

# PÓ LIOFILIZADO DA CASCA DA JABUTICABA REDUZ OS SINAIS CLÍNICOS E A INCIDÊNCIA DE TUMORES EM CAMUNDONGOS COM CÂNCER COLORRETAL

Palavras-chave: compostos bioativos, inflamação, *Myrciaria jaboticaba*

Autores:

Julia Soto Rizzato

Ms. Roberto de Paula do Nascimento

Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior

Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Faculdade de Engenharia de Alimentos

## INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma patologia cuja incidência e mortalidade vem apresentando um crescimento expressivo nas últimas décadas<sup>1</sup>. Os países desenvolvidos apresentam mais casos de CCR e o estilo de vida vem demonstrando estar intrinsecamente ligado ao aumento observado. O sedentarismo, o aumento da massa corpórea e o alto consumo de carnes vermelhas e processadas são alguns dos fatores determinantes para o aumento dos casos de CCR<sup>2-4</sup>. Ao mesmo tempo, países em desenvolvimento, como o Brasil, vêm apresentando um rápido crescimento no número de casos e de mortes na última década, aproximando-se aos índices alarmantes do continente europeu<sup>5</sup>. Esses dados indicam a necessidade de estudos que foquem na prevenção do CCR, possibilitando o maior controle da doença através da criação ou o aprimoramento de políticas públicas de saúde. Uma dieta com abundância em frutas ricas em compostos fenólicos e fibras vem sendo fortemente relacionada à diminuição do risco de desenvolvimento de CCR<sup>6-11</sup>.

Dessa forma, este estudo objetivou quantificar os compostos bioativos e atividade antioxidante da casca da jaboticaba, e avaliar os seus efeitos na atividade clínica, medidas teciduais do cólon, e na incidência e tamanho

de tumores em modelo de CCR induzido em camundongos.

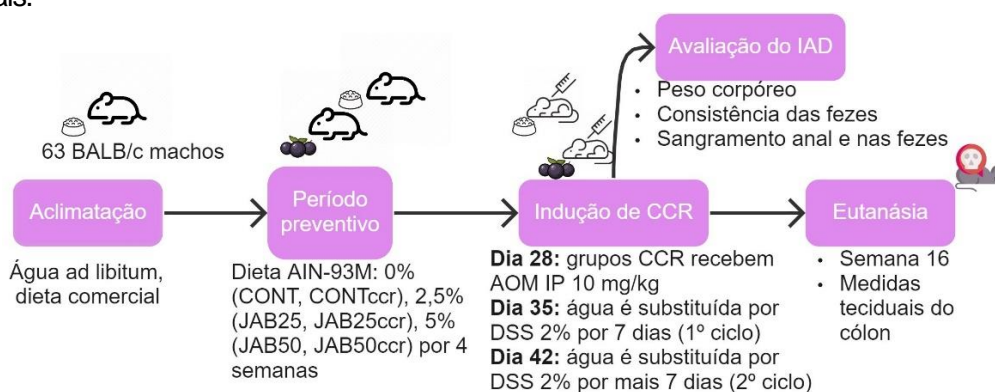
## METODOLOGIA

Inicialmente, os frutos da árvore *Myrciaria jaboticaba* (Verg.) Bell foram coletados, higienizados e a casca foi separada do restante do fruto. A casca da jaboticaba foi liofilizada, sendo mantida sob refrigeração (-20°C). Visando a realização de posteriores análises para a caracterização da composição e atividade antioxidante da casca da jaboticaba, uma amostra foi separada. A casca da jaboticaba foi analisada quanto ao conteúdo de umidade e cinzas<sup>12</sup>, lipídeos<sup>13</sup>, proteínas pelo método de Kjeldahl, compostos fenólicos totais<sup>14</sup>, antocianinas monoméricas<sup>15</sup>, flavonóides totais<sup>16</sup>, Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)<sup>17</sup> e Capacidade de Absorbância do Oxigênio Radicalar (ORAC)<sup>18</sup>. A dieta dos animais, acrescida ou não da casca de jaboticaba, também foi analisada pelos métodos descritos, exceto flavonóides e antocianinas monoméricas por geralmente não apresentarem leitura dentro da curva padrão.

