

Synsepalum dulcificum*: estudo pré-clínico de citotoxicidade *in vitro

Palavras-Chave: fruto do milagre, câncer, toxicidade.

Autoras:

Giulia Artioli Scumparim – FCM

Prof^a. Dr^a. Mary Ann Foglio (orientadora), LAFTex – FCF

INTRODUÇÃO:

A planta *Synsepalum dulcificum* (SD), popularmente conhecida como “fruto do milagre”, possui em sua polpa uma glicoproteína chamada miraculina, capaz de modular a percepção gustativa, induzindo uma sensação de sabor doce na vigência de uma substância originalmente azeda, justificando assim a designação popular da fruta. A literatura científica sobre a espécie é variada, com destaque para dados relativos à sua segurança toxicológica (TAFAZOLI et al., 2019), citotoxicidade *in vitro* (SEONG et al., 2018), atuação na recuperação da gustação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço que, devido ao tratamento, tiveram este sentido comprometido (SWAMY et al., 2014), e atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas (SEONG et al., 2018; QUIROZ-TRONCOSO et al., 2025; CHEN et al., 2022). Nesse contexto, a presente pesquisa tem como objetivo validar os dados já disponíveis na literatura sobre a atividade antiproliferativa da fruta com ensaios em linhagens celulares tumorais, utilizando a porção comestível da fruta.

JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS:

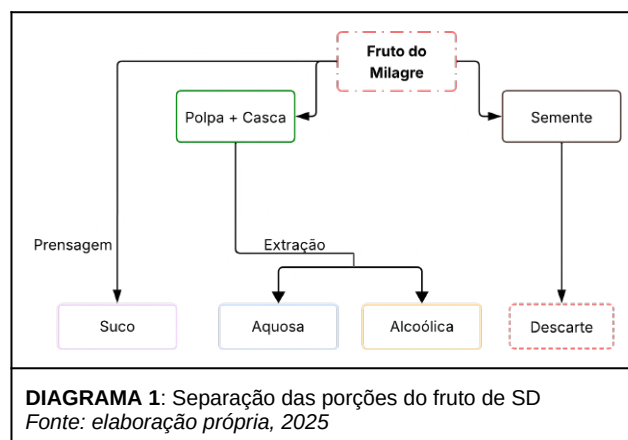
A disgeusia, frequentemente observada em pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia e radioterapia — especialmente em casos de neoplasias de cabeça e pescoço — representa um efeito adverso altamente debilitante. Essa alteração do paladar compromete não apenas a qualidade de vida, mas também o estado nutricional e a integridade imunológica do paciente. Nesse contexto, estratégias de caráter paliativo que promovam a restauração ou manutenção da gustação assumem relevância clínica e humanitária, contribuindo significativamente para o cuidado integral desses indivíduos. A proposta visa ampliar o conhecimento pré-clínico sobre a espécie, fornecendo dados mais robustos que possam futuramente subsidiar a realização de ensaios clínicos. A longo prazo, os achados poderão contribuir com os campos da medicina paliativa e oncologia, respectivamente, por meio do desenvolvimento de estratégias para recuperação da gustação em pacientes oncológicos, e da formulação de hipóteses sobre seu potencial uso como coadjuvante em terapias antineoplásicas.

METODOLOGIA e RESULTADOS:

FITOQUÍMICA

a. Preparação das amostras

Os frutos de SD foram coletados em Nova Odessa (SP) na data 05/03/2025, lavados em água corrente e armazenados em freezer até a data da preparação dos extratos. O espécime vegetal utilizado é classificado como exótico não naturalizado no Brasil, e, portanto, isento de obrigatoriedade de cadastro na plataforma SisGen por não se tratar de patrimônio genético brasileiro nos termos do Art. 2º da Lei nº13.123/2015.



segundo a Lei nº 13.123/2015.

