



Avaliar os efeitos protetores dos compostos bioativos do produto da digestão simulada da folha de beterraba em células de câncer colorretal

Palavras-Chave: Câncer, Digestão Simulada, Folha de Beterraba

Izabella Batista Barbosa (FCA/Unicamp)

Dr. Fernando Moreira Simabuco - co-orientador (FCA/Unicamp)

Prof.^a Dr.^a Rosangela Maria Neves Bezerra - orientadora (FCA/Unicamp)

INTRODUÇÃO:

O câncer colorretal é descrito pela formação de tumores no cólon, reto ou ânus, e consiste no segundo tipo câncer com mais mortalidade. A enfermidade afeta principalmente pessoas com mais de 50 anos, que apresentam excesso de peso, alimentação com poucas fibras, inatividade física, uso de tabaco e álcool, alto consumo de carnes vermelhas e alimentos processados. A prevenção da doença tem como base a prática regular de atividade física e uma dieta saudável e adequada [1].

Os polifenóis são compostos naturalmente presentes em plantas com várias propriedades funcionais. Estudos têm mostrado que essas moléculas, pertencentes ao metabolismo secundário das plantas, possuem atividades fisiológicas humanas, atuando na proteção do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis [2].

Dentre as fontes dessas moléculas, a folha de beterraba além de apresentar quantidades importantes de microelementos como ferro, potássio e vitaminas do complexo B, também possuem em sua composição quantidades significativas de vitexinas, um flavonoide derivado da apigenina [3]. Esses compostos vêm demonstrando efeitos benéficos ao organismo humano [2]. No entanto, pouco se sabe em relação aos compostos resultantes do processo de digestão dessa matriz alimentar.

Portanto, no atual trabalho, analisou-se o efeito dos compostos bioativos do produto da digestão simulada da folha da beterraba em células de câncer colorretal, da linhagem HCT116, através de ensaio de viabilidade celular, de proliferação, de formação de colônia e de migração.

METODOLOGIA:

Com o aparecimento de dificuldades no cultivo da célula HT29, o projeto se desenvolveu com linhagem HCT116, também de câncer colorretal que estava sendo tratada concomitantemente. O processo de digestão simulada da folha de beterraba liofilizada seguiu o modelo proposto por Minekus *et al.* (2014) [4]. O método utilizado para determinar a quantidade de compostos fenólicos foi o de Folin- Ciocalteu [5] em alíquotas do material digerido da folha de beterraba. Os métodos para avaliar a atividade antioxidante foram: a capacidade de sequestro do radical ABTS [6], DPPH pela redução do radical [7], ORAC em que há a diminuição da fluorescência de proteínas [8] e FRAP que mede a redução do ferro [9].

No procedimento da viabilidade celular, foram plaqueadas duas placas de 96 poços com 3×10^5 células, avaliadas nos tempos de 24 e 48 horas. As microplacas continham as seguintes triplicatas: controle, controle da digestão que contém as enzimas e os fluidos e o material digerido na concentração de 500 ppm,

Para o ensaio de proliferação, foram plaqueadas três placas de 24-well nos tempos 24, 48 e 72 horas, a concentração inicial de células foi de 5×10^4 , que foram tratadas com o material digerido e controle digerido ambos a 100 ppm, controle água (água miliq. Estéril) controle apenas com DMEM. A quantidade de células resultantes após o tratamento foi contada com contador manual nos três tempos.

Para a realização do ensaio de formação de colônia, foram plaqueados 500 células em placas p60. Após 24 horas, as amostras foram tratadas com 3 ml de meio normal, no controle, 3 ml de meio contendo os fluídos da digestão (controle da digestão) e 3 ml de meio contendo o material digerido na concentração de 10 ppm. O tratamento foi trocado a cada 3 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir do material obtido da digestão gastrointestinal simulada da folha de beterraba liofilizada foram realizados os experimentos propostos no projeto. O teor de fenólicos totais no extrato das folhas de beterraba foi de 13,2 mg EAG/g de amostra. Após a digestão foi observado uma diminuição do teor da fração líquida do material digerido, essa diferença pode estar associada à degradação devido às mudanças de pH que a amostra sofreu (tabela 1).

A respeito da capacidade antioxidante, os resultados mostraram reduções na atividade quando comparadas com o extrato bruto, principalmente no método DPPH. Nos resultados de ABTS foi observado uma redução de 10,2%, enquanto no DPPH a redução foi de 27,3%, no FRAP redução de 15,8% e no ORAC redução de 13% (tabela 2).

Tabela 1: Teor de fenólicos totais no material bioacessível das folhas de beterraba liofilizadas.

	Digestão simulada (fração líquida)	Digestão simulada c/ precipitação de proteínas	Extrato do material digerido (fração sólida)
Fenólicos totais mg EAG / g de amostra	12,6 ±0,8 ^b	11,7 ±0,3 ^c	3,2 ±0,1 ^d

EAG – equivalente de ácido gálico. Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. As diferentes letras na linha (a,b,c,d) representam diferenças estatísticas de 5% *p<0,05 (ANOVA seguido de teste Tukey).

