

4.05.01 - Nutrição / Bioquímica da Nutrição

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

Julia Soto Rizzato¹*, Ms. Roberto de Paula do Nascimento², Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior³

1. Graduanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

2. Doutorando do Laboratório de Nutrição e Metabolismo (LANUM) - UNICAMP

3. Professor responsável pelo LANUM - UNICAMP

Resumo

Em 2018 o câncer colorretal (CCR) ocupou o terceiro lugar em mortalidade e o segundo em incidência dentre todos os tipos de câncer. O consumo de frutas ricas em fibras e compostos fenólicos reduz significativamente o risco de desenvolvimento de CCR. A jabuticaba, fruto nativo brasileiro, possui altas concentrações destes compostos, indicando sua potencial atividade no CCR. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos protetivos do pó liofilizado da casca de jabuticaba em um modelo de inflamação crônica de CCR. Para tal, os camundongos receberam uma dieta controle, ou dieta acrescida de 2,5% ou 5% de casca de jabuticaba. Após 4 semanas de alimentação preventiva, os animais dos grupos CCR passaram pelo processo de indução química de CCR. O Índice de Atividade da Doença foi avaliado e na semana 16 os animais foram eutanasiados. Os tumores foram contados e uma amostra do cólon foi separada para as análises histológicas.

Autorização legal: O experimento animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (protocolo número 5246-1/2019).

Palavras-chave: Compostos bioativos, inflamação, *Myrciaria jaboticaba*.

Apoio financeiro: Este projeto contou com o apoio financeiro do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC, número de processo 120659/2019-0, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, número de processo 2020/00414-3.

Trabalho selecionado para a JNIC: Pró Reitoria de Pesquisa da UNICAMP.

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é uma doença cuja incidência e mortalidade vêm apresentando um aumento alarmante nas últimas décadas¹. Historicamente, países desenvolvidos apresentam maiores taxas de CCR, sendo que os fatores ambientais são os mais determinantes em sua incidência. O sedentarismo, o aumento da massa corpórea e o alto consumo de carnes vermelhas e processadas estão positivamente correlacionados ao desenvolvimento de CCR²⁻⁴. Na última década, países em desenvolvimento, como o Brasil, vêm apresentando um aumento expressivo nas taxas de CCR, aproximando-se aos índices de países europeus⁵. Esses dados indicam a necessidade de estudos focados na prevenção do CCR, visando o maior controle da doença através da criação ou do aprimoramento de políticas públicas de saúde. Uma dieta com abundância em frutas ricas em compostos fenólicos e fibras, por outro lado, vem sendo fortemente relacionada à diminuição do risco de desenvolvimento de CCR⁶⁻¹¹.

A jabuticaba (família Myrtaceae, gênero *Myrciaria*), é um fruto nativo brasileiro rico nestes compostos bioativos. Na casca são encontradas altas concentrações de fibras¹², sendo elas relacionadas à diminuição do risco de desenvolvimento do CCR devido à diluição de carcinogênicos fecais, diminuição no tempo do trânsito do bolo fecal e a geração de ácidos graxos de cadeia curta com propriedades anticancerígenas devido à ação das bactérias da microbiota intestinal^{13,14}. Os compostos fenólicos também são encontrados em abundância na casca do fruto, sendo as antocianinas um dos principais⁹. Estas possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer^{7,10}. Desta forma, o uso da jabuticaba de forma sustentável pode ser uma importante ferramenta na prevenção do CCR.

Tendo isso em vista, este estudo objetivou avaliar a atividade quantificar os compostos bioativos e a atividade antioxidante da casca da jabuticaba, bem como avaliar os seus efeitos na atividade clínica, medidas teciduais do cólon, e na incidência e tamanho de tumores em um 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 jabuticaba foi liofilizada, sendo mantida sob refrigeração (-20°C). Uma amostra foi separada, visando a realização análises de caracterização da composição e atividade antioxidante da casca da jabuticaba. As análises de umidade e cinzas¹⁵, lipídeos¹⁶, proteínas pelo método de Kjeldahl, compostos fenólicos totais¹⁷, antocianinas monoméricas¹⁸, flavonoides totais¹⁹, Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)²⁰ e Capacidade de Absorbância do Oxigênio Radicalar (ORAC)²¹ foram realizadas. As mesmas análises foram realizadas para a dieta dos animais, acrescidas ou não da casca de jabuticaba, exceto flavonoides e antocianinas monoméricas devido à habitual não leitura dentro da curva padrão.

