o carvacrol, seguido de timol, assim como seus precursores, γ -terpineno e p -cimeno. Pelos resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade, infere-se ausência de efeito em MN e ensaio padrão de Cometa sob as condições testadas.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, M. et al. Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. **Jama**, v. 313, n. 19, p. 1973-1974, 2015.
- AHIMA, R. **Metabolic Basis of Obesity**. New York: Springer, 2011. p. 75 a 77.
- ALBARELLO, R. A. et al. Effects of resistance training on the lipid profile of subjects with metabolic syndrome. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v. 10, n. 3, p. 142-146, 2017.
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 1, p. 469-480, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification o diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 41, n. 1, p. 13-27, 2018.
- ANBARLOU, A. et al. Cancer stem cells in acute lymphoblastic leukemia. **Stem Cell & Translational Investigation**, v. 2, n. 783, p. 1-2, 2015.
- ANNO, **Fattori di rischio per la salute: fumo, obesità, alcol e sedentarietà**. Itália, 2016. Disponível em: <<https://www.istat.it/it/archivio/202040>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- AWAD, M. A.; WAGENMAKERS, P. S.; ANTON DE JAGER, A. de. Effects of light on avonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. **Scientia Horticulturae**, v. 88, n. 1, p. 289-298, 2001.
- AZZINI, E.; GIACOMETTI, J.; RUSSO, G. L. Antiobesity Effects of Anthocyanins in Preclinical and Clinical Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 1-11, 2017.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARRECA, G. et al. Geodetic and geological evidence of active tectonics in south-western Sicily (Italy). **Journal of Geodynamics**, v. 82, n. 1, p. 138-149, 2014.
- BARROS, A. L. de. **Avaliação dos efeitos toxicológicos após exposição aguda e subaguda ao inseticida diflubenzuron em roedores**. 2013. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2013.
- BAUMANN, L. S. Polyphenols. **Skin & Allergy News**, v. 41, n. 1, p. 1-14, 2010.
- BHANDARI, R. et al. Metabolic syndrome is associated with increased breast cancer risk: a systematic review with meta-analysis. **International journal of breast cancer**, v. 2014, n. 1, p. 1-13, 2014.
- BIRT, D. F.; JEFFER, Y. E. Flavonoids. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 5, p. 576-577, 2013.

BLOWMAN, K. et al. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 1-12, 2018.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUTELLI, E. et al. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. **The Plant Cell**, v. 24, n. 3, p. 1242-1255, 2012.

CAMARGO, K. C. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Hyptis carpinifolia* Benth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 1, p. 2871-2877, 2017.

CAMBRUSSI, A. N. C. O. et al. O papel da nanotecnologia na redução do estresse oxidativo: uma revisão. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p.1-11, 2018.

CARDILE, V.; GRAZIANO, A.; VENDITTI, A. Clinical evaluation of Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange juice supplementation for the weight management. **Natural Product Research**, v. 29, n. 1, p. 2256-2260, 2015.

CARMO, C. A. do. **Clastogenicidade e/ou aneugenicidade do hormônio androgênico nandrolona (Deca-Durabolin®) em camundongos**. 2009. 32 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2009.

CARMONA, L. et al. Anthocyanin biosynthesis and accumulation in blood oranges during postharvest storage at different low temperatures. **Food Chemistry**, v. 237, n. 1, p. 7-14, 2017.

CARRERAS, G.; ORDOÑEZ, J. Adolescence, physical activity, and metabolic cardiovascular risk factors. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, n. 6, p. 565-8, 2007.

CARVALHO, A. R. M.; BELÉM, M. O.; ODA, J. Y. Sobrepeso e obesidade em alunos de 6-10 anos de escola Estadual de Umuarama/PR. **Arquivos Ciências Saúde - UNIPAR**, v. 21, n. 1, p. 3-12, 2017.

CARVALHO, RAPHAEL. **Fisiopatologia do diabetes**. 2017. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=6YwHLG7p9Rg>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

CEOLE, L. F.; CARDOSO, M. DAS G.; SOARES, M. J. Nerolidol, the main constituent of Piper aduncum essential oil, has anti-Leishmania braziliensis activity. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 1179-1190, 2017.

CHARI, R. V. J. Terapia de câncer direcionada: Conferir especificidade a drogas citotóxicas. **Contas de Pesquisa Química**, v. 41, n. 1, p. 98-107, 2008.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotechnologia: ciência e desenvolvimento**, v. 3, n. 1, p. 24-26, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-137, 2013.

CRIFÒ, T. et al. Short cold storage enhances the anthocyanin contents and level of transcripts related to their biosynthesis in blood oranges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 476-481, 2012.

DE ANDRADE, S. J. et al. Effect of the essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* and *Backhousia citriodora* on the synthesis of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* isolated from tropical wine grapes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 418-423, 2018.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Biologia celular e molecular**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 363 p.

DENG, S. et al. UCP2 Inhibits ROS-Mediated Apoptosis in A549 under Hypoxic Conditions. **Plos one**, v. 7, n. 1, p. e30714, 2012.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 2, p. 181-222, 2002.

DONG, M.; REN, J. What fans the fire: insights into mechanisms of leptin in metabolic syndrome-associated heart diseases. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 1, p. 652-658, 2014.

DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Chemical composition and biological activities of essential oils of curcuma species. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1-42 2018.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 1, p. 126-134, 2012.

ERDMAN, J.; ORIA, M.; PILLSBURY, L. Nutrition and Traumatic Brain Injury: Improving Acute and Subacute Health Outcomes in Military Personnel. **Journal of Head Trauma Rehabilitation**, v. 21, n. 5, p. 375-378, 2012.

FABRONI, S. et al. Anthocyanins in different *Citrus* species: a UHPLC-PDA-ESI/MS n - assisted qualitative and quantitative research. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 4797-4808, 2016.

FERGUSON, L. R.; CHEN, H. H.; COLLINS, A. R. Instabilidade genômica no câncer humano: insights moleculares e oportunidades de ataque terapêutico e prevenção através de dieta e nutrição. **Seminários em Biologia do Câncer**, v. 35, n. 1, p. S5-S24, 2015.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. S192-S203, 2007.

FORD, E. S. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 1, p. 309-314, 2004.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 1, p. 1752-1761, 2004.

GIROLA, N. et al. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 928-934, 2015.

GLOBOCAN - GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Cancer today**. France, 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

GOBBI, A.; BALBINOTTI, A. V. **Glicemia e Glicólise**. 2013. Disponível em: <<http://fisioterapiafisioex.blogspot.com/2013/03/glicemia-e-glicolise.html>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLFAKHRABADI, F. et al. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 104-115, 2015.

GOMES, M. S. et al. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 1, p. 299-305, 2016.

GROSSO, G. et al. Red orange: Experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. 1, p. 1-11, 2013.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, n. 1, p. 433-438, 2004.

GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Current opinion in cardiology**, v. 21, n. 1, p. 1-6. 2006.

GUO, H. et al. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂ – or TNF- α -induced insulin resistanc by inhibiting c-Jun NH₂-terminal Kinase activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 1, p. 1393-1401, 2008.

GUO, H. et al. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 349-360, 2012.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 391-400, 2007.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?** Brasil, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 6th ed. Bruxelas, 2013. Disponível em: <<https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/19-atlas-6th-edition.html>>. Acesso em: 02 out. 2018.

ISLAM, M. Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 25-31, 2011.

KAMONPATANA, K. et al. Susceptibility of anthocyanins to ex vivo degradation in human saliva. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 738-747, 2012.

KAPUR, A. et al. Modulation of oxidative stress and subsequent induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress allows citral to decrease cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

KEDIA, A. et al. Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in the suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpeas, with particular emphasis on the mode of antifungal action. **Protoplasma**, v. 243, n. 3, p. 647-653, 2016.

KUČERA, OTTO, et al. Is rat affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, n. 4, p. 281-289, 2011.

LATADO, R. R. et al. Influência do armazenamento refrigerado de laranjas sanguíneas quanto as suas características físico-químicas e concentração de antocianinas. **Laranja**, v. 29, n. 1, p. 51-67, 2008.

LEE, Y. M. et al. Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2017.

LI, C. et al. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, n. 1, p. 1-9, 2015.

LIMA, C. G. et al. Ingestão regular do suco de laranja vermelha reduz pressão arterial de adultos. **Revista do Instituto de Ciências da Saude (UNIP)**, v. 30, n. 1, p. 59-63, 2012.

LINHARES, R. S. et al. Distribuição de obesidade geral e abdominal em adultos de uma cidade no Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 1, p. 438-47, 2012.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 60, n. 1, p.1-4, 2013.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. Use of micronuclei and comet assay to evaluate the genotoxicity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. Virens) in rats exposed orally for 90 days. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 81, n. 12, p. 525-533, 2018.

LO PIERO, A. R.; LO CICERO, L.; PUGLISI, I. The metabolic fate of citric acid as affected by cold storage in blood oranges. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 161-166, 2014.

LO PIERO, A. R. et al. Anthocyanins accumulation and related gene expression in red orange fruit induced by low temperature storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 9083-9088, 2005.

LUCAS, G. C. et al. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 351-359, 2012.

LUIZ, A. H. M.; SILVA, K. L. DA.; ZERMIANI, T. **Extratos vegetais: fontes naturais de antioxidantes para a indústria alimentícia**. 2017. Duas rodas. Disponível em: <<https://www.duasrodas.com/en/news/extratos-vegetais-fontes-naturais-de-antioxidantes-para-a-industria-alimenticia>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

MACHADO, A. P. da F. **Extração e encapsulação de antocianinas de subprodutos industriais de frutas utilizando fluidos pressurizados**. 2018. 217 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

MAGALHÃES, M. L. et al. Influence of cold storage on the bioactivity properties and the ality of the juice of Moro blood Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **American Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 1, p. 24-37, 2009.

MAHMOUDVAND, H. et al. Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 21-27, 2015.

MENEZES, KARLA MENDONÇA. **Genotoxicidade e equoterapia no controle postural de portadores de esclerose múltipla**. 2011. 72 p. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica (UFC. Online)**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOLINU, M. G. et al. Effect of superatmospheric oxygen storage on the content of phytonutrients in ‘Sanguinello Comune’ blood orange. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, n. 1, p. 24-30, 2016.

MOURA, E. C. et al. Research on chronic noncommunicable diseases in Brazil: meeting the challenges of epidemiologic transition. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 31, n. 3, p. 240-245, 2012.

NAKAMURA, Y. M. et al. Um indutor de enzima de detoxificação de fase II de capim-limão: Identificação de citral e envolvimento de reação eletrofilica na indução enzimática. **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica**, v. 302, n. 3, p. 593-600, 2003.

NEIDLE, S.; THURSTON, D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 285-296, 2005.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGAI, R. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. **Discovery Medicine**, v. 8, n. 1, p. 55-60, 2009.

NOZAKI, A. C. M. et al. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. **7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**. Natal/RN, 2012.

OLIVEIRA, C. M. de et al. Chemical Characterization and in Vitro Antitumor Activity of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 1, p. 2664-2671, 2015.

OLIVEIRA, M. R. dos R. **Avaliação de danos genômicos de agentes de saúde de controle de endemias (dengue) do município de aparecida de Goiânia (GO)**. 2014. 64 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2014.

OUKERROU, M. A. et al. Differential Cytotoxic Activity of Essential Oil of *Lippia citriodora* from Different Regions in Morocco. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 7, 2017.

PAGANO, E. S.; SPINEDI, E.; GAGLIARDINO, J. J. White Adipose Tissue and Circadian Rhythm Dysfunctions in Obesity: Pathogenesis and Available Therapies. **Neuroendocrinology**, v. 104, n. 4, p. 347-366, 2017.

PANDEY, M. M. et al. Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. **Journal of Integrative Medicine**, v. 14, n. 6, p. 447-455, 2016.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, V. L. et al. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 96-136, 2014.

PINTO, W. de J. A função endócrina do tecido adiposo. *Revista Faculdade de Ciências Médicas*, v. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.

PIRES, J. Fisiologia matemática, biologia matemática, e biomatemática: leptina e a busca pelo controle de peso. *Revista Eletrônica Gestão & Saúde*, v. 6, n. 3, p. 2982-2986, 2015.

POJER, E. et al. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, n. 1, p. 483-508, 2013.

POMA, P. et al. Chemical composition, in vitro antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. *Plos One*, v. 13, n. 5, p. 1-11, 2018.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. *Ciência e Cultura*, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. *American Journal of Plant Sciences*, v. 8, n. 1, p. 154-170, 2017.

ROSA, R. et al. Estimated hospitalizations attributable to Diabetes Mellitus within the public healthcare system in Brazil from 2008 to 2010: study DIAPS 79. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 60, n. 3, p. 222-230, 2014.

RUIZ-PÉREZ, N. J. et al. Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* Essential Oils. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

RUSSO, A. et al. Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese *Salvia* species. *Industrial Crops and Products*, v. 83, n. 1, p. 492-499, 2016.

SALAMONE, F.; VOLTI, G. L. I.; TITTA L. Moro Orange juice prevents fatty liver in mice. *World Journal of Gastroenterology*, v. 18, n. 1, p. 3862-3868, 2012.

SALES, T. A. et al. Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*: Chemical Characterization and Evaluation of the Insecticide and Antifungal Activities. *American Journal of Plant Sciences*, v. 8, n. 1, p. 2516-2529, 2017.

SANTIAGO, J. de A. **Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, anticarcinogênica e citogenotóxica.** 2015. 222 p. Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobiotecnologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SANTIAGO, J. A. et al. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estruturas secretoras, atividades antibacteriana e antioxidante. *Acta Scientiarum. Ciências Biológicas (Impresso)*, v. 38, n. 1, p. 28303, 2016.

SANTIAGO, J. DE A. et al. Effect of the essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* and *Backhousia citriodora* on the synthesis of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* isolated from tropical wine grapes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 418-423, 2017.

SANTOS, NILTON CESAR NOGUEIRA dos. **Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world**. Nowich: Sinclair International, 1990. 128 p.

SEBASTIAN, R. S. et al. New database facilitates the characterization of flavonoid intake, sources and positive associations with diet quality among US adults. **Journal and Nutrition**, v. 145, n. 1, p. 1239-48, 2015.

SHARIFI-RAD, J. et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p.70, 2017.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed., Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SITAREK, P. et al. Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Essential Oils from Hairy and Normal Roots of *Leonurus sibiricus* L. and Their Chemical Composition. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 1-12, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 1, p. 1-19, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009**. 3. ed. Itapevi: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009. 400 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Atlas ID 2017 – **Diabetes no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2018/poster-atlas-idf-2017.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

SOCIEDADE CHINESA DE NUTRIÇÃO. **Manual chinês DRIs**. Pequim, China: Imprensa de padrões da China, 2013.

SOUZA, G. H. B. et al. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012. 376 p.

SRIKANTHAN, K.; SHAPIRO, J. I.; SODHI, K. The Role of Na/K-ATPase Signaling in Oxidative Stress Related to Obesity and Cardiovascular Disease. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1172, 2016.

TAHERKHANI, M. Chemical constituents and *in vitro* anticancer, cytotoxic, mutagenic and antimutagenic activities of *Artemisia diffusa*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 11, p. 729-734, 2015.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico**. 2016. 192 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

TEIXEIRA, M. L. et al. Essential oil from *Lippia origanoides* (Verbenaceae): haemostasis and enzymes activity alterations. **Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, 2018.

TITTA, L. et al. Blood Orange juice inhabits fat accumulation in mice. **International of Journal Obesity**, v. 34, n. 1, p. 578-588, 2010.

TONETTA, V. et al. O papel da linhaça como agente redutor de colesterol e perda de peso. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 11, n. 1, p. 159-167, 2017.

TSUDA, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of Preventing the Metabolic Syndrome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 642-646, 2008.

VALENZA, A. et al. Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 1-9, 2018.

VIGITEL (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico). **Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 130 p. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2017_vigilancia_fatores_riscos.pdf>. Acesso em: 12 out. 2018.

VILLAMIZAR, L. H. et al. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4 °C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online)**, v. 112, p. 131-139, 2017.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Antocianinas. **Avanços em Nutrição**, v. 6, n. 5, p. 620-622, 2015.

WHO – World Health Organization. **Overweight and obesity**. 2016. Disponível em:<https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/>. Acesso em: 24 jan. 2019.

WOOD, L. **Essential Oils Market by Product Type (Orange, Lemon, Lime, Peppermint, Citronella, Jasmine), Method of Extraction, Application (Food & Beverage, Cosmetics & Toiletries, Aromatherapy, Home Care, Health Care), and Region - Global Forecast to 2022.** 2017. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/research/64pGBP/essential_oils>. Acesso em: 03 fev. 2019.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; MARTIN, C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 81-90, 2014.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1**Influence of Cold Storage on the Bioactivity Properties and the Quality of the Juice of Moro Blood Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)****Publicado:**

Maísa Lamounier Magalhães, Luiz Carlos De Oliveira Lima, Allan da Silva Lunguinho, Danubia Aparecida De Carvalho Selvati Rezende, Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira, Rafaela Magalhães Brandão, Josefina Aparecida De Souza, Ellen Cristina De Souza, Kátia Júlia De Almeida, David Lee Nelson, Maria Das Graças Cardoso. **American Journal of Plant Science**, v. 10, p. 24-37, jan. 2019.

ABSTRACT

The possibility of commercialization of Moro blood oranges in tropical countries such as Brazil was evaluated to verify whether their post-harvest management through storage at low temperatures for a period of 60 days can improve the bioactive properties and quality parameters. Moro blood oranges cultivated in Brazil did not contain significant amounts of anthocyanins at the time of harvesting, but these compounds were activated by post-harvest management through storage at low temperatures (4 and 8 °C) for a period of 60 days. The emergence of the anthocyanins in the juices occurred within a few weeks of storage, but the maximum levels were attained after 60 days and at the temperature of 8 °C. Cold storage positively influenced other bioactive compounds such as total phenolic compounds, individual phenolic compounds, β -carotene and the antioxidant activity determined by the sequestration of DPPH free radicals. It did not influence the vitamin C content. In addition, storage significantly altered the color, total acidity and pH of the fruits, but it did not prevent its commercial use. The remaining quality parameters were not influenced. It is possible to commercialize these oranges in Brazil through post-harvest management.

Keyword: cyanidin-3-glycoside; antioxidant; post-harvest.

INTRODUCTION

The use of natural products as sources of bioactive substances that are capable of enhancing the body's functions has been extensively studied in recent decades. The consumer market is seeking products that are beneficial to health, and the interest of the food industries for these products is increasing, impelling research on the isolation, characterization and properties of these substances. In this context, fruits rich in antioxidants that may play a protective role against a number of diseases stand out.

From the most consumed fruits, oranges (*Citrus sinensis*) occupy notorious position in global economic scene, because they are responsible for a production amount of 50.672 thousand tons [1]. However, even with this high production, it is observed that some countries have low consumption and to reduce this deficiency, Moro blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (OM), for showing great nutritional and economic potential and for not being commercialized in countries hot weather, have been object of studies.

