

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**Efeitos da dieta enriquecida com os frutos das palmeiras
Euterpe oleracea Mart. e *Mauritia flexuosa* L.f. na
inflamação intestinal em ratos**

Tainan Freitas Salmeron Curimbaba
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi



Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas – Farmacologia,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre.

**Botucatu
2015**

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**Efeitos da dieta enriquecida com os frutos das palmeiras
Euterpe oleracea Mart. e *Mauritia flexuosa* L.f. na
inflamação intestinal em ratos**

Tainan Freitas Salmeron Curimbaba
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas – Farmacologia,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre.

**Botucatu
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Curimbaba, Tainan Freitas Salmeron.

Efeitos da dieta enriquecida com os frutos das
palmeiras Euterpe oleracea Mart. e Mauritia flexuosa L.f.
na inflamação intestinal em ratos / Tainan Freitas
Salmeron Curimbaba. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Alimentos funcionais. 2. Intestinos - Doenças. 3.
Palmeira. 4. Frutas. 5. Suplementos dietéticos.

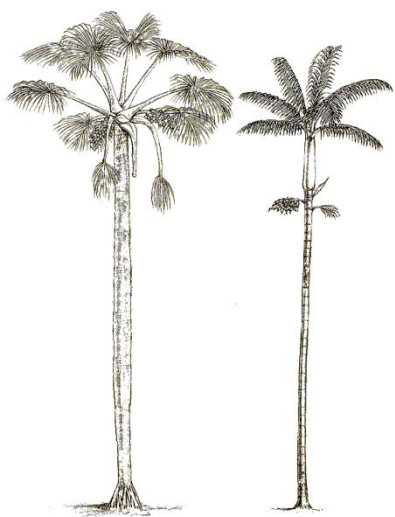
Palavras-chave: Alimentos funcionais; Doença Inflamatória
Intestinal; Euterpe oleracea Mart.; Mauritia flexuosa
L.f.; TNBS.

Auxílio Financeiro:



(Coordenação de Aperfeiçoamento

Pessoal de Nível Superior)



Dedicatória

Aos meus pais Luiz Flavio e Maria e à minha irmã Raira pelo amor, compreensão e apoio ao longo do meu desenvolvimento pessoal e profissional. Os exemplos que tenho em casa e a criação que vocês me deram são a minha base e o que me permitiu fazer as escolhas certas até aqui.

Ao Doti e à vovó Diva: o amor incondicional e a proteção de vocês continuam vivos comigo em todos os momentos.

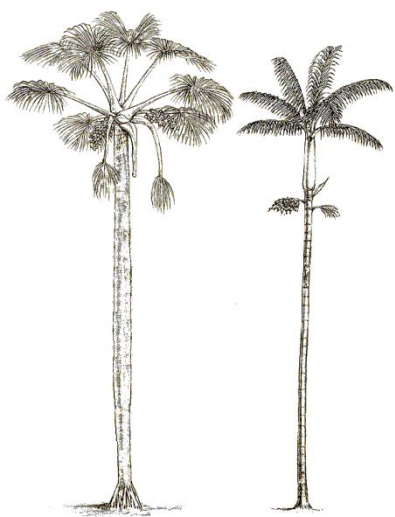
Ao tio Roberto e à tia Sônia pelo carinho que sempre tiveram comigo e pelo incentivo na escolha da profissão de bióloga.

Ao Leandro pela companhia, paciência e carinho durante essa trajetória. Que a relação que construímos durante esse tempo continue sendo uma das minhas maiores alegrias.

Às meninas da República ComVento: Carolina (Dona), Mariana (Vuku), Vanessa (Vixi), Paula (Gurgi), Clara (Pumba), Erika (Leetrão), Júlia (Minkia), Giovanna (Trisca), Thayssa (Fossets), Beatriz (Uni), Bruna (Foguetão), Rafaela (Gaiola), Carolina (Coxia), Luiza (Bixada) e Bárbara (Viking). Ao Tonho e suas demonstrações de amor desastradas. Obrigada pela compreensão e amizade nos melhores anos da minha vida, vocês são a minha segunda família.

“Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho.”

Tom Jobim



Agradecimientos

Ao professor Luiz Claudio Di Stasi pelo exemplo de profissionalismo, pelo aprendizado e pela oportunidade de trabalhar com uma equipe tão competente e companheira. Espero corresponder sempre da melhor forma possível.

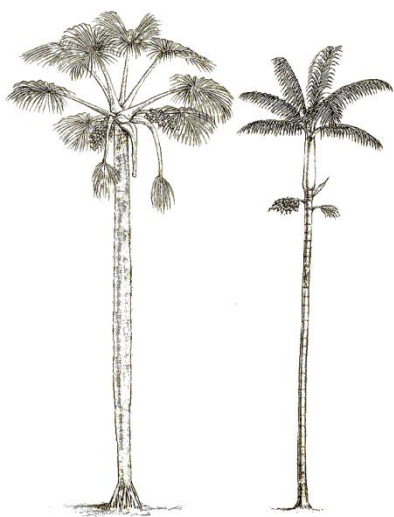
Aos meus colegas de laboratório Celso, Ana, Aline, Kita, Ju Severi, Dri, Fabi, Julian, Lesvi e Ellen pelo o aprendizado ao longo dessa trajetória. Um agradecimento especial ao Luiz e ao Alexandre pela parceria e dedicação durante todo o projeto. Desejo muito sucesso a todos vocês.

Aos professores e alunos do Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal do Pará Herculano, Evander, Karen, Luana e Tayana pela atenção e auxílio durante a minha estadia no Pará para as coletas.

Ao Laboratório de Dietas Experimentais da Unipex - FMB, especialmente ao Delala pela disponibilidade e auxílio durante o preparo das rações.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Farmacologia, aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia e aos funcionários da Seção de pós-graduação do Instituto de Biociências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.



Prólogo

Dados curriculares

Nome: Tainan Freitas Salmeron Curimbaba

Data de nascimento: 15/12/1987

Formação:

2008-2012 Graduação em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura (2011) e Bacharelado (2012), pelo Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

Atividades realizadas durante o curso de Mestrado (2013 - 2015)

DISCIPLINAS CURSADAS:

Disciplinas	Ano	Carga Horária	Frequência	Conceito
Farmacocinética	2013	75	100	B
Farmacodinâmica: Receptores e Interação Droga-Receptor	2013	45	82	B
Laboratório de Didática em Farmacologia	2013	90	75	B
Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória	2013	30	100	A
Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória	2013	60	100	A
Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar	2014	90	100	B
Prática de Ensino de Farmacologia	2014	60	92	A

Total de carga horária em disciplinas = 450

Total de carga horária em atividades complementares = 112,5

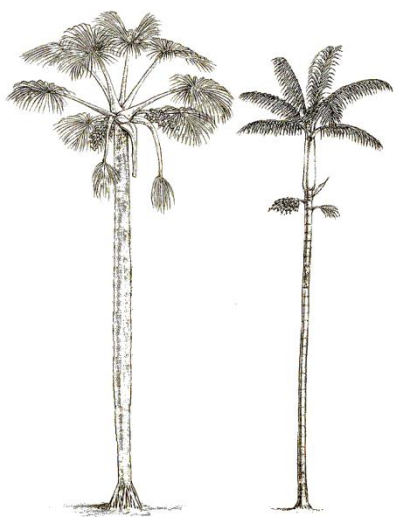
TOTAL GERAL = 562,5

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2014	XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.	Congresso
2014	XIII Workshop da Pós-Graduação.	Congresso
2013	II Simpósio Internacional sobre o uso de Plantas Medicinais em Psiquiatria.	Congresso

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS COM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

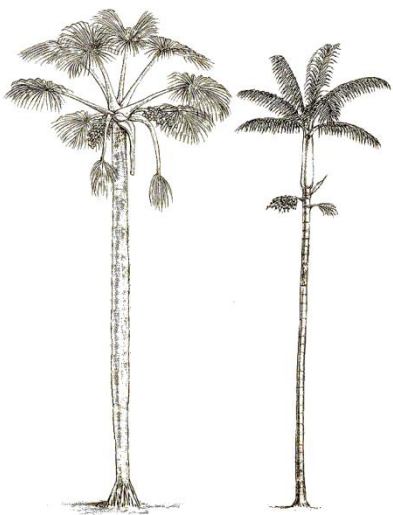
2014	“Avaliação dos efeitos da dieta enriquecida com os frutos das palmeiras <i>Euterpe oleracea</i> Mart. e <i>Mauritia flexuosa</i> L.f. na inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos” na forma de pôster - XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.	Congresso
2014	“Avaliação dos efeitos preventivos da dieta enriquecida com farinha de banana verde (<i>Musa</i> sp AAA) no modelo experimental de doença inflamatória por ácido trinitrobenzenosulfônico” na forma de pôster - XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.	Congresso



Resumo

Considerando que os tratamentos convencionais da doença inflamatória intestinal não representam a cura ou remissão dos sintomas e produzem intensos efeitos colaterais, a busca por estratégias complementares de prevenção e tratamento desta doença se apresenta como uma perspectiva promissora. Baseado nessas informações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal das dietas enriquecidas com os frutos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e do buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) na fase aguda do modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em ratos. Devido aos usos populares e conhecidos valores nutricionais, essas duas palmeiras da região amazônica possuem grande potencial de atuarem como prebióticos, antioxidantes e/ou moduladores da resposta imune. Os animais foram submetidos a uma dieta contendo a polpa desses frutos na ração em uma proporção de 10% durante 35 dias. Após 48 horas da indução do processo inflamatório, os animais foram mortos e seus cólons extraídos para a realização dos estudos macroscópicos (escore, extensão da lesão, relação peso comprimento do cólon e ocorrência de diarreia e aderência), histológicos (microscopia óptica) e bioquímicos (conteúdo de glutathione total e atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina). Paralelamente foi realizada uma análise comportamental, utilizando modelos experimentais de ansiedade e de atividade geral nos animais submetidos às dietas. As avaliações bioquímicas mostraram que ambas as dietas foram capazes de evitar a depleção dos níveis de glutathione e de diminuir a atividade das enzimas fosfatase alcalina e mieloperoxidase. Estes efeitos protetores foram acompanhados pela recuperação tecidual como observado pelas análises microscópicas. Esses resultados sugerem que a suplementação dietária com os frutos de *E. oleracea* Mart. (açaí) e de *M. flexuosa* L.f.

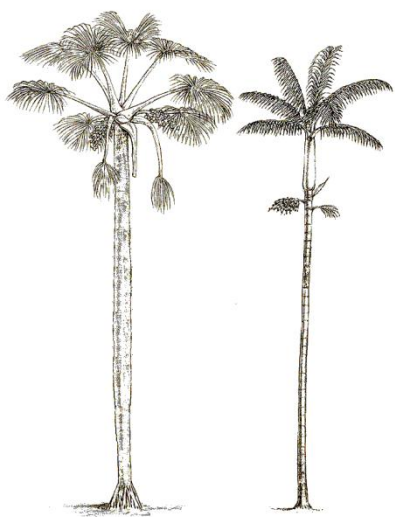
(buriti), em uma proporção de 10% na ração, foi responsável pela melhora do processo inflamatório colônico induzido por TNBS em ratos, sendo importante que novos estudos sejam realizados para se confirmar se estes efeitos são devidos às ações prebióticas, antioxidantes e/ou imunomoduladoras. Além disso a dieta enriquecida com a polpa de açaí produziu um efeito ansiolítico nos animais submetidos aos testes comportamentais, sugerindo a necessidade de mais testes que confirmem e esclareçam essa propriedade.



