



Fragaria ssp: Estudo do potencial farmacológico em modelos *in vitro* de proliferação celular e inibição de proliferação de células tumorais humanas das folhas e caules

Palavras-Chaves: MORANGO, PARTES VERDES, RESÍDUOS

Autores/as:

JULHIANA AYUMI IROKAWA (FCF -UNICAMP)

MESTRANDA MAYRA GABRIELA BICCIGO (coorientadora) (FCF- UNICAMP)

Ana Lucia Tasca Goes Ruiz (FCF -UNICAMP)

João Ernesto de Carvalho (FCF -UNICAMP)

Profª Drª MARY ANN FOGLIO (orientadora) (FCF- UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

Ao longo dos tempos até a atualidade, as espécies vegetais desempenham um papel importante na área da saúde sendo fontes promissoras para a descoberta de novas substâncias de interesse farmacológico. Assim, estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais e seus princípios ativos podem ser utilizados com fins terapêuticos ou precursores de novos fármacos. A *Fragaria*, um fruto silvestre popularmente consumido e conhecido como morango, é extensamente cultivada e apresentam alta capacidade antioxidativa, além de potenciais benefícios à saúde, se correlacionando a uma menor incidência de patologias crônicas como cardiovascular, obesidade, doenças relacionadas a inflamação, Doença de Alzheimer e atividade anticancerígena (DONGJU L. *et al*, 2020)

Sendo o morango uma das frutas mais acessíveis e consumida do mundo, com produção global em 2020 chegando a mais de 12 milhões toneladas em 79 países e por ser uma cultura extensiva, gera presumivelmente grandes quantidades de resíduos verdes não comestíveis ou fora dos parâmetros de qualidade, mas que podem vir a conter muitos componentes de alimentos funcionais e proveitosos na indústria (SALAS-ARIAS *et al*, 2023; VILLAMIL *et al*, 2022). A obtenção de compostos promotores de saúde a partir de subprodutos agroindustriais é uma estratégia utilizada para revalorizar subprodutos agroindustriais, gerando o seu reaproveitamento que permitem a transformação da economia circular, maximizando o uso de recursos e melhorando eficiência nas agroindústrias.

Essas observações sugerem que as folhas e os resíduos da produção de morango podem ser um biorrecurso promissor contendo quantidades significativas de compostos com alta atividade antioxidante, podendo ser até maior que o encontrado no fruto, além de possuir diversas aplicações relacionadas à saúde tais como vasodilatador, anti-inflamação e para diabetes (FOTIRIĆ AKŠIĆ *et al*, 2019). Assim, o objetivo desse projeto é avaliar o potencial farmacológico *in vitro* de extratos e frações produzidas a partir das folhas e caules oriundos do resíduo de produção da cultura de *Fragaria ssp* da empresa STAW Agricultura.

METODOLOGIA:

1. Padronização de processo de extração

Todos os insumos vegetais foram provenientes da empresa STAW Agricultura. A cultura de *Fragaria* e seus derivados são isentos de registro no SISGEN de acordo a instrução normativa nº 23 de 2017, isto é, as espécies listadas neste Anexo I não são consideradas patrimônio genético encontrado em condições *in situ* no território nacional dispensando seu registro no SISGEN. Todas as partes verdes liofilizadas da *Fragaria* (Folha liofilizada, coroa, broto, *Fragaria* verde *in natura* congelado, flor, talo e sépala) foram extraídas com solução hidroalcoólicas (álcool 70%). Os solventes orgânicos dos extratos produzidos foram eliminados sob vácuo a 50°C; resultando numa solução aquosa que foi posteriormente extraída por partição com acetato de etila, resultando em duas frações para cada amostra vegetal; uma fração aquosa e outra fração de acetato de etila.