These oranges, which originate in Italy, are characterized by the intense red coloration of the pulp and the juice and are differentiated from the other blood oranges by their high anthocyanin content, which is an important form of fruit enrichment. The potent synergism between flavonoids, ascorbic acid and hydroxycinnamic acids in the expressive antioxidant action is also noteworthy. These substances are related to the prevention of diseases such as degenerative and cardiovascular diseases, diabetes, arthritis and cancer [2].

In addition to these benefits, the OM is considered to be the only citrus fruit containing the specific anthocyanin cyanidin-3-glycoside. This substance contributes to the regulation of dysfunctions of the adipocyte cells that store energy and accumulate triacylglycerol during nutritional excess. Thus, this substance is important for weight management [3].

Previous studies have shown that the synthesis and accumulation of anthocyanin in blood oranges are genetically controlled, but they may suffer significant environmental influences. Cultivation in countries with a cold climate is the most appropriate. On the other hand, the possibility of increasing anthocyanin concentrations in fruits and juices through postharvest management involving cold storage has been demonstrated. This management facilitates commercialization in countries that possess a tropical climate. Although these fruits are considered non-climacteric, storage at low temperatures can increase the respiratory rate because of possible refrigeration lesions, and it can cause biochemical changes that preserve the fruits for long periods [4,5].

Given the importance that the citrus represent in the world economy, as well as the intense search for natural antioxidants, this work had the objective of providing new information to fruit growers and involved in the beverage industry about the possibility of bioactive compounds present in the incrementation of juice of Moro blood orange, through the storage at low temperatures, creating in this way an effective alternative to cultivate and market these fruit nutritionally enriched in countries that are not cold.

MATERIAL AND METHODS

Origin and treatment of fruits

Twenty-five OM were harvested from three plants of the Active Germplasm Bank of the Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC in Mogi-Mirim, São Paulo, Brazil. Adult plants (older than 10 years) were cultivated without irrigation, and the Cleopatra mandarin was used as rootstock. The collection was performed at random in the four quadrants of each plant 270

days after flowering, always at an average height between 1 and 2 meters and on the external portion of the plant canopy.

After harvesting, the fruits were sent for analysis, sanitized and the surface was disinfected. When dried, the fruits were packed in Styrofoam trays wrapped with plastic bags and transferred to cold chambers at temperatures of 4 °C and 8 °C and relative humidity of 70-80%. The fruits were stored for a period of 60 days, and analyses were performed with fruit and juice at every twenty days of storage (day 0, 20, 40 and 60).

Laboratory analyses

The analyses were performed at the Laboratório de Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças of the Departamento de Ciência de Alimentos and at the Laboratório Centro de Análise de Prospecção em Química, Departamento de Química, both located at the Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

General Quality Parameters

The coloration of the orange peels and pulps was determined according to the methods of the International Commission of L'Éclairage in a previously calibrated Konica Minolta CM-5 spectrophotometer using the coordinates of luminosity (L^*), a^* , b^* , angle Hue (h°) and chroma (C^*). After this evaluation, the juice from each sample was extracted in a manual extractor, and a 15 mL aliquot of this solution was filtered and used to perform the other analyses.

Soluble solids were determined in a digital refractometer, the results being expressed as °Brix. The pH was measured with the aid of a TECNAL pH meter. The titratable acidity was determined by titration with 0.01 M NaOH, using phenolphthalein as the indicator, and the results were expressed as percent of citric acid [6]. For each sample, the juice ratio (SS/AT) was calculated.

The soluble pectin was extracted [7] and determined colorimetrically [8]. The results were expressed as mg of galacturonic acid. The total soluble sugar content was determined by the Anthrone method, and the results were expressed in mg of glucose [9].

Bioactive analyses

To prepare the extracts for the antioxidant tests, 25 mL of juice was used and 40 mL of 50% methanol was added to the extracts. This solution was homogenized and allowed to stand for 60 minutes at room temperature. Then, it was centrifuged at 25,406.55 g (15,000

rpm) for 15 minutes and the supernatant was transferred to a 100 mL volumetric flask. The from the residue of the first extraction, 40 mL of 70% acetone, homogenized and allowed to stand for 60 minutes at room temperature. This solution was centrifuged to 25406.55 g (15,000 rpm) for 15 minutes and the supernatant was transferred to the flask containing the first supernatant. The volume was made up to 100 mL with distilled water [10]. These extracts were used for the determination of antioxidant capacity using the methods for DPPH, β -carotene/linoleic acid and total phenolic compounds.

DPPH

The antioxidant activity was determined through the capture of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical, and the results were expressed as percentage of free radical sequestration. An ethanolic solution of DPPH at the concentration of 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the test tubes 2.7 mL of the DPPH solution is added, followed by the addition of 0.3 mL of each sample dilution in methanol. After 60 minutes, readings are performed at 517 nm. The antioxidant activity (AA%) is calculated using the following equation: $\text{AA}\% = [(\text{ACN} - \text{AAmo}) / \text{ACN}] * 100$, (AAmo = DPPH Absorbance with sample; ACN = DPPH Absorbance with Methanol) [11].

β -Carotene

β -Carotene/linoleic acid analysis was performed, and the results were expressed as percent inhibition of oxidation. Initially a solution containing 0.06 mL of linoleic acid, 600 mg of Tween 20, 6 mg of β -carotene and 30 mL of chloroform was prepared. All chloroform was removed using a rotary evaporator with a 50 °C bath (Büchi Rotavapor R 114). Subsequently, 150 mL of distilled water saturated with oxygen were added to the mixture under constant stirring. In test tubes, 2.7 mL of this solution was added in 0.3 mL of each dilution of the samples. The absorbance (470 nm) was measured immediately and, after 60 minutes of incubation at 50 °C and under light. The antioxidant activity (AA%) is calculated as a percentage of activity after 60 min of incubation, using the following equation: $\text{AA}\% = [1 - (\text{AAm0} - \text{AAm0} - \text{ACN0} - \text{ACN})] * 100$, (AAm0 = Absorbance at the beginning of the incubation with the sample, AAm = Absorbance after 1 hour of incubation with the sample, ACN0 = Absorbance at the beginning of incubation with ethanol, ACN = Absorbance after 1 hour incubation with ethanol) [10].

Total phenolic compounds

Total phenolic compounds were determined by a Folin-Ciocalteu assay using gallic acid as standard. The absorbance was measured using a UV-vis spectrophotometer (UV 160, Shimadzu, Jap) at 765 nm against a reagent blank. The content of total phenolic compounds was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram (mg GAE/g) through the calibration curve of gallic acid. [12].

Individual phenolic compounds by HPLC-DAD/UV-Vis

The extracts for identification of phenolic compounds by chromatographic method were prepared following the methodology described by Ramaiya et al. [13]. For extraction, 2.5 g of sample, homogenized in 20 mL of 70% (v / v) HPLC grade methanol, were used for 1 hour in an ultrasonic bath at room temperature. The obtained extract was centrifuged at 1500 rpm (25.406,55g) for 15 minutes at 4 °C and filtered on filter paper with 14 µm porosity. For the injection of the samples, the extracts were again filtered using 0.45 µm porous membrane filters. The quantification and identification of the phenolic compounds were carried out in a high efficiency liquid chromatograph (HPLC-DAD / UV-Vis) model Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with four high pressure pumps (model LC-20AT) with a diode array detector (model SPD-M20A), degasser (model DGU-20A5), CBM-20A interface, CTO-20AC oven and automatic sampler (model SIL-20A). Separations were performed using a Shimadzu Shim-pack ODS GVP-C18 (4.6 x 250 mm, 5 mm) attached to a pre-column (Shimadzu-pack ODS GVP-C18, 4.6 x 10 mm, 5 µm). The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in deionized water (Mobile Phase A) and 70: 28: 2 (v/v) methanol/water/acetic acid (Mobile Phase B) at a rate of flow of 1.0 mL.min⁻¹ with a gradient elution program and run time of 65 minutes. The injection volume was 20 µL. The analyzes were performed at 15 °C. The phenolic compounds were detected at 280 nm. The standard solutions were diluted in methanol and the calibration curves were obtained from injections of ten different concentrations, in duplicate. Phenolic compounds were identified by comparison of retention times with standards (gallic acid; catechin; chlorogenic acid; caffeic acid; vanillin; *p*-coumaric acid; feruli acid; *m*-cumaric acid; trans-cinnamic; routine.). The results were expressed as mg of the phenolic compound 100 g⁻¹ of the sample.

Total anthocyanin

The determination of total anthocyanin was performed using the differential pH method, and the results were calculated using the molecular weight of cyanidin (449.2 g/mol).

The Absorbances were evaluated in UV/VIS, taking wavelength readings of 535 nm. The total content of anthocyanins was expressed in mg of anthocyanins 100 g⁻¹ [14].

Vitamin C

The vitamin C content was determined by the colorimetric method using 2,4-dinitrophenyl hydrazine, and the results were expressed as mg⁻¹ of ascorbic acid. 1.0 mL of the filtrate was added for the assay, adding 3 mL of 0.5% oxalic acid [15].

Statistical analysis

The statistical evaluation was conducted in a completely randomized block design with three replicates using the 1 x 2 x 4 triple factorial scheme based on the variety of blood orange, two cooling temperatures (4 °C and 8 °C) and four storage times (0, 20, 40 and 60 days). For each variable, the analysis of variance (Anova) and the Tukey test of means at the 5% probability level were applied. For the time variable, linear and quadratic regression equations were adjusted for the scores that were based on the significance of the unfolding, and the determination coefficients were calculated. The data were analyzed using the statistical program Sisvar [16].

RESULTS AND DISCUSSION

General quality parameters

The means obtained for the general quality parameters for acidity (A), pH (B), ratio (C), sugar (D), soluble solids (E) and pectin (F) of OM stored at different temperatures and times are presented in Figure 1.

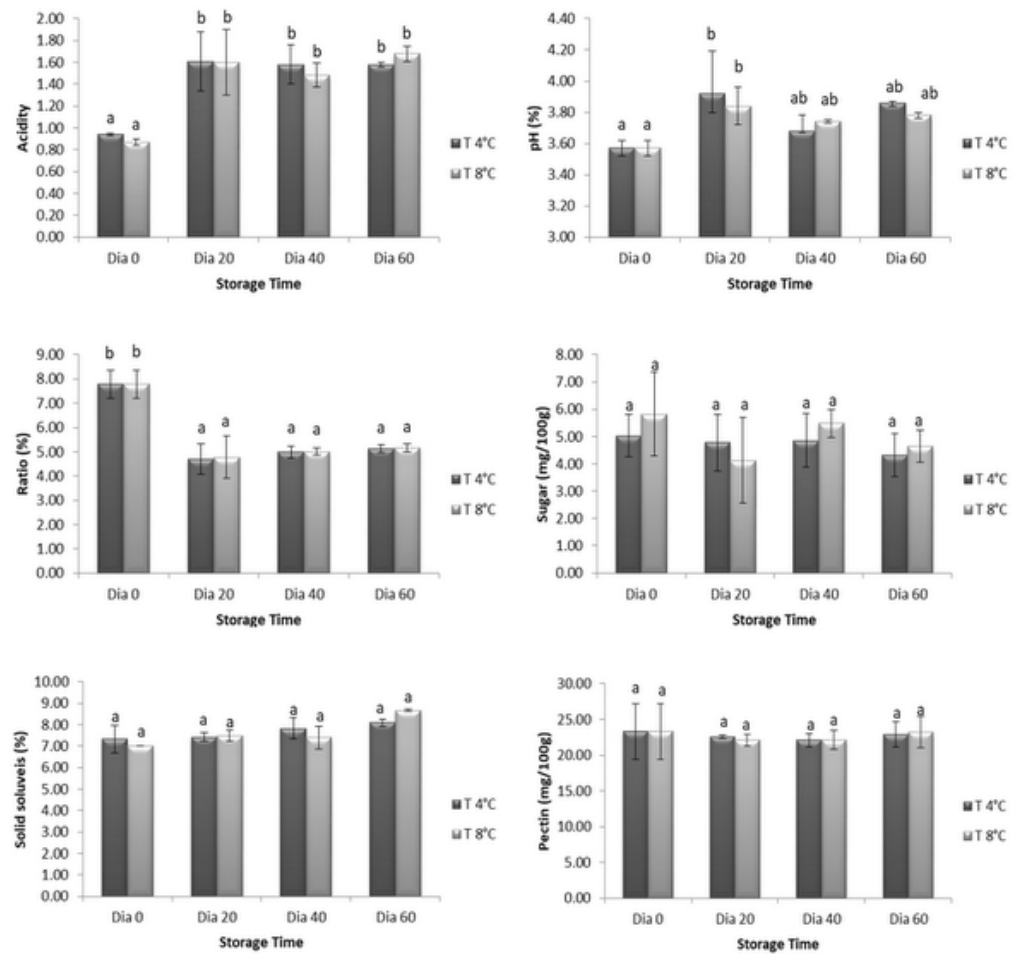


Figure 1. Average values of the parameters of quality of the oranges Moro stored at different temperatures and times. The medium followed by distinct letters between the temperatures of 4 °C and 8 °C differs each other by Tukey test ($p < 0.05$).

The values of titratable acidity varied between 0.94% and 1.68% and are compatible with the values found in work Habibi and Ramezian [17] ranging from 0.9 to 1.6%. The pH levels of the juices were influenced unequally during cold storage, and a common tendency could not be observed. Significant differences ($p > 0.05$) between the samples were observed during the different periods of storage. So, the results on day zero were lower than those found at day 20, but they were the same as those found on days 40 and 60, which were also equal to the results found on day 20.

The total soluble sugar content found in the orange juice varied from 4.32 to 5.04 mg 100 g⁻¹, and the results did not differ statistically ($p < 0.05$) during storage at the two temperatures. The same fact was observed in the analysis of soluble solids, where the results

were in the range of 7.00% to 8.10%, indicating that the blood orange variety used in this experiment was less sweet.

The pectin contents of the orange juices varied from 22.11 to 23.31 mg 100g⁻¹, and the results did not differ statistically ($p < 0.05$) during storage at the two refrigeration temperatures. The duration of storage significantly influenced ($p < 0.05$) the magnitude of the acidity, pH, ratio and soluble solids parameters.

The means obtained in the color analyses for the luminosity (L^*), a^* , b^* hue, angle (h°) and chroma (C^*) of the peels and pulps of OM stored at different temperatures and times are discussed below. The different storage times promoted significant changes in the luminosity parameters (L^*) ($p > 0.05$) of the oranges. Regarding the color of the peels and pulps, the highest levels observed were on days zero and 20, showing a greater tendency to white. The lowest values were found at time 60, with a black tendency because this parameter determines values between zero (0) and one hundred (100); these values are denominated black and white, respectively.

All the samples presented positive a^* , indicating that the greater red color saturation was observed on days 40 and 60, and this fact shows that both the peels and the pulps became redder at the end of the storage. That is, the anthocyanin, which are responsible for the change in coloration, reached the highest levels on these days. The values referring to the parameter b^* were also positive, indicating that the greater saturation of the yellow color was observed on days zero and 20. Thus, a stronger yellowish color was observed for the pulps and the peels during the first days of storage.

The hue angle (h°) shows the location of the color in a diagram, where the 0° angle represents red; 60° , yellow; 110° , green and 240° , blue. The hue angle for the pulps during the first 20 days of storage ranged from 66.75° to 80.54° , being close to 60° . During the rest of the storage, the angle varied from 55.50° to 48.33° , indicating a more reddish tint. The tonality of the pulps at 60 days and 4 °C was nearly yellow. This variation was considered normal because the coloration is not always uniform. If the peels were treated, a similar situation was observed, so that the results ranged from 54.08° to 80.28° on days zero and 20 and from 42.68° to 50.45° on the other days.

With regard to chromaticity (C^*), the application of low temperatures resulted in fruits with more intensely colored peels (30.78 to 50.72) throughout the storage period. However, when the pulps were treated, the results were lower, ranging from 16.66 to 25.34 and indicating the presence of less intense staining. The duration of storage had a significant influence on the magnitude of all the color parameters analyzed.

Bioactive analyses

The mean values obtained in the analyses of vitamin C (A), total anthocyanin (B), total phenolic compounds (C), DPPH (D) and β -carotene/linoleic acid (E) are shown in Figure 2. There was no significant difference ($p < 0.05$) in the vitamin C contents of the OM juices during the 60 days of storage. The results observed at the two refrigeration temperatures were similar ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 29.56 to 34.34 mg 100 g⁻¹ and $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 29.89 to 34.27 mg 100 g⁻¹), and they are in agreement with the results found by Kafkas et al. [18] (32 to 42 mg 100 g⁻¹). This stability in the results can be explained by the fact that juices were processed on the day of analysis and not stored. Storage is the main cause of vitamin C degradation [19].

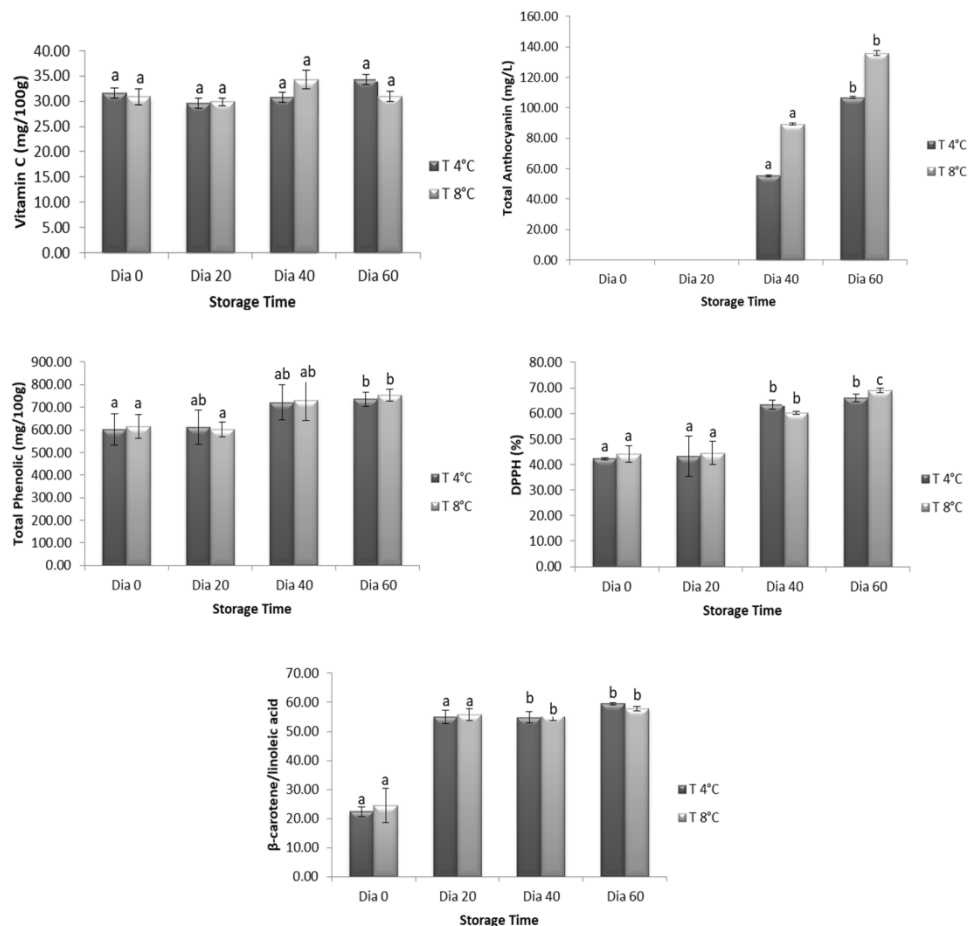


Figure 2. Average values of bioactive analyses of oranges Moro stored at different temperatures and times. The medium followed by distinct letters between the temperatures of $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ differ each other by Tukey test ($p < 0.05$).