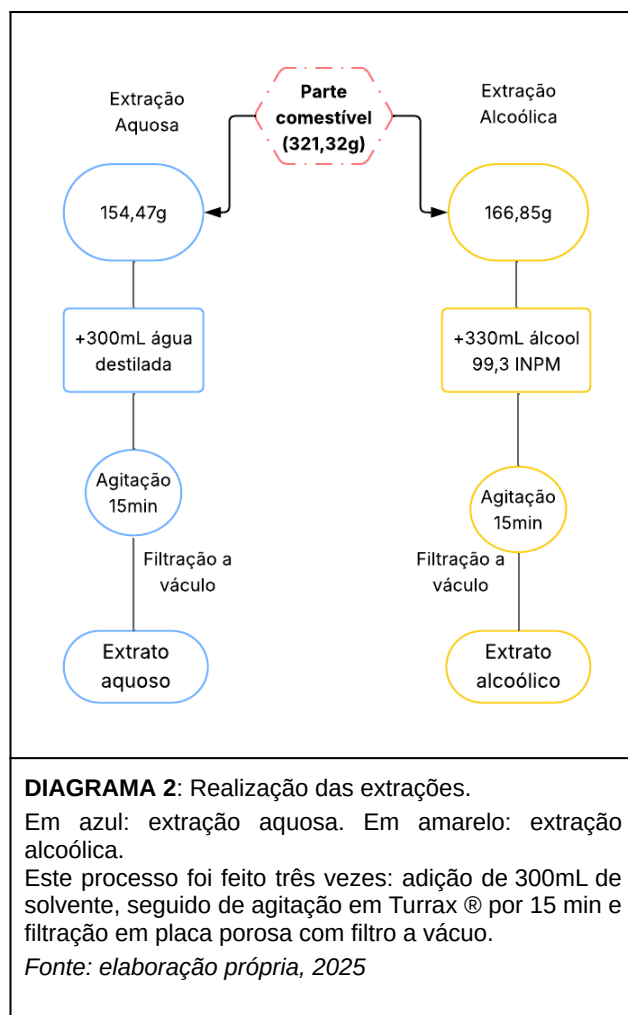
Os frutos foram separados manualmente em três frações: fruta inteira, porção comestível (polpa + casca) e sementes (DIAGRAMA 1). A fruta inteira foi triturada em almofariz e pistilo, mantendo íntegras as sementes, resultando em um suco bruto (SD SC). A partir da porção comestível foram realizadas duas extrações, a alcoólica (SD OH) e a aquosa (SD H₂O) (DIAGRAMA 2). Dessa forma, foram obtidas quatro amostras distintas:

i: = SD H₂O // ii: = SD OH // iii: = SD SC // iv: SD OH + SD SC.

b. Resíduo seco e rendimentos

Um mililitro de cada amostra (SD SC, SD H₂O e SD OH) foi transferido para recipientes previamente tarados e pesado em balança analítica de alta precisão. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 40 °C, com pesagens sucessivas em intervalos de 1 hora até que fosse observada estabilidade no peso, indicando a completa remoção da fração volátil. Esse procedimento permitiu a determinação do resíduo seco de cada amostra.

Além disso, a secagem controlada das amostras, realizada com o objetivo de preparação para os ensaios in vitro, permitiu estimar a



Amostra / Valor	SD SC	SD OH	SD H ₂ O
Amostra inicial	12mL	166,85g	154,5g
Peso seco (mg/mL)	51,50	8,35	4,45
Massa total do extrato seco (g)	0,62 (12mL)	9,35(10mL)	4,00 (900 mL)
Rendimento percentual	4,1%	5,0%	2,6%

TABELA 1: Dados obtidos a partir do resíduo seco.

A amostra inicial diz respeito ao conteúdo que foi manipulado
O resíduo seco consiste no valor de massa após secagem total de solvente

O percentual de massa consiste na quantidade de resíduo que compõe o total da massa inicial pré secagem

Fonte: elaboração própria, 2025

massa total do extrato seco equivalente a partir da proporção observada entre a massa inicial e o resíduo obtido. Essa relação foi utilizada para o cálculo do rendimento percentual de cada método de preparação em relação à amostra bruta processada. Os dados obtidos incluem o valor do resíduo seco (mg/mL), a massa total estimada de extrato seco (g) e o rendimento percentual para cada fração analisada (TABELA 1).