2. Análises colorimétricas

a) DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, FRAP- Ferric Reducing Antioxidant Power, Fenólicos totais e Flavonoides

Essas análises têm por objetivo caracterizar, quantificar e avaliar a composição fenólica, de flavonoide e capacidade antioxidante das amostras produzidas. As análises colorimétricas seguem o protocolo estabelecido pelo laboratório LAFTEX (Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia Experimental). A atividade de potencial antioxidante pelo teste de DPPH ocorre pela captura do radical DPPH e utiliza a determinação por EC₅₀ para obter os resultados. Já pelo método FRAP é medida pela capacidade de redução de íon férrico e utiliza μmol de Fe²⁺ (equivalentes de Fe²⁺)/mg de amostra. O teor de compostos fenólicos foi medido seguindo a metodologia Folin-Ciocalteu descrita por Singleton e Rossi (1965) com modificações e os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de amostra. E por fim, a análise de Flavonoides, que estabelece os resultados por equivalentes de catequina (EC)/mg de amostra.

3. Cromatografia Camada Delgada

Foi realizada cromatografia de camada delgada (um processo físico de separação para comparar os compostos da separação) utilizando solvente polar BAW (butanol:ácido acético:água 4:1:5) e também solvente apolar (diclorometano: metanol 99:1) para as amostras das folhas liofilizadas. Após a placa eluída, as placas foram reveladas com os reveladores: NP-Peg, Anisaldeído, Cloreto férrico e DPPH, para um panorama geral dos constituintes das amostras verdes do morango.

4. Cultura de Células

a) Teste de atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa das amostras foi realizada segundo o protocolo descrito por Monks *et al.* (1991) nas linhagens celulares mama (MCF-7), glioma (U251), ovário resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460), fibroblastos embrionários murinos (3T3) e uma linhagem não tumoral de queratinócito (HaCat). Esse teste visa estabelecer a toxicidade da amostra, compreendendo a existência de uma concentração tóxica responsável para os respectivos tipos de células tanto tumorais e não tumorais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

2. DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power, Fenólicos totais e Flavonoides

Aquoso

DPPH (EC50)	Folha <i>in natura</i>	Folha liofilizada	Coroa	Broto	Morango verde Congelado	Flor	Talo	Sépala
$\mu\text{g/mL}$	167,17	250,65	151,41	226,37	-	147,92	481,19	543,66

Acetato

DPPH (EC50)	Folha <i>in natura</i>	Folha liofilizada	Coroa	Broto	Morango verde Congelado	Flor	Talo	Sépala
$\mu\text{g/mL}$	-	99,76	-	97,27	-	-	98,21	-

Comparando os dados produzidos das amostras com o valor do padrão de referência Trolox[®] obtido em cada análise realizada, a amostra mais antioxidante é a que mais se aproxima com o padrão Trolox respectivo de sua análise. Sendo assim, a amostra de folha *in natura*, coroa e flor fração aquosa são as que apresentaram maior atividade antioxidante. Podemos também comparar as amostras da folha *in natura* e a liofilizada, em que a folha *in natura* (167,17 $\mu\text{g/mL}$) apresenta uma atividade antioxidante maior que a da liofilizada (250,65 $\mu\text{g/mL}$) e as frações acetato em geral apresentaram uma atividade antioxidante maior que as frações aquosas.

Aquoso

Amostra/ FRAP	Folha <i>in natura</i>	Folha liofilizada	Coroa	Broto	Morango verde congelado	Flor	Talo	Sépala
$\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{mg amostra(média)}$	1,846	0,372	1,001	2,019	0,793		1,209	1,035
Coefficiente de variação	3,254	7,117	0,428	10,849	3,227		3,443	5,545
DV PAD	0,060	0,026	0,004	0,219	0,026		0,042	0,057

Já para o método FRAP, os resultados observados para folha *in natura* e folha liofilizada corroboram com o que foi visto na análise do DPPH (*in natura* mais antioxidante que a liofilizada). O broto e a coroa também apresentam um alto potencial de atividade antioxidante.