It was found that, shortly after harvest, the fruits did not contain anthocyanin, and this observation can be explained by the existence of higher average daily temperatures at the

place of cultivation, which may have resulted in a low natural anthocyanin production in the fruits. Anthocyanin was detected in MO juices after 40 days of storage (4 °C, 55.26 mg L⁻¹ and 8 °C, 89.25 mg L⁻¹), and the highest content was 135.87 mg L⁻¹, recorded at 60 days of storage at 8 °C. According to literature, anthocyanin content in orange juice may vary from 122.2 to 146.6 mg L⁻¹ [20].

The occurrence of anthocyanin in fruits is related to climatic conditions, genetic factors and activation of the enzymes involved in the phenylpropanoid metabolism, such as phenylalanine ammonia liase, dihydroflavonol-4-reductase and UDP-glucose flavonoid glucosyl transferase induced by the low temperatures applied during post-harvest handling. Under these conditions, fruits subjected to thermal stress produce these pigments to protect themselves from unfavorable environmental conditions [21].

Some studies demonstrate the anthocyanin content in orange juice. Habibi and Ramezani [17] showed that exposure of Moro oranges to cold induced an 11 fold increase in total anthocyanin levels. Latado et al., [22] also found that storage for 60 days at 10 °C leads to significant accumulation of anthocyanin in the Pallazelli (153.5 mg L⁻¹) OM juice.

Crifò et al. [23] performed a genetic analysis with the aim of emphasizing the general induction in gene expression after exposure of oranges [(*Citrus sinensis*) L. Osbeck Tarocco Sciarra] to a low temperatures. As a result, it was found that citrate lyase was selectively induced in the cytosol by cold temperatures, suggesting that the citrate could be catabolized into acetyl CoA and oxaloacetate. The latter is converted to phosphoenol pyruvate, which can be channeled into plastids and consumed there via the phenylalanine biosynthesis pathway. On the other hand, acetyl CoA, in the form of malonyl CoA, becomes part of the flavonoid skeleton through the reaction catalyzed by the enzyme chalcone synthase.

Thus, it has been suggested that cold stress induces genetic modifications by increasing the biosynthesis of flavonoids in blood oranges, mainly by increasing the anthocyanin biosynthesis pathway during cold storage. Likewise, the anthocyanin levels of fruits exposed to cold reach values eight times higher than those observed in the zero-time sample [23]. Thus, cold storage improves the nutritional properties of fruits and may be useful in the prevention of degenerative diseases [24].

During the storage of OM, there was a significant increase ($p > 0.05$) in the content of total phenolic compounds present in the juices (Figure 2), and the lowest concentrations were observed on day zero (4 °C, 602.43 mg EAG 100 g⁻¹ and 8 °C, 615.17 mg EAG 100 g⁻¹). The highest concentrations were observed on day 60 (4 °C, 735.22 mg EAG 100 g⁻¹ and 8 °C, 753,56 mg EAG 100 g⁻¹). In the present study, Vasco et al. [25] evaluated the total phenolic

content in different fruits and classified them into three categories: low (<100 mg EAG 100 g $^{-1}$), medium (100 - 500 mg EAG 100 g $^{-1}$) and high concentration (>500 mg EAG 100 g $^{-1}$), and according to this information, the juices studied were classified as belonging to the high concentration category.

Hamedani et al. [26] obtained similar results, and according to these authors, phenolic compounds are connected to flavor, color, shelf life and the action of the product as a functional food, being strongly correlated with antioxidant capacity and levels of anthocyanin, mainly because of the ability of these substances to sequester free radicals, which have a negative effect on human health.

A total of five individual phenolic compounds were detected in the orange juice via high performance liquid chromatography, including catechin, gallic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and chlorogenic acid. Among the phenolic compounds identified, catechin, which has an important antioxidant capacity, was the principal substance present in the juice. During the storage of OM, there was also an increase in the concentration of this substance. The lowest levels were observed on day zero (4 °C, 5.89 mg of catechin in 100 g $^{-1}$ and 8 °C, 5.05 mg of catechin in 100 g $^{-1}$), and the highest at 60 days (4 °C, 22.13 mg of catechin in 100 g $^{-1}$ and 8 °C, 27.14 mg of catechin in 100 g $^{-1}$) (Figure 3).

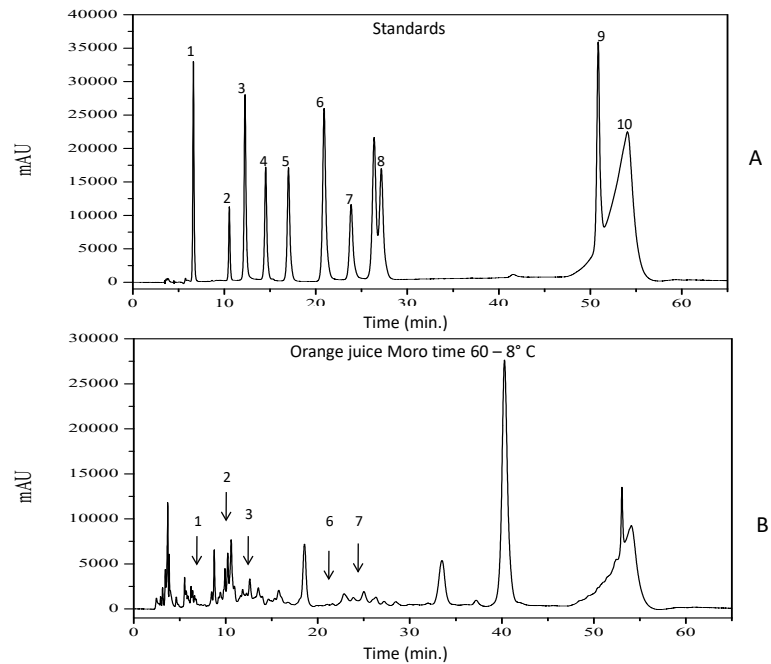


Figure 3. (A) Standards: 1 – gallic acid; 2 – catechin; 3 – chlorogenic acid; 4 – caffeic acid; 5 – vanillin; 6 – *p*-coumaric acid; 7 – ferulic acid; 8 – *m*-coumaric acid; 9 – trans-cinnamic; 10 –

routine. (B) Orange juice phenolic compounds Moro stored at 60 days at 8 °C using HPLC-DAD/UV-Vis.

It is emphasized that the high concentration of these substances in foods is desirable because they have health benefits. Catechin is effective in reducing disease, and research indicates that these substances are capable of inducing type 1 diabetes mellitus, heart disease, viral infections, inflammation in degenerative diseases or even cancer and aging.

Apparently, sequestering of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) occurred because the absorbances after the reaction of DPPH with the different concentrations of the samples were significantly lower than that observed for the blank (DPPH + ethanol) [11; 27]. Thus, the extracts exhibited antioxidant activity

The mean DPPH content of the OM juice stored at 4 °C varied from 42.27% to 66.03%, and the variation was from 44.10% to 68.98% at the temperature of 8 °C. The maximum levels were also observed during the last storage period. This information is in agreement with what was discussed above because anthocyanin levels, phenolic compounds and antioxidant activity are related.

According to the classification established by Melo et al. [28], the sequestering capacity of the DPPH radical is considered to be strong when it reaches percentages above 70%. It is considered to be moderate when it reaches percentages between 70 and 50%, and weak when it reaches values below 50%. The juices exhibited a moderate ability to sequester free radicals on days 40 and 60, thus contributing to the reduction of factors that trigger non-degenerative diseases.

The results of the β -carotene analysis for the OM juice stored at 4 °C ranged from 22.34% to 59.53%, and at 8 °C, the variation was from 24.49% to 57.90%. The highest levels were observed on the last two days, and they did not differ statistically ($p < 0.05$). This fact can be explained by the development of the reddish coloration in the pulps during. The storage time had a significant influence on the magnitude of the total anthocyanin, total phenolic, DPPH and β -carotene parameters ($p < 0.05$).

The principal components analysis showed that it was possible to describe 97.81% of the data; 86.21% of the total variance was described by the first principal component and 11.60% by the second. All the samples could be grouped to express their similarities and differences in relation to the bioactive analyses of OM. By means of the principal component analysis, it was verified that the cold storage influenced all the bioactive compounds present

in the OM juices, and the highest contents were observed during the last storage period (Figure 4).

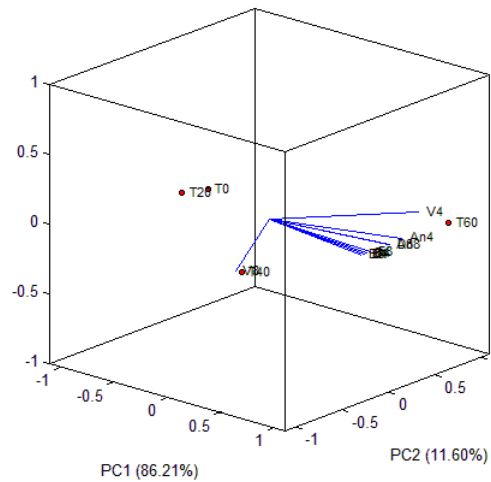


Figure 4. PC1 PC2 biplot graphic x of loadings and scores obtained in the analysis of bioactive oranges Moro stored at different temperatures and times.

CONCLUSIONS

The obtained results allowed to conclude that there wasn't anthocyanin in the Moro blood orange fruits and juice shortly after post-harvest, but these pigments were developed with post-harvest management, by storage at low temperatures, and the storage at 8 °C showed the greatest efficiency and the highest contents were observed at 60 days. The analyses showed that cold storage also increased other bioactive compounds, such as the total phenolic compounds, DPPH and β -carotene. In addition, it was found that cold treatment of the fruits during 60 days significantly altered some quality parameters of the juices, but it did not prevent their commercial use. These oranges because they are nutritionally enriched, are a good source of raw material for industrial processes and thanks to post-harvest storage can be grown and marketed in countries where the weather is cold, ensuring the integrity of the bioactive compounds present in your composition.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas

Gerais (FAPEMIG), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior 001 (CAPES) for financial support and scholarships granted.

REFERENCES

- [1] United States Department of Agriculture – USDA (2016). Production, Supply and Distribution. Available in: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Access in: december 29, 2016.
- [2] Fabroni, S. et al. (2016) Antocianinas em diferentes espécies de Citrus: uma UHPLC-PDA-ESI/MS n-assistiu investigação qualitativa e quantitativa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4797-4808.
- [3] Cardile, V., Graziano, A.C., Venditti, A. (2015) Clinical evaluation of Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange juice supplementation for the weight management. *Natural Product Research*, 29, 2256-2260.
- [4] Lo Piero, A. R., Lo Cicero, L., Puglisi. I. (2014) The metabolic fate of citric acid as affected by cold storage in blood oranges. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23, 161-166.
- [5] Chiabrando, V., Giacalone, G. (2017). Quality evaluation of blueberries coated with chitosan and sodium alginate during postharvest storage. *International Food Research Journal*, 24, 1553-1561.
- [6] Instituto Adolfo Lutz - IAL (2008) Normas analíticas do IAL: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020p.
- [7] Mccready, R. M., Mccomb, E. A. (1952) Extraction and determination of total pectic materials in fruits. *Analytical Chemistry*, 24, 1586-1588.
- [8] Bitters, W. P. (1961) Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. California: The University of California, 95p.
- [9] Dische, Z. (1962) General color reactions. New York: Academic Press, 512 p.
- [10] Rufino, M. S. M. et al. (2006b) Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β caroteno – ácido linoléico. *Comunicado Técnico Embrapa*, 126, 1-4.
- [11] Rufino, M. S. M. et al. (2007a) Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa*, 127, 1-4.

- [12] Xu, B., Chang, S. K. C. (2009) Total phenolic, phenolic Acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4754-4764.
- [13] Ramaiya, S. D. et al. (2013) Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1198-1205.
- [14] Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., Oliveira, F. C. (2008) Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, 55, 297-304.
- [15] Strohecker, R., Henning, H. M. (1967) *Análises de vitaminas: métodos comprovados*. Madrid: Editora Paz Montalvo, 428p.
- [16] Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- [17] Habibi, F., Ramezani, A. (2017) Vacuum infiltration of putrescine enhances bioactive compounds and maintains quality of blood orange during cold storage. *Food Chemistry*, 227, 1-8.
- [18] Kafkas, E. et al. (2009) Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: a comparative study. *Pharmacognosy Magazine*, 5, 329-335.
- [19] Spinola, V. et al. (2013) Effect of Time and Temperature on Vitamin C Stability in Horticultural Extracts. UHPLC-PDA vs. Iodometric Titration as Analytical Methods. *Food Science and Technology*, 50, 489-495.
- [20] Giuffrè, A. M., Zappia, C., Capocasale, M. (2017) Physicochemical stability of blood orange juice during frozen storage. *International journal of food properties*, 20, 1930-1943.
- [21] Molinu, M. G. et al. (2016) Effect of superatmospheric oxygen storage on the content of phytonutrients in 'Sanguinello Comune' blood orange. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 24-30.
- [22] Latado, R. R. et al. (2008) Influência do armazenamento refrigerado de frutos de laranjeiras sanguíneas quanto as suas características físico-químicas e concentração de antocianinas. *Laranja*, 29, 51-67.
- [23] Crifò, T. et al. (2011) Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: implication of the flavonoid biosynthetic pathway, *Gene* 476, 1-9.
- [24] Palma, A. et al. (2013) Cold quarantine responses of 'Tarocco' oranges to short hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 24-33.

- [25] Vasco, C., Ruales, J., Kamal Eldin, A. (2008) Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 816-823.
- [26] Hamedani, M. et al. (2012) Determination of storage duration and temperature effects on fruit quality parameters of blood orange (*Citrus sinensis* cv. Tarocco). *Biharean Biologist*, 6, 10-13.
- [27] Santiago, J. A. et al. (2016) Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 38, 139-147.
- [28] Melo, E. A. et al. (2008) Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 19, 67-72.

ARTIGO 2

Efeitos nos parâmetros metabólicos de ratos obesos e diabéticos tratados com suco da laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

RESUMO

A intervenção nutricional com a utilização de fitoquímicos é um método importante para o tratamento e prevenção da síndrome metabólica. No presente estudo, teve-se como objetivo avaliar a influência do suco da laranja Moro sobre os parâmetros metabólicos de ratos obesos, diabéticos ou ambos, mediante gerenciamento da massa corporal, após a ativação das antocianinas em armazenamento refrigerado. A obesidade foi induzida durante quarenta e dois dias, por meio de alimentação com ração hiperlipídica e o *Diabetes Mellitus* foi induzido com a utilização de injeção de estreptozotocina. Após a indução das doenças, o suco com os maiores teores de antocianinas foi fornecido *ad libitum* durante vinte e oito dias para metade dos animais e a outra metade bebeu somente água. Os ratos-controle receberam água e ração comercial. Foram mensurados durante todo o experimento (setenta dias) a massa corporal, o consumo de água, suco e ração e no início e final do fornecimento do suco o Índice de Lee e a glicemia. Após a eutanásia dos animais, foram realizadas análises histopatológicas no rim, fígado, pâncreas, baço e intestino delgado; análises histológicas nos tecidos adiposos perirenal e retroperitoneal; análises bioquímicas de colesterol total, lipoproteína de alta e baixa densidade e triglicerídeos; e análise enzimática de biomarcadores de lesão isquêmica hepática. A ingestão do suco reverteu a maioria das anormalidades metabólicas exibidas pelos ratos obesos, incluindo a redução da massa corporal e melhora no perfil bioquímico. A perda de massa corporal por parte dos animais diabéticos e dos animais obesos e diabéticos não foi atribuída à ingestão do suco e, sim, ao *Diabetes Mellitus* tipo I. Nesses animais, não foram observadas melhoras no perfil bioquímico, nas enzimas hepáticas e na glicemia, tornando, dessa forma, inviável esse modelo de tratamento. Os efeitos benéficos não podem ser explicados apenas pela antocianina C3G presente no suco, mas, sim, pelo sinergismo existente entre todos os componentes. Estudos em humanos são necessários para determinar se essa laranja pode ser recomendada como uma estratégia eficaz para prevenir e/ou amenizar complicações da obesidade.

Palavras-chave: cianidina-3-glicosídeo; síndrome metabólica; produtos naturais.

INTRODUÇÃO

O termo síndrome metabólica descreve um conjunto de fatores de risco que se manifesta em um indivíduo e aumenta as chances de desenvolver doenças cardíacas, derrames e diabetes. Tem como base a resistência à ação da insulina, obrigando o pâncreas a aumentar sua produção, elevando seu nível no sangue. Alguns fatores como a genética, obesidade e o sedentarismo contribuem para o seu desenvolvimento (Varella, 2018).

Dentre esses fatores, a obesidade, caracterizada como uma condição resultante do acúmulo excessivo de gordura corporal vem ganhando destaque, pois além das complicações físicas e sociais que apresenta, a alta prevalência da doença tornou-se um problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde, 26% da população mundial é considerada obesa e 78% está com sobrepeso. Assim, estratégias dietéticas naturais para aliviar as complicações metabólicas provenientes da obesidade estão sendo propostas como alternativas às intervenções farmacêuticas (WHO, 2016).

Enquadram-se, neste contexto, as laranjas sanguíneas da variedade Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), pois quando cultivadas em baixas temperaturas, apresentam elevados teores de antocianinas, ácido ascórbico e ácidos hidroxicinâmicos, e esses compostos, quando em sinergismo, podem atuar no controle de várias doenças, incluindo o gerenciamento da massa corporal (Grosso et al., 2013; Fabroni et al., 2016).

É pela modulação dos genes envolvidos no metabolismo dos lipídeos e a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos (PPAR γ) que o suco da laranja Moro diminui a captação dos lipídeos e normaliza a hipertrofia dos adipócitos, ocasionando o emagrecimento corporal (Cardile; Graziano; Venditti, 2015; Lee et al., 2017).

