

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos

Ariane Fernandes Guimarães



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, como parte das exigências para obtenção do título de *Mestre em Farmacologia e Biotecnologia*.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Co-Orientadora: Profa. Dra. Thelma de Barros Machado

Botucatu/SP
2019

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos

Ariane Fernandes Guimarães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, como parte das exigências para obtenção do título de *Mestre em Farmacologia e Biotecnologia*.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Co-Orientadora: Profa. Dra. Thelma de Barros Machado

Botucatu/SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Guimarães, Ariane Fernandes.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos / Ariane Fernandes Guimarães. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Coorientador: Thelma de Barros Machado

Capes: 21001006

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Plantas medicinais. 3. Alimentos funcionais. 4. Fibras. 5. Suplementos dietéticos.

Palavras-chave: Adlay; Doença inflamatória intestinal; Lágrimas de Nossa Senhora; TNBS.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

DISSESTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos

BANCA EXAMINADORA

1º Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Professor Titular do Departamento de Farmacologia/ Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu/SP.

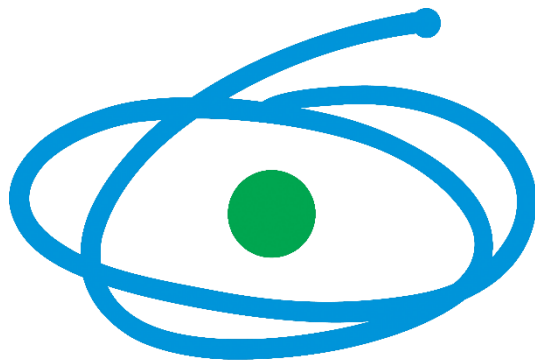
2º Prof. Dr. Luiz Domingues Almeida Junior

Professor Assistente na Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE - Campus São Manuel/SP.

3º Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Professor Adjunto do Departamento de Farmacologia/ Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu/SP

Auxílio Financeiro:



CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior)



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Walmir e Nilsa, por todo amor, apoio e dedicação investidos em mim, e também por todos os ensinamentos e incentivo em todas as etapas da minha vida.

À minha irmã Aline, pela amizade, pela torcida e amor incondicional.

E a pequena Eloísa, por ser a alegria diária de toda a nossa Família.

Ao meu namorado, Mateus por todo o amor, apoio e dedicação durante todo esse processo.



AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial ao Professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi, que mesmo sem me conhecer abriu as portas do seu laboratório e acreditou que eu teria algum potencial para fazer parte dessa equipe. Por todo aprendizado, direcionamentos e experiências adquiridas. Sou grata pela oportunidade.

À Professora Dra. Thelma de Barros Machado pela co-orientação e colaboração no desenvolvimento deste projeto.

A todos do Laboratório: Érika, Cristiane, Gabriela, Vinicius, Lesvi e Aline por todos os conhecimentos compartilhados, aprendizados durante essa trajetória e auxílio nos experimentos. À Ana, Tainan e Michelli por toda colaboração, apoio, conselhos, boas conversas e amizade.

Aos colegas do FitoFarmaTec: Patrícia, Fernanda e Elisa pela convivência diária e bons momentos compartilhados.

A todos os familiares, amigos e colegas que estiveram na torcida e de alguma forma buscaram sempre me ajudar, incentivar e apoiar essa e outras etapas da minha vida.

Ao Programa de pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia, aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UNESP e à Seção de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

Ao Lala da experimental-UNIPLEX pela disposição e auxílio no preparo da ração.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior) pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram e contribuíram na realização deste trabalho.



PRÓLOGO

DADOS CURRICULARES

Nome: Ariane Fernandes Guimarães

Nascimento: 11/06/1994

Formação: Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) – Campus de Bauru (2013-2017).

Atividades realizadas durante o mestrado (2017-2018):

I. Disciplinas cursadas:

Disciplina	Calendário	Conceito	Frequência	Créditos	Carga Horária
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	1º / 2017	A	100%	3	45
Farmacologia e Sociedade	1º / 2017	A	100%	3	45
Metabolismo Energético	1º / 2017	A	100%	4	60
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2º / 2017	A	91,70%	3	45
Farmacologia e Sociedade	2º / 2017	A	100%	3	45
Mediadores da Resposta Inflamatória	2º / 2017	A	100%	3	45
Farmacocinética e Toxicocinética	1º / 2018	A	87,50%	2	30
Farmacologia e Sociedade	1º / 2018	A	100%	3	45
Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Alimentos Funcionais	1º / 2018	B	100%	4	60
Prática de Ensino de Farmacologia	1º / 2018	A	100%	5	75

- Total de créditos cursados: 42
- Total de carga horária em disciplinas: 495 horas
- Total de créditos em atividades complementares: 9
- Total de carga horária em atividades complementares: 135 horas
- TOTAL GERAL: 630 horas

II. Participação em Congressos e Eventos

- VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia (SIMFARTEC) – Botucatu/SP (2017).
- Seminário de Ética em Pesquisa – 20 anos de funcionamento – Botucatu/SP (2017).
- 3ª Jornada Caipira da Doença Inflamatória Intestinal – Caipirã – Botucatu/SP (2017).

- VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia (SIMFARTEC) – Botucatu/SP (2018).
- I Congresso Nacional de Terapias Integradas da ABFIT, VII Jornada de Fitoterapia do Rio de Janeiro e I Jornada Multidisciplinar de Prescrição Magistral – Rio de Janeiro/RJ (2018).
- I Simpósio de Saúde Coletiva Simpósio de Saúde Coletiva – Bauru/SP (2018).
- XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – São Paulo/SP (2018).
- 21º Encontro Nacional de Biomedicina- ENBM - Botucatu/SP (2018).

III. Formação complementar

- Curso de curta duração em Técnicas de Centrifugação - Princípios e Aplicações. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2017.
- Curso de curta duração em Western Blot: princípios básicos e vantagens dos produtos Abcam. (Carga horária: 2h.) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2017.
- Curso de curta duração em Nova tecnologia em anticorpos monoclonais primários: vantagens, benefícios e validação dos RabMAbs. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2017.

IV. Outras atividades

- Membro da Comissão Organizadora VII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC). Botucatu/SP (2018).
- Membro da Comissão Organizadora I Curso de Inverno de Farmacologia e Biotecnologia. Botucatu/SP (2018).

V. Trabalhos Apresentados em Congresso

- GUIMARÃES, A. F. QUAGLIO, A. E. V., CURIMBABA, T. F. S., MACHADO, T., DI STASI, L. C. **Efeitos dieta enriquecida com farinha dos frutos de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.** XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – São Paulo/SP. 2018.
- GUIMARÃES, A. F. QUAGLIO, A. E. V., CURIMBABA, T. F. S., MACHADO, T., DI STASI, L. C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.** I Congresso Nacional de Terapias Integradas da ABFIT, VII Jornada de Fitoterapia do Rio de Janeiro e I Jornada Multidisciplinar de Prescrição Magistral – Rio de Janeiro/RJ. 2018.

VI. Colaboração em outros projetos de pesquisa

- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnston no modelo de indução por TNBS em ratos.
- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com banana prata verde (*Musa* sp AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.
- Efeitos da dieta enriquecida com os frutos de *Euterpe oleracea* Mart. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.
- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos
- Avaliação da atividade da casca de *Coffea arábica* e *Citrus sinensis* no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos



RESUMO

GUIMARÃES, A. F. **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.** 2019. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

A Doença Inflamatória Intestinal é uma doença considerada multifatorial com etiologia ainda pouco elucidada que compreende duas principais formas clínicas, denominadas como Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn que induzem quadros crônicos de inflamação em diferentes regiões do trato gastrointestinal, com períodos de exacerbação e remissão dos sintomas. Os tratamentos farmacológicos disponíveis para a doença apresentam sérios efeitos colaterais e alto custo, o que faz com que o desenvolvimento de estratégias complementares de prevenção e tratamento seja uma importante meta na terapia da DII. A busca por estratégias complementares de prevenção e tratamento, como o uso de alimentos funcionais ricos em fibras e compostos bioativos, é uma perspectiva promissora, visto que as fibras têm sido associadas à promoção de efeitos prebióticos com consequente proteção ao processo inflamatório intestinal. *Coix lacryma-jobi* L., é uma planta cuja semente é rica em fibras e são amplamente utilizadas tanto na culinária quanto na medicina tradicional chinesa onde são indicadas para o tratamento de diversas doenças. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da dieta enriquecida com farinha das sementes inteiras *C. lachryma-jobi*. no modelo de inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos. Para tanto foram testadas três dietas com ração enriquecida de farinha de *C. lachryma-jobi* nas proporções de 5%, 10% e 20%, onde foram avaliados parâmetros clínicos (consumo diário, peso corporal e diarreia), macroscópicos (escore, extensão da lesão, relação peso/comprimento cólico e aderência) e bioquímicos (mieloperoxidase, fosfatase alcalina e glutatona total) em dois protocolos de indução do processo inflamatório distintos: A) animais tratados, submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no dia 33 e mortes 2 dias após; B) animais tratados, submetidos ao processo de indução da inflamação intestinal no dia 33 e mortos 8 dias após. Adicionalmente, foi realizada a análise bromatológica das sementes. Nenhuma das dietas nas proporções analisadas foi capaz de alterar parâmetros clínicos ou macroscópicos. As avaliações bioquímicas mostraram que nenhuma das concentrações avaliadas foi capaz de evitar a depleção dos níveis de glutatona e de diminuir a atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina. A análise bromatológica evidenciou uma alta proporção de fibras insolúveis e baixa de fibras solúveis. A ausência de efeitos protetores foi associada à baixa concentração de fibras solúveis presentes nas sementes desta espécie e os resultados sugerem que a suplementação dietética com farinha de *C. lachryma-jobi* não se mostra como um produto útil como terapia complementar para a DII em humanos.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal, TNBS, Adlay, lágrimas de Nossa Senhora.



