



CASCA DA JABUTICABA E SEU EFEITO PREVENTIVO NO CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO EM CAMUNDONGOS: UM ESTUDO PILOTO

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma patologia cuja incidência e mortalidade têm crescido no mundo e no Brasil nos últimos anos. Atualmente, essa doença ocupa o segundo lugar em incidência e o terceiro em mortalidade dentre todos os tipos de cânceres no mundo¹. Historicamente, o CCR possui uma maior incidência nos países desenvolvidos, mas na última década, houve um grande crescimento dos casos nos países em desenvolvimento². Atualmente, alguns países da América Latina, como o Brasil, possuem números equiparáveis à países da Europa³, como Áustria, França e Suíça⁴.

Apesar do CCR possuir uma carga genética ligada ao seu desenvolvimento, este não é o fator determinante para o desenvolvimento da maioria dos seus casos¹. Cerca de 75% dos casos de CCR são esporádicos e diversas vias de sinalização estão envolvidas na sua progressão. Fatores genéticos, ambientais e/ou a associação de ambos influenciam na evolução do CCR. Acredita-se que a perda de estabilidade genética seja o principal fator para o início do desenvolvimento do CCR. Com isso, ocorre o acúmulo de mutações e alterações epigenéticas nos oncogenes e supressores tumorais, levando à rápida expansão das células mutadas e resultando na formação do tumor maligno⁵⁻⁸. Macroscopicamente, o desenvolvimento do CCR é caracterizado pela formação inicial de criptas aberrantes, seguidas por pólipos, adenomas pequenos, adenomas grandes, carcinomas iniciais e avançados e, por fim, metástase^{9,10}.

O aumento dos casos de CCR vem sendo fortemente atrelado ao estilo de vida do indivíduo¹¹. O uso de tabaco, a ingestão diária de álcool, o consumo de carnes vermelhas e processadas, bem como o aumento da massa corporal e a ocorrência de diabetes mellitus são fatores que aumentam consideravelmente o risco de desenvolvimento de CCR¹²⁻¹⁶. Por outro lado, a ingestão diária de leite, a prática de exercícios físicos, além da ingestão diária de fibras advindas de hortaliças e frutas diminuem esse risco¹⁶⁻¹⁸. O consumo de fibras advindas de frutas vem sendo relacionado com a diminuição do risco de desenvolvimento de CCR¹⁹. Da mesma forma, estudos demonstram uma relação inversa entre o elevado consumo de alimentos com altas concentrações de antocianinas e a ocorrência de CCR^{20,21}. A jabuticaba (família Myrtaceae, gênero *Myrciaria*) é um exemplo de fruto nativo brasileiro com significativa concentração de compostos fenólicos e fibras dietéticas, o que têm chamado a atenção em pesquisas atuais²²⁻²⁴. As fibras são encontradas principalmente na casca e na semente²³. Os compostos fenólicos, por sua vez, são encontrados majoritariamente na casca da jabuticaba¹⁹.

OBJETIVO

Avaliar o potencial preventivo do pó liofilizado da casca da jabuticaba em modelo experimental animal de CCR.

MATERIAL E MÉTODOS

A jabuticaba da árvore *Myrciaria jaboticaba* (Verg.) Bell foi coletada, devidamente higienizada, e a casca foi separada do restante do fruto. Esta foi mantida sob refrigeração (-20°C) até o processo de liofilização. O produto liofilizado foi armazenado a -20 °C. Uma pequena quantidade de amostra foi separada para que fossem realizadas as análises de conteúdo de umidade e cinzas²⁵, lipídios²⁶, proteínas pelo método Kjeldahl, compostos fenólicos totais²⁷, antocianinas monoméricas²⁸ e flavonóides totais²⁹. Também foram realizadas análises quanto à atividade antioxidante pelos métodos Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)³⁰ e Capacidade de Absorbância do Oxigênio Radicalar (ORAC)³¹.