Essa laranja, que é originária da Itália, é caracterizada pela coloração vermelho intenso da polpa e se diferencia das demais sanguíneas devido aos elevados teores de antocianinas

que possui, sendo essa uma importante forma de enriquecimento do fruto. A síntese e o acúmulo desses pigmentos têm controle genético, mas podem sofrer grande influência ambiental, sendo o cultivo em países de clima frio o mais adequado. Em contrapartida, já foi demonstrada a possibilidade de incrementação das antocianinas nos frutos e nos sucos por meio do manejo pós-colheita, mediante o armazenamento em câmara fria, facilitando, assim, a comercialização em países de clima tropical (Magalhães et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, após a ativação das antocianinas em armazenamento refrigerado, a influência do suco da laranja Moro sobre os parâmetros metabólicos de ratos obesos, diabéticos ou ambos, por meio do gerenciamento da massa corporal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com o protocolo 038/17. Todos os procedimentos cumpriram as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Um total de quarenta e dois ratos jovens (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, em estado hígido, com massa corporal de aproximadamente 200 g, foram fornecidos pelo Biotério da UFLA. Posteriormente, os animais foram submetidos à aclimação com o ambiente e equipe de execução do experimento por um período de sete dias, sendo fornecido água e ração comercial Nuvilab CR-1 (100110067) da marca Quimtia *ad libitum*. Foram mantidas as condições ideais preconizadas para a espécie (temperatura de 22 ± 2 °C, umidade $45 \pm 15\%$ e com ciclos claro/escuro de 12/12 horas).

Após a aclimatação, os animais foram divididos de forma aleatória de acordo com os grupos experimentais, com seis repetições de um animal e acomodados individualmente em gaiolas metabólicas. A cada dois dias, foi aferida a massa corporal e, diariamente, o consumo de ração, água e suco, sendo essas medidas obtidas de forma direta por pesagem e medição de volume.

Período Experimental

O experimento teve duração de setenta dias, sendo dividido em dois períodos: indução e tratamento. Os animais dos grupos A e B foram induzidos à obesidade; os animais dos grupos C e D foram induzidos ao *Diabetes Mellitus* tipo I; os animais dos grupos E e F foram induzidos à obesidade e ao *Diabetes Mellitus* tipo I, sendo caracterizados com síndrome metabólica; e os animais do grupo G foram os controle (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Descrição dos tratamentos
Grupo A (n=6)	Animais obesos recebendo água
Grupo B (n=6)	Animais obesos recebendo suco
Grupo C (n=6)	Animais diabéticos recebendo água
Grupo D (n=6)	Animais diabéticos recebendo suco
Grupo E (n=6)	Animais obesos e diabéticos recebendo água
Grupo F (n=6)	Animais obesos e diabéticos recebendo suco
Grupo G (n=6)	Animais controle

Durante a indução da obesidade, foi fornecida aos animais por quarenta e dois dias uma dieta hiperlipídica contendo 20% de gordura suína, em que a massa resultante foi servida em pasta. Para confirmação, foram mensurados tanto no final da indução como no dia da eutanásia a massa corporal e o Índice de Lee, que é a raiz cúbica da massa corporal em gramas dividida pelo comprimento crânio caudal em centímetros, em que valores iguais ou

superiores a 0,3 caracterizam animais obesos (Nascimento et al., 2013; De Araújo et al., 2016).

Ao término da indução da obesidade, procedeu-se à indução do *Diabetes Mellitus* tipo I nos animais dos grupos C, D, E e F, que foram submetidos a jejum de 4 horas e receberam injeção intraperitoneal de 80 mg/Kg de estreptozotocina (Sigma - Aldrich) diluída em tampão citrato. Após 48 horas, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas para mensuração da glicemia, sendo coletadas amostras sanguíneas por meio da amputação da ponta da cauda utilizando um glicosímetro Accu-Check® (Roche Brasil). Foram considerados diabéticos os animais com nível sérico de glicose de jejum acima de 250 mg/dL. A glicose foi novamente mensurada no dia da eutanásia (Lobato et al., 2015).

Durante todo o experimento, os animais dos grupos C, D e G receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (100110067) da marca Quimtia *ad libitum* e os animais dos grupos A, B, E e F receberam dieta hiperlipídica (De Araújo et al., 2016), em que a massa resultante também foi servida na forma de pasta.

Após as induções das doenças, foi administrado diariamente *ad libitum* aos grupos B, D e F, por um período de vinte e oito dias, o suco da laranja Moro cultivada no Brasil após armazenamento refrigerado a 8 °C por sessenta dias, de acordo com metodologia desenvolvida por Magalhães et al. (2019).

Eutanásia

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas e eutanasiados por punção cardíaca. Para esse procedimento, os animais foram anestesiados com 50 mg/Kg de tiopental sódico via intraperitoneal. O sangue foi coletado com auxílio de uma seringa e centrifugado para obtenção do soro (armazenado a -22 °C), que foi utilizado nas análises bioquímicas e enzimáticas. Após punção cardíaca, os animais foram submetidos à

abertura ampla da cavidade abdominal até a exposição dos órgãos internos, coletados para as análises posteriores.

Análise histopatológica

As análises histopatológicas do rim, fígado, pâncreas, baço e intestino delgado foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Veterinária da UFLA. Esses órgãos foram conservados em solução de formaldeído a 4% e processados rotineiramente para a confecção de cortes histológicos. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Para confecção das lâminas histológicas, os blocos parafinados foram seccionados em micrótomo manual na espessura de 3 μ m, desparafinadas em estufa a 65 °C e, posteriormente, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (Godim et al., 2018).

As imagens digitais foram obtidas por meio de sistema de captura e análise de imagem, constituído por microscópio Olympus BX41 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com uma câmera acoplada (Câmera SC30 CMOS de cor para Microscopia de Luz Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). As medições foram realizadas usando o Image-Pro® software Express (Targetware Informática Ltda do Brasil, Água Branca, SP, Brasil) (Godim et al., 2018).

Análise histológica

As análises histológicas dos tecidos adiposos perirenal e retroperitoneal foram realizadas no Laboratório de Citologia e Histologia do Departamento de Veterinária da UFLA. Frações desses tecidos foram fixadas em solução de formaldeído a 4%, por 72 horas e, posteriormente, conservadas em etanol a 70% até a confecção de cortes histológicos. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em

xilol e incluídas em blocos de parafina. Para confecção das lâminas histológicas, os blocos parafinados foram seccionados em micrótomo manual na espessura de 4 μm , desparafinadas em estufa a 65 °C e, posteriormente, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.

As imagens digitais foram obtidas por meio de sistema de captura e análise de imagem, constituído por microscópio trinocular CX31 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP) e câmera (SC30 Color CMOS Câmera para Microscopia de Luz, Olympus Optical Ltda. Brasil, São Paulo, SP). Cerca de 120 adipócitos por região avaliada, para cada animal, foram analisados aleatoriamente no software ImageJ. Os seguintes parâmetros foram avaliados: (1) diâmetro, medindo a partir da maior distância entre as duas extremidades da célula, (2) área, a partir de sua delimitação, e (3) densidade, utilizando um quadrado de área conhecida sobreposto em determinados campos das imagens capturadas (Gomes et al., 2013).

Na análise da densidade de adipócitos (número de adipócitos por unidade de área de tecido) (NA), duas bordas do quadrado foram desconsideradas. Assim, os adipócitos foram contados inteiramente dentro do quadrado, ou sobrepostos por pelo menos uma de suas duas bordas restantes. Aproximadamente 15 áreas foram avaliadas por região, para cada animal, tendo o cálculo de NA seguido a fórmula descrita por Howard e Reed (1998): $NA = \frac{\sum N}{\alpha \cdot \sum P}$ (adipócitos): $[\alpha \cdot \sum P \text{ (tecido)}]$, em que $\sum N$ (adipócitos) é o número total de adipócitos contados em todos os campos examinados, α é a área do quadrado usado e $\sum P$ (tecido) é o número de campos analisados.

Análise bioquímica

As análises bioquímicas de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e triglicerídeos (TGs) foram avaliadas no plasma sanguíneo dos animais no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, utilizando kits comerciais colorimétricos (Labtest Diagnostica S/A®, Lagoa Santa, MG, Brasil). A

lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculada utilizando a fórmula de Friedewald:
$$\text{LDL-c} = ((\text{triglicerídeos}/5) + \text{HDL-c}) - \text{colesterol total}$$
 (Sposito et al., 1997).

Análise enzimática

Biomarcadores de lesão isquêmica hepática, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT) foram avaliados no plasma sanguíneo dos animais no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, por meio de ensaio enzimático e colorimétrico fornecido pela Labtest Diagnostica S/A[®] (Lagoa Santa, MG, Brasil) (Soldin; Brugnara; Wong, 2005).

Análise estatística

A análise de variância das análises bioquímicas (CT, HDL-c, LDL-c e TGs) dos biomarcadores de lesão isquêmica hepática (ALT, AST e GGT) e análises histológicas de área, densidade e diâmetro dos tecidos adiposos foi realizada de acordo com o delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com três grupos com seis repetições cada um, utilizando a função *dic* do pacote *Expdes.pt* do programa estatístico R. Utilizou-se o teste de médias de Tukey a 5% de significância para comparar os grupos (R Core Team, 2018).

A análise de variância do consumo de água, ração e suco foi realizada de acordo com o DIC com três grupos com seis repetições cada um, sendo seis semanas de avaliação para o consumo de água, dez semanas para o consumo de ração e quatro semanas para o consumo de suco, analisados em esquema de parcela subdividida no tempo. Para essa análise, foi utilizada a função *psub2.dic* do pacote *Expdes.pt* do programa estatístico R. Utilizou-se o teste de médias de Tukey a 5% de significância, para comparar os grupos e análise de regressão ao longo das semanas (R Core Team, 2018).

Em relação às análises de glicemia e Índice de Lee, a análise de variância foi realizada de acordo com o DIC com três grupos com seis repetições cada um e dois períodos de avaliação em esquema fatorial (3x2). Para essa análise, foi utilizada a função *fat2.dic* do pacote *Expdes.pt* do programa estatístico R. Utilizou-se o teste de médias de Tukey a 5% de significância para comparar os grupos e os períodos de avaliação (R Core Team, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ganho de massa corporal

Após o período de quarenta e dois dias de indução da obesidade, os animais tratados com dieta hiperlipídica (grupos A, B, E e F) apresentaram-se metabolicamente mais pesados (Índice de Lee > 0,300), quando comparados com os animais alimentados com dieta convencional (grupos C, D e G).

Ao final do período de tratamento, constatou-se que os animais obesos que beberam suco (grupo B) ganharam menos massa corporal do que os que beberam água (grupo A), ao passo que a massa corporal dos animais diabéticos e diabéticos e obesos que beberam suco (grupos D e F) não se diferenciou dos animais que beberam água (grupos C e E) ($p>0,05$) (Tabela 2). Na Figura 1, pode-se observar o ganho de massa corporal semanalmente.

Tabela 2. Efeito do suco da laranja Moro sobre a massa corporal de ratos obesos, diabéticos ou ambos⁽¹⁾.

Ganho de peso corporal (g)	
<i>Animais obesos</i>	
Group A	15,33 ^a
Group B	8,48 ^b
Group G	12,33 ^{ab}
<i>Animais diabéticos</i>	
Group C	6,94 ^b
Group D	5,93 ^b
Group G	12,33 ^a
<i>Animais obesos e diabéticos</i>	
Group E	6,94 ^b
Group F	6,66 ^b
Group G	12,33 ^a

(1) Médias seguidas de letras distintas entre os grupos (grupo A – animais obesos recebendo água; grupo B – animais obesos recebendo suco; grupo C – animais diabéticos recebendo água; grupo D – animais diabéticos recebendo suco; grupo E – animais obesos e diabéticos recebendo água; grupo F – animais obesos e diabéticos recebendo suco; grupo G – animais controle) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

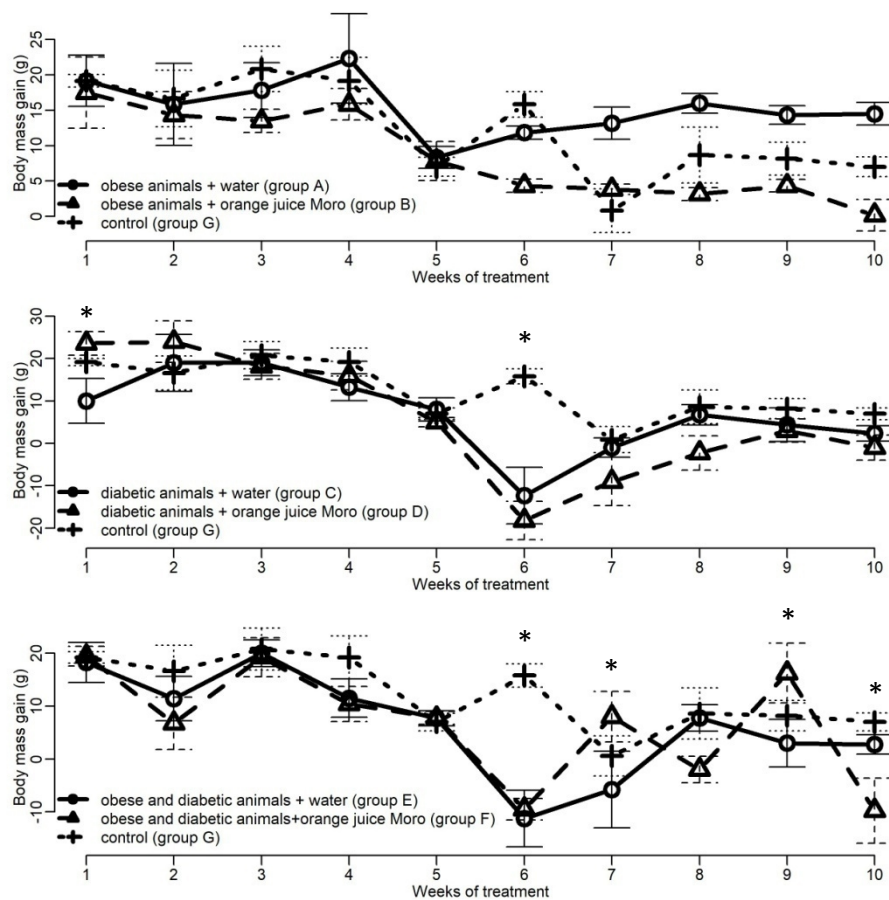


Figura 1. Efeito do suco da laranja Moro sobre a massa corporal de ratos obesos, diabéticos ou ambos ao longo de dez semanas⁽¹⁾. * diferença significativa ($p < 0,05$).

O ganho de massa corporal dos animais obesos que beberam água e suco (grupos A e B) foi afetado pelo tratamento ($p < 0,01$) e pelo tempo ($p < 0,001$), mas não foi afetado pela interação 'tratamento x tempo' ($p < 0,1$). Pode-se constatar que os animais do grupo B que beberam suco tiveram uma redução de 44,7% na massa corporal final, quando comparados com os animais que beberam água (grupo A). Esse fato pode ser atribuído ao suco da laranja Moro, que devido ao sinergismo entre a antocianina C3G, flavonoides, ácido ascórbico e ácidos hidroxicinâmicos pode atuar no gerenciamento da massa corporal pela regulação das disfunções das células adipocitárias que armazenam energia e acumulam triacilglicerol durante o excesso nutricional (Fabroni et al., 2016).

Estudos realizados por Titta et al. (2010), Cardile, Graziano e Venditti (2015) e Lee et al. (2017) com ratos obesos que ingeriram antocianinas evidenciaram que a regulação das disfunções dos adipócitos ocorre por meio de alterações na expressão gênica. As antocianinas, quando ingeridas em quantidades adequadas, possuem a capacidade de aumentar a secreção de adipocitocinas e a expressão de genes proliferadores de peroxissoma (PPAR γ), normalizando a hipertrofia dos adipócitos isolados do tecido adiposo. As adipocitocinas mais conhecidas são a leptina, com a capacidade de aumentar o gasto energético, e a adiponectina, responsável por modular processos metabólicos, como a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos (Wu et al., 2018).

Foi confirmado que o ganho de massa corporal dos animais diabéticos que beberam água e suco (grupos C e D) e dos animais diabéticos e obesos que beberam água e suco (grupos E e F) foi afetado pelo tratamento ($p < 0,001$), pelo tempo ($p < 0,001$) e pela interação 'tratamento x tempo' ($p < 0,001$). Pode-se constatar que os animais do grupo C e D tiveram uma redução na massa corporal de 43,7% e 51,9% e os animais do grupo E e F 46,9% e 45,8%, respectivamente, quando comparados com os animais-controle (grupo G). Mas, como os animais que beberam água também perderam massa corporal, esse fato não pode

ser atribuído ao tratamento com o suco e, sim, ao *Diabetes Mellitus* tipo I, que também pode propiciar a redução da massa corporal, conforme descrito por Silva et al. (2016).

Na sexta semana de experimento, foi observada uma redução significativa na massa corporal dos animais dos grupos C e D e dos animais dos grupos E e F e esse fato ocorreu, pois, nesse período, os animais foram submetidos a jejum e, posteriormente, induzidos ao *Diabetes Mellitus*, ocasionando a perda da massa corporal.

Consumo de ração, água e suco

Com relação ao consumo semanal de ração, foi observado que, nas semanas três, quatro, oito e nove, os animais-controle (grupo G) tiveram um maior consumo, quando comparados com os animais obesos que beberam água e suco (grupos A e B) ($p < 0,001$) (Figura 2).

Entre os animais diabéticos que beberam água e suco (grupos C e D) e os animais-controle (grupo G), constatou-se diferença no consumo de ração nas semanas sete, nove e dez ($p < 0,001$), tendo os animais controle consumido menos ração que os demais. Esse fato pode ser atribuído à indução do *Diabetes Mellitus* tipo I, visto que essa doença pode provocar aumento no apetite dos animais, aumentando o consumo de ração (Figura 2).

Já entre os animais diabéticos e obesos que beberam água e suco (grupos E e F) e os animais-controle (grupo G), constatou-se diferença no consumo de ração apenas na semana sete ($p < 0,01$), tendo os animais-controle consumido menos ração que os demais. Esse fato também pode ser atribuído à indução do *Diabetes Mellitus* tipo I (Figura 2).

Foi observada em todos os grupos uma queda no consumo de ração na décima semana de experimento e esse fato ocorreu, pois, nesse período, os animais foram submetidos a jejum para serem submetidos, posteriormente, a eutanásia.