O experimento animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (protocolo 5246-1/2019). Este experimento visou avaliar a atividade de 2,5% e 5% do pó liofilizado da casca da jaboticaba em um modelo de inflamação colônica crônica (ou colite crônica) que gera CCR. Para isso, foram utilizados 63 camundongos BALB/c machos de 8 semanas de idade, divididos nos seguintes grupos: controle

(CONT - dieta padrão), controle câncer (CONT<sub>CCR</sub> - dieta padrão e indução de câncer), jabuticaba<sub>25</sub> (JAB<sub>25</sub> - dieta adicionada de 2,5% da jabuticaba), jabuticaba<sub>25CCR</sub> (JAB<sub>25CCR</sub> - dieta adicionada de 2,5% da jabuticaba e indução de câncer), jabuticaba<sub>50</sub> (JAB<sub>50</sub> - dieta adicionada de 5% da jabuticaba) e jabuticaba<sub>50CCR</sub> (JAB<sub>50CCR</sub> - dieta adicionada de 5% da jabuticaba e indução de câncer). Passadas as quatro semanas iniciais do período preventivo apenas recebendo a dieta acrescida ou não da casca da jabuticaba, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de azoximetano (AOM) (10mg/kg) e, 7 dias depois, uma solução de dextran sulfato de sódio (DSS) a 2% substituiu a água de beber durante o período de 7 dias. Após este período, os animais receberam água comum por 7 dias, seguido por mais um ciclo de 7 dias com DSS a 2%. Após esse período, os animais voltaram a receber água comum até o final do experimento. Durante todo o experimento, os animais não deixaram de receber as dietas de seus respectivos grupos experimentais.

Utilizando o critério de avaliação de Gommeux et al.<sup>19</sup>, o Índice de Atividade da Doença (IAD) foi avaliado durante o experimento. Este índice considera a perda de massa corpórea; a consistência das fezes; bem como o sangramento anal e nas fezes, uma vez que estas alterações estão frequentemente associadas ao desenvolvimento de colite e CCR<sup>20</sup>. A mortalidade dos animais também foi avaliada. Os animais foram eutanasiados na semana 16 com uma solução de quetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Na eutanásia, as medidas teciduais do cólon (comprimento, peso/comprimento) foram analisadas e a quantidade de tumores vistos foi contada. Uma parte do cólon distal foi fixada em formol 4% para análise histológica (coloração HE) da frequência de adenoma e carcinoma. *One-Way* ou *Two-Way* ANOVA seguido de Tukey foram utilizados para as análises estatísticas, considerando um  $p < 0,05$ . A **Figura 1** resume a metodologia do experimento.



**Figura 1:** Esquematização do experimento.

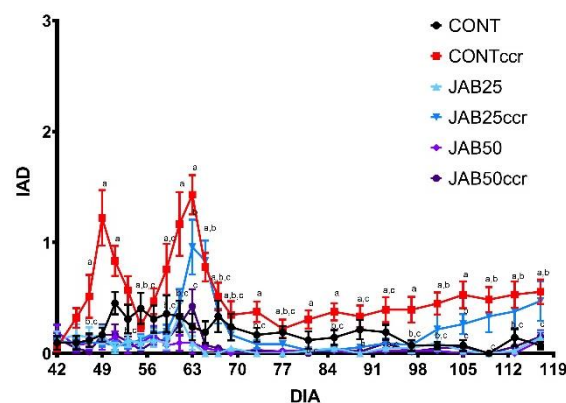
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da composição da casca da jabuticaba e da dieta estão expressos na **Tabela 1**.

Este experimento contou com a perda de apenas um animal em razão da indução de CCR (grupo CONT<sub>CCR</sub>). Ao contrário do esperado, a perda de peso não teve relação com a severidade da doença desenvolvida pelos animais, ou seja, os animais com maior severidade da doença não apresentaram perda de peso expressiva.

O IAD foi avaliado (**Figura 2**). O grupo JAB<sub>50CCR</sub> foi capaz de reduzir significativamente este índice ( $p < 0,05$ ) nos períodos de pico (ciclos de DSS e final do experimento), aproximando-se dos grupos sem indução de câncer. Especialmente, a

casca da jabuticaba a 5% na dieta foi eficiente em prevenir contra o sangramento e a perda de consistência das fezes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2:** Índice de Atividade da Doença (IAD).