Abstract

Whereas conventional treatments of inflammatory bowel disease does not represent a cure or remission of symptoms and produce severe side effects, the search for additional strategies to prevent and treat this disease is presented as a promising prospect. Based on this information, the present study aimed to evaluate the intestinal anti-inflammatory activity of the diets enriched with the fruits of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) in the acute phase of experimental model of induced inflammatory bowel disease TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) in rats. Due to popular uses and known nutritional values, these two palm trees in the Amazon region have great potential to act as prebiotics, antioxidants and / or modulators of the immune response. The animals were submitted to a diet containing the pulp of the fruits in the feed in a ratio of 10% for 35 days. After 48 hours of induction of the inflammatory process, the animals were sacrificed and their colons removed for the achievement of macroscopic studies (score, lesion length, weight ratio length of the colon and occurrence of diarrhea and grip), histological (light microscopy) and biochemical (total glutathione content and activity of myeloperoxidase and alkaline phosphatase enzymes). At the same time a behavioral analysis was performed using experimental models of anxiety and general activity in animals which were fed. The biochemical evaluations showed that both diets were able to avoid the depletion of glutathione levels and decrease the activity of the alkaline phosphatase and myeloperoxidase enzymes. These protective effects were accompanied by tissue recovery as observed by microscopic analysis. These results suggest that dietary supplementation with the fruits of *E. oleracea* Mart. (açai) and *M. flexuosa* L. F. (buriti) in a proportion of 10% in the diet was responsible for the improvement of colonic inflammation induced by TNBS in rats, in this way it is important to conduct further

studies to confirm whether these effects are due to prebiotic actions, antioxidants and/or immunomodulatory. Also enriched diet with açai pulp produced an anxiolytic effect in animals subjected to behavioral tests, suggesting the need for further tests to confirm and clarify this property.



Introdução

1. DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) compreende várias manifestações clínicas, das quais se destacam duas doenças muito semelhantes em alguns aspectos: a doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa. Ambas são inflamações crônicas idiopáticas que podem levar, em longo prazo, à incapacidade da estrutura e função gastrointestinal. Elas distinguem-se pela localização e caracterização do processo inflamatório, sendo que em uma minoria dos casos que envolvem apenas o cólon, elas são indistinguíveis e categorizadas como colite indeterminada (BOUMA & STROBER, 2003).

A doença de Crohn pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal, e é caracterizada pela formação descontínua de lesões, ou seja, intercaladas por segmentos de intestino normal, formação de fibrose e granulomas. Seus sintomas incluem dor abdominal, diarreia, estreitamento da luz intestinal levando à estenose e obstrução intestinal, fistulização e formação de abscessos. Na Retocolite Ulcerativa a inflamação é superficial, atingindo exclusivamente a mucosa colônica, sendo que a lesão é contínua e a doença se manifesta por diarreia grave com perda de sangue e perda progressiva da função peristáltica, com consequente enrijecimento do tubo colônico (COLLINS & CROITORU, 1994; BOUMA & STROBER, 2003).

1.1. Terapêutica Convencional

Inúmeros fármacos compreendem a terapêutica atual e dentre eles destacam-se algumas classes: aminossalicilatos, glicocorticoides e imunossupressores. Nenhuma delas promove a remissão total dos sintomas e tampouco a cura dessas doenças, além de poderem apresentar intensos efeitos colaterais, diferentes resultados em cada paciente (alguns não respondem a nenhum dos fármacos) e normalmente são de alto custo. No Brasil os fármacos mais utilizados são os aminossalicilatos e os

glicocorticoides (ABRAHAM & CHO, 2009; SOUZA et al., 2002).

Os aminossalicilatos (sais de ácido 5-aminossalicílico) englobam, principalmente, a sulfassalazina, a balsalazina, a olsalazina e a mesalazina, sendo que a mesalazina é a mais comumente utilizada para casos mais brandos da Retocolite Ulcerativa e da doença de Crohn. Ela possui atividade anti-inflamatória por inibição da síntese de prostaglandinas. Porém apresenta uma série de efeitos colaterais, tais como, dores de cabeça, diarreia, tonturas, anorexia e náusea (BIONDO-SIMÕES et al., 2003).

Os glicocorticoides também apresentam efeito anti-inflamatório e são mais utilizados no tratamento de casos severos de ambas as doenças. Sua ação se dá por meio da ligação com receptores proteicos intracelulares, modulando a síntese de algumas proteínas envolvidas no processo inflamatório. Devido ao seu mecanismo promover o estímulo da transcrição de determinados genes, seu uso prolongado acarreta em inúmeros e graves efeitos colaterais decorrentes da retenção de sódio promovida por esses fármacos, ocasionando um desequilíbrio eletrolítico e de fluídos corpóreos, como anormalidades metabólicas, alterações nos sistemas hepático, cardiovascular, mental e muscular esquelético, hiperglicemia, aumento do risco de diabetes, desenvolvimento de hipertensão arterial e edema. Muitos desses efeitos podem ser irreversíveis (SHANAHAN, 2002).

Uma terceira classe utilizada é a dos imunossupressores como a azatioprina e a 6-mercaptopurina, as quais apresentam efeitos na doença ativa e eficientes para manter a remissão, mas não são efetivos no controle dos casos agudos. A mercaptopurina, metabólito ativo da azatioprina, possui ação citotóxica por meio da inibição da síntese de DNA. Entre os efeitos colaterais relata-se a supressão medular, desenvolvimento de leucopenia e trombocitopenia e associados com o desenvolvimento de linfomas

(NAVARRO & HANAUER, 2003).

Devido aos diferentes efeitos colaterais produzidos por estes fármacos associado a um baixo número de pacientes que respondem a estes tratamentos, anticorpos monoclonais anti-TNF- α foram introduzidos como novos produtos de valor terapêutico para o tratamento da DII em humanos, dentre os quais se destaca o infliximab. Infelizmente, apesar de toda eficácia dos agentes biológicos no tratamento da DII, uma proporção significativa de pacientes não responde ou deixa de responder ao tratamento ao longo do tempo (TRIANTAFILLIDIS & MERIKAS, 2011; YANAI & HANAUER, 2011).

1.2. Epidemiologia e Etiologia

Diversos estudos vêm sendo feitos há anos a fim de contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia da Doença Inflamatória Intestinal e, apesar de já se ter descoberto muito sobre os processos patogênicos da doença de Crohn e da Retocolite Ulcerativa, a etiologia das mesmas ainda não é totalmente conhecida, a não ser pela clara natureza multifatorial, envolvendo resposta imune desregulada combinada à predisposição genética e fatores ambientais, etiologia comum a todos os processos inflamatórios imunomediados (MAYER, 2010).

São diversos os fatores relacionados com o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal que estão sendo fortemente estudados a fim de se esclarecer melhor a etiologia das mesmas. Dentre eles estão o tabagismo, onde os fumantes apresentam aumento do risco de desenvolver a doença de Crohn, o uso de fármacos com foco principalmente nos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e nos contraceptivos orais e o estresse psicológico, com o agravamento dos sintomas da doença inflamatória intestinal, o que pode ser devido à ativação do sistema nervoso

entérico e expressão de citocinas pró-inflamatórias (BRANDI et al., 2009).

Fatores genéticos, bem como os marcadores envolvidos na predisposição à doença também são uma importante fonte de estudos não só visando o tratamento como a prevenção da mesma. Algumas mutações em genes específicos vêm sendo bastante estudadas a fim de se descobrir o início da cascata inflamatória além de estudos de caracterização envolvendo indivíduos de diferentes grupos familiares e étnicos (ABRAHAM & CHO, 2009; TELAKIS, 2007).

Estima-se que na América do Norte e na Europa haja uma ocorrência de 10-200 casos por 100.000 indivíduos e dados indicam que cerca de 1,4 milhões de americanos sofrem da doença. No Brasil, um dos poucos estudos que visou caracterizar a ocorrência dessas doenças foi realizado no centro-oeste paulista, onde foram registrados cerca de 22 casos para cada 100 mil habitantes. Na maior parte dos países subdesenvolvidos, existem poucos estudos que reúnem dados e informações sobre a incidência e distribuição da doença na população, o que seria essencial para uma caracterização melhor da manifestação da mesma nessas regiões, já que a baixa ocorrência de casos em relação aos países desenvolvidos pode estar relacionada com a precariedade dos sistemas de saúde e consequente ausência de registros nesses países (BOUMA & STROBER, 2003; ABRAHAM & CHO, 2009, VICTORIA et al. 2009).

No entanto, sabe-se que a incidência mundial da doença inflamatória intestinal é maior em regiões urbanizadas e economicamente desenvolvidas, e acredita-se que isso está fortemente relacionado aos hábitos urbanos contemporâneos que envolvem principalmente dietas ricas em alimentos industrializados (pobres em nutrientes), sedentarismo e baixa exposição a antígenos.

1.2.1. Alimentação

O papel da má alimentação na patogênese da doença inflamatória intestinal ainda não é totalmente conhecido, mas devido a alguns dados epidemiológicos fica clara a relação entre a transição alimentar ocidental, que envolveu o aumento do consumo de alimentos refinados e processados, ricos em gorduras de origem animal e açúcar, com o aumento da incidência da doença. Alguns alimentos já se mostraram relacionados com a progressão da inflamação como o álcool, o leite de vaca o açúcar refinado, carboidratos em grandes quantidades e proteínas de origem animal (NEISH, 2009; DORÉ & CORTIER, 2010; YAMAMOTO et al., 2009; VIND et al., 2008; ANDERSEN et al., 2012; FORBES et al., 2011; TARGAN & SHANAHAN, 1994).

Componentes da dieta são capazes de afetar o funcionamento intestinal tanto atuando como antígenos como, e principalmente, interferindo no estresse oxidativo e na microbiota intestinal, contribuindo com o desenvolvimento do processo inflamatório. Já se sabe também que dietas ricas em frutas e vegetais, incluindo fibras e ácidos graxos poli-insaturados como ômega 3 podem ser preventivas para o agravamento do processo inflamatório. Além disso, a deficiência de oligoelementos, minerais e vitaminas são comuns em pacientes com algum tipo de inflamação intestinal, refletindo anemia, diarreia e perda da capacidade absorptiva em determinadas regiões do intestino (ANDERSEN et al., 2012; FORBES et al., 2011).

1.2.2. Hipótese da higiene

A baixa exposição a antígenos também é um fator importante quando pensamos na influência dos hábitos urbanos ocidentais no desenvolvimento da inflamação intestinal. O contato com agentes infecciosos (evidenciando os que co-evoluíram com o ser humano) é capaz de enriquecer o nosso sistema imunológico, preparando-o de

forma a evitar o desenvolvimento de um amplo espectro de doenças autoimunes, fato que nos leva à chamada hipótese da higiene, que propõe, a partir de dados epidemiológicos, a relação direta entre a diminuição da incidência de doenças infecciosas e o aumento de doenças auto-imunes ao longo dos anos. Para se ilustrar melhor essa hipótese, podemos pensar que um indivíduo que nasce e cresce em ambiente pouco contaminado, com acesso a sistema médico adequado envolvendo vacinação, vermifugação e ampla utilização de antibióticos, acesso a produtos de higiene, água e alimentos higienizados e pouco contato com animais, é um ser humano “superprotegido” de microrganismos em relação aos seus antepassados, e essas são características do modo de vida ocidental a partir do século 20 e em centros urbanos de países economicamente desenvolvidos (STRACHAN, 1989; KOLOSKI et al., 2008; BERNSTEIN et al., 2010; OKADA et al., 2010).