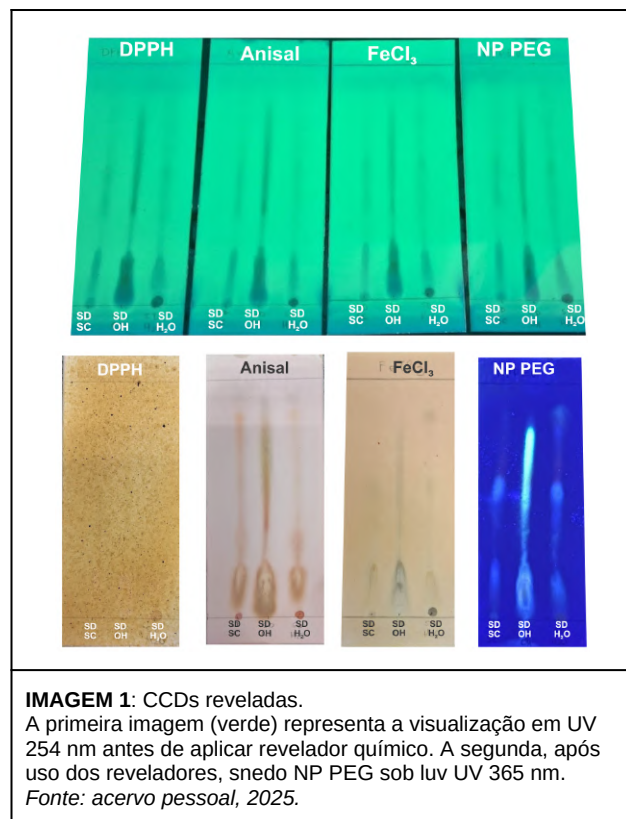
c. Análises cromatográficas

Foram realizadas cromatografias de camada delgada (CCD)

com objetivo de identificar as classes de compostos químicos e estabilidade dos componentes das amostras de SD ao longo da manipulação, como secagem em estufa a 40°C, após diluição em solventes e armazenamento em freezer. A fase móvel utilizada foi a mistura BAW (n-butanol + ácido acético + água destilada na proporção 4:5:5 (V/V/V)); a fase estacionária consistia em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha). Além disso foi realizada uma triagem utilizando diferentes reveladores químicos a fim de avaliar quais classes de compostos foram melhor evidenciadas (TABELA 2 e IMAGEM 1).

d. Análises cromatográficas

Foram realizadas cromatografias de camada delgada (CCD) com objetivo de identificar as classes de compostos químicos e estabilidade dos componentes das amostras de SD ao longo da manipulação, como secagem em estufa a 40°C, após diluição em solventes e armazenamento em freezer. A fase móvel utilizada foi a mistura BAW (n-butanol + ácido acético + água destilada na proporção 4:5:5 (V/V/V)); a fase estacionária consistia em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha). Além disso foi realizada uma triagem utilizando diferentes reveladores químicos a fim de avaliar quais classes de compostos foram melhor evidenciadas (TABELA 2 e IMAGEM 1).



Revelador	Classe de compostos	Resultados
Anisalaldeído sulfúrico	Triagem universal	Evidenciou as mesmas classes de compostos ao longo da manipulação, sem indícios de degradação
Cloreto férrico	Fenóis e taninos	Evidenciou fenóis e taninos
DPPH	Antioxidantes	Não evidenciou compostos antioxidantes
NP-PEG	Flavonoides	Evidenciou abundância de flavonoides

TABELA 2: Reveladores para CCD.

Sumarização de todos os reveladores testados nas amostras de SD, suas composições, método de aplicação, classe de compostos revelados e resultados observados na IMAGEM 1

DPPH: 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil
NP: Reagente para Produtos Naturais
PEG: Polietilenoglicol

Fonte: elaboração própria (2025), a partir de WAGNER (1996)

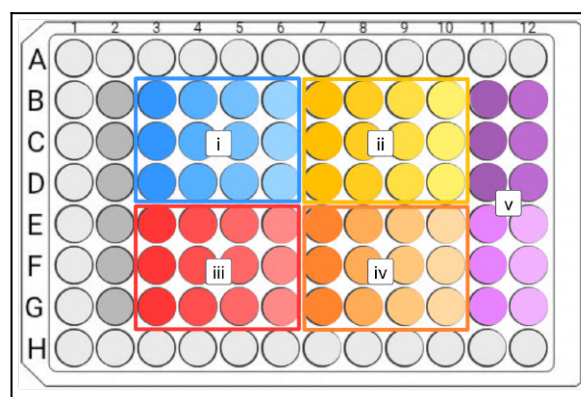
fixação; as demais seis placas possuíam cada uma uma linhagem que entrou em contato com as quatro amostras (i: e. aquoso; ii: e. alcoólico, iii: suco bruto e iv: mistura de suco bruto + e. alcoólico) e um controle doxorrubicina diluída em dimetilsulfóxido (100mg/mL), sendo todas as intervenções feitas em triplicata, com diluições seriadas 0,15; 1,5; 15 e 150 µg/mL, em meio completo, totalizando volume de 200µL em cada poço contendo suspensão celular + amostra + meio de cultura.