ANÁLISE	Pó liofilizado da casca de jabuticaba (matéria seca)	Dieta controle	Dieta acrescida de 2,5% de jabuticaba	Dieta acrescida de 5% de jabuticaba
LIPÍDEOS (%)	1,333 ± 0,0003	4,398 ± 0,109	4,398 ± 0,287	3,687 ± 0,125
UMIDADE (%)	17,149 ± 0,498	8,970 ± 0,407	9,056 ± 0,067	9,168 ± 0,170
CINZAS (%)	1,908 ± 0,156	3,212 ± 0,489	2,865 ± 0,182	1,814 ± 0,124
PROTEÍNAS (%)	4,509 ± 0,481	11,107 ± 1,507	10,354 ± 1,120	10,698 ± 0,388
CARBOIDRATOS TOTAIS (%)*	76,989 ± 0,245	75,493 ± 0,507	76,163 ± 0,369	76,422 ± 0,172
FLAV (mg/Q/g)**	12,621 ± 0,190	ND	ND	ND
AM (mg C3/g)**	7,148 ± 0,282	ND	ND	ND
FRAP (µmol TE/g)**	1130,588 ± 34,123	2,419 ± 0,083	5,080 ± 0,373	8,894 ± 0,295
FOLIN (mg AG/g)**	84,367 ± 1,318	0,386 ± 0,019	0,627 ± 0,054	0,928 ± 0,039
ORAC (µmol TE/g)**	806,175 ± 41,095	5,970 ± 0,181	9,637 ± 0,862	20,699 ± 0,419

**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; 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 HCl pH 1<sup>21</sup>.

Foi possível notar uma redução considerável no número de tumores de forma dependente da dose. Em média, os grupos CONT<sub>CCR</sub>, JAB<sub>25CCR</sub> e JAB<sub>50CCR</sub> apresentaram 11, 12,7 e 4,2 tumores por animal, respectivamente (Figura 3). Estatisticamente, os grupos JAB<sub>50CCR</sub> e JAB<sub>25CCR</sub> não apresentaram diferença em relação ao grupo CONT<sub>CCR</sub>. Entretanto, o grupo JAB<sub>50CCR</sub> também não apresentou diferença estatística em relação aos grupos sem câncer, aproximando-se mais de uma condição sem alteração. Outros parâmetros avaliados, como a consistência das fezes e o sangramento anal apresentaram comportamento semelhante (Figura 4). Vale ressaltar que esta é uma análise macroscópica preliminar e a seguir detalha-se com a análise histológica.

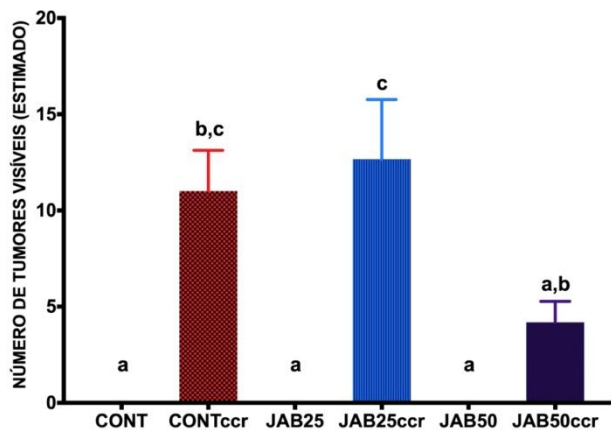


Figura 3: Número de tumores visíveis.



Figura 4: Sangramento, consistência das fezes e aspecto do cólon.

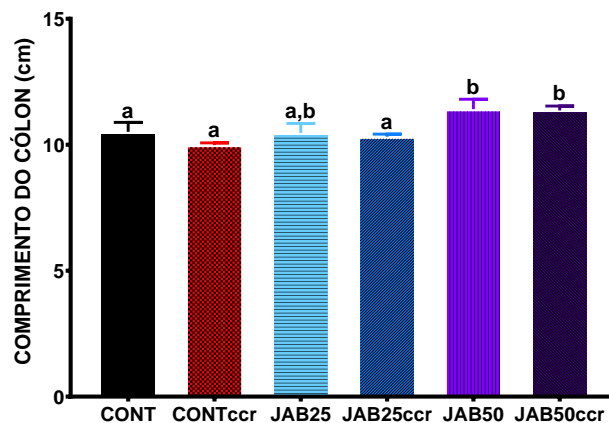
A análise histológica revelou que o modelo experimental utilizado foi realmente eficaz para a formação de adenomas e carcinomas no grupo controle, com 16,66% e 66,66% dos animais que desenvolveram as condições acima citadas, respectivamente. Por outro lado, o pó liofilizado da casca de jabuticaba da dieta dos animais foi capaz de suprimir a formação de adenomas e a progressão para carcinomas em ambos os grupos. No grupo acrescido de 2,5% de casca de jabuticaba na dieta, 45,45% dos animais não apresentaram quaisquer alterações e no grupo de 5% esse número foi ainda maior, chegando a 75%. Com relação a formação de

adenomas, o grupo JAB<sub>25CCR</sub> apresentou uma diminuição expressiva, na qual nenhum dos animais apresentou esta condição. Por outro lado, 54,54% dos animais desenvolveram carcinomas. Este, portanto, seria um indício de que a adição de 2,5% de casca de jabuticaba na dieta dos animais foi capaz de suprimir a formação de adenomas, mas uma vez instaurados, o fruto não foi capaz de inibir a sua evolução para carcinoma. O grupo JAB<sub>50CCR</sub>, por sua vez, apresentou 12,5% dos animais com adenomas e 12,5% dos animais com carcinomas. Este resultado evidencia a capacidade da casca de jabuticaba a 5% na dieta dos animais em inibir tanto o início quanto a progressão do CCR, corroborando com o resultado encontrado na avaliação do IAD. Os resultados da histologia estão enunciados na **Tabela 2**.