O experimento animal foi aprovado pela CEUA da UNICAMP (nº 5246-1/2019). Este experimento visou avaliar a atividade de 2,5% e 5% do pó liofilizado da casca da jabuticaba em um modelo de inflamação colônica crônica que leva à formação de CCR. Para isso, 68 camundongos BALB/c machos de 8 semanas de idade foram utilizados. Estes, foram divididos nos seguintes grupos: controle (C – dieta padrão), controle câncer (CCCR – dieta padrão e indução de câncer), jabuticaba₂₅ (J₂₅ – dieta acrescida de 2,5% da jabuticaba), jabuticaba₂₅CCR (J₂₅CCR – dieta acrescida de 2,5% da jabuticaba e indução de câncer), jabuticaba₅₀ (J₅₀ – dieta acrescida de 5% da jabuticaba), jabuticaba₅₀CCR (J₅₀CCR – dieta acrescida de 5% de jabuticaba e indução de câncer). Após o período preventivo inicial de 4 semanas, onde os animais receberam apenas a dieta acrescida ou não da casca de jabuticaba, foi realizado o processo de indução de CCR. Para isso, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de azoximetano (10mg/kg) e, após uma semana, uma solução de 2% de dextran sulfato de sódio (DSS) substituiu a água de beber por 7 dias. Após esse período, os animais voltaram a receber água comum durante uma semana, seguido por mais um ciclo de 7 dias com DSS a 2%. Após, os animais voltaram a receber água comum até o final do experimento. Durante todo o experimento, os animais receberam as dietas de seus respectivos grupos experimentais.

Utilizando o critério de avaliação de Gommeaux et al.², o índice de Atividade da Doença (IAD) foi realizado. Este índice considera a perda de massa corpórea; a consistência das fezes; e o sangramento anal e nas fezes, uma vez que estas alterações estão frequentemente associadas ao desenvolvimento de CCR²². Na semana 16 os animais foram eutanasiados. Na eutanásia, as medidas teciduais do cólon (comprimento, peso/comprimento) foram realizadas e a quantidade de tumores vistos foi contada. Uma amostra do cólon distal foi separada para análise histológica (coloração HE) da frequência de adenoma e carcinoma. One-Way ou Two-Way ANOVA seguido de Tukey foram realizados para as análises estatísticas, considerando um p<0,05.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da composição da casca da jabuticaba e da dieta estão expressos na **Tabela 1**. Ao comparar os resultados obtidos com aqueles de outro estudo publicado pelo nosso grupo, existe uma grande semelhança. Neste estudo, a concentração de flavonoides totais no pó liofilizado da jabuticaba foi de 9.51 ± 0.04 (mg QE/g), enquanto a concentração das antocianinas monoméricas foi de 1.52 ± 0.15 (mg C3G/g)²³. A partir destes resultados, evidencia-se que a composição e o potencial antioxidante da dieta são proporcionais à concentração do pó liofilizado da casca da jabuticaba. Também fica evidente que os compostos fenólicos, as antocianinas e a maior capacidade antioxidante da dieta são provenientes do pó liofilizado da casca da jabuticaba.

ANÁLISE	Pó liofilizado da casca de jabuticaba	Dieta controle	Dieta acrescida de 2,5% de jabuticaba	Dieta acrescida de 5% de jabuticaba
UMIDADE (%)	17,1 ± 0,5	9,0 ± 0,4a	9,1 ± 0,7a	9,2 ± 0,2a
LIPÍDEOS (%)	1,3 ± 0,0	4,4 ± 0,1b	4,4 ± 0,3b	3,7 ± 0,1a
PROTEÍNAS (%)	4,5 ± 0,5	11,1 ± 1,5a	10,3 ± 1,1a	10,7 ± 0,4a
CINZAS (%)	1,9 ± 0,2	3,2 ± 0,5a	2,9 ± 0,2a	2,5 ± 0,0a
CARBOIDRATOS TOTAIS (%)*	75,1 ± 0,3	72,3 ± 0,6	73,3 ± 0,4	74,0 ± 0,2
FLAV (mg/Q/g)**	12,6 ± 0,2	ND	ND	ND
AM (mg C3G/g)**	7,1 ± 0,3	ND	ND	ND
FRAP (µmol TE/g)**	1130,6 ± 34,1	2,4 ± 0,1a	5,1 ± 0,4b	8,9 ± 0,3c
FOLIN (mg AG/g)**	84,4 ± 1,3	0,4 ± 0,0a	0,6 ± 0,0b	1,0 ± 0,0c
ORAC (µmol TE/g)**	806,2 ± 41,1	6,0 ± 0,2a	9,7 ± 0,9b	20,7 ± 0,4c