Além do pouco contato com agentes infecciosos, o indivíduo que possui esses hábitos urbanos e contemporâneos, consequentemente também vai desenvolver uma microbiota residente pouco diversificada, fator essencial para entendermos o funcionamento do sistema imune intestinal.

1.2.3. *Microbiota intestinal*

Alterações da microbiota intestinal estão diretamente relacionados com os processos inflamatórios: microorganismos e as substâncias que eles produzem são responsáveis pelo aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e desencadeamento de resposta imune. Sabe-se que parte da refinada relação entre a microbiota e o sistema imune do hospedeiro se deve ao importante papel da mesma na proteção contra patógenos, através da barreira física que as bactérias benéficas formam, ocupando sítios de aderência, competindo por nutrientes e estimulando a

produção de substâncias antimicrobianas, como defensinas, lisozimas e catelicidinas pelas células do hospedeiro. Em paralelo, o sistema imune intestinal desenvolveu características e mecanismos que mantêm as populações dessas bactérias equilibradas, ao mesmo tempo em que evitam sua passagem para sítios sistêmicos. Diversos estudos mostram evidências de disbiose na composição global da microbiota em pacientes com doença inflamatória intestinal, com a redução da diversidade e complexidade de filos de bactérias benéficas e o aumento de populações de bactérias patogênicas como a *E. coli*, o que põe em risco a integridade da barreira epitelial e consequentemente a homeostase do hospedeiro (BOUMA & STROBER, 2003; KOLOSKI et al., 2008; GUINANE & COTTER, 2013; MAGRONE & JIRILLO, 2013; GEIRNAERT et al., 2014; HART & HENDY, 2014).

1.2.4. Estresse oxidativo

Finalmente, o estresse oxidativo tem papel fundamental na combinação de processos que levam ao mau funcionamento do sistema imune intestinal. O estresse oxidativo se dá devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas no metabolismo e sua eliminação através da produção de antioxidantes pelo sistema de defesa do organismo. Essas substâncias oxidantes são responsáveis por morte celular, alterações no metabolismo das células e mutações genéticas, podendo estar diretamente relacionadas com as lesões da mucosa gastrointestinal (REZAIE et al., 2007).

2. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Frente a essa grande dificuldade em se combater os principais sintomas da doença inflamatória intestinal, e levando-se em consideração o importante papel da

microbiota intestinal e do estresse oxidativo no desenvolvimento da mesma, a busca por novos compostos que apresentem eficácia perante os sintomas e patogênese dessa doença, sem se deparar com os graves e diversos efeitos colaterais da terapêutica convencional, é incontestavelmente necessária na atualidade. A pesquisa de novos agentes terapêuticos a partir de espécies vegetais representa uma estratégia promissora para a busca de novos tratamentos da Doença Inflamatória Intestinal, onde podemos incluir os alimentos funcionais como terapia complementar.

Visando a prevenção e remissão dos sintomas, a minimização de efeitos colaterais e a ação multi-alvo pela possibilidade de efeito sinérgico de diversos constituintes, os estudos envolvendo alimentos funcionais no tratamento da Retocolite Ulcerativa e da doença de Crohn, têm mostrado resultados interessantes, como a farinha de banana e a farinha do rizoma de taboa (VILADOMIU, 2013; FRUET et al., 2012; SCARMINIO et al., 2012).

Os alimentos funcionais são alimentos que, em sua constituição convencional de consumo, além de possuírem seus valores nutricionais básicos, apresentam benefícios à saúde, podendo promover redução do risco e auxílio no tratamento de doenças. Dentre as possíveis substâncias benéficas, podemos citar proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, polifenóis, fibras alimentares e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), sendo esses três últimos os mais fortemente relacionados à saúde intestinal (MORAES & COLLA, 2006).

2.1. Polifenóis

Os polifenóis são membros de uma família muito grande de componentes derivados de vegetais, englobando principalmente os flavonoides. Polifenóis são conhecidos por agirem como potentes antioxidantes sequestrando radicais livres,

como espécies reativas de oxigênio. Além disso também podem oferecer proteção indireta contra o estresse oxidativo através da ativação da transcrição de genes para enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante endógeno (ETXEBERRIA et al., 2013; IMPELLIZZERI et al., 2004).

A indução da expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante por polifenóis obtidos da dieta resulta principalmente da ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE), mediada por fatores de transcrição, que é encontrado na região promotora de muitos genes induzidos por alterações no estado redox (GUERRA et al., 2011).

Por outro lado, os polifenóis e seus metabólitos podem interferir no equilíbrio da microbiota intestinal, inibindo bactérias patogênicas. O consumo de vegetais ricos em flavonoides está associado com a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias (GUERRA et al., 2011; IMPELLIZZERI et al., 2004; ETXEBERRIA et al., 2013).

2.2. Ácidos graxos poliinsaturados

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) também desempenham um papel importante como compostos bioativos alimentares dentre eles pode-se incluir os ômega 3 e ômega 6. Sabe-se que uma composição equilibrada de PUFAs na alimentação é essencial para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, desempenhando um papel importante na prevenção e tratamento de doenças arteriais, hipertensão, doenças autoimunes, câncer, e outras condições inflamatórias (TEITELBAUM & WALKER, 2001).

Nos processos envolvidos no desenvolvimento da doença inflamatória intestinal,

os PUFAs são capazes de modular a resposta inflamatória e a resposta imune, através de efeitos sobre a transdução de sinais intracelulares, expressão de genes, fluidez da membrana celular, enrijecimento das junções intercelulares, inibição do crescimento de determinadas espécies de bactérias, proliferação e diferenciação das células epiteliais e inibição e modulação da produção e diferenciação de células imunes (TEITELBAUM & WALKER, 2001).

2.3. Prebióticos

Outro grupo importante de alimentos envolvido na manutenção da saúde intestinal são os prebióticos, alimentos ricos em fibras e amidos resistentes que atuam como substrato para a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por bactérias fermentativas no cólon, melhorando o desempenho da microbiota intestinal e estimulando os mecanismos de modulação da homeostase. Os AGCC são um subconjunto de ácidos graxos saturados de importantes efeitos tróficos para os colonócitos, sendo que deles se destaca o butirato, com ação anti-inflamatória e imunomoduladora, através de participação na modulação de genes envolvidos na diferenciação celular, apoptose e estagnação do ciclo de células prejudiciais e à inibição da expressão de citocinas inflamatórias (WONG et al. 2006; MORAES & COLLA, 2006; TAN et al., 2014; LEONEL & ALVAREZ-LEITE, 2012).

Devido a estes efeitos, vários prebióticos são potenciais produtos complementares para a prevenção e tratamento da DII em humanos, sendo que a espécie *Plantago ovata*, rica em fibras solúveis, apresenta importantes efeitos protetores em diferentes modelos experimentais de inflamação intestinal, assim como em ensaios clínicos (FERNANDEZ-BAÑARES et al., 1999; RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2002; RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2003; DAMASKOS & KOLIOS, 2008). Outros produtos com esta

atividade prebióticos já estudados são a inulina (HUDA-FAUJAN et al., 2010), polidextrose (WITAICENIS et al., 2010) e a lactulose (CAMUESCO et al., 2005).

Diversos estudos epidemiológicos demonstram que dietas ricas em frutos e hortaliças são responsáveis por menor incidência de doenças crônicas não transmissíveis, tais como obesidade, câncer, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Também demonstraram efeitos neuroprotetores, principalmente associados à ação antioxidante de compostos fenólicos, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo no cérebro. Muitos frutos de origem tropical são amplamente consumidos pela população, com grande valor nutricional e grande aceitabilidade tanto no mercado nacional como no internacional, especialmente devido a suas composições ricas em polifenóis, fibras, carboidratos complexos e lipídeos bioativos se apresentam como fontes de produtos com atividade prebiótica e antioxidante. Dentre estes frutos, podemos destacar as espécies de palmeiras como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e o buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), espécies com ampla distribuição, cultivo e ocorrência na região amazônica brasileira (TOLEDO et al., 2013; PITOZZI, 2010; MESSAOUDI et al, 2008).

2.4. Açaí

Mais conhecida como açaí, o *Euterpe oleracea* Mart. é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, nativa da América do Sul, crescendo principalmente na região Amazônica. Suas palmeiras fornecem principalmente madeira, palmito e pequenos frutos em cachos, que podem ser colhidos durante todo o ano, especialmente nos meses mais secos. Cada fruto possui uma semente grande em relação ao seu tamanho e em torno dela uma polpa fibrosa e uma casca fina, ambas utilizadas para o consumo como alimento, onde são normalmente preparadas na

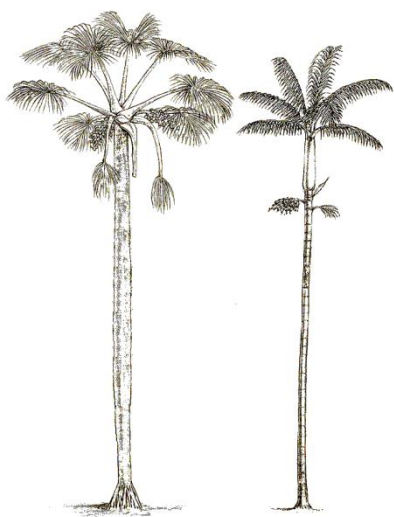
forma de um suco espesso que pode ser incorporado a uma grande variedade de bebidas e alimentos. Seu uso na medicina popular especialmente nas regiões norte e nordeste do país está relacionado com o tratamento de febre, dores, gripe e problemas gastrointestinais.

Diversos estudos a respeito das propriedades nutricionais e funcionais dos frutos do açaí destacaram a presença de altas quantidades de polifenóis, principalmente antocianinas, que conferem sua cor roxa intensa, ácido ascórbico, carotenoides, altas quantidades de ácidos graxos insaturados, especialmente das famílias ômega 3 e ômega 6 e fitosteróis. Além desses compostos a polpa do açaí também é rica em fibras, sugerindo um potencial prebiótico. São inúmeros os estudos que comprovam seus efeitos na diminuição do estresse oxidativo, efeitos anti-inflamatórios, antineoplásicos e imuno-estimulantes do açaí (SOUZA, 2010; KANG, 2011; KANG, 2012; CANUTO et al., 2010).

2.5. Buriti

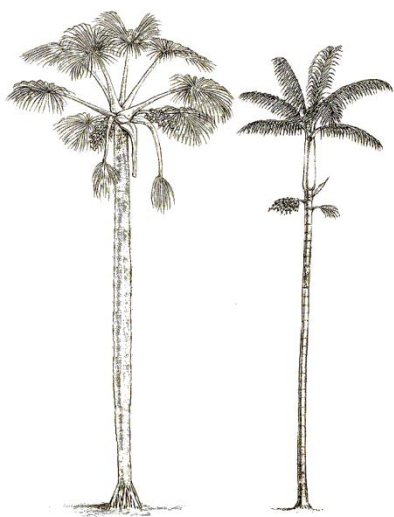
Conhecida como buriti, ou miriti, a *Mauritia flexuosa* L.f. é uma palmeira de amplo uso popular, devido ao fornecimento de madeira e folhas para a construção de casas e artesanato e do palmito e frutos utilizados de diversas formas na culinária. Seus frutos, predominantes nos meses de novembro e dezembro possuem formato globoso, e são constituídos de cerca de 50% de polpa, 5% de casca e 45% de semente. A polpa do fruto do buriti possui cor alaranjada, devido ao alto teor de carotenoides e é muito rica em vitamina A e lipídeos, sendo que seu óleo possui ampla utilização na culinária e na indústria cosmética. Dentre os ácidos graxos mais abundantes na polpa, podemos destacar a presença dos ácidos graxos poli-insaturados oleico, linoleico e linolênico, também conhecidos respectivamente por ômega 9, ômega 6 e ômega 3. Suas

propriedades antioxidantes foram relatadas em diversos estudos e são atribuídas principalmente à presença do beta caroteno e do tocoferol (vitamina E) (ALBUQUERQUE et al. 2003). A alta concentração de vitamina A mostrou-se eficaz no combate à xeroftalmia clínica e hipovitaminose A e a presença de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) faz do buriti uma importante fonte de estudos relacionados à imunomodulação e atividade anti-inflamatória, propriedades características desses compostos.



