



Efeitos do consumo preventivo da casca da jaboticaba e polpa de açaí na obesidade associada a colite induzida em camundongos

Gabriele Polezi, Roberto de Paula do Nascimento, Patrícia Berilli Batista, Paulo Sérgio Loubet Filho, Nathália Medina dos Santos, Ana Paula Ribeiro Paiotti, Cinthia Baú Betim Cazarin, Mario Roberto Maróstica Junior.

Palavras-chave:

Doença inflamatória intestinal, Myrciaria jaboticaba, Euterpe oleracea.

Introdução

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o sobrepeso e a obesidade são dois dos maiores problemas de saúde pública negligenciados atualmente. A causa da obesidade é multifatorial, podendo estar relacionada a fatores genéticos, ambientais e psicossociais, sendo relacionada não apenas à quantidade do consumo alimentar, como também à composição e qualidade da dieta (ALBUQUERQUE et al., 2017). O consumo de alimentos ricos em lipídeos e carboidratos contribui para um balanço energético positivo, aumentando a quantidade de energia consumida, o que leva ao ganho de peso. O acúmulo anormal ou excessivo de gordura também está associado com a ocorrência de processos inflamatórios intestinais (COSNES et al., 2011), devido a complexas interações de componentes liberados pelo organismo.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) se configuram por alterações estruturais no revestimento e na estrutura do trato gastrointestinal. As duas principais categorias de DII são a doença de Crohn e a colite ulcerativa, que têm características clínicas e patológicas sobrepostas e distintas. Enquanto a colite se caracteriza por inflamação e ulceração da camada mais superficial do intestino grosso (cólon), a doença de Crohn pode afetar qualquer parte do sistema digestivo, principalmente a parte inferior do intestino delgado e o intestino grosso. Os principais sintomas das DII são dores abdominais, diarreia persistente, sangramento retal/fezes com sangue, perda de apetite e perda de peso. A etiopatogênese das DII ainda não é completamente compreendida, mas hoje sabe-se que a obesidade atua como um fator de risco para a ocorrência dessas doenças (BOUTROS; MARON, 2011). O consumo de uma dieta rica em gorduras (especialmente os ácidos graxos saturados) pode favorecer a ocorrência de processos inflamatórios no organismo (ENOS et al., 2013). Em contrapartida, a ingestão de alimentos com altos teores de fibras e polifenóis, considerados importantes por possuírem ação anti-obesogênica e antidiabetogênica, pode atuar na prevenção das DII (LENQUISTE et al., 2012).

Dentre os alimentos potencialmente anti-inflamatórios e antioxidantes, destacam-se o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e a jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg), dois frutos nativos brasileiros ricos em antocianinas e fibras dietéticas (LENQUISTE et al., 2012; SILVA et al., 2019).



Considerando o exposto, torna-se importante a realização de novos estudos para a melhor compreensão de novas formas de prevenção de processos inflamatórios. Assim, este projeto de pesquisa teve como principal objetivo estudar o consumo da casca da jabuticaba e polpa de açaí na prevenção de obesidade e inflamação de cólon induzidas, utilizando-se um modelo animal robusto para experimentação.

Metodologia

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (protocolo 5169-1/2019). Para o experimento, foram utilizados 68 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, com 6 a 7 semanas de vida, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP.

Para a indução da obesidade, durante 91 dias, os animais receberam dieta *high-fat* (HFD) de 35% de gordura (m/m) suplementada ou não, dependendo do grupo experimental, com o pó liofilizado da casca da jabuticaba ou da polpa de açaí na proporção de 5% (m/m) do total.

Para a indução de colite aguda experimental, do dia 91 ao dia 95, os animais receberam garrafas de água com dextran sulfato de sódio (DSS) (36-50 kDa) na concentração de 3% (m/v), as quais substituíram as garrafas com água filtrada comum. No dia 96 do experimento, as garrafas com DSS foram substituídas por aquelas com água comum até o final do experimento (dia 100).