A dieta dos animais, com ou sem jabuticaba, também foi analisada quanto à composição e atividade antioxidante.

O experimento animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP, sob o número 5246-1/2019. Foi realizado um modelo de inflamação aguda que gera CCR. O experimento contou com 18 camundongos BALB/c machos, divididos nos seguintes grupos: *controle* (C – dieta padrão), *controle câncer* (CC – dieta padrão e indução de câncer) e *jabuticaba câncer* (J – dieta acrescida de 5% da casca de jabuticaba e indução de câncer). Após quatro semanas de alimentação preventiva com a casca da jabuticaba, os animais dos grupos *câncer* passaram pelo processo de indução de CCR. Os animais dos grupos CCR receberam uma injeção intraperitoneal de azoximetano (AOM) (10 mg/kg). Após uma semana, as garrafas de água foram substituídas, durante sete dias, por garrafas de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) a 2%. Após esse período, os animais voltaram a receber água filtrada comum, permanecendo assim até o final do experimento. Os animais receberam a dieta, adicionada ou não da casca da jabuticaba, do início ao final do experimento. A mortalidade e o Índice de Atividade da Doença (IAD) foram avaliados durante o experimento. O IAD avalia a perda de peso, consistência das fezes e o sangramento retal, tendo em vista que essas alterações estão frequentemente associadas à utilização de DSS em modelos de inflamação colônica e CCR³². Na semana 16, os animais foram eutanasiados. O cólon foi pesado e mensurado, a fim de obter a relação massa/comprimento (mg/cm), sendo este considerado um índice de inflamação³³. A quantidade de tumores vistos macroscopicamente foi contada. *One-way* ou *Two-way* ANOVA seguido de Tukey foram utilizados para as análises, considerando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Os resultados das análises da composição do pó liofilizado da casca da jabuticaba e das dietas estão contidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição química e nutricional, e potencial antioxidante da casca da jabuticaba e dieta dos animais

Análise	Pó liofilizado da casca de jabuticaba (matéria seca)	Dieta controle (matéria úmida)	Dieta 5% de jabuticaba (matéria úmida)
UMIDADE (%)	11,61 ± 0,77 (casca não liofilizada: 72,40 ± 0,30)	10,81 ± 0,13	7,99 ± 0,30
LIPÍDIOS (%)	1,55 ± 0,08	3,97 ± 0,47	3,58 ± 0,25
PROTEÍNAS (%)	6,47 ± 0,51	11,50 ± 0,65	11,28 ± 0,56
CINZAS (%)	2,18 ± 0,13	2,35 ± 0,07	2,42 ± 0,03
CARBOIDRATOS (%)*	89,80 ± 0,24	82,18 ± 0,40	82,72 ± 0,28
FOLIN (mg AG/g)**	87,34 ± 6,64	0,46 ± 0,06	1,44 ± 0,04
FLAV (mg Q/g)**	6,92 ± 0,17	ND	ND
AM (mg C3G/g)**	5,64 ± 0,12	ND	ND
FRAP (µmol TE/g)**	915,90 ± 20,19	0,50 ± 0,03	11,19 ± 0,60
ORAC (µmol TE/g)**	821,8 ± 38,61	6,73 ± 0,43	13,41 ± 0,44

Abreviaturas: FOLIN: método Folin-Ciocalteu para determinação de compostos fenólicos totais; AG: ácido gálico; FLAV: flavonóides; Q: quercetina; AM: antocianinas totais; C3G: cianidina 3-glucosídeo; FRAP: método de redução do ferro para determinação da atividade antioxidante; ORAC: Capacidade de absorvência do oxigênio radicalar; TE: trolox equivalente. ND: não detectável com base no menor ponto da curva padrão. *Calculado a partir da soma dos outros componentes (umidade, lipídios, proteínas, cinzas). **Análise realizada a partir de extrato 46% etanol pH 2³⁴.