Aquoso

Amostra/ Fenólicos	Folha <i>in natura</i>	Folha liofilizada	Coroa	Broto	Morango verde congelado	Flor	Talo	Sépala
mg de ácido gálico (EAG)/g de amostra (média)	259,164	34,768	132,270	78,461	42,705	190,031	85,825	140,899
Coefficiente de variação	0,173	1,745	0,998	2,518	2,643	1,892	0,514	0,967
DV PAD	0,447	0,607	1,321	1,976	1,129	3,595	0,441	1,362

Acetato

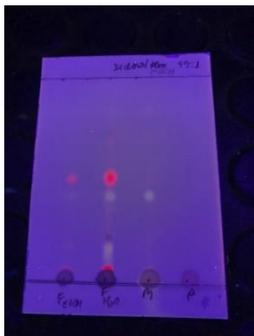
Amostra/ Fenólicos	Folha <i>in natura</i>	Folha liofilizada	Coroa	Broto	Morango verde congelado	Flor	Talo	Sépala
mg de ácido gálico (EAG)/g de amostra (média)	356,159	220,478	772,143	593,559	127,010	560,738	958,679	815,231
Coefficiente de variação	1,460	2,841	0,457	1,533	9,231	1,524	3,588	1,112
DV PAD	5,200	6,264	3,525	9,101	11,724	8,547	34,399	9,065

Aquoso

Amostra/ Flavonóides	Folha <i>in natura</i>	Folha liofilizada	Coroa	Broto	Morango verde congelado	Flor	Talo	Sépala
mg de catequina /mg de amostra (média)	68,602	7,609	52,166			51,775		65,583
Coefficiente de variação	3,470	4,935	3,503			8,223		5,038
DV PAD	2,381	0,375	1,827			4,257		3,304

3. Cromatografia Camada Delgada

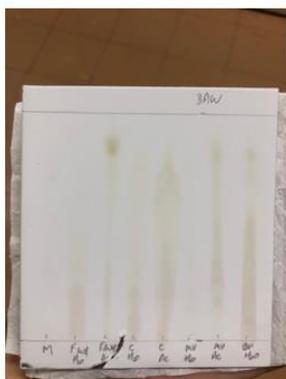
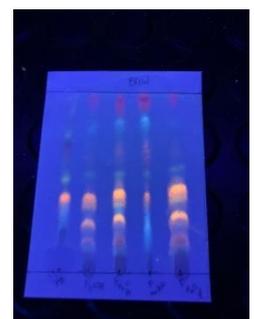
A: Placa diclorometano:metanol 99:1, F_{EtOH} – Extrato alcoólico da folha liofilizada; F_{H_2O} – Extrato aquoso da folha liofilizada; M – morango; P – pelargonidina, após revelador anisaldeído



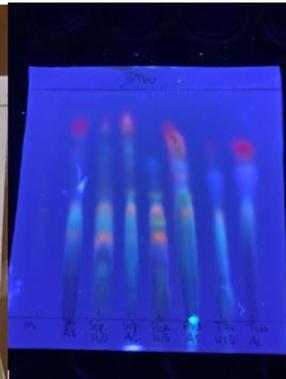
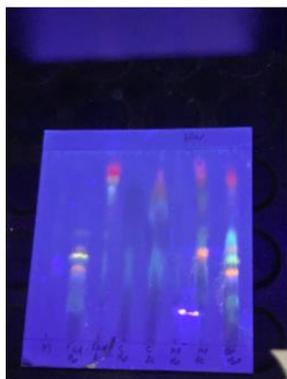
B: Placa BAW, F_{EtOH} – Extrato alcoólico da folha liofilizada; F_{H_2O} – Extrato aquoso da folha liofilizada; M – morango; P – pelargonidina, após revelador NP-PEG



C: Placa BAW, M – morango; F_{EtOH} – Extrato alcoólico da folha liofilizada; F_{H_2O} – Extrato aquoso da folha liofilizada antes e após rotaevaporador; $F_{acetato}$ – Extrato acetato de etila da folha liofilizada, pós NP-PEG. (365 nm)

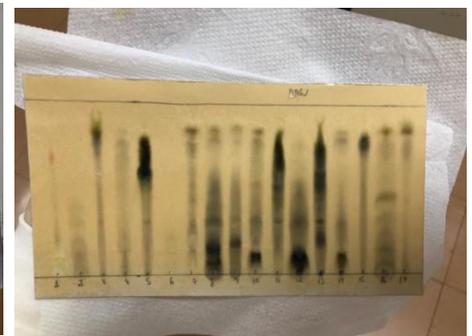


365 nm (Pós NP- PEG)



365 nm (Pós NP- PEG)