Os resultados referentes ao pó liofilizado estão em matéria seca e das dietas estão em matéria úmida. 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 1²⁴. Letras diferentes indicam diferença estatística.

O IAD foi avaliado (**Figura 2a**). Houve uma diminuição significativa neste índice (p<0,05) no grupo J₅₀CCR durante os 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 na prevenção contra o sangramento e a perda de consistência das fezes (p<0,05). Da mesma forma, 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 2b**). Ou seja, quanto maior a concentração de jabuticaba, menor a relação massa/comprimento do cólon. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos (p>0,05).

Macroscopicamente, foi possível notar uma redução considerável no número de tumores de forma dependente da dose. Em média, os grupos C_{CCR}, J₂₅CCR e J₅₀CCR apresentaram 11, 12,7 e 4,2 tumores por animal,

respectivamente. Estatisticamente, os grupos com adição de jabuticaba na dieta não apresentaram diferença em relação ao grupo C_{CCR}. Entretanto, o grupo J_{50CCR} também não apresentou diferença estatística em relação aos grupos sem câncer, aproximando-se mais de uma condição sem alteração.

A análise histológica evidenciou a eficácia do modelo na formação de adenomas e carcinomas no grupo controle, com 16,66% e 66,66% dos animais com as condições citadas acima, respectivamente. Ao mesmo tempo, os animais que receberam a dieta enriquecida do pó liofilizado da casca de jabuticaba apresentaram uma redução nas alterações descritas. No grupo com 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 J_{25CCR} 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 foi incapaz de inibir a sua evolução para carcinoma. Já o grupo J_{50CCR}, apresentou apenas 12,5% dos animais com adenomas e carcinomas. Este resultado evidencia o efeito inibitório da casca da jabuticaba a 5% na dieta dos animais tanto no início, quanto na progressão do CCR, corroborando com o resultado encontrado na avaliação do IAD. Os resultados da histologia estão enunciados na **Tabela 2a**.

Com relação ao escore médio da histologia, os animais que receberam a dieta acrescida de jabuticaba com indução de câncer não apresentaram diferença estatística dos animais do grupo C_{CCR}. Apesar disso, houve uma diminuição significativa no escore histológico do grupo J_{50CCR} quando comparado ao grupo J_{25CCR} ($p < 0,05$), aproximando-se dos valores de escore do grupo C e indicando que maiores concentrações de jabuticaba podem trazer efeitos preventivos mais eficazes. Os valores da média de escore estão contidos na **Tabela 2b**. Ao analisar os dados da histologia com maiores detalhes, foi possível notar uma redução significativa no escore da distorção de arquitetura de cripta, quando comparado aos grupos C_{CCR} e J_{25CCR} ($p < 0,05$). No escore da depleção caliciforme, por outro lado, apesar dos grupos que receberam a dieta acrescida da casca da jabuticaba não terem apresentado uma diminuição significativa, o grupo J_{50CCR} apresentou uma redução considerável ao comparar com o grupo J_{25CCR} ($p < 0,05$). Da mesma forma, os escores de vascularização da mucosa, edema da mucosa, edema da submucosa e infiltrado inflamatório não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Entretanto, foi possível observar uma tendência de diminuição no escore entre os grupos J_{25CCR} e J_{50CCR}, indicando que o efeito protetivo da casca da jabuticaba se dá de forma dose dependente.