Inicialmente, o experimento 1 havia sido delineado para ter a duração de 20 semanas, entretanto, devido à perda de três animais, este teve o seu encerramento adiantado para a semana 16. Duas destas mortes foram ocasionadas pela toxicidade do carcinogênico, sendo uma do grupo CC e a outra do grupo J. A última perda foi do grupo CC, causada pela progressão do carcinoma (**Figura 1**).

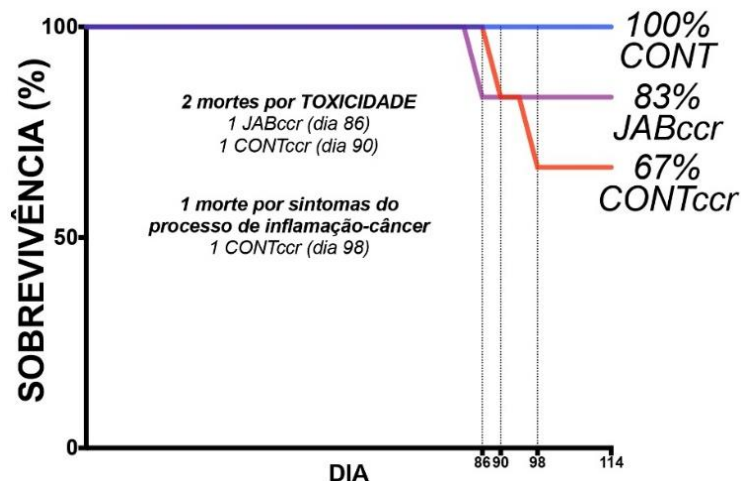


Figura 1: Sobrevivência dos animais ao longo do experimento.

Apesar do grupo J ter ingerido mais água contendo a solução de DSS ($p < 0,05$), os animais deste grupo não apresentaram sintomas significativos de desenvolvimento de inflamação colônica e/ou CCR, como fezes moles, sangramento nas fezes/ânus e perda de peso (**Figura 2**). Além disso, não foi possível observar nenhuma lesão macroscópica de CCR neste grupo. Este, portanto, seria um indicativo do efeito preventivo da casca de jabuticaba a 5% na dieta dos animais, confirmando a hipótese inicial. Por outro lado, 3 dos 4 animais do grupo CC que sobreviveram, apresentaram carcinomas vistos macroscopicamente (**Figura 3**).

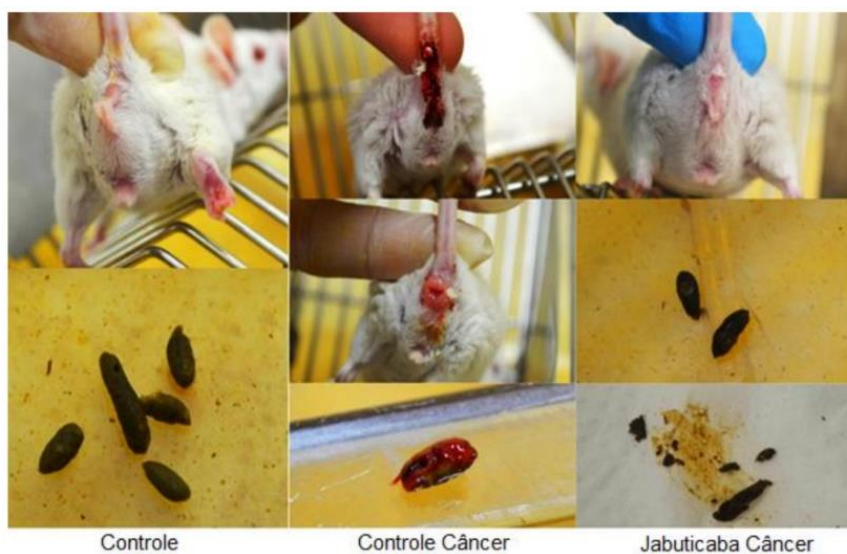


Figura 2: Sangramento e consistência das fezes. Divulgação não permitida.