Objetivo

Avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal das dietas enriquecidas com os frutos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e do buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) na fase aguda do modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em ratos.



Material e Métodos

1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

1.1. Coleta

Os frutos foram obtidos no dia 8 de agosto de 2013, através de convênio com o Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, contando com o auxílio de professores e alunos do laboratório para o alojamento em Belém, transporte até os locais de coleta e extração das polpas.

Os frutos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) foram colhidos na propriedade do Projeto Paricuiã, com o auxílio de um funcionário do projeto, onde é cultivada a cultivar “BRS Pará”, desenvolvida pela Embrapa Amazônia Oriental. Os frutos do buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) foram coletados manualmente em uma pequena propriedade. Ambas as coletas foram realizadas no município de Terra Alta- PA.

1.2. Extração das polpas

A extração das polpas dos frutos coletados ocorreu no Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal do Pará, durante os 5 dias seguintes às coletas. O processo foi realizado manualmente de acordo com o conhecimento popular da região.

Os frutos do açaí, depois de lavados, foram mantidos durante cerca de 1 hora em água morna (40°C) para que fosse possível amolecer o mesocarpo e em seguida amassados com a ajuda de uma garrafa de vidro. A partir desse processo foi possível separar a polpa e a casca do caroço.

Os frutos do buriti foram mantidos em água a 44°C e conforme seu mesocarpo amolecia eram retirados da água, descascados e despulpados com o auxílio de uma colher. O processo de amolecimento variou de 1 a 3 dias, conforme o estágio de

madureza de cada fruto.

As polpas foram divididas em porções de 200g, armazenadas em sacos plásticos hermeticamente fechados e mantidas em freezer a -80°C até serem transportadas através de caixas de isopor para o Laboratório de Fitomedicamentos Farmacologia e Biotecnologia de Botucatu, onde novamente foram armazenadas em freezer a -80°C.

2. PREPARO DAS RAÇÕES

Para o preparo da ração enriquecida com açaí a 10% e da ração enriquecida com buriti a 10%, as polpas foram incorporadas manualmente à ração para roedores Nuvilab® pulverizada, baseando-se na técnica de diluição em série. O processo de preparo das rações foi realizado por 4 vezes ao longo do experimento para garantir a integridade e conservação das mesmas.

Depois de descongelada uma porção de cada polpa foi misturada ao pó de ração a uma proporção de 1:1 e a massa obtida foi sucessivamente acrescida de quantidades crescentes de ração até que, com o auxílio de uma peneira, se tornasse um pó de ração úmido com 10% de polpa. Essa técnica permitiu que se obtivesse o máximo de homogeneização possível.

Uma vez obtidos os pós das rações enriquecidas, foi iniciado o processo de peletização que consistiu em misturar o pó a uma pequena quantidade de água para que pudesse ser compactado e adicioná-lo à máquina peletizadora, cedida pelo Laboratório de Dietas Especiais da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu. As rações não enriquecidas, fornecidas aos grupos branco e controle, sofriram o mesmo processo de adição de água e posterior peletização. Os pelets foram mantidos em estufa a 50°C por 12 horas para a eliminação da umidade e

depois armazenados em sacos hermeticamente fechados para o uso diário na alimentação dos animais.

3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS DIETAS ENRIQUECIDAS

3.1. Animais

Ratos machos albinos Wistar de 180 a 220 g, adquiridos comercialmente da empresa Anilab®, foram utilizados para os testes de atividade anti-inflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia, localizado nas dependências do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências da UNESP, durante 10 dias antes do início dos experimentos. Após o início do experimento os animais ficaram alojados em caixas separados por grupos de 7, com 3 ou 4 animais por caixa, e foram alimentados com as rações produzidas e água corrente ad libitum por 38 dias. Este biotério dispõe de estantes climatizadas, com temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (Protocolo n. 42/04 – CEEA).

3.2. Grupos experimentais

Os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais:

- A. Grupo branco: animais saudáveis alimentados com a ração Nuvilab®
- B. Grupo controle: animais colíticos alimentados com a ração Nuvilab®
- C. Grupos Testes:

- a- animais colítricos alimentados com a ração Nuvilab® enriquecida em 10% da polpa de *Euterpe oleracea* Mart. (açaí)
- b- animais saudáveis alimentados com a ração Nuvilab® enriquecida em 10% da polpa de *Euterpe oleracea* Mart. (açaí)
- c- animais colítricos alimentados com a ração Nuvilab® enriquecida em 10% da polpa de *Mauritia flexuosa* L.f. (buriti)
- d- animais saudáveis alimentados com a ração Nuvilab® enriquecida em 10% da polpa de *Mauritia flexuosa* L.f. (buriti)

3.3. Avaliação da atividade comportamental

Os animais saudáveis submetidos às dietas enriquecidas com os frutos-teste, ao final dos 35 dias foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da atividade motora e ansiolítica dessas dietas. Para tal, foram realizados os seguintes testes:

A. Teste do Campo Aberto

Modelo utilizado para o estudo da emocionalidade e atividade locomotora dos animais segundo WALSH E CUMMINS (1976). O teste consiste em uma arena circular construída em acrílico branco com 97 cm de diâmetro e paredes com 32,5 cm de altura. A área foi dividida em 12 quadrantes periféricos e 6 centrais. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e permaneceram durante 5 minutos em movimentação livre, período no qual foram registrados o número de quadrantes percorridos, assim como o número de levantamentos (*rearings* – quando os animais ficam com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida pra cima, apoiados

nas patas posteriores). Enquanto o número de quadrantes percorridos é um indicador de ambulação espontânea, o número de levantamentos é indicador de comportamento exploratório. A arena foi limpa com água destilada entre os diferentes animais testados.

B. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) foi descrito para ratos por PELLOW e colaboradores (1985), sendo adequado para mensuração de ansiedade generalizada de roedores e usado extensivamente na descoberta de novos agentes ansiolíticos. O aparato do LCE consiste em dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados. Os braços abertos e fechados medem 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, e as paredes dos braços fechados têm 25 cm de altura. A altura em relação ao solo é de 50 cm. Os braços abertos são considerados aversivos a roedores devido à altura e ausência de proteção lateral. O protocolo experimental consistiu em colocar o animal no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados sendo-lhe permitido explorar livremente o aparelho por 5 minutos. Posteriormente, o aparelho foi limpo com pano embebido em água para colocação do próximo animal. Foi registrado o tempo de permanência em ambos.

Para a avaliação dos testes comportamentais foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

A. Grupos controles:

- a- controle negativo: animais alimentados com a ração Nuvilab® que receberam administração de solução salina via intraperitoneal

- b- controle positivo: animais alimentados com a ração Nuvilab® que receberam administração de solução de diazepam 1mg/kg via intraperitoneal

B. Grupos testes:

- a- Animais alimentados com a ração Nuvilab® enriquecida em 10% da polpa de *Euterpe oleracea* Mart. (açaí)
- b- Animais alimentados com a ração Nuvilab® enriquecida em 10% da polpa de *Mauritia flexuosa* L.f. (buriti)

3.4. Indução do processo inflamatório intestinal por administração retal de TNBS

Os animais foram submetidos às dietas enriquecidas contendo, em cada grupo, a polpa de um dos frutos na ração em uma proporção de 10% durante 35 dias.

Após esse período foi realizada a indução do processo inflamatório pelo método descrito por MORRIS et al., (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas e posteriormente anestesiados com éter etílico por inalação em cuba de vidro fechada. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2 mm, pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm) de 0,25 mL de uma solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório.

3.5. Avaliação clínica e macroscópica do processo inflamatório intestinal

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral, tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas. 48 horas após a indução os animais foram mortos, os cólons extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos. Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por BELL et al., 1995.

Tabela 1. Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.

Escala	Critério
0	Sem danos
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o dano cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (a escala é aumentada em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 7 fragmentos longitudinais que foram pesados e congelados separadamente em freezer a -80°C para a realização das avaliações bioquímicas posteriormente.

3.6. Avaliações bioquímicas relacionadas à atividade anti-inflamatória intestinal

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica, sendo que a homogeneização foi realizada a frio durante

aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflón e um recipiente de vidro de 10 ml de capacidade. Nas análises bioquímicas foram avaliados os seguintes parâmetros:

A. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de KRAWISZ et al., (1984) e os resultados expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C A atividade da mieloperoxidase se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

B. Determinação da atividade da enzima fosfatase alcalina

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos clássicos descritos por SMITH et al., (1985) e BESSEY et al., (1946), respectivamente.

C. Determinação do conteúdo de glutathiona total

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por ANDERSON (1985), que está baseado na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra à sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente.

O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu consequente incremento de absorbância a

412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido.

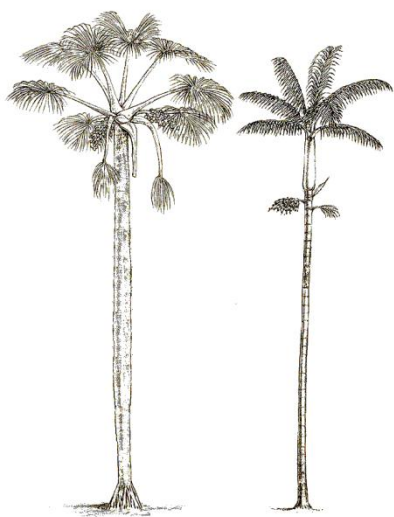
3.7. Avaliação microscópica das amostras de cólon

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico, amostras de tecido (0,5mm) adjacentes à área de lesão foram coletadas para processamento histológico com o auxílio de uma lâmina. Essas amostras foram fixadas em Alfac por 24 horas, desidratadas em série alcoólica etílica crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec- Pastilhas (Merck-11609) e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6 micrômetros de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando série alcoólica etílica decrescente. A seguir, as amostras foram submetidas à coloração em eosina-hematoxilina para a análise morfológica das lesões.

As lâminas histológicas foram observadas e microfotografadas com o microscópio de luz Zeiss Axio Imager A2, nos aumentos de 2,5x e 5x.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo que nas análises comportamentais os testes também foram seguidos por teste de Mann-Whitney. Dados descontínuos foram analisados pelo teste X². Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.



Resultados e Discussão

1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta do *E. oleracea* (açaí) forneceu cerca de 22 kg de frutos inteiros que foram utilizados para a extração da polpa. O processo de extração manual rendeu 2,5 kg de polpa, o que caracteriza um rendimento global de 11% em relação ao peso fresco.

A coleta do *M. flexuosa* (buriti) forneceu cerca de 15 kg de frutos inteiros, que renderam 3,0 kg de polpa, caracterizando um rendimento global de 20%.

Ambas as polpas extraídas foram armazenadas em freezer a -80°C.