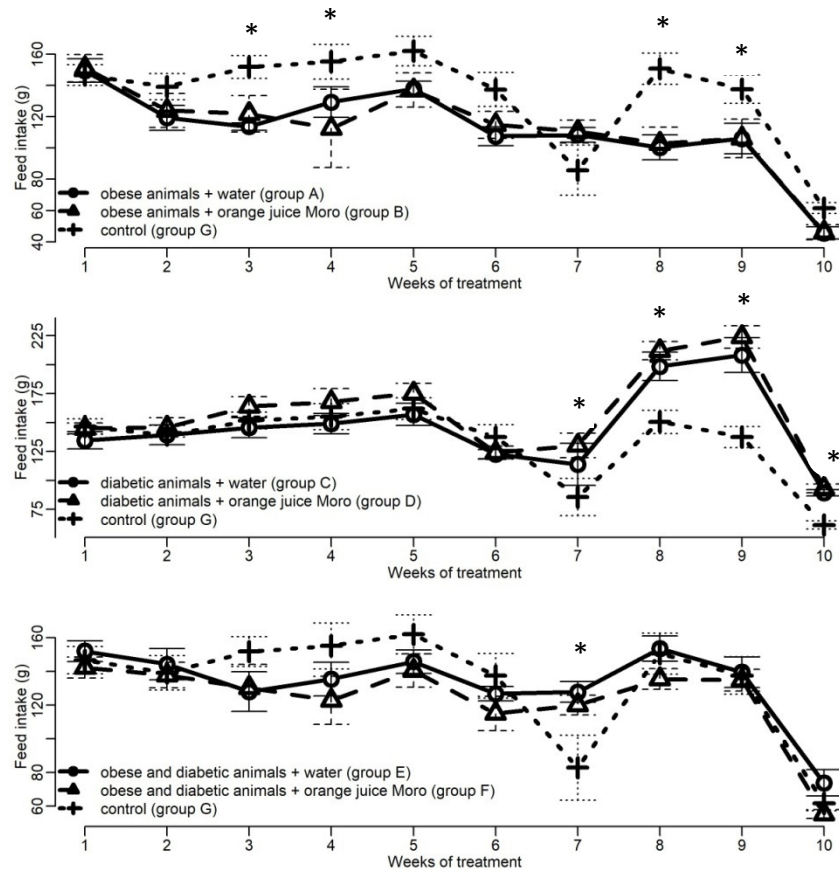


Figura 2. Parâmetros relativos ao consumo de ração de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro ao longo de dez semanas.* diferença significativa.

Quando avaliada a ingestão de água, foi observado em todos os tratamentos que os animais-controle (grupo G) tiveram um maior consumo que os demais grupos na primeira semana ($p < 0,001$). Já na sexta semana, os animais diabéticos (grupo C) e diabéticos e obesos (grupo E) aumentaram o consumo de água devido à indução do *Diabetes Mellitus* tipo I e se tornaram estatisticamente iguais ao grupo controle ($p < 0,001$). Os animais diabéticos (grupo D) e os animais diabéticos e obesos (grupo F) não tiveram aumento no consumo de água na sexta semana devido ao consumo do suco da laranja Moro (Figura 3).

Segundo Guerra (2018), o *Diabetes Mellitus* fora de controle pode aumentar a sede, consequência do esforço do organismo para eliminar o excesso de açúcar presente no organismo. Como falta insulina, a glicose não é absorvida pela célula e sua quantidade aumenta no sangue. Dessa forma, o corpo tenta eliminar o açúcar por meio do rim, fazendo

com que o indivíduo aumente o volume urinário, desidrate, aumentando a sede consequentemente.

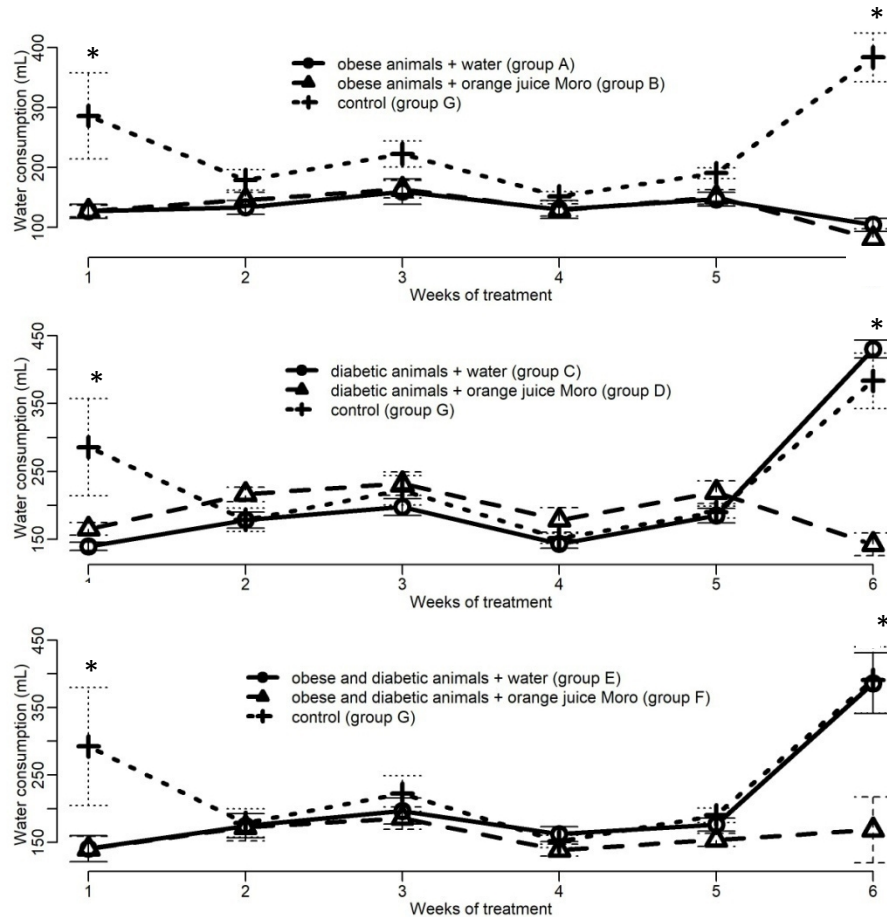


Figura 3. Parâmetros relativos ao consumo de água de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro ao longo de seis semanas.* diferença significativa.

Foi observado ao longo das quatro semanas de tratamento com suco da Laranja Moro que os animais diabéticos (grupo D) foram os que tiveram o maior consumo de suco ($p < 0,05$) (Figura 4) e este fato pode ser explicado pois estes foram os animais que tiveram o maior índice glicêmico no final do experimento (Figura 5), o que fez com que eles tivessem mais sede, bebendo mais suco.

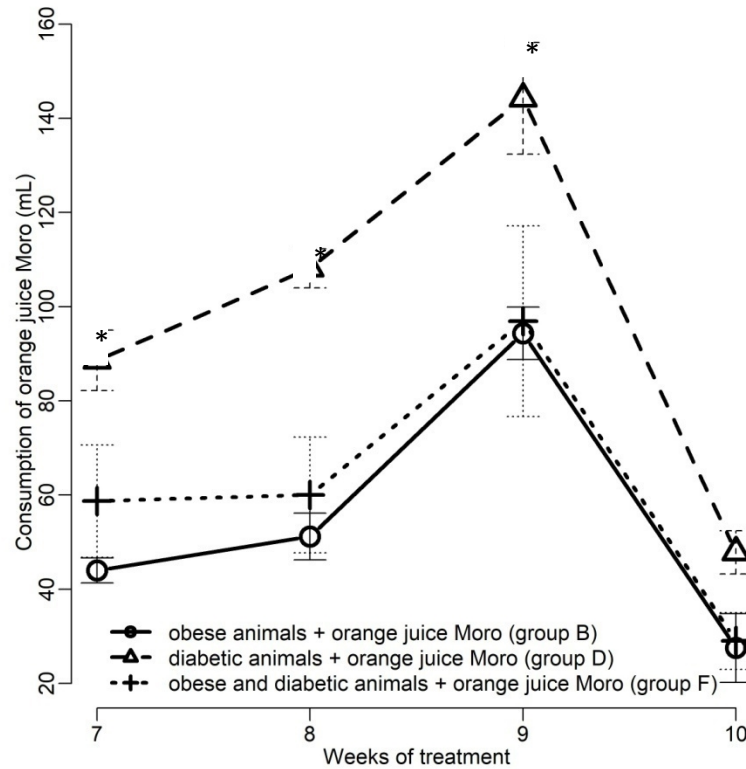


Figura 4. Parâmetros relativos ao consumo de suco da laranja Moro de ratos obesos, diabéticos ou ambos ao longo de quatro semanas. * diferença significativa.

Glicemia

Foi observado por meio da medição da glicemia final e inicial que a administração do suco da laranja Moro não promoveu redução na glicemia dos animais diabéticos (grupo D) e dos animais diabéticos e obesos (grupo F) que beberam o suco (Figura 5). Esse fato pode ser atribuído ao tempo curto de tratamento com o suco, bem como ao tipo de *Diabetes Mellitus* que foi induzido nos animais, visto que o suco pode ser eficaz em diabetes menos severas, como a tipo II, devido à diminuição da resistência à insulina. E como no presente trabalho foi aplicada uma dose de estreptozotocina elevada (80 mg/Kg), os animais foram induzidos ao *Diabetes Mellitus* tipo I, sendo necessário futuros estudos com a aplicação de doses baixas.

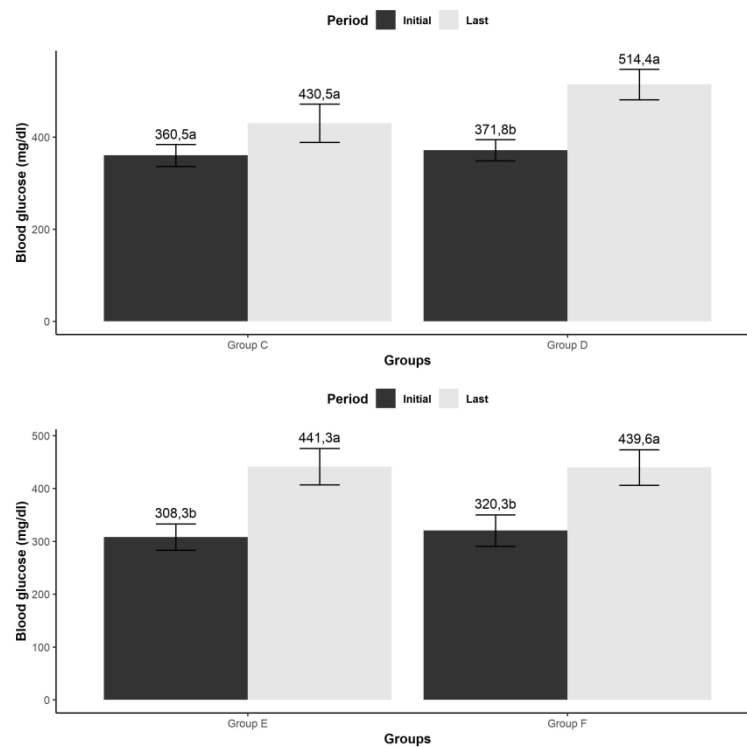


Figura 5. Parâmetros relativos à glicemia de ratos diabéticos e diabéticos e obesos. Notas: grupo C – animais diabéticos recebendo água; grupo D – animais diabéticos recebendo suco; grupo E – animais obesos e diabéticos recebendo água; grupo F – animais obesos e diabéticos recebendo suco.

Tais resultados não corroboram com os encontrados por Guo et al. (2012), que estudaram camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica por doze semanas e camundongos geneticamente diabéticos com seis semanas que receberam suplementação dietética com C3G (0,2%) por cinco semanas. Foi constatado que a C3G reduziu os níveis de glicose em jejum e melhorou significativamente a sensibilidade à insulina tanto nos camundongos diabéticos como nos obesos, em comparação aos controles não suplementados.

Nishimura, Manabe e Nagai (2009) sugeriram que a C3G presente no suco da laranja Moro pode reduzir os níveis de glicose em indivíduos com *Diabetes Mellitus* tipo II, através dos componentes inflamatórios relacionados à obesidade que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento da resistência à insulina. O tecido adiposo de indivíduos obesos secreta um grande número de adipocitocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), que bloqueiam

a sinalização da insulina em vários tecidos. Posteriormente, relatos de Li et al. (2015) e Valenza et al. (2018) mostraram que a C3G têm uma potente atividade anti-inflamatória, e a sub-regulação de TNF- α , MCP-1 e IL-6 pode contribuir para a melhoria da resistência à insulina.

Outro efeito benéfico da C3G diante da resistência à insulina induzida pela obesidade é demonstrado pela inibição na via FoxO1, que representa um regulador central do metabolismo em tecidos periféricos. A regulação da fosforilação e localização intracelular da FoxO1 é fundamental para a sua atividade transcricional. No estado de jejum, em que a FoxO1 está localizada no núcleo, ela impulsiona a expressão de enzimas gliconeogênicas, como G6Pase (glucose-6-fosfatase) e PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase). No estado alimentado, a insulina aumenta acentuadamente a fosforilação da FoxO1, mediada pela proteína quinase B (Akt) e suprime a gliconeogênese para proteger o organismo contra a hiperglicemia (Gross, Wan, Birnbaum, 2009; Calabuig-Navarro et al., 2015).

Guo et al. (2012) mostraram que a fosforilação mediada por Akt de FoxO1 por realimentação estava prejudicada nos camundongos obesos e diabéticos, evidenciados pela fosforilação constitutiva e acúmulo nuclear de FoxO1 ao longo de cada estado nutricional. Em contraste, a C3G da dieta aumentou a fosforilação de Akt e FoxO1 e diminuiu os níveis de FoxO1 na proporção do núcleo para citoplasma no fígado e tecido adiposo após realimentação. Essas alterações levam a uma regulação negativa do G6Pase e do PEPCK, envolvendo uma diminuição na produção de glicose no sangue.

Análise histopatológica

Em relação às análises histopatológicas, foi observado que todos os animais mantiveram as características histológicas do rim, fígado, pâncreas, baço e intestino delgado

inalteradas, sem indicação de lesão microscópica proveniente do tratamento com o suco da laranja Moro.

Análise histológica

Com a análise histológica dos adipócitos, verificou-se que os animais que ingeriram o suco da laranja Moro apresentaram estatisticamente maior densidade (Figura 6), menor diâmetro (Figura 7) e menor área (Figura 8), quando comparados com os animais que ingeriram água em pelo menos um dos tecidos adiposos estudados. Os grupos que não se diferenciaram estatisticamente ($p > 0,05$) foram os C e D, em relação ao diâmetro e os grupos A e B e E e F em relação à densidade.

Esses resultados são considerados positivos, pois confirmam que a ingestão do suco da laranja Moro ocasionou redução no tamanho dos adipócitos após algumas semanas de tratamento, proporcionando a perda de massa corporal. Resultados semelhantes foram encontrados por Titta et al. (2010), que constataram redução significativa no ganho de massa corporal e de tecidos adiposos abdominais, inguinal e interescapular em ratos obesos após ingestão de suco de laranja Moro cultivada na Itália.

Provavelmente é o sinergismo entre os compostos presentes na laranja Moro que contribui para a redução acentuada no tamanho dos adipócitos pela diminuição do acúmulo de lipídeos e aumento da sensibilidade à insulina. Essa alteração ocorre porque o suco modula genes envolvidos no metabolismo dos lipídios, incluindo o adipoQ (adiponectina), lep (leptina), Acil-CoA sintetase e proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2), além de contribuir para o controle da expressão da proteína transportadora de ácidos graxos (PPAR- γ), que também está envolvida na captação de lipídeos pelos adipócitos. E pela da regulação da expressão gênica, ocorre a redução dos lipídeos nos adipócitos e triglicerídeos no músculo e fígado, reduzindo a resistência à insulina. Esse efeito é consequência do aumento de

moléculas envolvidas tanto na metabolização de ácidos graxos, quanto na dissipação de energia muscular (Tsuda et al. 2008; Guo et al., 2008; Titta et al., 2010).

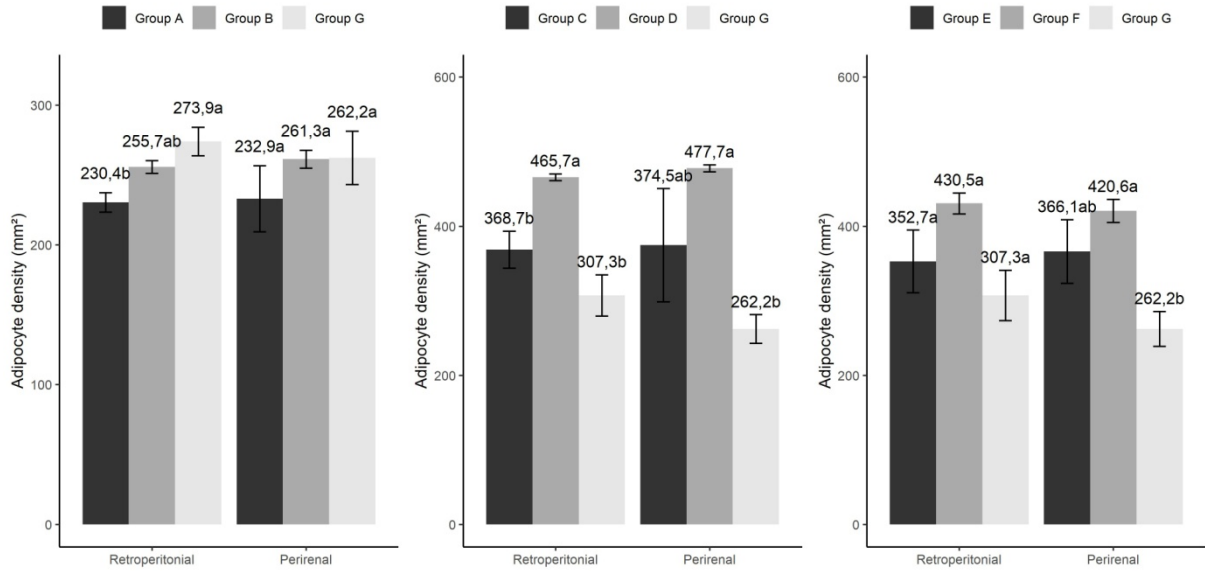


Figura 6. Parâmetros relativos à densidade dos tecidos adiposos retroperitoneal e perirenal de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro. Notas: grupo A – animais obesos recebendo água; grupo B – animais obesos recebendo suco; grupo C – animais diabéticos recebendo água; grupo D – animais diabéticos recebendo suco; grupo E – animais obesos e diabéticos recebendo água; grupo F – animais obesos e diabéticos recebendo suco; grupo G – animais controle.