Um grupo HFD recebeu Mesalazina (100 mg/kg) diariamente, a partir da inclusão de DSS na água de beber, via gavagem, como um tratamento para a colite. Assim, foram criados seis grupos experimentais: Controle (C), Controle colite (CC), *High-fat* colite (HFC), *High-fat* colite jabuticaba (HFCJ), *High-fat* colite açaí (HFCA) e *High-fat* colite Mesalazina (HFCM).

Durante todo o experimento, os camundongos foram monitorados periodicamente quanto a massa corporal e o consumo de alimento e água. A partir do dia 91, também foram monitorados a consistência das fezes e o sangramento nas fezes/ânus, analisando-se estes três critérios através de um score clínico (0 a 3) denominado Índice de Atividade da Doença (GOMMEAUX et al., 2007), sendo estas alterações comumente associadas à colite experimental e utilização de DSS (CHASSAING et al., 2014). Após a eutanásia, foram coletados sangue/soro, tecidos adiposos, fígado, baço, cólon e fezes para análises posteriores. O cólon foi pesado (em g) e seu comprimento foi mensurado (em cm) com uma régua, de forma simples em uma superfície plana e horizontal. A relação massa/comprimento do cólon (mg/cm) é utilizada como índice de inflamação (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2013). Além disso, amostras da região distal do cólon foram submetidas à avaliação histológica, através do score (0 a 3) de (STUCCHI et al., 2000), examinando-se: ulceração em epitélio intestinal, atividade mitótica e depleção de células



caliciformes em cripta intestinal, vascularização em lâmina própria, edema em submucosa e infiltração mononuclear e de granulócitos em lâmina própria e submucosa.

Além disso, o projeto também envolveu a parte de análise de composição das dietas dos animais e dos pós liofilizados dos frutos. Foram analisados o conteúdo de umidade e cinzas (ZENEBO; PASCUET, 2008), lipídeos (BLIGH; DYER, 1959), proteínas (AOAC, 1990)(AOAC, 1990), compostos fenólicos (SWAIN; HILLIS, 1959), antocianinas totais (GIUSTI; WROLSTAD, 2001) e capacidade antioxidante (BENZIE; STRAIN, 1996; DÁVALOS, 2004).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na caracterização química dos frutos demonstram, em especial, um alto teor de polifenóis totais na casca da jabuticaba (27 ± 1 mg AGE/g) e na polpa de açaí (22 ± 1 mg AGE/g). Dentre as variadas classes de compostos fenólicos, as antocianinas compõem $5,41 \pm 0,07$ mg C3G/g na casca da jabuticaba e $4,35 \pm 0,03$ mg C3G/g na polpa de açaí, contribuindo para a ação antioxidante que estes alimentos apresentam. Já nas dietas dos animais, a composição de polifenóis totais foi de $1,110 \pm 0,004$ mg AGE/g na HFD com casca da jabuticaba e de $1,14 \pm 0,03$ mg AGE/g na HFD com polpa de açaí. Assim, tendo em vista que os camundongos consumiram, em média, de 2 a 3 g de dieta por dia, aqueles que receberam dietas suplementadas com os frutos obtiveram entre 2,2 e 3,6 mg de compostos fenólicos totais por dia do experimento. Os resultados obtidos nas análises de FRAP e ORAC das dietas suplementadas com casca da jabuticaba (11 ± 1 μ mol TE/g e 12 ± 1 μ mol TE/g) e com polpa de açaí ($10,7 \pm 0,9$ μ mol TE/g e 25 ± 4 μ mol TE/g) nos mostram, de fato, a elevada capacidade antioxidante dos componentes presentes nas dietas dos animais.

A partir dos resultados do ensaio *in vivo*, observou-se que a dieta *high-fat* induziu obesidade a partir da 8ª semana de experimento ($p < 0,05$). Os animais que consumiram polpa de açaí apresentaram, a partir da 5ª semana experimental, uma aceleração no desenvolvimento de obesidade, e na última semana antes da indução da colite, a sua massa corporal estava 38% mais elevada que do grupo HFD ($p < 0,0001$). Já os animais que receberam a casca da jabuticaba tiveram a obesidade induzida de forma mais lenta, sendo esta observada apenas a partir da 11ª semana de experimento. Na última semana antes da indução da colite, o grupo HFCJ teve a sua massa corporal diminuída em 26% ($p < 0,05$), o que indica que o consumo da casca da jabuticaba preveniu contra o aumento excessivo de peso.