Tabela 2: Atividade antioxidante do material bioacessível das folhas de beterraba liofilizadas.

	ABTS μ mol Trolox / g	DPPH μ mol Trolox / g	FRAP μ mol Sulfato ferroso / g	ORAC μ mol Trolox / g
Extrato da folha de beterraba	78,4 ±8,5 ^a	48,4 ±3,4 ^a	173,9 ±7,0 ^a	263,4 ±4,7 ^a
Digestão simulada	70,4 ±5,4 ^a	35,2 ±1,7 ^b	146,4 ±1,7 ^b	230,8 ±5,6 ^b
Extrato do material digerido	19,4 ±2,3 ^b	23,9 ±1,9 ^c	29,9 ±1,4 ^c	47,9 ±15,5 ^c

Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. As diferentes letras nas colunas (a,b,c) representam diferenças estatísticas de 5% *p<0,05 (ANOVA seguido de teste Tukey).

O resultado do ensaio de viabilidade utilizando o método MTT indicou morte celular nas amostras com o material digerido da folha de beterraba na concentração de 500 ppm em 24 e 48 horas, tanto quando comparado com o controle quanto quando comparado com o controle da digestão como mostra nas Figuras 1 e 2.

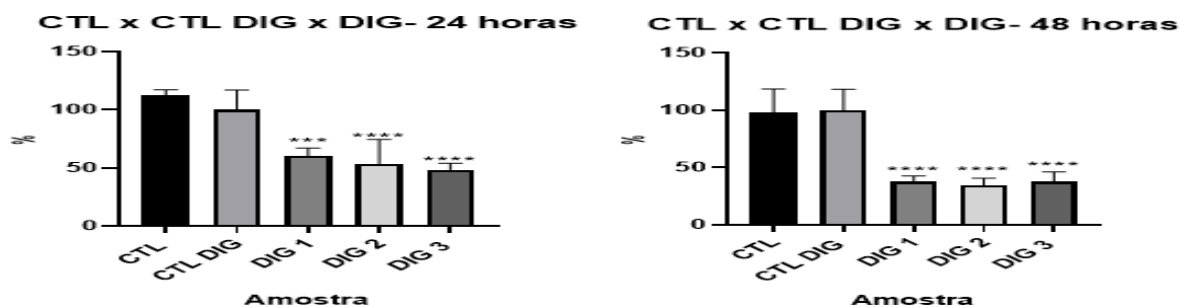


Figura 1: Controle x controle digerido x material digerido na concentração 500 ppm em 24 e 48 horas, respectivamente. Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* p <0,05; * p <0,01; ** p < 0,001; ** p <0,0001). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

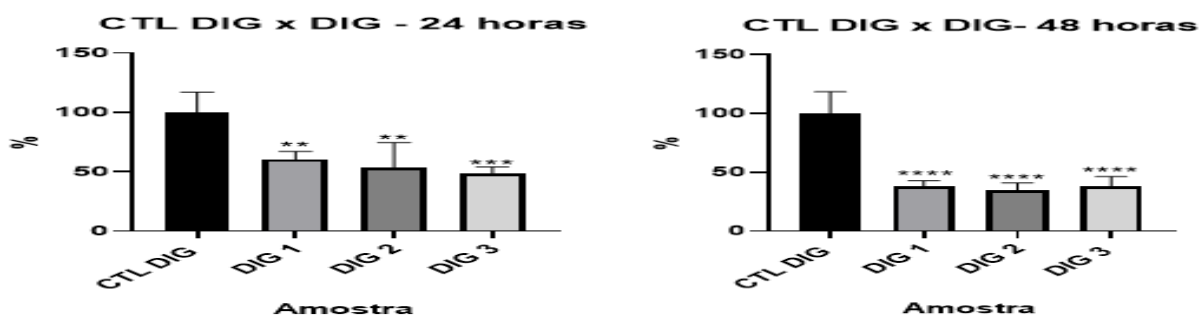


Figura 2: Controle digerido x material digerido ambos na concentração de 500 ppm em 24 e 48 horas, respectivamente. Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

No ensaio de proliferação, percebe-se que após o período de 72 horas as amostras tratadas com material digerido foram capazes de reduzir significativamente a proliferação (figura 3).

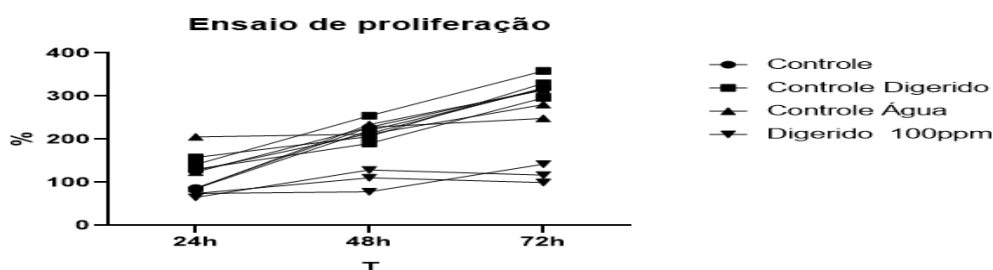


Figura 3: Ensaio de proliferação em amostras de controle, controle digerido, controle de água e material digerido a 100 ppm nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA, seguido de teste Tukey e Dunnet ($p < 0,05$).