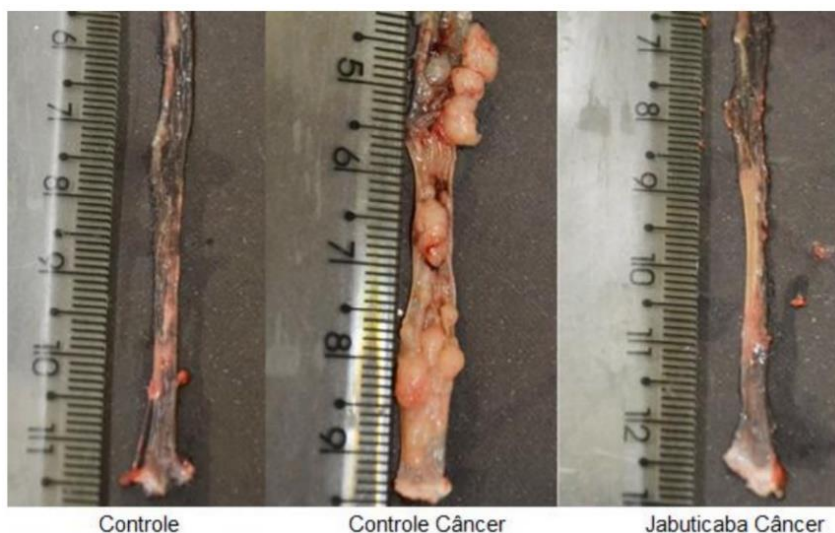


Figura 3: Aspecto e comprimento do cólon no dia da eutanásia. Divulgação não permitida.

Também foi possível notar uma redução no comprimento do cólon no grupo CC ($p < 0,001$), enquanto que o grupo J apresentou um comprimento equiparável ao do grupo C. Ainda, ao realizar a relação massa/comprimento do cólon, o grupo CC apresentou resultados significativamente maiores ($p < 0,01$), indicando a presença de processo inflamatório local. Por outro lado, os grupos CC e J apresentaram resultados similares, evidenciando a eficácia da casca da jabuticaba na prevenção do CCR.

Da mesma forma, o IAD do grupo CC foi significativamente maior do que os outros grupos ($p < 0,05$). O IAD deste grupo teve um pico no período de indução do CCR e após um período de recuperação, aumentou em resposta à formação de carcinomas. Por outro lado, o IAD dos grupos C e J se mostrou baixo e praticamente constante durante todo o experimento. Logo, o grupo CC apresentou diversas manifestações clínicas da progressão do CCR, enquanto nos grupos C e J isso não foi observado (**Figura 4**). Esta, portanto, seria outra evidência da atividade preventiva da casca de jabuticaba no desenvolvimento do CCR.