Após 48 horas das células em contato com as amostras, elas foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA) e incubadas por

BIOLOGIA CELULAR:

a. Placas de cultura celular

Para avaliação de atividade antiproliferativa, foi seguido o protocolo descrito por Monks et al. (1991). Foram montadas sete placas de cultura celular, cujas amostras celulares totalizaram 100µL, sendo a T0 a placa controle, com todas as linhagens celulares, sem intervenção, com incubação por 24h seguida de



Branco da amostra: apenas meio e amostra, sem células

Cinza: apenas célula e meio, sem amostra, configura o T1

i: = SD H₂O
ii: = SD OH
iii: = SD SC

iv: SD OH + SD SC
v: doxorrubicina

Fonte: elaboração própria, 2025

1 hora a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas com água e mantidas em temperatura ambiente até a secagem. Após, foi realizada adição de 50 µL de sulforrodamina B 0,4 % dissolvido em ácido acético 1% para corar as membranas celulares, então foram lavadas com ácido acético 1% e secas novamente em temperatura ambiente por 48h.

b. Espectrofotômetro

As células foram ressuspensas mediante aplicação de solução de Trizma base 150µL, em pH 10,5, e a leitura espectrofotométrica realizada em 540 nm em um leitor de microplacas. A partir dos dados obtidos foi possível calcular a proliferação celular, representada nos gráficos 1 a 5.

Nenhuma linhagem apresentou efeito citocida. Na linhagem U-251, observou-se efeito citostático moderado a forte, com valores entre 13,07% e 67,48% (média: 40,61%). As amostras não promoveram efeito relevante sobre a linhagem MCF-7, que manteve valores próximos a 100% (máximo: 100,16%; mínimo: 92,82%; média: 96,57%). Para SK-MEL-28, o efeito citostático foi leve a moderado (máximo: 56,24%; mínimo: 4%; média: 24,33%). A linhagem NCI-H460 apresentou comportamento atípico, com aumento de proliferação celular (máximo: 200,88%; mínimo: 74,57%; média: 134,44%). Já em HT-29, o efeito citostático foi leve a moderado (máximo: 131,27%; mínimo: 11,46%; média: 62,36%). Por fim, a linhagem não tumoral HaCaT apresentou resposta citostática forte, com média de 6,74% (máximo: 11,12%; mínimo: 0,83%). A análise por amostra, considerando os valores médios de proliferação nas linhagens tumorais, resultou nos seguintes valores:

- SD H₂O: máximo: 170,46%; mínimo: 13,07%; média: 70,96%
- SD OH: máximo: 200,88%; mínimo: 20,6%; média: 88,13%
- SD SC: máximo: 140,16%; mínimo: 4%; média: 61,32%
- SD SC + SD OH: máximo: 136,63%; mínimo: 9,54%; média: 66,25%

CONCLUSÕES:

Os resultados demonstraram que os diferentes extratos de SD apresentaram rendimentos coerentes com o tipo de matriz vegetal empregada, e perfis fitoquímicos relativamente estáveis ao longo da manipulação, sem evidência significativa de degradação. As análises cromatográficas evidenciaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides e outros metabólitos secundários relevantes, especialmente nos extratos alcoólico e no suco bruto.

Na avaliação em células tumorais e não tumorais *in vitro*, os resultados das amostras de SD exerceram, de modo geral, um efeito citostático, mais evidente nas concentrações mais elevadas. Esse efeito foi mais