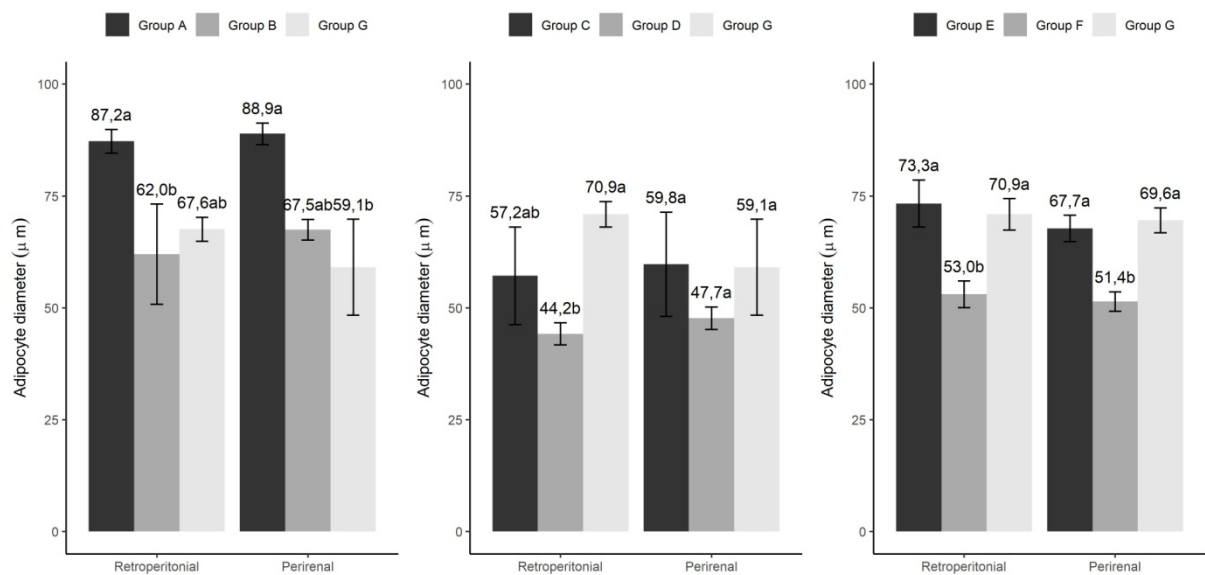


Figura 7. Parâmetros relativos ao diâmetro dos tecidos adiposos retroperitoneal e perirenal de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro. Notas: grupo A

– animais obesos recebendo água; grupo B – animais obesos recebendo suco; grupo C – animais diabéticos recebendo água; grupo D – animais diabéticos recebendo suco; grupo E – animais obesos e diabéticos recebendo água; grupo F – animais obesos e diabéticos recebendo suco; grupo G – animais controle.

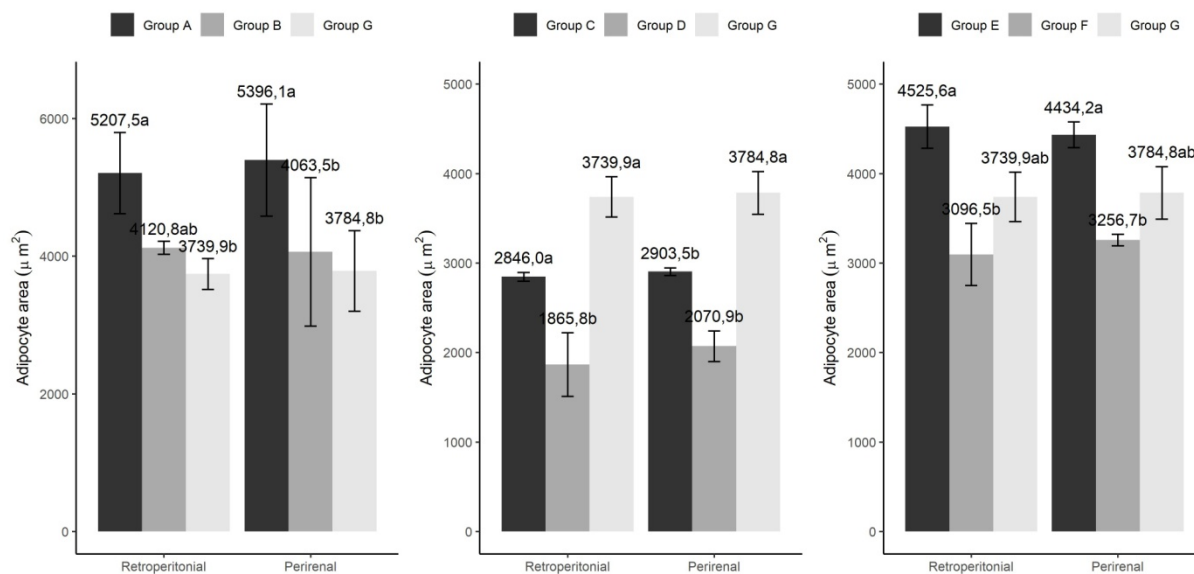


Figura 8. Parâmetros relativos à área dos tecidos adiposos retroperitoneal e perirenal de ratos obesos, diabéticos ou ambos que consumiram água ou suco da laranja Moro. Notas: grupo A – animais obesos recebendo água; grupo B – animais obesos recebendo suco; grupo C – animais diabéticos recebendo água; grupo D – animais diabéticos recebendo suco; grupo E – animais obesos e diabéticos recebendo água; grupo F – animais obesos e diabéticos recebendo suco; grupo G – animais controle.

Análise bioquímica e análise enzimática

Foi observada redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de triacilglicerol (21,35%), colesterol total (14,0%) e LDL-colesterol (16, 2%) e aumento nos níveis de HDL-colesterol (10,1%) ($p < 0,05$) nos animais obesos que beberam suco (grupo B) em relação aos animais obesos que beberam água (grupo A) (Tabela 4).

Dados de Albarello et al. (2017) e Tonetta et al. (2017) indicam que essa melhora no perfil bioquímico pode estar relacionada à redução de massa corporal dos animais, pois estudos clínicos têm mostrado que a perda de massa corporal causa diminuição do colesterol plasmático, ao passo que o aumento da circunferência da cintura e a obesidade estão associadas com altos níveis plasmáticos de colesterol total e triacilglicerol.

Anteriormente, Lima et al. (2012) relataram que as flavanonas seriam as responsáveis pelo efeito hipolipidêmico encontrado no suco de laranja vermelha, pois elas possuem capacidade de reduzir o conteúdo de colesterol hepático, a esterificação do colesterol e aumentar a atividade dos receptores de LDL, que são responsáveis pela captação das lipoproteínas ricas em colesterol (remanescentes de quilomícrons e LDL) do plasma, diminuindo suas concentrações.

Salamone et al. (2012) analisaram o efeito do consumo do suco da laranja Moro cultivada na região do Mediterrâneo sobre a esteatose hepática em camundongos com obesidade induzida por dieta, e constataram, pelas análises bioquímicas, que os animais obesos que beberam suco tiveram redução nos níveis de colesterol total (33,3%) e triglicerídeos (37,5%), corroborando com o presente trabalho.

No entanto, em relação aos animais diabéticos que beberam suco (grupo D), não foram observadas melhoras nesses parâmetros em relação aos animais diabéticos que beberam água (grupo C) e esse fato pode ser atribuído à presença do *Diabetes Mellitus* tipo I, pois, segundo Nwosu et al. (2018), sabe-se que essa doença apresenta um descontrole metabólico muito elevado devido a falhas na produção de insulina e, conseqüentemente, as principais alterações lipoproteicas que normalmente ocorrem são a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia, sendo estas as principais causas de doenças cardiovasculares.

O mesmo foi observado nos animais diabéticos e obesos (grupos E e F); porém, nesses grupos, os parâmetros bioquímicos estavam muito elevados, quando comparados com os animais-controle e esse fato se justifica, pois esses animais estavam metabolicamente muito alterados devido à indução das duas doenças (Tabela 3). Talvez, para um efeito melhor, fosse necessário um maior tempo de tratamento ou a ingestão de uma maior dosagem de suco.

Quanto às enzimas hepáticas, não houve aumento dos níveis sanguíneos de AST, ALT e Gama GT em relação aos animais que beberem água e suco. Essa ausência do efeito protetor

hepático demonstrada por parte do suco da laranja Moro pode ser atribuída aos volumes de suco ingerido diariamente e ao tempo de tratamento. Esses dados corroboram com aqueles encontrados por Salamone et al. (2012), ao analisarem o efeito do consumo do suco da laranja Moro cultivada na região do Mediterrâneo sobre a esteatose hepática em camundongos com obesidade induzida por dieta. Observaram que o suco administrado por doze semanas neutralizou a esteatogênese hepática nos camundongos, representando uma opção dietética promissora para a prevenção de esteatose hepática.

Tabela 3. Efeito do suco da laranja Moro sobre parâmetros bioquímicos e enzimáticos de ratos obesos, diabéticos ou ambos⁽¹⁾.

Contents	Animais obesos			Animais diabéticos			Animais obesos e diabéticos		
	A	B	G	C	D	G	E	F	G
Triglicerídeos (mg/dL)	157,4 ^a	123,8 ^b	90,7 ^c	91,3 ^a	91,9 ^a	90,7 ^a	289,3 ^a	250,7 ^a	90,7 ^b
Colesterol total (mg/dL)	216,4 ^a	186,0 ^b	73,8 ^c	89,0 ^a	85,2 ^a	83,8 ^a	230,4 ^a	210,0 ^a	73,8 ^c
HDL-colesterol (mg/dL)	23,1 ^c	25,7 ^b	31,2 ^a	32,0 ^a	31,9 ^a	31,2 ^a	18,4 ^b	20,8 ^b	31,2 ^a
LDL-colesterol	161,8 ^a	135,5 ^b	24,4 ^c	34,9 ^a	38,4 ^a	24,4 ^a	154,1 ^a	139,1 ^a	24,4 ^b
ALT (U/L)	37,5 ^a	38,7 ^a	36,5 ^a	37,9 ^a	28,9 ^a	36,5 ^a	33,5 ^a	31,0 ^a	36,5 ^a
ASL (U/L)	64,5 ^a	64,1 ^a	59,2 ^a	68,7 ^a	68,2 ^a	59,2 ^a	68,5 ^a	67,2 ^a	69,7 ^a
Gama GT (U/L)	4,1 ^a	4,0 ^a	4,4 ^a	3,9 ^a	3,9 ^a	4,4 ^a	3,8 ^a	4,1 ^a	4,4 ^a

(1) Médias seguidas de letras distintas entre os grupos (grupos A – animais obesos recebendo água, B – animais obesos recebendo suco e G – animais controle; grupos C – animais diabéticos recebendo água, D – animais diabéticos recebendo suco e G – animais controle; grupos E – animais obesos e diabéticos recebendo água; F – animais obesos e diabéticos recebendo suco e G – animais controle) na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

CONCLUSÃO

A ingestão de suco da laranja Moro, após a ativação das antocianinas em armazenamento refrigerado, influenciou a maioria dos parâmetros metabólicos exibidos pelos ratos obesos, incluindo a redução da massa corporal e melhora no perfil bioquímico. Essa influência não foi observada nos animais diabéticos e/ou obesos, tornando, dessa forma, inviável esse modelo de tratamento. Mais estudos são necessários para determinar se essa

laranja pode ser recomendada como uma estratégia eficaz para prevenir e/ou tratar complicações da obesidade em humanos.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior 001 (Capes) pelo apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarelo, R. A.; Farinha, J. B.; Azambuja, C. R.; Santos, D. L. dos. Effects of resistance training on the lipid profile of subjects with metabolic syndrome. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte* **2017**, *10*, 142-146.

Calabuig-Navarro V. et al. Forkhead Box O6 (FoxO6) Depletion Attenuates Hepatic Gluconeogenesis and Protects against Fat-induced Glucose Disorder in Mice. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 15581-15594.

Cardile, V.; Graziano, A.; Venditti, A. Clinical evaluation of Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange juice supplementation for the weight management. *Natural Product Research* **2015**, *29*, 2256-2260.

de Araújo, T. V.; Andrade, E. F.; Lobato, R. V.; Orlando, D. R.; Gomes, N. F.; Sousa, R. V.; Zangeronimo, M. G.; Pereira, L. J. Effects of beta-glucans ingestion (*Saccharomyces cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high-fat diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **2016**, *101*, 349-358.

Fabroni S.; Ballistreri G.; Amenta M.; Rapisarda P. Anthocyanins in different Citrus species: an UHPLC-PDA-ESI/MSn-assisted qualitative and quantitative investigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2016**, *96*, 4797-4808.

Godim P. N.; Rosa, P. V.; Okamura, D.; Silva, V. O.; Andrade, E. F.; Biihrer, D. A.; Pereira, L. J. Benefits of Fish Oil Consumption over Other Sources of Lipids on Metabolic Parameters in Obese Rats. *Nutrients* **2018**, *10*, 1-13.

Gomes, J. A. de S.; Faria, B. G.; Silva, V. de O.; Zangerônimo, M. G.; Miranda, J. R.; Lima, A. R. de; Pereira, R. G. F. A.; Pereira, L. J. Influence of Integral and Decaffeinated Coffee Brews on Metabolic Parameters of Rats Fed with Hiperlipidemic Diets. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2013**, *56*, 829-836.

Gross, D. N.; Wan, M.; Birnbaum, M. J. The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Current Diabetes Reports* **2009**, *9*, 208-214.

Grosso, G.; Galvano, F.; Mistretta, A.; Marventano, S.; Nolfo, F.; Calabrese, G.; Buscemi, S.; Drago, F.; Veronesi, U.; Scuderi, A. Red orange: Experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, *13*, 1-11.

Guerra, M. Por que o diabetes fora de controle pode causar muita sede ou fome? Disponível em: <<https://cuidadospelavida.com.br/saude-e-tratamento/diabetes/por-que-diabetes-fora-de-controle-pode-fome-sede>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2019.

Guo, H.; Ling, W.; Wang, Q.; Liu, C.; Hu, Y.; Xia, M. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂ – or TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal Kinase activation. *Biochemical Pharmacology* **2008**, *75*, 1393-1401.

Guo, H.; Xia, M. Zou, T.; Ling, W.; Zhong, R.; Zhang, W. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2012**, *23*, 349–360.

Howard, C. V.; Reed, M. G. *Medição tridimensional de estereologia imparcial em microscopia*. Oxford: editores científicos da Bios, 1998.

Lee, Y. M.; Yoon, Y.; Yoon, H.; Park, H.M.; Song, S.; Yeum, K. J. Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. *Nutrients* **2017**, *9*, 1-15.

Li, C.; Rui, C.; Hua, W.; Fengxia, L. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology* **2015**, *2015*, 1-9.

Lima, C. G.; Basile, L. G.; Silveira, J. Q.; Cesar, T. B. Ingestão regular do suco de laranja vermelha reduz pressão arterial de adultos. *Revista do Instituto de Ciências da Saude (UNIP)* **2012**, *30*, 59-63.

Lobato, R. V.; Silva, V. O.; Andrade, E. F.; Orlando, D. R.; Zangeronimo, M. G.; Sousa, R. V.; Pereira, L. J. Metabolic effects of β -glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) per os administration in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nutrición Hospitalaria* **2015**, *32*, 256-264.

Magalhães, M. L.; Lima, L. C. de O.; Lunguinho, A. da L.; Rezende, D. A. de C. S.; Ferreira, V. R. F. F.; Brandão, R. M.; Souza, J. A. de S.; Souza, E. C. de; Almeida, K. J. de A.; Nelson, D. L.; Cardoso, M. das G. Influence of cold storage on the bioactivity properties and the ality of the juice of Moro blood Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *American Journal of Plant Sciences* **2019**, *10*, 24-37.

Nascimento, C. M. do; Cassol, T.; Silva, F. S. da; Bonfleur, M. L.; Nassar, C. A.; Nassar, P. O. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* **2013**, *7*, 365-370.

Nishimura, S.; Manabe, I.; Nagai, R. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discovery medicine* **2009**, *8*, 55-60.

Nwosu, B. U.; Zhang, B.; Ayyoub, S. S.; Choi, S.; Villalobos-Ortiz, T. R.; Alonso, L. C.; Bruce A.; Barton, B. A. Children with type 1 diabetes who experienced a honeymoon phase had significantly lower LDL cholesterol 5 years after diagnosis. *Plos One* **2018**, *13*, 1-13.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2018. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 25 de september de 2018.

Salamone, F.; Volti, G. L. I.; Titta L. Moro Orange juice prevents fatty liver in mice. *World Journal of Gastroenterology* **2012**, *18*, 3862-3868.

Silva, J. R. da; Lemesbc, E. de O.; Vargem, D. da S. ; Valeriano, A. F.; Silva, C. V. da. Avaliação da Importância da Associação dos Diabéticos para a População de uma Cidade do Estado de Goiás. *Revista Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e Saúde* **2016**, *20*, 195-199.

Soldin, S. J.; Brugnara, C.; Wong, E. C. **Pediatric Reference Intervals**, 5.ed. Washington: AACCC Press, 2005. p. 98-99.

Sposito, A. C.; Caramelli, B.; Fonseca, F. A. H.; Bertolami, M. C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, [Rio de Janeiro], v. 88, p. 2-19, abr.1997. Suplemento I.

Titta, L.; Trinei, M.; Stendardo, M.; Berniakovich, I.; Petroni, K.; Tonelli, C.; Riso, P.; Porrini, M.; Minucci, S.; Pelicci, P. G.; Rapisarda, P.; Reforgiato, R. G.; Giorgio, M. Blood Orange juice inhibits fat accumulation in mice. *International Journal of Obesity* **2010**, *34*, 578-588.

Tonetta, V.; Dambrós, B. D.; Minotto, E.; Santin, N. C. O papel da linhaça como agente redutor de colesterol e perda de peso. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento* **2017**, *11*, 159-167.

Tsuda, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of Preventing the Metabolic Syndrome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 642-646.

Valenza, A.; Bonfanti, C.; Pasini, M. E.; Bellosta, P. Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. *BioMed Research International* **2018**, *2018*, 1-9.

Varella, D. Síndrome metabólica. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2018. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/dicas-em-saude/2610-sindrome-metabolica/>>. Acesso em: 24 de outubro de 2018.

WHO – World Health Organization. Overweight and obesity. **2016**. Disponível em:<https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2019.

Wu, T.; Yang, L.; Guo, X.; Zhang, M.; Liu, R.; Sui, W. Raspberry anthocyanin consumption prevents diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and modulating hepatic lipid metabolism. *Food & Function* **2018**, *9*, 2112-2120.