Os animais do grupo HFCA apresentaram um grande ganho de peso durante o período de indução de obesidade. No entanto, esse enorme aumento de massa corporal não exacerbou a colite induzida experimentalmente, visto que este grupo apresentou uma recuperada razão peso/comprimento do cólon ($p < 0,05$).



Os animais dos grupos HFCJ e HFCA apresentaram menores valores de escore clínico (**Figura 1a**) da colite em comparação ao grupo que recebeu apenas dieta *high-fat* ($0,13 \pm 0,23$ e $0,48 \pm 0,48$ vs. $1,68 \pm 0,73$; $p < 0,001$), sendo este evidenciado por menor perda de massa corporal, e redução ou ausência de diarreia e sangramento retal. Além disso, os valores de escore histológico (**Figura 1b**) para os grupos HFCJ e HFCA reduziram significativamente ($p < 0,05$) em comparação com o grupo HFC. Essas observações evidenciam os efeitos positivos da casca da jabuticaba e da polpa de açaí na prevenção de processos inflamatórios nos animais utilizados neste estudo.

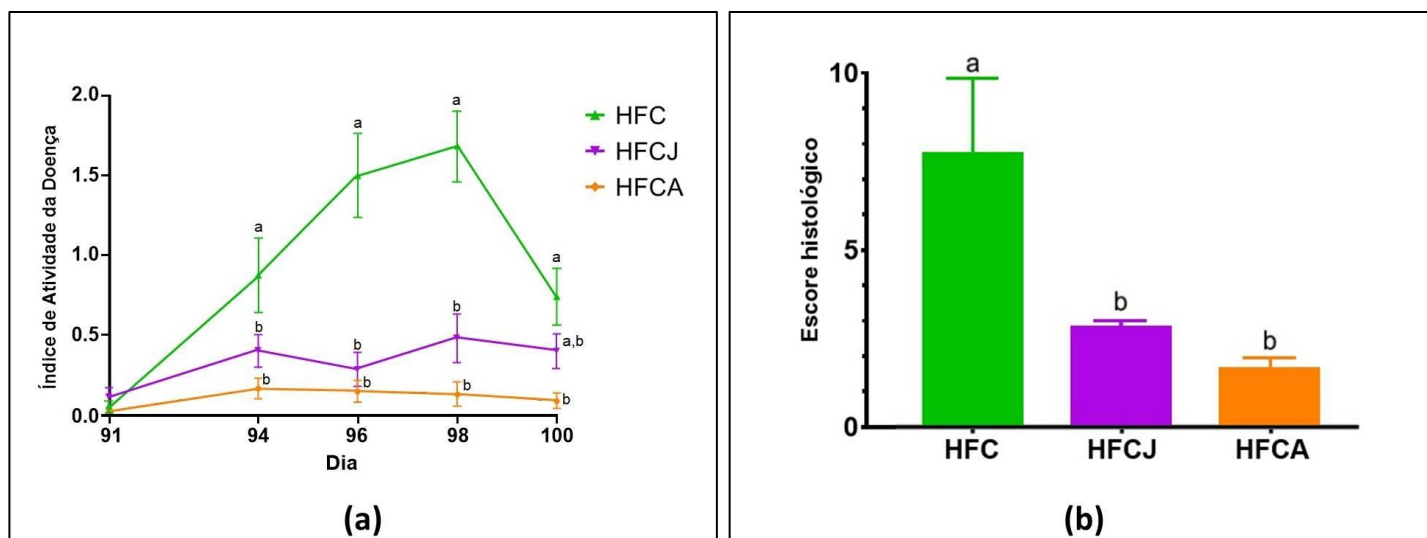


Figura 1. (a) Índice de atividade da doença e (b) escore histológico dos grupos HFC, HFCJ e HFCA. Letras diferentes indicam diferença estatística mínima de $p < 0,05$.

A administração do medicamento Mesalazina causou alta mortalidade (41,66%) e não apresentou efeitos positivos significativos no tratamento das inflamações intestinais, o que nos sugere um papel inverso quando administrado a camundongos obesos.