Conclusão (%)	Grupo experimental		
	CONT CCR	JAB 25CCR	JAB 50CCR
Sem alteração	16,66	45,45	75
Adenoma	16,66	0	12,5
Carcinoma	66,66	54,54	12,5

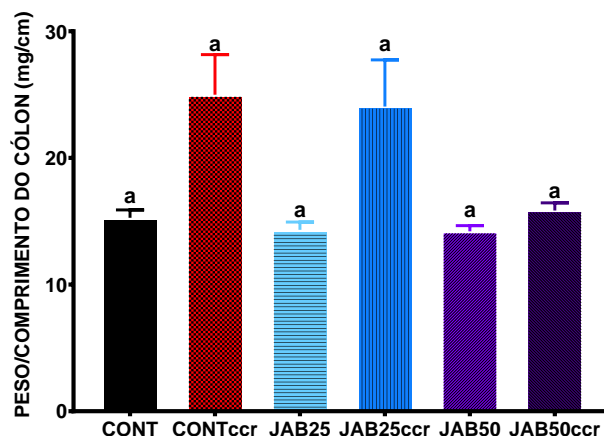
**Tabela 2:** Resultados da análise histológica.

A análise do comprimento do cólon dos animais revelou que não houve diminuição na extensão deste órgão nos animais com câncer (**Figura 5**). Este efeito foi gradual, uma vez que os animais do grupo JAB<sub>25CCR</sub> não apresentaram diferença estatística do grupo CONT<sub>CCR</sub> e nem do CONT, mas o grupo recebendo casca da jabuticaba a 5% na dieta apresentou uma diferença significativa em relação grupo CONT<sub>CCR</sub> ( $p < 0,05$ ). Este pode indicar um efeito protetivo da casca da jabuticaba.



**Figura 5:** Comprimento do cólon dos animais.

Ao realizar a relação massa/comprimento do cólon, utilizada como índice de inflamação, foi possível observar uma tendência inversamente proporcional à dosagem de jabuticaba na dieta dos animais com CCR (**Figura 6**). Ou seja, quanto maior a concentração de jabuticaba, menor a relação massa/comprimento do cólon. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6:** Relação massa/ comprimento do cólon (mg/cm).

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados preliminares deste estudo, evidencia-se um efeito protetivo da casca da jabuticaba no modelo de indução à inflamação crônica que leva ao CCR. Além disso, este efeito parece ser dose dependente, uma vez que a adição de 2,5% de pó liofilizado da casca de jabuticaba não foi tão benéfica quanto a de 5%. Ainda é necessário realizar as análises de expressão de proteínas para a confirmação dos resultados.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP por possibilitar o financiamento deste projeto (nº 2020/00414-3), ao Prof. Dr. Mario R. Maróstica Jr e ao Ms. Roberto do Nascimento por sempre propiciarem um ambiente de aprendizado e crescimento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–25 (2015).
2. Bernard, W. S. & Christopher, P. W. *World cancer report 2020. World Health Organization* (2014).
3. 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).
4. Mingyang Song, Wendy S. Garrett, A. T. C. Nutrients and Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **148**, 1244–1260 (2015).
5. Sierra, M. S. & Forman, D. Burden of colorectal cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiol.* **44**, S74–S81 (2016).
6. 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).
7. Choi, Y. J. *et al.* Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Gut Liver* **11**, 243–252 (2017).
8. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
9. 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).
10. Li, Y., Zhang, T. & Chen, G. Y. Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants* **7**, 1–27 (2018).
11. 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).
12. IAL, I. A. L. 1ª Edição Digital. *Métodos físicos-químicos para análise Aliment.* **9**, 453–460 (2008).
13. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
14. 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).
15. Lees, D.H.; Francis, F. J. Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. *HortScience* **7**, 83–84 (1972).
16. Batista, Â. G. *et al.* Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem.* **197**, 1153–1159 (2016).
17. 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).
18. 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).
19. Gommeaux, J. *et al.* Colitis and Colitis-Associated Cancer Are Exacerbated in Mice Deficient for Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2215–2228 (2007).
20. 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).
21. 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.