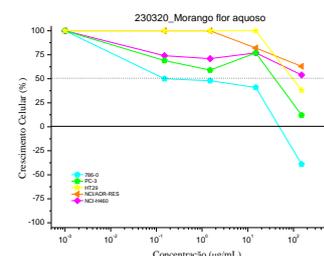
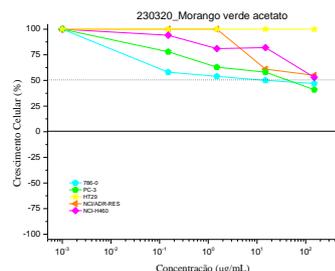
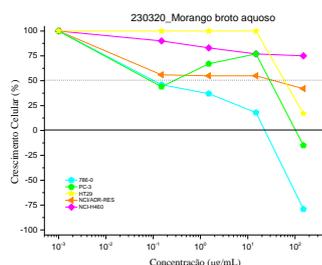
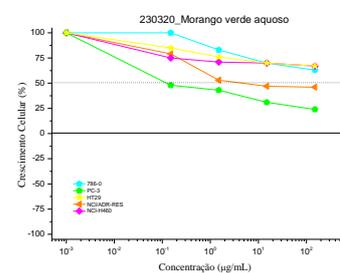
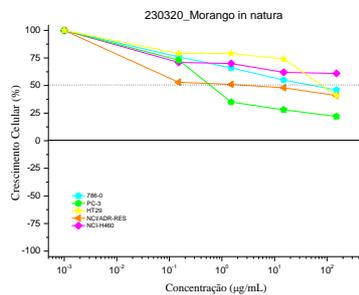
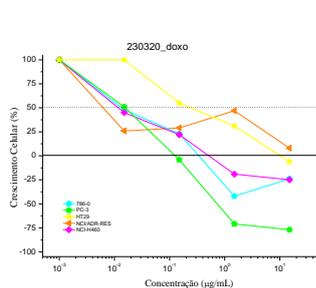
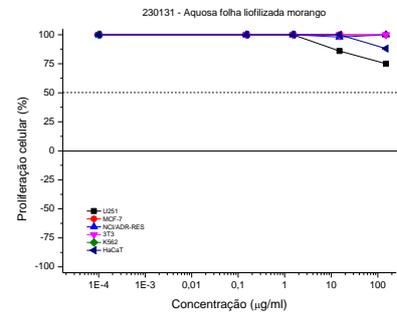
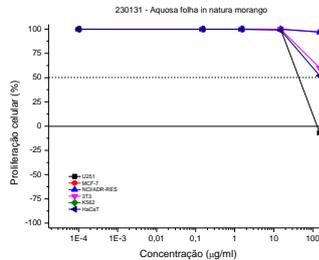
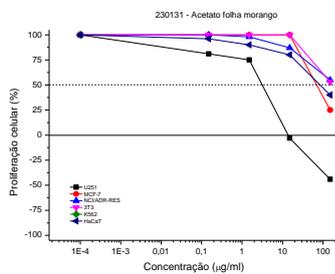
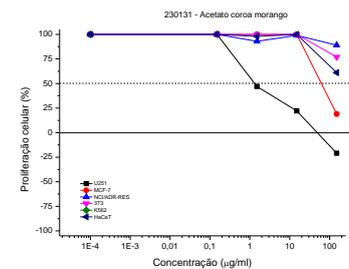
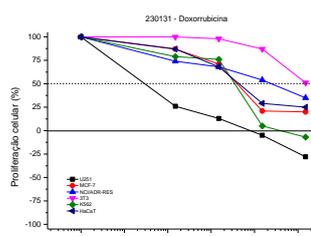
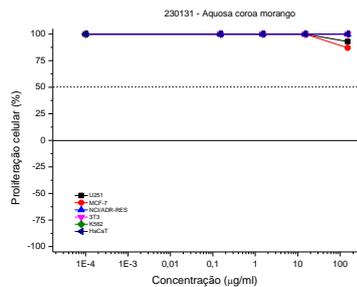
Legenda: M – morango
 Flif H2O - Folha liofilizada aquosa
 Flif Ac - Folha liofilizada acetato
 C H2O – Coroa extrato aquoso
 C Ac – Coroa extrato acetato
 MV H2O – extrato morango verde aquoso
 MV Ac – extrato morango verde acetato
 Br H2O – extrato broto aquoso
 Br Ac – extrato broto acetato
 Sép H2O – extrato sépala aquoso
 Sép Ac – extrato sépala acetato
 Flor H2O – extrato flor aquoso
 Flor Ac – extrato flor acetato
 Talo H2O – extrato talo aquoso
 Talo Ac – extrato talo acetato