2. PREPARO DAS RAÇÕES

O processo de preparo das rações a serem administradas aos animais foi realizado 4 vezes (em intervalos de 10 a 15 dias) para que não houvesse risco de contaminação e/ou oxidação com consequente perda de suas propriedades nutricionais. Ao todo foram produzidos 11,5 kg de ração de açaí e 10,8 kg da ração de buriti tendo sido utilizados aproximadamente 1,2 kg de polpa de açaí e 1,0 kg de polpa de buriti. As rações foram armazenadas em sacos hermeticamente fechados e eram diariamente pesadas e introduzidas nas gaiolas dos animais.

3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS DIETAS ENRIQUECIDAS

3.1. Avaliação comportamental das dietas enriquecidas

As respostas comportamentais que caracterizam a percepção psíquica da ansiedade são um aumento da vigilância, tensão motora e hiperatividade autônoma, alterações associadas a um estado de excitabilidade em excesso do sistema nervoso central e/ou prejuízo dos sistemas GABAérgico, serotoninérgico (5-HT) e noradrenérgico. Fármacos benzodiazepínicos atuam nos receptores GABAérgicos,

facilitando o acoplamento do GABA aos seus receptivos receptores, suprimindo a excitabilidade dos neurônios, o que caracteriza uma ação ansiolítica. Dessa forma os benzodiazepínicos como o diazepam são amplamente utilizados no tratamento de transtornos de ansiedade e como droga padrão (controle) em testes que visam a detecção de tal atividade (CARLINI & MENDES, 2011).

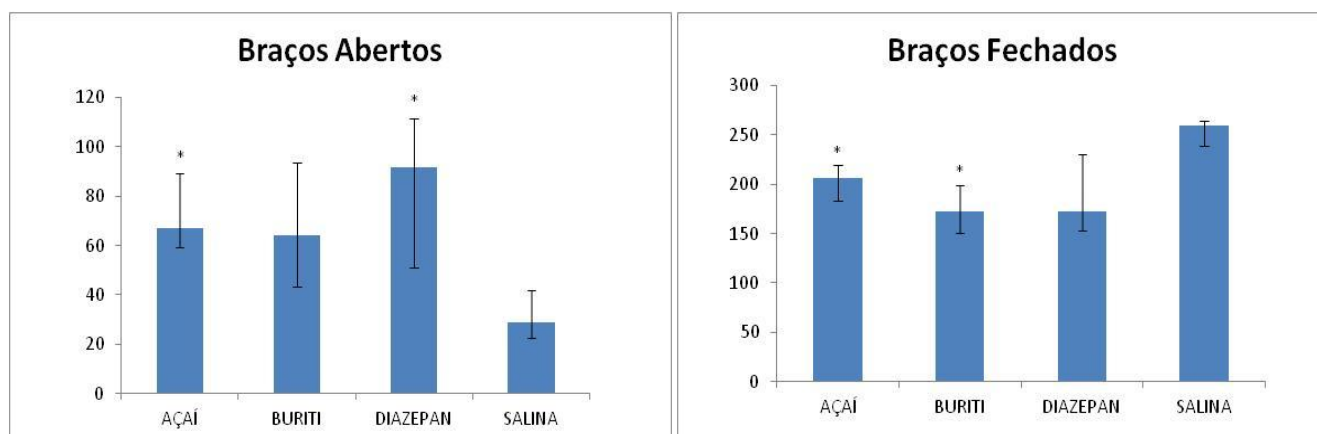
O Teste de Campo Aberto tem como princípio submeter o animal a um ambiente desconhecido e, entre outros fatores, permite avaliar a capacidade locomotora e exploratória dos animais, além de também descartar qualquer tipo de efeito sedativo, o que pode interferir nos resultados de outros testes complementares, como o labirinto em cruz. O Teste do Labirinto em Cruz Elevado por sua vez é amplamente utilizado para avaliar substâncias com ação ansiolítica ou ansiogênica sobre a atividade exploratória dos roedores. Ele é baseado no medo inato que esses animais apresentam de espaços abertos, o que se apresenta significativamente reduzido em animais sob efeito de substâncias ansiolíticas (CARLINI & MENDES, 2011).

Grupo	Nº de Quadrantes	Nº de Levantamentos
Controle Negativo (salina)	78 (74,75 - 85)	33 (21 - 45,5)
Controle Positivo (diazepam)	86 (80,5 - 104,75)	30 (24,5 - 43,5)
Açaí	54,5 (47 - 89,25)	31 (27,25 - 37,5)
Buriti	62 (49 - 75,25)	44 (29,25 - 50,5)

Tabela 1: Número de quadrantes percorridos e levantamentos no Teste do Campo Aberto. Dados expressos em mediana (intervalo).

Durante o teste do campo aberto não foram observadas alterações/dificuldades de locomoção, em nenhum dos grupos sendo que todos os animais apresentaram capacidade ambulatoria, indicada pelo número de quadrantes percorridos, e

comportamento exploratório, avaliada a partir do número de levantamentos.



Figuras 1 e 2: tempo de permanência dos animais nos braços abertos e fechados, respectivamente. Dados expressos em mediana (intervalo) comparados com o grupo controle negativo (salina), onde * $p < 0,05$.

No teste do labirinto em cruz elevado foram avaliados os tempos de permanência nos braços abertos e nos braços fechados. O grupo de animais submetidos à dieta enriquecida com a ração de açaí permaneceu um tempo significativamente maior nos braços abertos e menor nos braços fechados, quando comparados ao grupo que recebeu solução salina (controle). Considerando-se a capacidade locomotora dos animais e a ausência de efeito sedativo, esses resultados indicam efeito ansiolítico da dieta de açaí.

Os estudos correlacionando a atividade ansiolítica com os principais compostos da polpa de açaí são ainda muito escassos. No entanto há alguns indicativos de potencial efeito ansiolítico mediado pelo sistema GABAérgico de flavonoides, como indicado por Guaraldo (2010), e de efeito relacionado também com o consumo de ômega 3 na melhora dos transtornos de humor, cujos mecanismos são parcialmente semelhantes à ansiedade (ROSS et al., 2009). Sendo assim há uma grande necessidade em se estudar mais detalhadamente o efeito dessas substâncias no comportamento da ansiedade

visando analisar os mecanismos pelos quais a polpa do açaí pode estar atuando.

Os animais submetidos à dieta enriquecida com a polpa de buriti não apresentaram tempo significativamente maior de permanência nos braços abertos, porém permaneceram significativamente menos tempo nos braços fechados. Isso é devido a um tempo maior de permanência na região central do labirinto, que juntamente com os braços fechados indica uma tendência dos animais a se protegerem e caracteriza o comportamento de ansiedade.

3.2. Avaliação clínica e macroscópica do processo inflamatório intestinal

De acordo com a avaliação do consumo de alimento não houve alterações significativas do consumo de ração ao longo do experimento, tampouco entre os grupos experimentais (Figura 3), a não ser a queda de consumo em todos os grupos experimentais após a indução da inflamação pela administração do TNBS.

Os animais do grupo branco (não colítico) restabelecem normalmente o consumo após o jejum e diferem estatisticamente na quantidade de alimento ingerida quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais que se alimentaram com a ração de buriti foram os que restabeleceram melhor a ingestão de alimento após a indução, seguidos pelo grupo alimentado com a ração de açaí e por último o grupo controle. Como o processo inflamatório causa dor abdominal e desconforto nos animais, a queda do consumo de alimento é esperada após a administração do TNBS (CAMPOS et al., 2002).

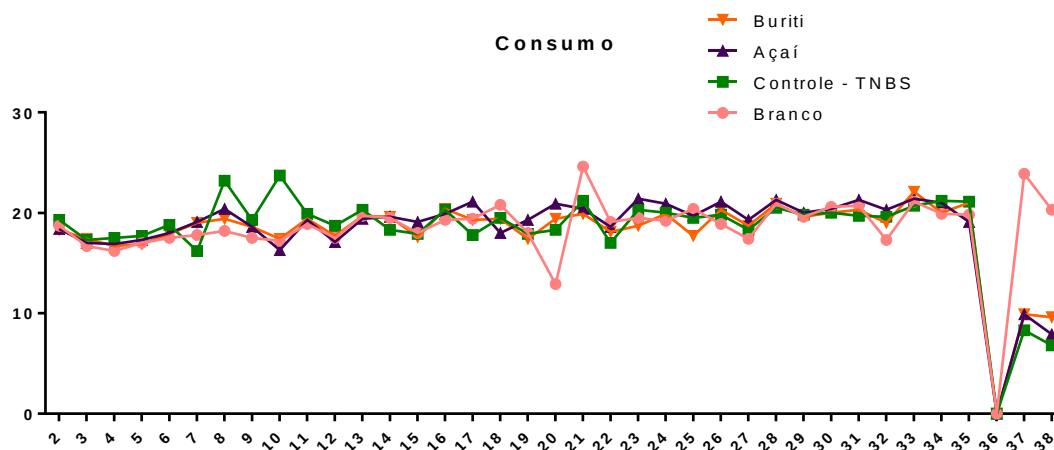


Figura 3. Avaliação do consumo de ração por grupo, em animais submetidos à dieta enriquecida pelos frutos de açai e buriti no modelo experimental preventivo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em consumo/ número de animais.

Durante todo o experimento os animais foram pesados diariamente e, a partir dos registros pode-se notar que houve um ganho de peso gradual e muito semelhante em todos os grupos (Figura 4), o que é natural perante a idade dos animais. Após a fase de jejum pré-indução apenas os animais do grupo branco restabeleceram o peso anterior. Os grupos experimentais que receberam a ração de açai e de buriti e o grupo controle não conseguiram restabelecer o peso após a administração do TNBS, apresentando inclusive uma diminuição gradual do peso corpóreo ao longo do dois dias que sucederam o processo de indução da inflamação. Essa queda de peso é uma consequência da queda de consumo de alimento associada às dores abdominais e à incidência de diarreia.

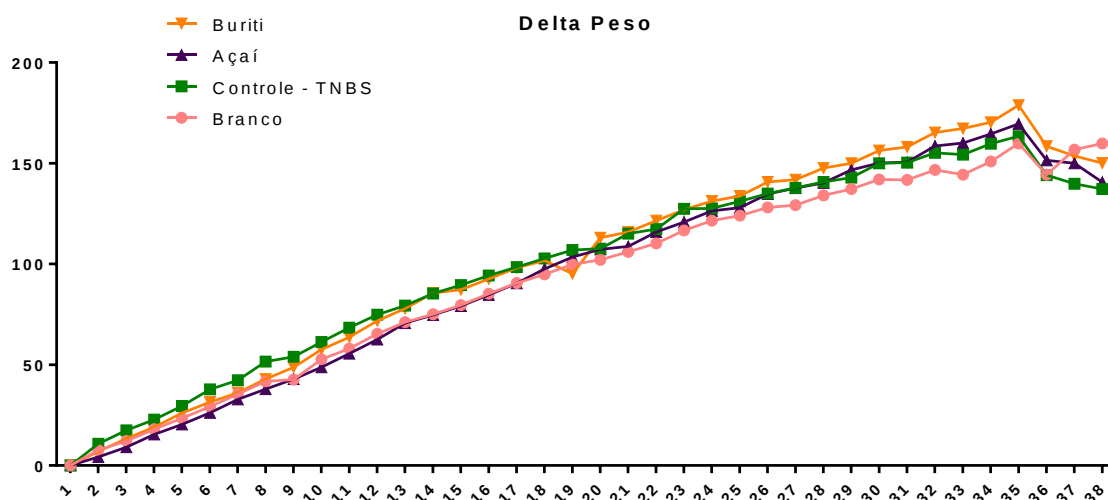


Figura 4. Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos à dieta enriquecida pelos frutos de açaí e buriti no modelo experimental preventivo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em média do (Peso final - peso inicial) comparados com o grupo controle TNBS.