A partir da análise de concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), presentes nas fezes coletadas, foram obtidos resultados que mostram um aumento da concentração desses AGCC totais, acetato e propionato nas fezes dos animais que consumiram dieta *high-fat* ($p < 0,05$). O grupo HFCJ apresentou valores reduzidos de AGCC em comparação ao grupo HFC, não tratado. Os resultados observados sugerem que o aumento na concentração de AGCC pode estar relacionado com maior risco de obesidade e inflamação. No entanto, isto está em oposição a estudos publicados (OHIRA; TSUTSUI; FUJIOKA, 2017), que demonstram efeitos benéficos dos AGCC em modelos murinos de colite e outras doenças inflamatórias. Para explicar os resultados obtidos neste projeto, propõe-se a justificativa de que os animais que consumiram dieta suplementada com casca da jabuticaba, por apresentarem menor peso corporal – em comparação ao grupo HFC – teriam uma maior absorção intestinal e, portanto, menores níveis de AGCC nas fezes. Além disso, a menor concentração de AGCC nas fezes desses animais também pode estar



associada a um aumento da absorção intestinal como resultado de um mecanismo de recuperação do processo inflamatório gerado pela colite.

Conclusões

O estudo realizado mostrou que o consumo da casca da jaboticaba ou da polpa do açaí, mesmo presentes na dieta *high-fat*, foi capaz de atenuar os sintomas da colite nos animais, sendo evidenciado pela diminuição da perda de massa corporal, redução de diarreia e sangramento retal/fecal durante o estágio de indução da doença e valores de escore histológico reduzidos. Portanto, pode-se concluir que a casca da jaboticaba e a polpa de açaí possuem propriedades anti-inflamatórias na colite induzida por DSS em camundongos fêmeas obesas. Com isso, é possível sugerir que esses frutos poderiam ser utilizados como um potencial manejo dietético na redução do risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, no entanto mais análises precisam ser realizadas de forma a entender os mecanismos por trás disso.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa (403328/2016-0), ao doutorando Roberto de Paula do Nascimento pelo apoio e ao Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior pela orientação.

- ALBUQUERQUE, D. et al. The contribution of genetics and environment to obesity. **British Medical Bulletin**, v. 123, n. 1, p. 159–173, 2017.
- AOAC. Method 979.09. Semi-micro-Kjeldahl. **Association Analytical Chemists**, n. 15th ed, 1990.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Determination of optimal extraction conditions for phenolic compounds from: Pistacia atlantica leaves using the response surface methodology. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BOUTROS, M.; MARON, D. Inflammatory bowel disease in the obese patient. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 24, n. 4, p. 244–252, 2011.
- CHASSAING, B. et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, n. SUPPL.104, p. 1–14, 2014.
- COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785–1794.e4, 2011.
- DÁVALOS, A. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.
- ENOS, R. T. et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: Composition matters. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 1, p. 152–163, 2013.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. 1–13, 2001.
- GOMMEAUX, J. et al. Colitis and Colitis-Associated Cancer Are Exacerbated in Mice Deficient for Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 6, p. 2215–2228, 2007.
- LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.
- OHIRA, H.; TSUTSUI, W.; FUJIOKA, Y. Are short chain fatty acids in gut microbiota defensive players for inflammation and atherosclerosis? **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 24, n. 7, p. 660–672, 2017.
- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Dietary unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil supplementation attenuates acute ulcerative colitis in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 572–581, 2013.
- SILVA, H. R. DA et al. Obtaining and characterization of anthocyanins from Euterpe oleracea (açaí) dry extract for nutraceutical and food preparations. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 5, p. 677–685, 2019.
- STUCCHI, A. F. et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 6 42-6, p. 1298–1306, 2000.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63–68, 1959.
- TRICHES, R. M.; GIUGLIANI, E. R. J. Obesidade, práticas alimentares e conhecimentos de nutrição em escolares Obesity, eating habits and nutritional knowledge among school children. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, 2005.
- ZENEON, O.; PASCUET, N. S. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. **Instituto Adolfo Lutz**, 2008.