Gráficos 1-5: Gráficos do estudo Antiproliferativo

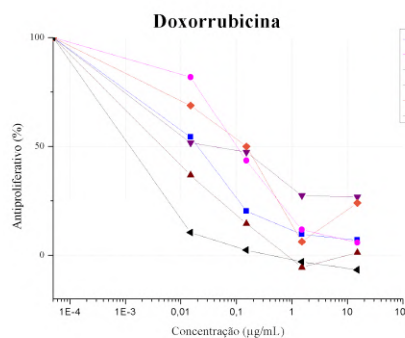


Gráfico 1: controle com doxorrubicina

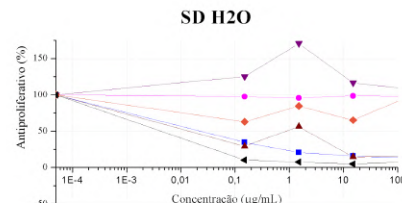


Gráfico 2: extrato aquoso de SD

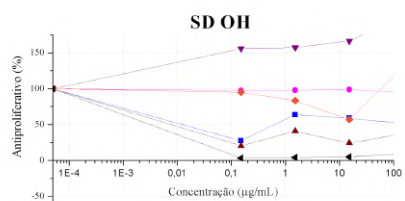


Gráfico 3: extrato alcoólico de SD

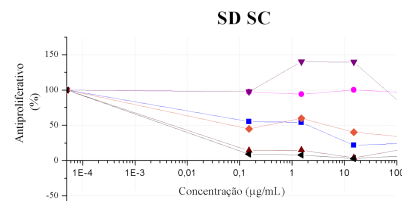


Gráfico 4: suco bruto de SD

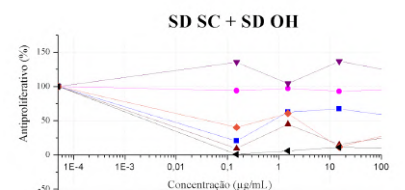
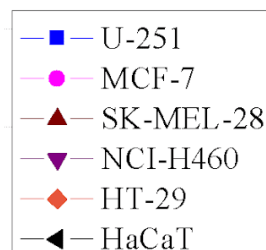


Gráfico 5: suco bruto de SD + extrato alcoólico de SD.



LEGENDA DOS GRÁFICOS 1 - 5:
Proliferação celular

Fonte: Origin Pro® 8, elaboração própria, 2025

perceptível nas linhagens tumorais SK-MEL-28, U-251 e HT-29. O uso concomitante de SD SC e SD OH não demonstrou efeito significativamente diferente do uso isolado de SD SC. No conjunto, os dados indicam ausência de ação citocida relevante, com predomínio de um efeito citostático moderado, que sugere que os extratos atuam mais sobre a retenção da proliferação celular do que sobre a indução de morte celular. Os resultados também sugerem segurança das amostras, considerando que não foram observadas respostas deletérias expressivas na linhagem não tumoral HaCaT. Em contrapartida, a linhagem NCI-H460 respondeu com aumento da proliferação, o que sugere um possível efeito trófico específico que merece investigação posterior.

Embora a literatura aponte efeitos antiproliferativos significativos de SD em linhagens tumorais (SEONG et al., 2018; QUIROZ-TRONCOSO et al., 2025; CHEN et al., 2022), os extratos testados neste estudo apresentaram apenas efeito citostático, mais acentuado em U-251 e SK-MEL, sem ação citocida relevante. Esse resultado pode estar relacionado ao uso de extratos simples e não purificados, com menor concentração dos compostos ativos, frequentemente isolados nos estudos prévios. O aumento de proliferação observado em NCI-H460 sugere um possível efeito trófico sobre esta linhagem, que merece investigação futura, uma vez que o uso de SD em pacientes com uma neoplasia similar a essa possa representar uma adversidade ao tratamento oncológico. Apesar dos efeitos discretos, os achados somam-se aos dados pré-existentes de literatura .

BIBLIOGRAFIA

- CHEN, Q. et al. Mechanism of Synsepalum dulcificum Daniell. Inhibiting Lung Adenocarcinoma. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 2022, 2022.
- MONKS, A. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. JNCI Journal of the National Cancer Institute, v. 83, n. 11, p. 757–766, 5 jun. 1991.
- QUIROZ-TRONCOSO, J. et al. Anticancer Potential, Phenolic Profile, and Antioxidant Properties of Synsepalum dulcificum (Miracle Berry) in Colorectal Tumor Cell Lines. Antioxidants, v. 14, n. 4, p. 381, 24 mar. 2025.
- SEONG, J.; OYONG, G.; CABRERA, E. Synsepalum dulcificum extracts exhibit cytotoxic activity on human colorectal cancer cells and upregulate c-fos and c-jun early apoptotic gene expression. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 8, n. 3, p. 173, 2018.
- SWAMY, K. B. et al. The clinical effects of Synsepalum dulcificum: a review. Journal of medicinal food, 2014.
- TAFAZOLI, S. et al. Safety assessment of miraculin using in silico and in vitro digestibility analyses. Food and Chemical Toxicology, v. 133, p. 110762, nov. 2019.
- WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996.