Os resultados de escore macroscópico, extensão da lesão, relação peso comprimento do cólon e ocorrência de diarreia e aderência estão apresentados na Tabela 2.

A administração de TNBS promove a inflamação do epitélio colônico que, após 48 horas fica evidenciada com o aparecimento de necrose na camada mucosa, estendendo-se por 3.8 – 5.8 cm ao longo do cólon, e promovendo espessamento e hiperemia na parede intestinal. O escore macroscópico classifica essas características em uma numeração de 1 a 10, sendo que apesar dos escores dos grupos submetidos às dietas de açaí e buriti terem sido menores que o escore do grupo controle (9 e 8 vs. 9), não houve diferenças significativas entre as medianas.

Analisando a relação peso/comprimento dos cólons (mg/cm) os animais do grupo controle apresentaram uma relação de $172.4 \pm 8,61$ vs. 90.46 ± 2.51 do grupo branco, com diferença estatística de $p < 0,0001$. No entanto nenhum dos dois grupos experimentais submetidos às dietas diferiu significativamente do grupo controle.

Em relação à extensão da lesão, nenhum dos grupos experimentais apresentou diferença significativa em comparação com o grupo controle que apresentou uma média de $4,25 \pm 0,32$ cm.

O aumento de peso do tecido danificado está diretamente relacionado à severidade da lesão e, conseqüentemente, à sua extensão e escore macroscópico. Esses parâmetros de maiores dimensões dificilmente são alterados por intervenções farmacológicas, principalmente se considerarmos a severidade do modelo de indução por TNBS e o caráter preventivo dos experimentos com os alimentos (RACHMILEWITZ et al., 1989; VELJACA et al., 1995).

Devido à necrose tecidual causada pela inflamação, há uma perda drástica da capacidade absorviva do cólon, o que resulta na ocorrência de diarreia, um dos principais sintomas da doença inflamatória intestinal. A indução da inflamação por TNBS não só ocasiona necrose tecidual como esta se manifesta em todas ou quase todas as camadas da parede colônica, resultando em uma inflamação transmural, característica da doença de Crohn, e ocasionando aderência do cólon aos órgãos adjacentes (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2002; LEVINE, 1994).

Todos os animais dos grupos experimentais submetidos à indução por TNBS apresentaram diarreia nos dias seguintes à indução e aderência aos órgãos adjacentes. Apesar da incidência de 100% de diarreia, a aparência e consistência das fezes dos grupos submetidos às dietas enriquecidas com açaí e buriti foram notadamente diferentes ao grupo controle. Os animais apresentaram fezes mais consistentes, com odor menos acentuado e coloração diferente.

Tabela 2: Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos da dieta enriquecida pelos frutos de açaí e buriti no modelo experimental preventivo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos

Grupo	Escore (0-10) ^a	Lesão (cm) ^b	Relação Peso/comprimento (mg/cm) ^b	Diarreia (%) ^c	Aderência (%) ^c
Branco	0***	0****	90.46 ± 2.51****	0*	0*
Controle	9 (7-10)	4,25 ± 0,32	172.4 ± 8,61	100%	100%
Açaí	9 (7-10)	4.27 ± 0,24	180,4 ± 8,03	100%	100%
Buriti	8 (4-9)	3.71 ± 0,39	171,0 ± 8,29	100%	100%

^a Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), ^b extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M. onde * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ****p<0,0001 comparados ao grupo controle.

3.3. Avaliação microscópica das amostras de cólon

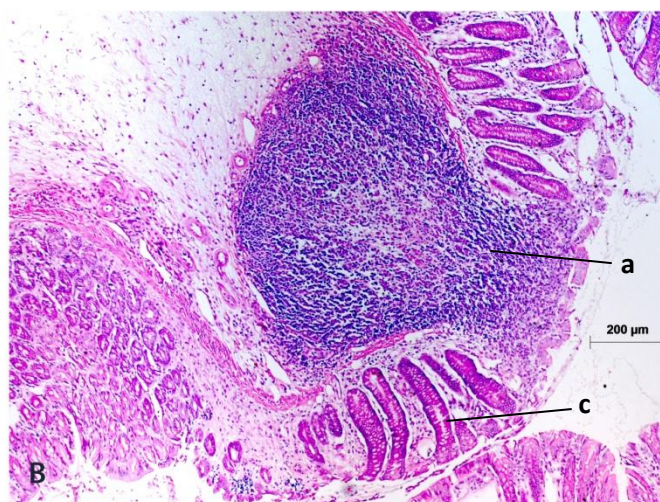
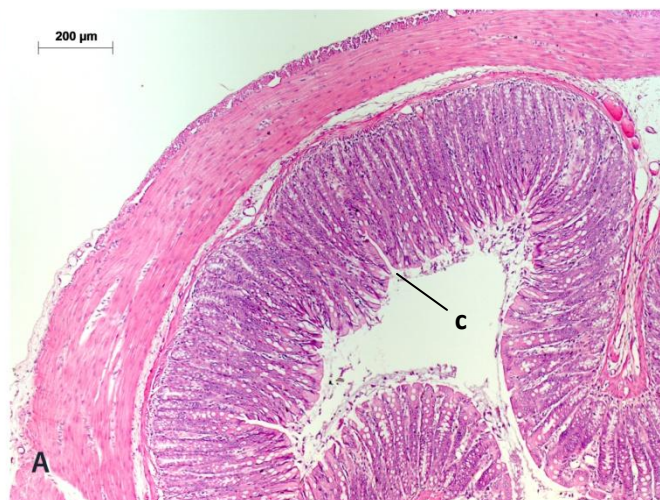
A doença inflamatória intestinal é caracterizada por uma infiltração acentuada na lâmina própria e na mucosa de células imunes como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e monócitos, associada a danos no epitélio colônico com consequentes ulcerações, edemas, aumento da permeabilidade da mucosa e deformação da conformação das glândulas e respectivas criptas (ABRAHAM & CHO, 2009; MAGRO et al. 2013).

A análise histológica mostrou que os animais do grupo controle apresentaram diâmetro do cólon e espessura da parede colônica consideravelmente aumentados devido a edemas e infiltrados de células, além de vilosidades menos acentuadas indicando dano e desestruturação epitelial (Figura 6). Nas fotomicrografias é possível identificar a presença de edema (moderado a severo), infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria e casos de ulceração severa da mucosa. No aumento de 5x pode-se observar glândulas com criptas mais abertas e com grande quantidade

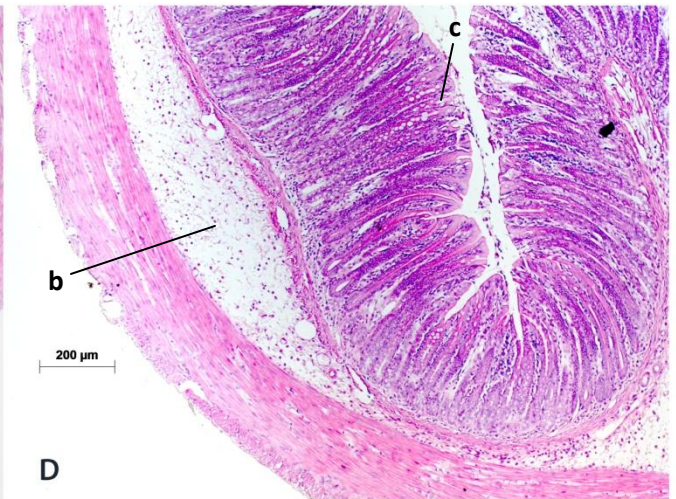
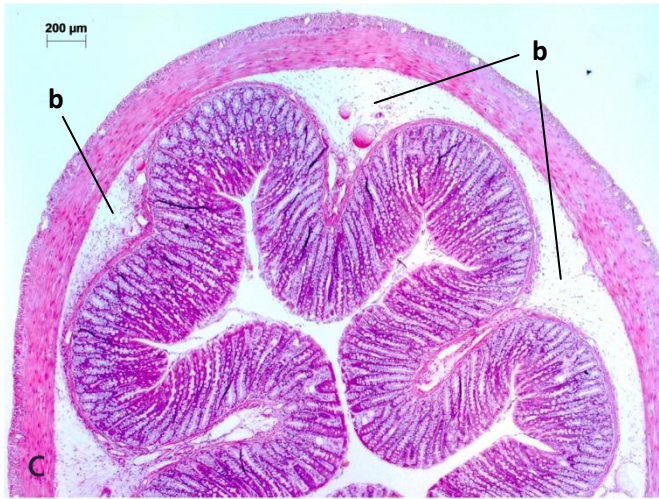
de células caliciformes.

Nos grupos de animais alimentados com a ração de açai e com a ração de buriti há, em relação ao grupo controle, uma presença de edemas moderados (mais brandos) na submucosa, menor presença de infiltrado inflamatório, pouca presença de ulceração, na maioria nenhuma, glândulas mais organizadas com criptas mais fechadas e menor presença de células caliciformes. Além disso, é possível notar uma menor espessura da parede e um menor diâmetro dos cólons, com vilosidades mais acentuadas (Figuras 7 e 8).

A melhora dos parâmetros microscópicos pode confirmar outros dados que indiquem atividade anti-inflamatória das dietas enriquecidas.



Figuras 5 e 6: Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos grupos **Branco (A)** e **Controle (B)** dois dias após a administração de TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias feitas com microscópio óptico Zeiss Axio Imager A2, nos aumentos de 2,5x e 5x, respectivamente. Grupo controle com ulceração severa com infiltrado inflamatório, presença de edema severo e glândulas com criptas aumentadas. As setas indicam: (a) ulceração severa, (b) edema e infiltrado de células na submucosa (lâmina própria), (c) criptas das glândulas.



Figuras 7 e 8: Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos grupos **Açaí (C)** e **Buriti (D)** dois dias após a administração de TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias feitas com microscópio óptico Zeiss Axio Imager A2, nos aumentos de 2,5x e 5x, respectivamente. Em ambos há uma presença de menor infiltrado inflamatório, edemas menores, ausência de ulcerações, glândulas mais organizadas e criptas menos abertas. As setas indicam: (b) edema e infiltrado de células na submucosa (lâmina própria), (c) criptas das glândulas.

3.4. Avaliações bioquímicas relacionadas à atividade anti-inflamatória intestinal

Após a administração do TNBS, os mediadores inflamatórios estão em grande atividade, o que fica evidente ao se observar o grupo controle vs. grupo branco na avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (Figura 10) e fosfatase alcalina (Figura 11). Além disso, durante a inflamação também há uma diminuição significativa do conteúdo de glutathione colônica (Figura 9).

O influxo de células inflamatórias na mucosa do intestino é responsável pela mediação da lesão tecidual durante o processo inflamatório. Uma vez que a barreira epitelial está danificada, permite-se a entrada de bactérias patogênicas provenientes do lúmen na submucosa e o consequente extravasamento de granulócitos, iniciando-se uma cascata de resposta imune. A ativação dessas células fagocitárias no cólon leva à produção de mediadores químicos inflamatórios e à produção de radicais livres, principalmente as espécies reativas de oxigênio (REZAIE, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas e subprodutos naturais do metabolismo do oxigênio. Tecidos vitais possuem mecanismos endógenos de defesa antioxidante, como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase, que em condições normais são capazes de combater as EROs na mucosa intestinal. No entanto, em um processo inflamatório, com o aumento da demanda por antioxidantes endógenos há um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, gerando o estresse oxidativo, que está associado ao aumento de lesões teciduais, diminuição dos níveis de glutathione nos tecidos e ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, contribuindo com o

desenvolvimento da inflamação (IMPELLIZZERI, 2014; REZAIE, 2007).