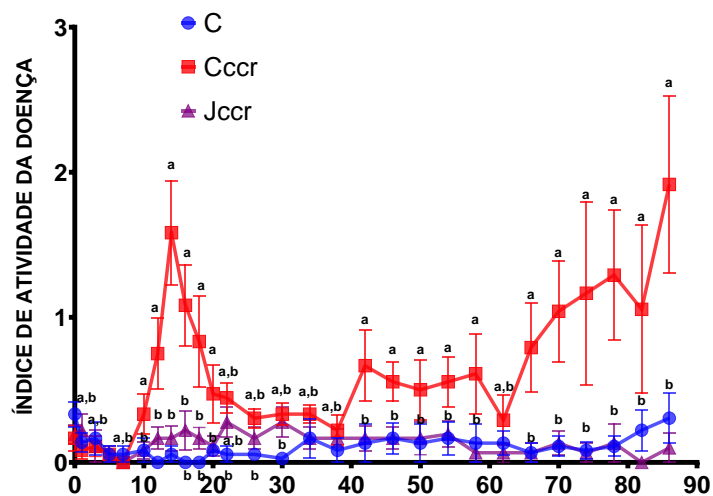


Figura 4: Índice de Atividade da Doença

Devido à pandemia da COVID-19, não foi possível realizar outras análises, dificultando a obtenção de dados que permitam maiores conclusões.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o experimento mostrou-se muito promissor, evidenciando o potente efeito preventivo da casca de jabuticaba na dieta de animais com CCR induzido. Entretanto, ainda são necessárias análises mais detalhadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–25 (2015).
2. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
3. Sierra, M. S. & Forman, D. Burden of colorectal cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiol.* **44**, S74–S81 (2016).
4. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683–691 (2017).
5. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
6. Grady, W. M. & Carethers, J. M. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* **135**, 1079–1099 (2008).
7. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
8. Lengauer, C. K. W. V. B. Genetic instabilities in human cancers. (cover story) . *Nature*. 12/17/1998 **396**, 643. 7p. 3 Color Photographs (6712).
9. Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F. & Ricciardiello, L. Molecular pathways involved in

- colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 16365–16385 (2013).
10. Alrawi, S. J. *et al.* Aberrant crypt foci. *Anticancer Res.* **26**, 107–119 (2006).
 11. Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *Lancet* **383**, 1490–1502 (2014).
 12. Fedirko, V. *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-Response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.* **22**, 1958–1972 (2011).
 13. Botteri, E. *et al.* Smoking and Colorectal Cancer. *Jama* **300**, 2765 (2008).
 14. World Cancer Research Fund. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. *Contin. Updat. Proj.* 1–62 (2018).
 15. Guraya, S. Y. Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World J. Gastroenterol.* **21**, 6026–6031 (2015).
 16. Mingyang Song, Wendy S. Garrett, A. T. C. Nutrients and Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **148**, 1244–1260 (2015).
 17. Dahm, C. C. *et al.* Dietary fiber and colorectal cancer risk: A nested case-control study using food diaries. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 614–626 (2010).
 18. Arem, H. *et al.* Physical activity and cancer-specific mortality in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *Int. J. Cancer* **135**, 423–431 (2014).
 19. Kunzmann, A. T. *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **102**, 881–890 (2015).
 20. Wang, X. *et al.* Anthocyanin Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *J. Am. Coll. Nutr.* **38**, 470–477 (2019).
 21. Chang, H., Lei, L., Zhou, Y., Ye, F. & Zhao, G. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer: An updated meta-analysis of epidemiological studies. *Nutrients* **10**, (2018).
 22. Leite-Legatti, A. V. *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Res. Int.* **49**, 596–603 (2012).
 23. Inada, K. O. P. *et al.* Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *J. Funct. Foods* **17**, 422–433 (2015).
 24. Wu, S. B., Long, C. & Kennelly, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Res. Int.* **54**, 148–159 (2013).
 25. IAL, I. A. L. 1ª Edição Digital. *Métodos físicos-químicos para análise Aliment.* **9**, 453–460 (2008).
 26. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
 27. Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C. & Pastore, G. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *J. Food Sci.* **71**, 102–107 (2006).
 28. Lees, D.H.; Francis, F. J. Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. *HortScience* **7**, 83–84 (1972).
 29. Batista, Â. G. *et al.* Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem.* **197**, 1153–1159 (2016).
 30. Ou, B., Chang, T., Huang, D. & Prior, R. L. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *J. AOAC Int.* **96**, 1372–1376 (2013).
 31. Pellegrini, N. *et al.* Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* **133**, 2812–2819 (2003).
 32. Villegas, I., Sánchez-Fidalgo, S. & de la Lastra, C. A. Chemopreventive effect of dietary curcumin on inflammation-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 259–267 (2011).
 33. Sánchez-Fidalgo, S. *et al.* Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin. Nutr.* **29**, 663–673 (2010).
 34. Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D. & Narain, N. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. *Ind. Crops Prod.* (2015) doi:10.1016/j.indcrop.2015.02.059.