ARTIGO 3

**Atividades biológicas do óleo essencial da casca da laranja Moro (*Citrus sinensis*
(L.) Osbeck)**

RESUMO

Os óleos essenciais de citros tem se tornado foco de diversas pesquisas, por possuírem ampla atividade biológica, devido à sua composição química. Neste estudo, objetivou-se avaliar os efeitos do óleo essencial da casca fresca da laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sobre as atividades antitumoral, antifúngica, antioxidante, citotóxica e genotóxica. A extração do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado. A caracterização e a quantificação química dos constituintes foram realizadas por GC/MS e GC/FID. As atividades citotóxica e antitumoral foram realizadas por meio da viabilidade celular, utilizando linhagem derivada de fibroblastos e linhagens neoplásicas derivadas de adenocarcinoma de pulmão, de mama e melanoma, respectivamente. A atividade genotóxica foi realizada pelo ensaio Cometa, utilizando linhagem derivada de fibroblastos. A atividade antifúngica foi realizada mediante a avaliação do efeito inibitório sobre o crescimento dos fungos filamentosos *A. carbonarius* e *A. flavus*, empregando-se o teste de difusão em disco. A atividade antioxidante foi determinada empregando-se as metodologias de DPPH, ABTS e β -caroteno. O óleo essencial da casca da laranja Moro apresentou alto rendimento de extração, tendo como constituinte majoritário o limoneno. Observou-se ausência de efeito citotóxico e genotóxico nas concentrações testadas e o óleo essencial apresentou maior redução da viabilidade celular na linhagem tumoral de melanoma. O óleo essencial inibiu o crescimento de ambos os fungos na Concentração Mínima Inibitória de $125 \mu\text{l mL}^{-1}$. Pelas metodologias empregadas, não foi observada atividade antioxidante. O óleo essencial da casca da laranja Moro apresenta-se como promissor na bioprospecção de novos fármacos para o tratamento de câncer, podendo ser empregado também na indústria alimentícia como conservante natural, pela sua atividade antifúngica.

Keywords: produtos naturais, subproduto, anticâncer, citotoxicidade, atividade antifúngica, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

1. Introdução

Na atualidade, os resíduos sólidos gerados pelas indústrias alimentícias passaram a apresentar um novo papel na sociedade, de geradores de impacto ambiental a subprodutos, sendo um exemplo a indústria de laranja, na qual após a fabricação do suco, é possível extrair a partir das cascas, o óleo essencial. Este óleo, constituído de terpenos e fenilpropanóides, está presente em diversas espécies vegetais e apresenta alto valor comercial agregado devido às potencialidades biológicas que possui (Dosoky e Setzer, 2018).

Os óleos essenciais são definidos, segundo a *International Organization for Standardization*, como produtos obtidos de uma planta ou das suas partes por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água) ou de pericarpos de frutos cítricos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado expressão. São constituintes voláteis, odoríferos, lipofílico e, no processo de hidrodestilação, separam-se da água por diferenças de polaridade e densidade (Simões et al., 2007).

Pesquisadores evidenciam e comprovam a eficácia do uso dos óleos essenciais de citros em diversos ramos, devido aos compostos terpênicos presentes em sua composição. Na indústria alimentícia podem ser utilizados como conservante natural, em substituição aos conservantes sintéticos, reduzindo os impactos negativos como o desenvolvimento de células tumorais quando ingeridos em excesso. Na indústria farmacêutica, podem atuar como modelo para a síntese de novas drogas anticancerígenas, agindo em conjunto com o tratamento atual em pacientes que desenvolvem resistência as drogas existentes.

A laranja sanguínea da variedade Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) vem se destacando mundialmente devido aos elevados teores de antocianinas, ácido ascórbico e ácidos hidroxicinâmicos que apresentam em sua composição e estes compostos quando em sinergismo, podem atuar no controle de várias doenças, incluindo o gerenciamento da massa

corporal (Fabroni et al., 2016). Apesar da escassez de estudos, é possível extrair a partir das cascas e folhas dessas laranjas óleo essencial.

Com o propósito de ampliar a caracterização, visando a uma melhor compreensão da sua ação em sistemas biológicos e possibilitando a indicação de aplicações seguras, tanto na saúde, como na alimentação humana, no presente trabalho teve-se como objetivos a caracterização química e a avaliação dos efeitos do óleo essencial da casca da laranja Moro sobre as atividades antitumoral, antifúngica, antioxidante, citotóxica e genotóxica.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta do material vegetal

As laranjas sanguíneas maduras da variedade Moro foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, em Mogi - Mirim (SP), em dia ameno e sem precipitação. Os frutos foram colhidos aleatoriamente a partir de três plantas adultas, duzentos e setenta dias após o florescimento, nos quatro quadrantes de cada planta, na altura média entre 1 e 2 metros e na parte externa do dossel da planta.

2.2. Extração e rendimento do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), das cascas das laranjas refrigeradas. O método de extração empregado foi o de hidrodestilação por um período de 2 horas, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de 5 L. O hidrolato foi centrifugado a 965,36 g por 15 minutos e o óleo essencial foi separado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e em seguida acondicionado em vidro âmbar e armazenado sob refrigeração e na ausência de luz (Brasil, 2010).

Paralelamente à extração, determinaram-se o teor de umidade e o rendimento em Base Livre de Umidade (% p/p BLU). Em um balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL acoplado a um condensador com coletor Dean-Stark, foram colocados 5 g do material vegetal com 80 mL de cicloexano (Synth, Diadema, SP, Brasil). Após 2 horas, o volume de água foi medido (Pimentel et al., 2006).

2.3. Caracterização química do óleo essencial

A identificação química do óleo essencial foi realizada por cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-EM) (Shimadzu, modelo QP 2010 Plus). Empregou-se uma coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m). O gás de arraste utilizado foi o hélio (Pró-service), a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura foi programada de 60 °C a 240 °C, com uma taxa de 3 °C/min., seguida de um aumento de 10 °C, até atingir 300 °C, mantendo-se constante por 7 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram 220 °C e 240 °C, respectivamente. Foi injetado 0,5 μ L da amostra diluída em hexano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), a uma taxa de partição 1:100 (Adams, 2007).

A quantificação dos constituintes foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector por ionização de chamas (GC-DIC) (modelo Shimadzu GC 2010), nas mesmas condições experimentais empregadas na etapa de identificação, com temperatura do detector de 300 °C. Os compostos foram identificados pelas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21 e os índices de retenção foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz (1963), baseada na série homóloga de alcanos (C₈-C₁₈), com extrapolação para C₁₉ e C₂₀ e comparados com a literatura segundo Adams (2007).

2.4. Atividade citotóxica, genotóxica e antitumoral do óleo essencial

2.4.1. Linhagem celular e condições de cultivo

Foram utilizadas linhagens derivadas de células normais (fibroblastos de pele humana - CCD-1059Sk) e de células tumorais (melanoma - HT144, adenocarcinoma de pulmão - A549 e de mama - MCF7), adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂).

2.4.2. Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada utilizando a linhagem CCD-1059Sk, por meio da viabilidade celular utilizando o Kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A linhagem foi semeada em placas de 96 poços, na densidade de 1x10⁴ células/poço. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas por 48 horas com os óleos essenciais nas concentrações de 62,5; 125; 200; 250 e 500 µg mL⁻¹, coradas com MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) e analisadas em leitor de Elisa a 490 nm . Os valores de IC₅₀ foram determinados usando o programa GraphPadPrism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os valores apresentados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata ± desvio padrão (Cory et al., 1991).

2.4.3. Atividade genotóxica

A atividade genotóxica foi realizada utilizando o ensaio do Cometa, com as células da linhagem CCD-1059Sk, que foram semeadas em placas de 24 poços (5x10⁴ células/poço).

Após a adesão, as culturas foram tratadas com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo essencial por 48 horas. A suspensão celular foi obtida por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution*/Sigma-Aldrich LTDA, Brasil) e centrifugada a 1000 g por 5 minutos. O precipitado foi solubilizado em 100 μL de meio de cultura, e 5×10^5 das células foram homogeneizadas em 100 μL de agarose de baixa temperatura de fusão (Sigma Aldrich, Alemanha) e distribuídas sobre uma lâmina histológica pré-coberta com agarose (temperatura de fusão padrão) (Sigma Aldrich, Alemanha). As lâminas foram mantidas a 4 °C em solução de lise.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal em condições alcalinas por 20 minutos, 20 volts e 300 mA (1v/cm^2). Após esse processo, as lâminas foram mantidas em tampão de neutralização por 15 minutos, sendo, em seguida, secas e coradas com Sybr Green (Molecular Probes SYBR® Green I nucleicacid gel stain). A análise foi realizada com microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon), analisando 50 cometas por lâmina com a utilização do software Open Comet/ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os resultados referem-se à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata (Singh et al., 1988).

2.4.4. Atividade antitumoral do óleo essencial

A atividade antitumoral foi realizada utilizando as linhagens HT144, A549 e MCF7, por meio da viabilidade celular utilizando o Kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA) conforme descrito no item 2.4.2 (Cory et al., 1991).

2.5. Atividade antifúngica do óleo essencial

Foram utilizadas duas espécies de fungos filamentosos toxigênicos: *Aspergillus carbonarius* (*A. carbonarius*) (CCDCA 10507) e *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) (CCDCA

10508), que foram adquiridos da Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. O inóculo de cada fungo foi incubado em placas de Petri contendo meio Agar Extract Malt (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 25 °C por sete dias. Após esse período, a suspensão de esporos dos fungos em água destilada estéril contendo 1% de Tween 80 (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi preparada. A câmara de Newbauer foi utilizada para a determinação da concentração de esporos (10^6 esporos/mL).

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi avaliada pelo método difusão em disco, aceito pelo *Food and Drug Administration* e estabelecido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Um volume de 100 μ L da solução de esporos foi transferido para a placa contendo o meio pela técnica de espalhamento em superfície. Discos estéreis de papel-filtro de 5 mm de diâmetro, embebidos com 10 μ L dos óleos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, SP, Brasil), nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 μ g mL⁻¹, foram colocados sobre o meio de cultura. DMSO foi utilizado como controle negativo e o fluodioxonil (2 μ L mL⁻¹) (Sigma Aldrich, Alemanha), como controle positivo. As placas foram incubadas em BOD, a 25 °C, por 72 horas. Foram realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados. Foi definida como a CMI a menor concentração de óleo essencial, que apresentou um halo de inibição. O teste foi realizado em triplicata (Andrade et al., 2015).

2.6. Atividade antioxidante do óleo essencial

A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios ABTS, DPPH e β -Caroteno. Em todas as atividades, utilizou-se, o BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) como controle positivo para fins de comparação. O óleo essencial e o BHT foram diluídos em etanol e avaliados nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 500 μ g mL⁻¹. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

2.6.1. Método de estabilização do radical ABTS• [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]

A atividade de estabilização do radical ABTS• [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizada segundo metodologia descrita por Rezende et al. (2017). Em 1900 µL do radical ABTS• (Sigma Aldrich, Alemanha), previamente diluído, foram adicionados 100 µL das concentrações do óleo essencial. A reação-controle foi preparada com 1900 µL de etanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e 100 µL da diluição mais concentrada do óleo essencial; e o controle negativo, com 1900 µL da solução de ABTS e 100 µL de etanol. Após 10 minutos de reação no escuro, a absorvância foi monitorada espectrofotometricamente a 734 nm (Shimadzu UV-1601PC).

A porcentagem de inibição do radical ABTS• pelas amostras foi calculada pela equação: % Efeito de captação do radical = $[(ACN - AAm) / ACN] * 100$, (ACN = Absorvância do controle negativo; AAm = Absorvância da amostra).

2.6.2. Método de estabilização do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante pela estabilização de radical DPPH foi realizada segundo metodologia descrita por Teixeira et al. (2014). Em tubos de ensaio, foram adicionados 2700 µL da solução etanólica de DPPH ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma Aldrich, Alemanha) e 300 µL de amostra de óleo essencial e BHT (Sigma Aldrich, Alemanha). Utilizou-se etanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) como controle negativo. Após incubação por 60 minutos, foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) no comprimento de onda de 515 nm.

A porcentagem de atividade antioxidante obtida pelo método de estabilização do radical DPPH• foi calculada empregando-se a equação: %AA = $[(ACN - AAm) / ACN] * 100$, (ACN = Absorvância do controle negativo; AAm = Absorvância da amostra).

2.6.3. Método de avaliação da proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante de branqueamento de β -Caroteno foi realizada segundo metodologia descrita por Teixeira et al. (2014). Foi preparada uma emulsão contendo 0,06 mL de ácido linoléico (Sigma Aldrich, Alemanha), 600 mg de Tween 20 (Synth, Diadema, SP, Brasil), 6 mg de β -caroteno (Sigma Aldrich, Alemanha) e 30 mL de clorofórmio (Vetec, RJ, Brasil). Após a rotaevaporação do solvente, adicionaram 150 mL de água destilada saturada de oxigênio. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2700 μ L de emulsão e 300 μ L de amostra de óleo essencial e BHT (Sigma Aldrich, Alemanha). Etanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi utilizado como controle negativo. Leituras de absorbâncias a 470 nm foram realizadas no tempo zero e após 60 minutos de incubação a 50 °C.

A atividade antioxidante (AA%) foi calculada como % de atividade, após 60 min de incubação, pela equação: $AA\% = [1 - (AAm_0 - AAm) / (ACN_0 - ACN)] * 100$, (AAm₀ = Absorbância no início da incubação com a amostra; AAm = Absorbância depois de 1 hora de incubação com a amostra; ACN₀ = Absorbância no início da incubação com o etanol; ACN = Absorbância depois de 1 hora de incubação com o etanol).

2.7. Análise estatística

Foi realizada a análise estatística dos resultados referentes às atividades citotóxica, genotóxica e antitumoral. Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey usando o software GraphPadPrism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3. Resultados e discussão

3.1. Rendimento e composição química do óleo essencial

O rendimento de extração do óleo essencial obtido das cascas da laranja Moro foi de 1,3% (p/p em base livre de umidade), sendo esse considerado elevado quando comparado com óleos essenciais provenientes de outras espécies vegetais. Gomes et al. (2014) encontraram um rendimento de 1,1% no óleo essencial extraído das cascas de laranjas douradas (*C. sinensis*). Na Tabela 1 e a Figura 1, apresentam-se a constituição química e a estrutura dos componentes do óleo essencial da laranja Moro.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial da laranja Moro.

Pico	IR	Composto	%
1	916	α -pineno	0,3589
2	965	sabineno	0,5409
3	988	mirceno	1,0721
4	1.030	limoneno	95,1197
Total identificado			97,0916

IR = Índice de retenção. % = porcentagem de cada componente presente no óleo essencial.

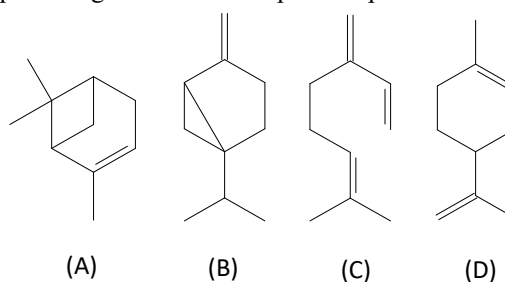


Figura 1 Estruturas químicas dos componentes do óleo essencial da laranja Moro: (A) α -pineno; (B) sabineno; (C) mirceno; (D) limoneno.

No total, quatro componentes terpênicos foram identificados no óleo essencial, sendo eles: α -pineno, sabineno, mirceno e o limoneno como majoritário. Esses resultados vêm ao encontro de diversos autores, que afirmam a presença do limoneno como componente

majoritário do óleo essencial de casca de diferentes tipos de citros (Hsouna et al., 2017; Bozkurt, Gülnaz e Kaçar, 2017; Himed, Merniz e Barkat, 2016).

Gomes et al. (2014), estudando atividades biológicas do óleo essencial da laranja Pera (*Citrus sinensis*), encontraram os compostos triciclono (4,16%), sabineno (2,50%), β -pineno (6,67%), mirceno (2,92%), octanal (1,69%), limoneno (76,00%), γ -terpineno (1,89%) e linalol (4,17%). Posteriormente Martins et al. (2017), estudando o óleo essencial da casca de laranja doce (*Citrus sinensis*), encontraram os compostos α -pineno (1,08%), mirceno (3,60%), limoneno (83,33%), sabineno (1,02%), trans- β -terpineol (0,14%), linalol (8,91%) e octanol (0,57%), corroborando com dados do presente trabalho, que também encontrou o limoneno como composto majoritário.

As variações qualitativas e quantitativas encontradas na composição química de óleos essenciais podem ser atribuídas a diversos fatores, mas principalmente a fatores relacionados a características genéticas das espécies e condições ambientais em que foram cultivadas (clima, sazonalidade e geografia) (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

3.2. Atividade citotóxica e genotóxica do óleo essencial

O potencial citotóxico do óleo essencial obtido das cascas da laranja Moro sobre células normais derivadas de pele humana (CCD-1059Sk) está representado na Figura 2. Observa-se que o óleo essencial não ocasionou morte das células após 48 horas de tratamento, não exibindo um efeito citotóxico nas concentrações testadas.

A investigação da citotoxicidade em linhagens não tumorais em óleos essenciais é de extrema importância, visto que, antes de seu uso ser indicado para a aplicação em alimentos ou medicamentos, é importante que seja realizada uma avaliação de risco, a fim de verificar a ausência de compostos tóxicos, garantindo a inocuidade do produto à saúde do consumidor

(WHO, 1995). O produto, para ser viável no ensaio de citotoxicidade, não deve ocasionar morte das células, nem afetar suas funções celulares, o que foi observado neste trabalho.

Nicolic et al. (2017) estudaram a atividade citotóxica do óleo essencial de limão (*Citrus limon* L.) utilizando a linhagem celular derivada de fibroblastos de pulmão fetal humano, pelo ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) e confirmaram ausência de atividade citotóxica, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

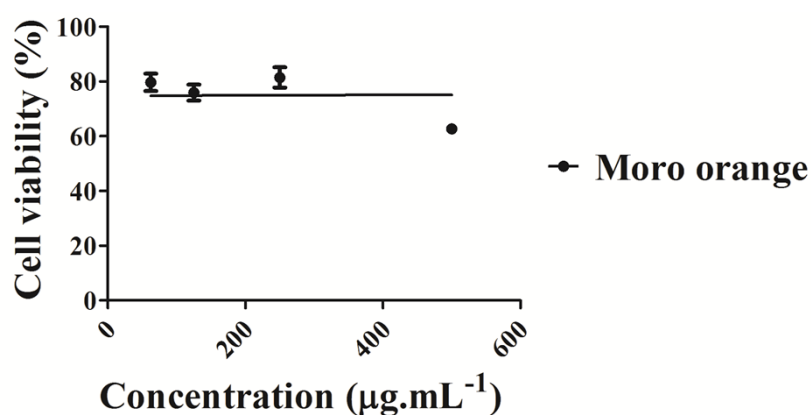


Figura 2. Estudo de citotoxicidade diante da linhagem CCD-1059Sk após tratamento por 48 horas com diferentes concentrações de óleo essencial da laranja Moro.

O resultado do potencial genotóxico do óleo essencial da laranja Moro (Figura 3) demonstra ausência de dano ao DNA em células da linhagem CCD-1059Sk, na concentração avaliada ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), podendo, dessa forma, ser utilizado com segurança como agente terapêutico.