Sendo assim, uma estratégia importante durante o tratamento da doença inflamatória intestinal é inibir os radicais livres, interferindo na produção de enzimas que agem na sua produção, sequestrando radicais livres já produzidos ou aumentando a produção de compostos antioxidantes (DRYDEN et al., 2005).

Dentre os diversos antioxidantes endógenos conhecidos, a glutathiona (GSH) é um dos mais importantes e abundantes, sendo fortemente estudado no desenvolvimento do processo inflamatório intestinal. A depleção dos níveis de glutathiona colônica vem sendo diretamente associada ao estresse oxidativo e a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças gastrointestinais (OPARA, 2006).

A GSH em sua forma reduzida possui um grupo sulfidril capaz de sequestrar radicais livres, atuando na proteção contra EROs e citocinas pró inflamatórias. Ao entrar em contato com radicais livres, a GSH entra em sua forma oxidada (GSSG), sequestrando essas moléculas reativas em um processo catalisado pela enzima glutathiona peroxidase (GPx). Para a manutenção dos níveis de GSH, deve haver um processo de recuperação da forma reduzida, realizado pela enzima glutathiona redutase que reduz a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH. Esse equilíbrio entre sua utilização e síntese pode ser abalado por condições de maior oxidação, típicas do processo inflamatório intestinal e levando ao estresse oxidativo. Dessa forma, a intensidade do estresse oxidativo pode ser medida pela dosagem da glutathiona total, que é a soma dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (LOGUERCIO et al., 2003).

No estudo realizado com a administração prévia de rações enriquecidas com os frutos do açaí e do buriti, ambas as dietas foram capazes de evitar a depleção dos

níveis de glutathiona colônica total (Figura 9). Esses resultados podem estar relacionados com a grande presença de polifenóis nos frutos estudados, especialmente no açaí. Sabe-se que polifenóis, como os flavonoides, podem ser eficazes na diminuição da progressão de processos inflamatórios por diversos mecanismos, dentre eles o sequestro de espécies reativas de oxigênio. Além dos polifenóis, as altas concentrações de tocoferol (vitamina E) no buriti também podem estar relacionadas com esses resultados já que o mesmo também reage com espécies reativas de oxigênio, impedindo principalmente a peroxidação lipídica, doando H^+ para os radicais produzidos e evitando danos às proteínas e bases nitrogenadas do DNA (IMPELLIZZERI, 2014). Esses mecanismos antioxidantes podem contribuir fortemente para um menor recrutamento da GSH, e assim uma menor depleção de seus níveis.

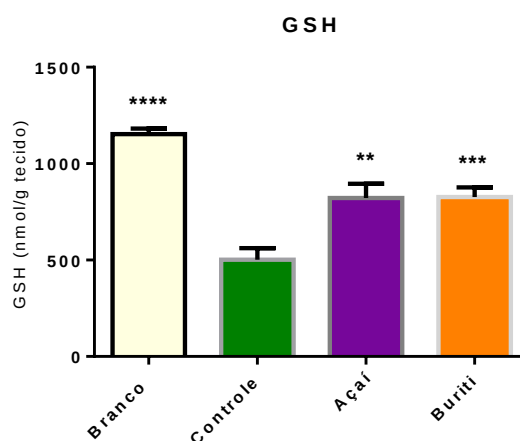


Figura 9: Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos à dieta enriquecida pelos frutos de açaí e buriti no modelo experimental preventivo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. com $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

As avaliações bioquímicas também mostraram que ambas as dietas do açaí e do buriti foram capazes de diminuir a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (Figura 10).

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e macrófagos que catalisa a conversão de cloreto e peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, espécie reativa de oxigênio conhecida por promover desequilíbrio associado a danos em importantes estruturas biológicas, ativando as metaloproteinases de matriz (MMPs) e desativando seus inibidores (TIMPs), que promovem o enfraquecimento da camada fibrosa que leva à desestruturação tecidual. Em adição a MPO está relacionada com processos de oxidação lipídica e consumo de óxido nítrico de origem endotelial, reduzindo sua biodisponibilidade e prejudicando suas propriedades vasodilatadoras e anti-inflamatórias (KARAKAS & KOENIG, 2012).

Dessa forma, a redução da atividade da enzima além de sugerir uma atividade antioxidante do produto, pode indicar uma atividade anti-inflamatória, visto que a MPO está envolvida no processo de migração de neutrófilos para o tecido colônico (LORIA, 2008; DHIMAN, 2009). Devido às altas concentrações de polifenóis na polpa de açaí e buriti, além da grande concentração de tocoferol (vitamina E) no buriti, essa redução da atividade da MPO pode estar relacionada à presença desses potentes antioxidantes. Outro fator importante a se considerar é que as propriedades prebióticas desses frutos também podem estar envolvidas na diminuição do processo inflamatório e assim na diminuição da migração de neutrófilos.

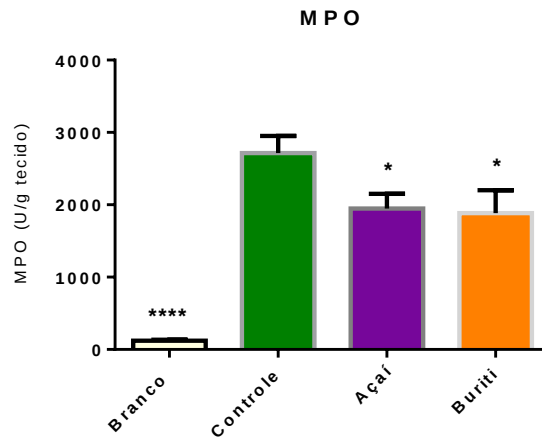


Figura 10: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos à dieta enriquecida pelos frutos de açaí e buriti no modelo experimental preventivo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. com $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Outra análise que pode contribuir para a indicação de atividade anti-inflamatória é a atividade da enzima fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma enzima que possui capacidade de quelar grupos fosfato de uma série de moléculas, em pH alcalino. No intestino ela está presente na membrana com borda em escova dos enterócitos, participando do processo de absorção de nutrientes e em células da lâmina própria, como neutrófilos. Fisiologicamente sua função não é totalmente conhecida, mas sabe-se que seu teor fica aumentado durante a inflamação (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2002; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004).

Nos animais submetidos tanto à dieta enriquecida com açaí como à dieta de buriti houve uma redução significativa da atividade da fosfatase alcalina (Figura 11), reforçando os potenciais anti-inflamatórios desses frutos.

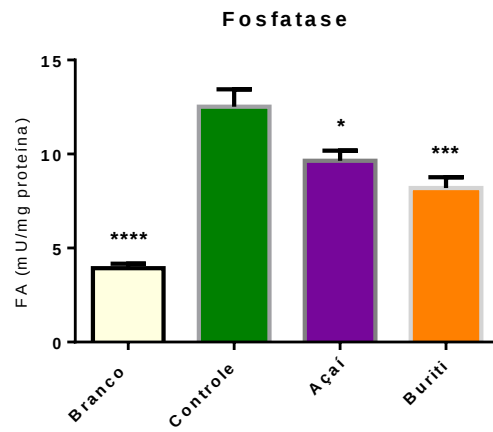
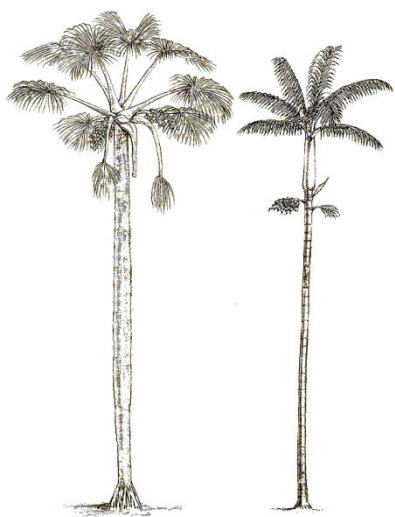


Figura 11: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos à dieta enriquecida pelos frutos de açai e buriti no modelo experimental preventivo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. com $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.



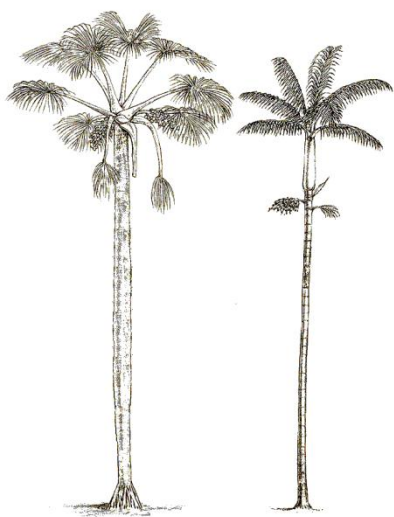
Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A adição de 10% das polpas dos frutos *Euterpe oleracea* Mart. (açai) e *Mauritia flexuosa* L.f. (buriti) na dieta promoveu efeito anti-inflamatório intestinal em ratos associado à diminuição do estresse oxidativo, como evidenciado pela diminuição da atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina e redução da depleção de glutathiona colônica;

- A adição de 10% da polpa de *Euterpe oleracea* Mart. (açai) na dieta apresentou efeito ansiolítico em ratos;

- Sugere-se que os efeitos observados estão relacionados com a presença de antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados nas polpas testadas, além de um potencial prebiótico das mesmas, o que necessita ainda de estudos adicionais.



Referências Bibliográficas

ABRAHAM, C. & CHO, J. H. Inflammatory Bowel Disease. New England Journal of Medicine, v. 361, n. 20, p. 66-78, 2009.

ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA JR., P.; MOREIRA, S. G. C. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. Vibrational Spectroscopy, v. 33, p. 127-131, 2003.

ANDERSEN, V.; OLSEN, A.; CARBONNEL, F.; TJØNNELAND, A.; VOGEL, U. Diet and risk of inflammatory bowel disease. Digestive and Liver Disease, v. 44, p. 185-94, 2012.

BAUER, C.; DUEWELL, P.; MAYER, C.; LEHR, H. A.; FITZGERALD, K. A.; DAUER, M.; TSCHOPP, J.; ENDRES, S.; LATZ, E.; SCHNURR, M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. Gut., p. 1- 8, 2010.

BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. American Journal of Physiology, v. 268, p. 622-630, 1995.

BERNSTEIN, C. N.; FRIED, M.; KRABSHUIS, J. H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R.; FEDAIL, S.; GEARRY, R.; GOH, K. L.; HAMID, S.; KHAN, A. G.; LEMAIR, A. W.; MALFERTHEINER, OUYANG, Q.; REY, J. F.; SOOD, A.; STEINWURZ, F.; THOMSEN, O. O.; THOMSON, A.; WATERMEYER, G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010. Inflammatory Bowel Disease, v. 16, n. 1, 2010.

BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROOK, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of seru. Journal of Biological Chemistry, v. 164, p. 321-329, 1946.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. Revista Brasileira de Coloproctologia, v. 23, n. 3, p. 172-182, 2003.

BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nature Reviews Immunology, v. 3, p. 521-533, 2003.

BRANDI, M. T.; RIBEIRO, M. S.; CHEBLI, L. A.; FRANCO, M. B.; PINTO, A. L.; GABURRI, P. D.; ZANINI, A.; CHEBLI, J. M. Psychological distress in Brazilian Crohn's disease patients: Screening, prevalence, and risk factors. Medical Science Monitor, v. 15, n. 8, 2009.

CAMPOS, F. G.; WAITZBERG, D. L.; TEIXEIRA, M. G.; MUSCERINO, D. R.; HABRAGAMA, A.; KISS, D. R. Inflammatory bowel diseases, principles of nutritional therapy. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. v. 57, n. 4, p. 187-198, 2002.