A amostra de folha de beterraba digerida também foi capaz de diminuir a formação de colônia tanto em tamanho (Figura 4), quanto em número de colônias (Figura 5), quando comparadas com o controle que continha apenas meio, e, principalmente, com o controle que continha os fluidos e enzimas digestivas.

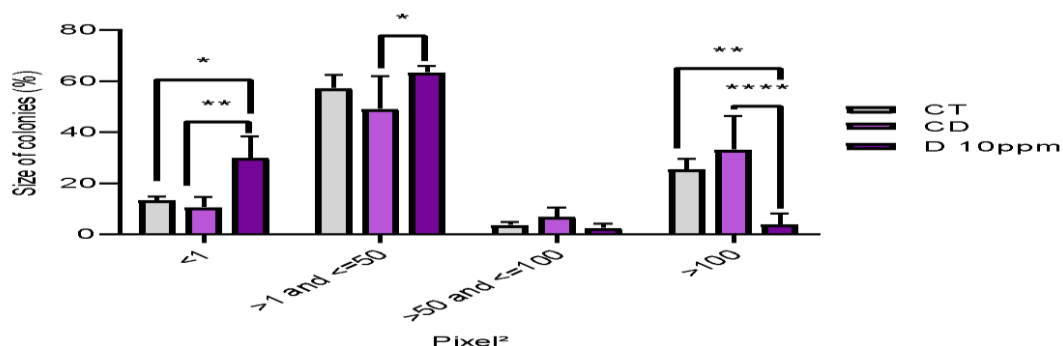


Figura 4: Ensaio de formação de colônia em amostras de controle (CT), controle do material digerido (CD) e digerido a 10ppm (D 10ppm). Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

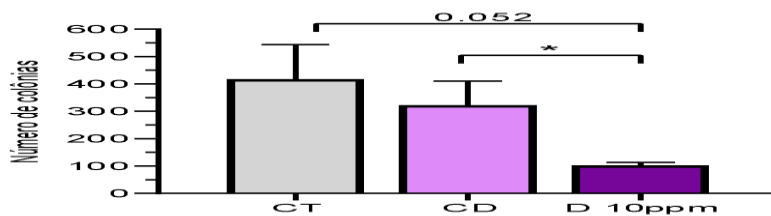


Figura 5: número de colônias nas amostras do controle (CT), controle do material digerido (CD) e tratamento realizado com material digerido a 10 ppm (D 10ppm). Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

CONCLUSÕES:

Como conclusão, o tratamento com a folha de beterraba liofilizada após o processo de digestão apresentou efeitos na célula de câncer colorretal, quando comparado com ambos os controles. O material digerido da folha de beterraba levou à morte celular quando as células foram submetidas a uma concentração de 500 ppm. No controle de proliferação, o produto da digestão foi eficaz na concentração de 100 ppm, e na diminuição da formação de colônias, tanto em número quanto em tamanho, a concentração ideal foi 10 ppm.

Mais estudos avaliando os efeitos nas vias moleculares envolvidas nas características fisiológicas das células de câncer colorretal são necessárias para entender os resultados observados.

AGRADECIMENTOS: Agradeço aos co-autores desse trabalho Luis Gustavo Saboia Ponte (lg_saboia@hotmail.com), Isadora Carolina Betim Pavan (isadora.bpavan@gmail.com), Ana Paula Morelli (apm.morelli@gmail.com), Luiz Guilherme Salvino da Silva (luizsalvino@yahoo.com.br), Mariana Camargo Silva Mancini (marianamancini5@gmail.com).

BIBLIOGRAFIA

- [1] INCA. Tipos de câncer > Intestino. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>>. Acesso: 16 ago. 2021.
- [2] ABBAS, M. *et al.* Natural polyphenols: an overview. *International Journal of Food Properties*. V. 20, n. 8, p. 1689-1699, 2017.
- [3] TIVELLI, S. W. *et al.* Beterraba: do plantio à comercialização, (Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 210), p. 45, Campinas: Instituto Agronômico, 2011.
- [4] MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* V. 5, p. 1113-1124, 2014.
- [5] SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. V. 299, p. 152-178, 1999.
- [6] RE, R., *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- [7] AI-Duais, M. *et al.* Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. *European Food Research and Technology*. V. 228, p. 813-821, 2009.
- [8] CHISTÉ, R. C. *et al.* In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*. 127, n. 2, p. 419-426, 2011.
- [9] BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, v.299, p.15-27,1999.