Cavalcanti et al. (2012) avaliaram a genotoxicidade do óleo essencial obtido das folhas de *Alpinia zerumbet* utilizando o ensaio Cometa e encontraram uma constituição química de 98,3% de monoterpenos. Observaram, em seguida, que o óleo essencial não induziu a genotoxicidade em leucócitos humanos nas concentrações de 50 a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$; porém, em uma concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, causou uma redução na viabilidade celular, e um aumento

no dano ao DNA foi constatado. Entretanto, experimentos *in vivo* demonstraram que o óleo essencial (400 mg / kg) não levou a mutagenicidade em sangue periférico e células de medula óssea em ratos.

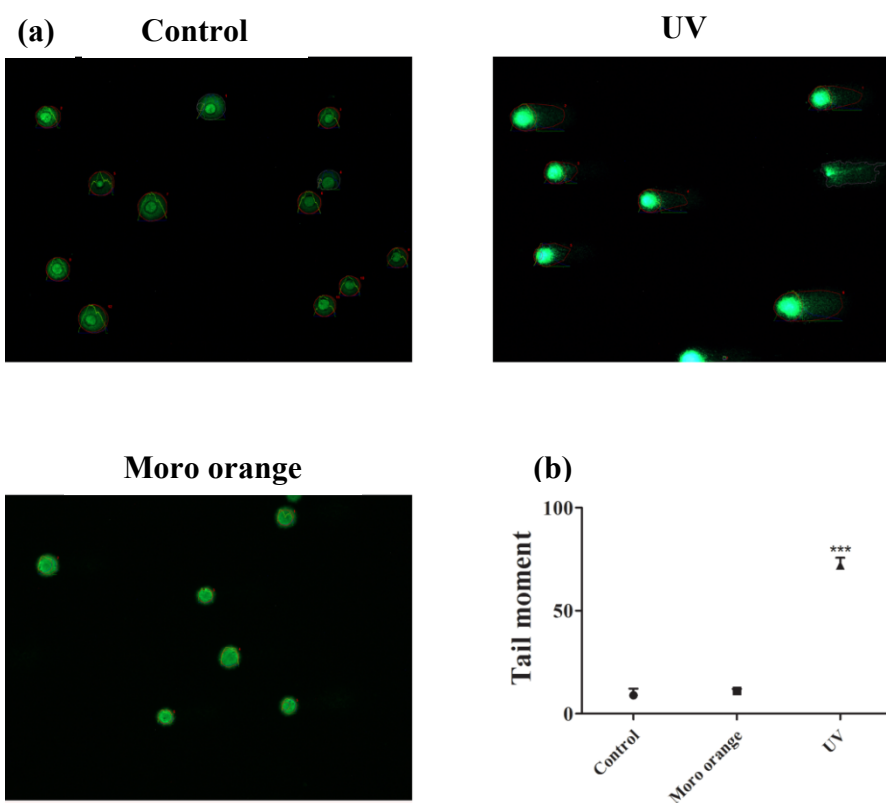


Figura 3. Estudo de genotoxicidade diante da linhagem CCD-1059Sk após tratamento por 48 horas com $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo essencial da laranja Moro. Notas: (a) Imagens ilustrativas de cometas em amostras visualizadas em microscópio de fluorescência após coloração com *SybrGreen*. (b) Análise realizada a partir de 50 cometas por lâmina através do software *OpenComet*. Os dados do gráfico referem-se ao parâmetro momento da cauda e estão representados como a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata. A barra de erros representa o desvio padrão. UV-ultravioleta * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

3.3. Atividade antitumoral do óleo essencial

A atividade antitumoral do óleo essencial obtido das cascas da laranja Moro sobre as linhagens tumorais de melanoma (HT144), adenocarcinoma de pulmão (A549) e adenocarcinoma de mama (MCF7) está representada na Figura 4. Pelos resultados, verificou-

se que a maior redução da viabilidade celular ocorreu com a linhagem tumoral HT144 inibindo aproximadamente 50% da viabilidade celular, na concentração de 272,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

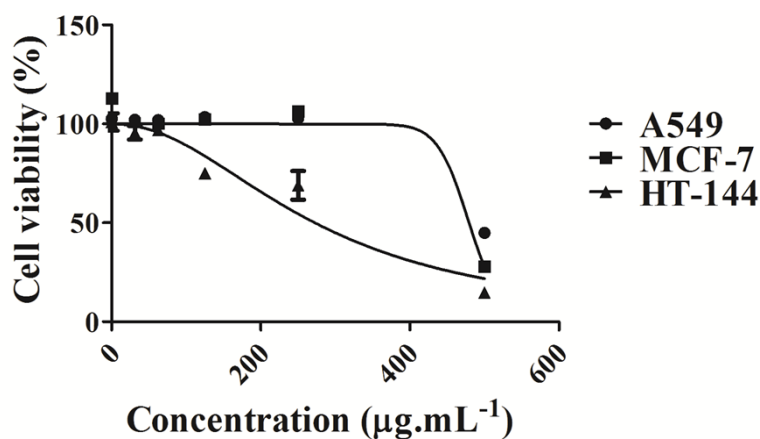


Figura 4. Viabilidade celular das linhagens A549, MCF-7 e HT-144, após tratamento por 48 horas com óleo essencial da laranja Moro.

Segundo Lesgards e colaboradores (2014), a atividade antitumoral dos óleos essenciais está relacionada à ativação da morte celular (apoptose) induzida pelas proteínas caspases em células cancerígenas, com menores modificações de células saudáveis. Muitos fenômenos parecem ocorrer, entre os quais estão a superexpressão e regulação de enzimas de desintoxicação do fígado, alterações no potencial de membrana de células cancerígenas e mitocôndrias, produção de radicais livres nas células cancerígenas, inibição da angiogênese e modificação da indução dos genes dos tumores. Os constituintes dos óleos essenciais parecem agir sinergicamente com a quimioterapia e radioterapia convencional.

Chen et al. (2011a) evidenciaram que os efeitos benéficos dos terpenoides contra o câncer estão associados também com uma mudança na polarização da membrana de células cancerígenas e especialmente na mitocôndria. Isso se deve pelo fato de os terpenoides serem muito lipofílicos e terem alta afinidade pelas membranas celulares. As células cancerígenas são frequentemente hiperpolarizadas e sua despolarização induzida pelo terpeno ajuda a

restaurar processos normais na célula, incluindo apoptose. Como exemplo, tem-se o composto germacreno, que despolariza a membrana mitocondrial das células cancerígenas no câncer de mama.

Chao e colaboradores (2017) estudaram a atividade antitumoral do óleo essencial da casca de laranja produzida na China. Foi constatado um efeito positivo na inibição da proliferação de câncer humano de pulmão e de próstata, com concentrações variando de 6,25 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as linhagens. Os autores atribuíram essa atividade ao composto limoneno encontrado em 74,6% na composição química do óleo essencial, apresentando, dessa forma, efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos contra múltiplos tipos de tumores, corroborando consequentemente, com a presente pesquisa.

3.4. Atividade antifúngica do óleo essencial

Os resultados da atividade antifúngica do óleo essencial obtido das cascas da laranja Moro avaliando a CMI sobre os fungos filamentosos *A. carbonarius* e *A. flavus* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial da laranja Moro sobre os fungos filamentosos *A. carbonarius* e *A. flavus*.

Fungos	CMI ($\mu\text{L mL}^{-1}$)		
	DMSO	FD	Óleo essencial da laranja Moro
<i>A. carbonarius</i> (CCDCA 10507)	NI	2	125
<i>A. flavus</i> (CCDCA 10508)	NI	2	125

NI: não inibiu; DMSO: dimetilsulfóxido (C-); FD: fluodioxonil (C+)

Pelos dados descritos na Tabela 2, observa-se que o óleo essencial da laranja Moro foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *A. carbonarius* e *A. flavus*, na CMI de 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Gomes et al. (2014) estudaram a atividade antifúngica do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) diante de fungos *A. niger*, *A. flavus* e *A. carbonarius*, usando o método de difusão em disco. Foi observado pela CMI que o óleo essencial apresentou resultados inferiores ao observado no presente trabalho (*A. niger* - 3,91 $\mu\text{L mL}^{-1}$, *A. flavus* - 62,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e *A. carbonarius* - 3,91 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e esse fato pode ser explicado pela diferença na variedade de laranja, resultando diferenças na composição química do óleo essencial.

Li et al. (2014) relataram que existe uma relação entre a atividade antimicrobiana e as estruturas químicas dos compostos mais abundantes nos óleos essenciais. Segundo Viriato (2014), muitas substâncias ricas em terpenos, como o limoneno, são consideradas antimicrobianas naturais, por apresentarem atividade frente aos fungos, por possuírem estruturas químicas apolares, com características hidrofóbicas e lipofílicas, facilitando a interação com os elementos da membrana da célula fúngica.

Dessa forma, segundo Kedia, Jha e Dubey (2015), os óleos essenciais atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, interrompem a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e interagem com as enzimas e proteínas da membrana responsáveis pela biossíntese do ergosterol, produzindo um fluxo de prótons para o exterior da célula. Concomitantemente, ocorre o rompimento de sua organização, ocasionando um desequilíbrio na permeabilidade que reflete um vazamento do conteúdo celular, culminando na morte do fungo.

3.5. Atividade antioxidante do óleo essencial

Não foram observadas no óleo essencial obtido das cascas da laranja Moro atividades antioxidantes na faixa de concentrações utilizadas perante os métodos testados (ABTS, DPPH e proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico). Essa ausência de atividade se justifica pelas estruturas químicas dos compostos presentes no óleo essencial em estudo.

Em relação aos métodos DPPH e ABTS, que são baseados na estabilização de radicais, a ausência de atividade justifica-se pela dificuldade de doação de um hidrogênio por parte dos compostos terpênicos presentes no óleo essencial para neutralizar a ação do radical. Corroborando com os dados obtidos neste trabalho, Radan et al. (2018) também não encontraram atividade antioxidante por esses métodos, quando avaliaram óleos essenciais da casca de laranja amarga de duas variedades (*Aurantii amari flavedo* e *Citrus aurantium* L.), que também apresentavam predominância de limoneno em sua constituição química (91,1 e 51,3%, respectivamente).

Anteriormente, Torres-Álvarez et al. (2016), investigando a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH, constataram atividades no óleo essencial de laranja (23,25 $\mu\text{mol TE/mL}$ - ABTS e 3,01 $\mu\text{mol TE/mL}$ - DPPH) e no óleo essencial de laranja concentrado 20 vezes (156,25 $\mu\text{mol TE/mL}$ - ABTS e 21,24 $\mu\text{mol TE/mL}$ - DPPH), ao passo que não foi observada nenhuma atividade no composto isolado (limoneno). Os autores justificaram esses resultados devido a diferenças na composição e porcentagem dos compostos, em que os compostos minoritários foram potencializados e o composto majoritário limoneno reduzido no óleo essencial de laranja e no óleo essencial de laranja concentrado.

Esse fato vem ao encontro com o proposto por Choi et al. (2000), que descobriram que, embora o limoneno seja o composto majoritário em óleos essenciais de laranja, não desempenha o papel principal na determinação da atividade antioxidante e, sim, o sinergismo entre os compostos. Liu et al. (2012) observaram maior atividade antioxidante em óleo essencial de laranja, quando comparado com compostos individuais (linalol, decanal, octanal e valencene).

Em relação ao método de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico, baseado na inibição da peroxidação lipídica, também não foi observada atividade antioxidante.

Provavelmente, essa ausência de atividade também se justifica pela composição química do óleo essencial em estudo.

Yamina, Augustin e Djamel (2018) avaliaram a atividade antioxidante pelo método de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico em óleos essenciais de *Citrus limon* var. Eureka e *Citrus sinensis* var. Valência e encontraram resultados positivos por esse método (36,19 e 55,56% de inibição do ácido linoléico), sendo constituídos por um menor teor de limoneno, quando comparados ao presente estudo (54,95 e 83,6%). Segundo Andrade et al. (2013), óleos essenciais ricos em terpenos apresentam melhores valores de atividade antioxidante pelo método de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico do que nos métodos de estabilização de radicais (ABTS e DPPH), pelo fato de o primeiro ser mais específico para antioxidantes lipofílicos.

4. Conclusão

O óleo essencial da casca da laranja Moro apresentou alto rendimento de extração e o componente limoneno como majoritário. O óleo essencial não apresentou efeito citotóxico e genotóxico nas concentrações testadas. Pelos resultados da atividade antitumoral, verificou-se maior redução da viabilidade celular na linhagem tumoral de melanoma. O óleo essencial apresentou CMI de $125 \mu\text{l mL}^{-1}$ para ambos os fungos analisados, mas não apresentou atividade antioxidante pelas metodologias empregadas.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas

Gerais (Fapemig) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior 001 (Capes) pelo apoio financeiro.

Referencias

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy*. (4 th ed.). Allured: Carol Stream.
- Andrade, M. A. A., Cardoso, M. das G., Gomes, M. de S., Azeredo, C. M. O. de, Batista, L. R., Soares, M. J., Rodrigues, L. M. A. & Figueiredo, A. C. S. (2015). Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 189-194.
- Andrade, M. A., das Graças, C. M., de Andrade, J., Silva, L. F., Teixeira, M. L., Valério, R. J. M., Silva, F. A. C. & Barroso, J. G. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants*, 2(4), 384-397.
- Bozkurt, T., Gülnaz, O., & Kaçar, Y. A. (2017). Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 11(10), 01-08.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2010). *Farmacopéia Brasileira*, fifth ed. Fiocruz, Brasília.
- Cavalcanti, B. C., Ferreira, J. R., Cabral, I. O., Magalhães, H. I., de Oliveira, C. C., Rodrigues, F. A., Rocha, D. D., Barros, F. W., da Silva, C. R., Júnior, H. V., Canuto, K. M., Silveira, E. R., Pessoa, C. & Moraes, M. O. (2012). Genetic Toxicology Evaluation of Essential Oil of *Alpinia zerumbet* and its Chemoprotective

- Effects Against H₂O₂-Induced DNA Damage in Cultured Human Leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4051 – 4061.
- Chao, Y., Hui, C., Hongli, C., Balian, Z., Xuzhong, L. & Jiong, C. (2017). Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel Chao. *Molecules*, 22(1), 1-10.
- Chen, W., Lu, Y., Wu, J., Gao, M., Wang, A., & Xu, B. (2011a). Beta-elemene inhibits melanoma grow thand metastasis via suppressing vascular end othelialgrowthfactor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(4), 799–808.
- Choi, H. S., Song, H. S., Ukeda, H., & Sawamura, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 4156 - 4161.
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture. *Cancer Communications*, 3(1), 207-212.
- Dosoky, N. S. & Setzer, W. N. (2018). Biological Activities and Safety of *Citrus* spp. Essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1-25.
- Fabroni, S., Ballistreri, G., Amenta M., & Rapisarda P. (2016). Anthocyanins in different Citrus species:an UHPLC-PDA-ESI/MSn-assisted qualitative and quantitative investigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 4797-4808.
- Gobbo-Neto, N. P. L., Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374-381.
- Gomes, M. S., Cardoso, M. G., Soares, M. J., Batista, L. R., Machado, S. M. F., Andrade, M. A., Azeredo, C. M. O., Resende, J. M. V., & Rodrigues, L. M. A. (2014). Use of

- essential oils of the genus Citrus as biocidal agents. *American Journal of Plant Sciences*, 5(1), 299-305.
- Himed, L., Merniz, S., & Barkat, M. (2016). Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of Citrus limonessential oil and its application in margarine preservation. *Algerian Journal of Natural Products*, 4(2), 316-322.
- Hsouna, A. B., Halima, N. B., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease*, 16(146), 1-11.
- Kedia, A., Jha, D. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. *Microbiology Book Series*, 5(1), 208-214.
- Lesgards, J. F., Baldovini, N., Vidal, N. & Pietri, S. (2014). Anticancer Activities of Essential Oils Constituents and Synergy with Conventional Therapies: A Review. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1423.
- Li, J., Zhentian, L., Ligai, L., Rangjin, X., Wanpeng, X., Yu, G., Lloyd, W. S. & Zhiqin, Z. J. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3011–3033.
- Liu, K., Chen, Q., Liu, Y., Zhou, X., & Wang, X. (2012). Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. *Journal of Food Science*, 77(1), C1156 – C1161.
- Martins, G. dos S. O., Zago, H. B., Costa, A. V., Junior, L. M. de A. & Carvalho, J. R. de. (2017). Caracterização química e toxicidade de óleos essenciais cítricos sobre *Dysmicoccus brevipes* (hemiptera: pseudococcidae). *Revista Caatinga*, 30(3), 811-817.

- Nikolic, M. M., Jovanovic, K. K., Markovic, T. L., Markovic, D. L., Gligorijevic, N. N., Radulovic, S. S., Kostic, M., Glamoclija, J. M. & Sokovic, M. D. (2017). Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of *Citrus limon* L., *Piper nigrum* L. and *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(11), 1606-1614.
- Pimentel, F. A., Cardoso, M. das G., Salgado, A. P. S. P., Aguiar, P. M., Silva, V. de F., Morais, A. R. de & Nelson, D. L. (2006). A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. *Química Nova*, 29(2), 373-375.
- Radan, M., Parcina, A. & Burcul, F. (2018). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil Obtained from Bitter Orange Peel (*Citrus aurantium* L.) Using Two Methods. *Croatica Chemica Acta*, 91(1), 125-128.
- Rezende, D. A. C. S., Souza, R. V., Magalhães, M. L., Silva, C. A. R., Sousa, C. M. S., de Souza, E. C., De Lima, G. L. G., Nelson, D. L., Batista, L. R. & das Graças, C. M. (2017). Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 8(1), 154-170.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. (6 th ed.). Porto Alegre: UFSC/UFRGS.
- Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184-191.
- Teixeira, M. L., Cardoso, M. das G., Figueiredo, A. C. S., Moraes, J. C., Assis, F. A., Andrade, J. de, Nelson, D. L., Gomes, M. de S., Souza, J. A. de & Albuquerque, L. R. M. de. (2014). Essential Oils from *Lippia organoides* Kunth. and *Mentha spicata*

- L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. *American Journal of Plant Sciences*, 5(9):1-10.
- Torres-Álvarez C., Báez-González, J. G., Amaya, G. C. A., Núñez-González, A. & Alanís, G. M. G. (2016). Desarrollo de emulsiones con aceite esencial de naranja formuladas con diferentes biopolímeros. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 850-856.
- Van den dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gás liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11(1), 463-471.
- Viriato, A. (2014). Terpenoids with antifungal activity for *Candida Berkhout* species, causing hospital infections. *O Mundo da Saúde*, 38(1), 40-50.
- Yamina, B. M., Agustin, A. & Djamel, D. (2018). Study of Antifungal, Anti-aflatoxigenic, Antioxidant Activity and Phytotoxicity of Algerian *Citrus limon* var. Eureka and *Citrus sinensis* var. Valencia Essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(2), 345-361.
- World Health Organization (WHO). (1995). Application of risk analysis to food standards issues. Report of a FAO/WHO Exper Consultation. WHO/FNU/FOS/95.3. Geneva, 1995.