CAMUESCO, D.; PERAN, L.; COMALADA, M.; NIETO, A.; DI STASI, L. C.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Preventative Effects of Lactulose in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. Inflammatory Bowel Disease, v. 11, n. 3, 2005.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CARLINI, E. A. & MENDES, F. R. Protocolos em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.

COLLINS, S. M. & CROITORU, K. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: effect of inflammation on intestinal function. In: Targan SR, Shanahan F (eds). Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 194-209, 1994.

DAMASKOS, D.; KOLIOS, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 65, p. 453–467.

DHIMAN, M.; ESTRADA-FRANCO, J. G.; PANDO, J. M.; RAMIREZ-AGUILAR, F. J.; SPRATT, H.; VAZQUEZ-CORZO, S.; PEREZ-MOLINA, G.; GALLEGOS-SANDOVAL, R.; MORENO, R.; GARG, N. J. Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 660–666, 2009

DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Planta Medica*, v. 70, p. 315–320, 2004.

DRYDEN, G. W.; DEACIUC, I.; ARTEEL, G.; MCCLAIN, C. J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Current Gastroenterology Reports*, v. 7, p. 308–316, 2005.

ETXEBERRIA, U.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MILAGRO, F. I.; AGUIRRE, L.; MARTÍNEZ, J. A.; PORTILLO, M. P. Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 9517–9533, 2013.

FORBES, A.; GOLDESGEYME, E.; PAULON, E. Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 35, n. 5, p. 571–580, 2011.

FRUET, A. C.; SEITO, L. N.; RALL, V. L. M.; DI STASI, L. C. Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia* L.) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, n. 62, p. 1472–6882, 2012.

GEIRNAERT, A.; STEYAERT, A.; EECKHAUT, V.; DEBRUYNE, B.; ARENDS, J. B. A.; VAN IMMERSEEL, F.; BOON, N.; VAN DE WIELE, T. *Butyricicoccus pullicaecorum*, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions. *Anaerobe*, v. 30, p. 70–74, 2014.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 31, p. 83–86, 1996.

GUARALDO, L.; CHAGAS, D. A.; KONNO, A.C.; KORN, G.P.; PFIFFER, T.; NASELLO, A.G.; Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 61–67, 2000.

GUERRA, J. F. C.; MAGALHÃES, C. L. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. v. 49, n. 3, p. 188–194, 2011.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 6, n. 4, p. 295–308, 2013.

HART, L.; HENDY, P. The microbiome in inflammatory bowel disease and its modulation as a therapeutic manoeuvre. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 73, p. 452–456, 2014.

HUDA-FAUJAN, N.; ABDULAMIR, A. S.; FATIMAH, A. B.; MUHAMMAD ANAS, O.; SHUHAIMI, M.; YAZID, A. M.; LOONG, Y.Y. The Impact of the Level of the Intestinal Short Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease Patients Versus Healthy Subjects. *The*

Open Biochemistry Journal, v. 4, p. 53-58, 2010.

IMPELLIZZERI, D.; BRUSCHETTA, G.; DI PAOLA, R.; AHMAD, A.; CAMPOLO, M.; CUZZOCREA, S.; ESPOSITO, E.; NAVARRA, M. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*, p. 1-9, 2014.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OUB, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*, v. 133, p. 671-677, 2012.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WUB, T.; WUA, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities *Food Chemistry*, v. 128, p. 152-157, 2011.

KARAKAS, M.; KOENIG, W. Myeloperoxidase Production by Macrophage and Risk of Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, v. 14, n. 3, p. 277-83, 2012.

KARP, S. M. & KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis. Mon.*, v. 52, p. 199-207, 2006.

KOLOSKI, N. A.; BRET, L.; RADFORD-SMITH, G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 2, p. 165-173, 2008.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. *Gastroenterology*, v. 87, p. 1344- 1350, 1984.

LEONEL, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Butyrate: implications for intestinal function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 15, n. 5, p. 474-479, 2012.

LEVINE, A. D. Apoptosis: implications for inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 6, n. 3, p. 191-205, 2000.

LEVINE, D. S. Clinical features and complications of Crohn's disease. In: *Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside*. TARGAN, S.R., SHANAHAN, F. eds., p 478-486, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and Liver Disease.*, v. 35, p. 635-641, 2003.

LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L.M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators of Inflammation*, doi:10.1155/2008/135625, 2008.

MAGRO, F.; LANGNER C.; DRIESSENC, A.; ENSARI, A.; GEBOES, K.; MANTZARIS, G. J.; VILLANACCI, V.; BECHEANUH, G.; BORRALHO NUNES, P.; CATHOMAS, G.; FRIES, W.; JOURET-MOURIN, A.; MESCOLI, C.; DE PETRIS, G.; RUBIOO, C. A.; SHEPHERDP, N. A.; VIETH M.; ELIAKIMR, R. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 7, p. 827-851, 2013.

MAGRONE, T.; JIRILLO, E. The Interplay between the Gut Immune System and Microbiota in Health and Disease: Nutraceutical Intervention for Restoring Intestinal Homeostasis. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, p. 1329-1342, 2013.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *Journal of Gastroenterology*, v. 45, p. 9-16, 2010.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições legislação e benefícios a saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, p. 109-122,

2006.

MORRIS, G. P.; BECK, P.L.; HERRIDGE W.; DEPEW, W.; SZCEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, v. 96, p. 795-803, 1989.

NAVARRO, F. & HANAUER, S. B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 98, n. 12, 2003.

NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, v. 136, p. 65–80, 2009.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J.-F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 160, p. 1–9, 2010.

OPARA, E. C. Oxidative Stress, *Dis. Mon.* v. 52, p. 183-198, 2006.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PITOZZI, V.; JACOMELLI, M.; ZAID, M.; LUCERI, C.; BIGAGLI, E.; LODOVICI, M.; GHELARDINI, C.; VIVOLI, E.; NORCINI, M.; GIANFRIDDO, M.; ESPOSTO, S.; SERVILI, M.; MOROZZI, G.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; DOLARA, P.; GIOVANNELLI, L. Effects of dietary extra-virgin olive oil on behaviour and brain biochemical parameters in ageing rats. *British Journal of Nutrition*, v. 103, p. 1674–1683, 2010.

RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P. L.; SCHWARTZ, L. W.; DON GRISWOLD, E.; FONDACARO, J. D.; WASSERMANN, M. A. Inflammatory mediators of experimental colitis rats. *Gastroenterology*, v. 312, p. 326-337, 1989.

REZAI, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? *Digestive Diseases and Sciences*, v. 52, p. 2015–2021, 2007.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; GALVEZ, J.; CAMUESCO, D.; LORENTE, M. D.; CONCHA, A.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; REDONDO, L.; ZARZUELO, A. Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. *Clinical Nutrition*, v. 22, n. 5, p. 463–471, 2003.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; GALVEZ, J.; LORENTE, M. D.; CONCHA, A.; CAMUESCO, D.; AZZOUZ, S.; OSUNA, A.; REDONDO, L.; ZARZUELO, A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *Journal of Nutrition*, v. 132, p. 3263–3271, 2002.

ROJAS-CARTAGENA, C.; FLORES, I.; APPLEYARD, C. B. Role of tumor necrosis factor receptors in an animal model of acute colitis. *Cytokine*, v. 32, p. 85-93, 2005.

ROSS, B. M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 81, p. 309–312, 2009.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J. A.; ZARZUELO, A. Effect of quercetrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences*, v. 70, p. 3097-3108, 2002.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; NIETO, A.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, p. 2317-2326, 2004.

SCARMINIO, V.; FRUET, A. C.; WITAICENIS, A.; RALL, V. L. M.; DI STASI, L. C.

Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Nutrition Research*, v. 32, p. 202–209, 2012.

SHANAHAN, F. Crohn's disease. *The Lancet*, v. 359, p. 62–69, 2002.

SIMS, J.E. & SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews, Immunology*, v. 10, p. 89-102, 2010.

SMITH, G.P.; HARRIS, H.; PETERS, T.J. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinica Chimica Acta*, v. 142, p. 221–30, 1984.

SOUZA, M. H. L. P.; TRONCON, L. E. A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C. F. G.; ONOFRE, P. H. C.; MONTEIRO, R. A.; PASSOS, A. D. C.; MARTINELLI, A. L. C.; MENEGHELLI, E. U. G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 39, n. 2, p. 98-105, 2002.

SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*, v. 26, p. 804–810, 2010.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. *Archive of "British Medical Journal"*. v. 299, p. 1259-1260, 1989.

TAN, J.; MCKENZIE, C.; POTAMITIS, M.; THORBURN, A. N.; MACKAY, C. R.; MACIA, L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in Immunology*, v. 121, p. 91-119, 2014.

TARGAN S. R.; SHANAHAN, F. Mucosal immune regulation. In: *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 65–77, 1994.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 12, p. 21–32, 2001.

TELAKIS, E. Inflammatory bowel disease genetics and pharmacogenetics: An overview. *Annals of Gastroenterology*, v. 20, n. 3, p. 174-9, 2007.

TOLEDO, R. C. L.; BRITO, L. F.; RIBEIRO, S. M. R.; PELUZIO, M. C. G.; SIQUEIRA, C. L. M.; QUEIROZ, J. H. Efeito da ingestão da polpa de manga (*Mangifera indica* L.) sobre os parâmetros bioquímicos séricos e integridade hepática em ratos. *Bioscience Journal*, v. 29, n. 2, p. 516-525, 2013.

TRIANTAFILLIDIS, J. K.; MERIKAS, E.; GEORGOPOULOS, F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Drug Design, Development and Therapy*, v. 5, p. 185-210, 2011.

VELJACA, M.; LESCH, C.A.; PLLANA, R.; SANCHEZ, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 102, p. 1524- 1534, 1995.

VICTORIA, C. R.; SASSAKI, L. Y.; NUNES, H. R. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo state, Brazil. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 46, n. 1, p. 20-25, 2009.

VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; YUAN, L.; LU, P.; BASSAGANYA-RIERA, J. Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, n. 6, p. 929-939, 2013.

VIND, I.; LENE RIIS, L.; JESPERGAARD, C.; JESS, T.; KNUDSEN, K.; PEDERSEN, N.; ELKJAERE, M.; HANSEN, T.S.; ANDERSEN, I.B.; PAERREGAARD, A.; BONDESENH, S.;

LOCHT, H.; LARSEN, S.O.; MOESGAARD, F.; BENDTSEN, F.; ANDERSEN, P.S.; MUNKHOLM, P. Genetic and environmental factors as predictors of disease severity and extent at time of diagnosis in an inception cohort of inflammatory bowel disease. Copenhagen County and City 2003–2005. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 2, p. 162–169, 2008.

WALSH, R. N.; CUMMIS, R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, p. 482-504, 1976.

WITAICENIS, A. et al. Dietary Polydextrose Prevents Inflammatory Bowel Disease in Trinitrobenzenesulfonic Acid Model of Rat Colitis. *Journal of Medicinal Food*, v. 13, n. 6, p. 1391–6. 2010.

WONG, J. M. W.; SOUZA, R.; KENDALL, C. W. C.; EMAM, A.; JENKINS, D. J. A. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 40, n. 3, p. 235–243, 2006.

YAMAMOTO, T.; NAKAHIGASHI, M.; SANIABADI, A. R. Review article: diet and inflammatory bowel disease – epidemiology and treatment. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 30, p. 99–112, 2009.

YANAI, H.; HANAUER, S. B. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *American Journal of Gastroenterology*, v. 106, n. 4, p. 685-98, Apr 2011.