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

A

Grupo	Experimento 2
Controle	0,6889
Controle Câncer	1,2727
Jabuticaba 2,5%	0,4630
Jabuticaba 2,5% câncer	1,5833
Jabuticaba 5%	0,6296
Jabuticaba 5% câncer	0,8194

B

Tabela 2a: Resultados da análise histológica. **Tabela 2b:** Escore histológico.

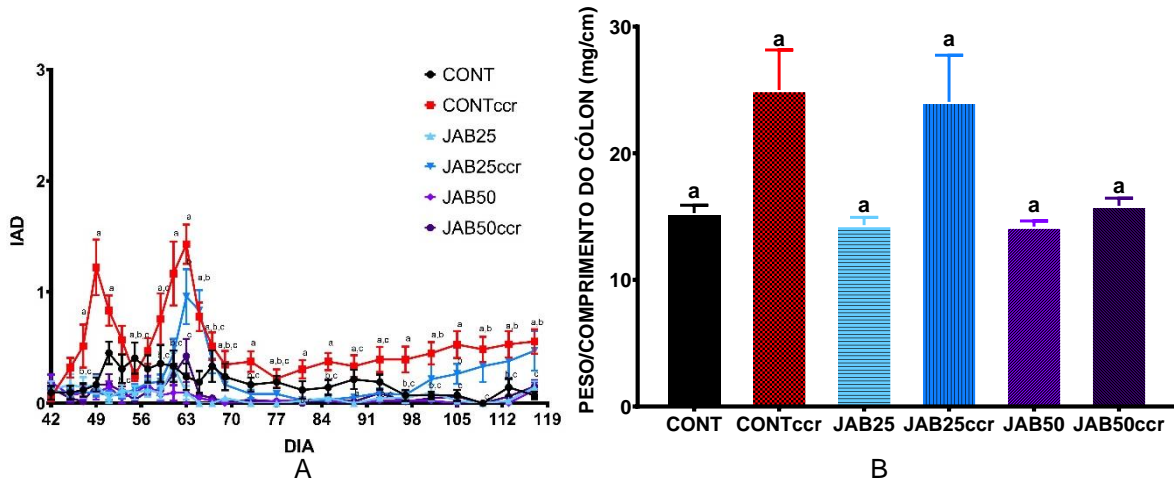


Figura 1A: Índice de Atividade da Doença. **Figura 1B:** Relação massa/ comprimento do cólon (mg/cm).

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, evidencia-se o efeito protetivo da casca da jabuticaba no modelo de indução à inflamação crônica que gera CCR. Além disso, este efeito parece ser dose dependente, uma vez que a adição de 5,0 % de pó liofilizado da casca de jabuticaba gerou um efeito mais proeminente na redução dos índices da doença em relação à dose de 2,5%.

Referências bibliográficas

- Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–25 (2015).
- 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).
- 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).
- Mingyang Song, Wendy S. Garrett, A. T. C. Nutrients and Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **148**, 1244–1260 (2015).
- Sierra, M. S. & Forman, D. Burden of colorectal cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiol.* **44**, S74–S81 (2016).
- 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).
- Choi, Y. J. *et al.* Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Gut Liver* **11**, 243–252 (2017).
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
- 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).
- Li, Y., Zhang, T. & Chen, G. Y. Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants* **7**, 1–27 (2018).
- 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).
- Inada, K. O. P. *et al.* Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *J. Funct. Foods* **17**, 422–433 (2015).
- Sengupta, S., Muir, J. G. & Gibson, P. R. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 209–218 (2006).
- Lipkin, M., Reddy, B., Newmark, H. & Lampecht, S. A. Dietary Factors in Human Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 545–586 (1999).
- IAL, I. A. L. 1ª Edição Digital. *Métodos físicos-químicos para análise Aliment.* **9**, 453–460 (2008).
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
- 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).
- Lees, D.H.; Francis, F. J. Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. *HortScience* **7**, 83–84 (1972).
- Batista, Â. G. *et al.* Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem.* **197**, 1153–1159 (2016).
- 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).
- 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).
- 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).
- Nascimento, R. de P. do *et al.* Brazilian berries prevent colitis induced in obese mice by reducing the clinical signs and intestinal damage. *Food Biosci.* **44**, (2021).
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D. & Narain, N. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Ind. Crops Prod.* (2015) doi:10.1016/j.indcrop.2015.02.059.