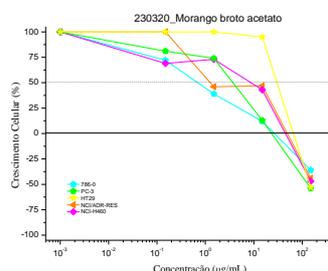
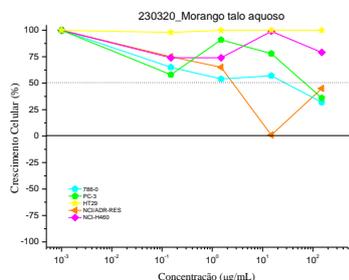


365nm – reveladores Anisaldeído, DPPH, Cloreto Férrico

4.Cultura celular

Além disso, foram realizadas com o auxílio do Doutorando Rogério José Machado Júnior, testes *in vitro* antiproliferativo para as amostras aquosas e de acetato:





Observa-se que os extratos de acetato apresentaram uma atividade antiproliferativa significativa apenas na maior concentração, podendo ser indicativo de um potencial atividade de inibição de crescimento tanto de células tumorais e não tumorais. Já as amostras aquosas apresentaram pouca ou quase nenhuma atividade antiproliferativa, sendo, portanto não tóxicas para as linhagens celulares testadas e não interferindo na sua proliferação. O teste proliferativo que será realizado em seguida irá analisar como essas amostras vão interferir no potencial das células proliferarem e crescerem no meio.

CONCLUSÃO:

As amostras das partes verdes advindas dos resíduos da produção do morango mostraram-se como sendo fontes de diversos tipos de compostos, vistos pela CCD (cromatografia de camada delgada), com atividades promissoras relacionadas ao seu potencial antioxidante (DPPH e FRAP), conteúdo fenólicos e flavonoides tanto para as amostras aquosas quanto para as frações acetatos. A folha *in natura* em comparação com a folha liofilizada apresentou ter essas propriedades mais pronunciadas, sendo uma possível fonte de estudo acerca dessa característica antioxidante, além disso, outras amostras como o broto, flor e coroa do morango também revelaram ter efeitos potenciais contra radicais livres. Em relação à cultura celular, os extratos da fração acetato apresentaram uma atividade antiproliferativa significativa na maior concentração, o que pode indicar uma provável atividade inibidora no crescimento das células tumorais e não tumorais. Já as amostras aquosas não demonstraram quase nenhuma atividade antiproliferativa, sendo não tóxicas e não interferindo na proliferação de células.

Referências:

SALAS-ARIAS, K., IRÍAS-MATA, A., SÁNCHEZ-KOPPER, A., HERNÁNDEZ-MONCADA, R., SALAS-MORGAN, B., VILLALTA-ROMERO, F., & CALVO-CASTRO, L. A. Strawberry *Fragaria x ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(4), 1865.

VILLAMIL G.E., ANTUNES-RICARDO, M. & PIAGENTINI, A. & JACOBO-VELÁZQUEZ, D. Adding value to strawberry agro-industrial by-products through ultraviolet A-induced biofortification of antioxidant and anti-inflammatory phenolic compounds. *Frontiers in Nutrition*, 2022

MONKS, A et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 83,11:757-66, 5 jun. 1991.

DONGJU L., QING M., YIWEN Z. & ZEYAN P. Phenolic compounds with antioxidant activity from strawberry leaves: a study on microwave-assisted extraction optimization, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 874-882, 2020

FOTIRIĆ AKŠIĆ M, DABIĆ ZAGORAC D, SREDOJEVIĆ M, MILIVOJEVIĆ J, GAŠIĆ U, MELAND M, NATIĆ M. Chemometric Characterization of Strawberries and Blueberries according to Their Phenolic Profile: Combined Effect of Cultivar and Cultivation System. *Molecules*, 24(23):4310, 2019 Nov 26.