ABSTRACT

GUIMARÃES, A. F. **Evaluation of the intestinal anti-inflammatory activity of the enriched-diet with *Coix lachryma-jobi* L. flour in the TNBS-induced intestinal inflammation model in rats.** 2019. Thesis (Master in Pharmacology and Biotechnology) - Botucatu Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

Inflammatory Bowel Disease is a multifactorial disease with a not fully elucidated etiology that comprises two main clinical forms designate as Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, which present chronic inflammation in different regions of the gastrointestinal tract, with periods of exacerbation and remission of the symptoms. The pharmacological treatments available for the disease have serious side effects and high cost, which makes the development of complementary prevention and treatment strategies an important goal in IBD therapy. The search for complementary treatment and prevention strategies, such as the use of functional foods rich in fiber and bioactive compounds, are a promising prospect, since the fibers have been associated with the promotion of prebiotic effects with consequent protection of the inflammatory bowel process. *Coix lachryma-jobi* L., is a plant containing seed rich in fiber and are widely used both in cooking and traditional Chinese medicine for the treatment of several diseases. This work aims to evaluate the effects of the diet enriched with flour of the whole seeds of *C. lachryma-jobi* in the experimental model of intestinal inflammation induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rats. Three diets enriched with *C. lachryma-jobi* flour were tested in the proportions of 5%, 10% and 20% and were evaluated in the clinical parameters (daily food intake, body weight, diarrhea), macroscopic damage (score, lesion extension, weight/length ratio, adherence), biochemical parameters (myeloperoxidase, alkaline phosphatase, total glutathione) in two different protocols: A) Treated animals submitted to induction of intestinal inflammation at 33 day and died after 2 days; B) Treated animals submitted to the process of induction of intestinal inflammation at 33 day and died after 8 days. In addition, the bromatological analysis of the seeds was carried out. None of the diets were able to alter clinical or macroscopic parameters. Biochemical evaluations showed that none of the concentrations evaluated was able to avoid the depletion of glutathione levels and decrease myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities. The bromatological analysis evidenced a high proportion of insoluble fibers and low soluble fibers. The absence of protective effects was associated with the low concentration of soluble fibers present in the seeds, these results suggest that dietary supplementation with *C. lachryma-jobi* flour is not a useful product as a IBD complementary therapy in humans.

Key words: Inflammatory Bowel Disease, TNBS, Adlay, Job tears.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografias das sementes da <i>C. lacryma-jobi</i> verdes e depois de colhidas. Fotografias de Thelma Machado.....	31
Figura 2. Esquema de tratamento de colite induzida por TNBS em ratos no protocolo de 48 horas.....	40
Figura 3. Esquema de tratamento de colite induzida por TNBS em ratos no protocolo de 8 dias.....	41
Figura 4. Mecanismo de redução cíclica do DTNB a partir da oxidação de GSH.....	44
Figura 5. Consumo de ração por grupo no protocolo experimental de 48 horas. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=8).....	48
Figura 6. Consumo de ração por grupo no protocolo experimental de 8 dias. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=8).....	48
Figura 7. Média do ganho de peso corpóreo dos animais protocolo experimental de 48 horas. Dados expressos em média em gramas (Peso final –Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=8).....	49
Figura 8. Média do ganho de peso corpóreo dos animais protocolo experimental de 8 dias. Dados expressos em média em gramas (Peso final –Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=8).....	50
Figura 9. A) Aparência macroscópica do colón de um animal do grupo saudável. B) Aparência macroscópica do colón de um animal do grupo controle-TNBS no protocolo de 48 horas. C) Aparência macroscópica do colón de um animal do grupo controle-TNBS no protocolo de 8 dias.....	51
Figura 10. Efeitos da dieta enriquecida com 5%, 10% e 20% de farinha de <i>C. lachryma-jobi</i> na atividade cólica da mieloperoxidase após a realização dos protocolos experimentais de 48 horas e 8 dias em ratos com inflamação intestinal induzida por TNBS. Os dados são expressos pela média ± E.P.M foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, em relação ao controle-TNBS.....	53
Figura 11. Efeitos da dieta enriquecida com 5%, 10% e 20% de farinha de <i>C. lachryma-jobi</i> do conteúdo total de glutathiona após a realização dos protocolos experimentais de 48 horas e 8 dias em ratos com inflamação intestinal induzida por TNBS. Os dados são expressos pela média ± E.P.M foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, em relação ao controle-TNBS.....	54
Figura 12. Efeitos da dieta enriquecida com 5%, 10% e 20% de farinha de <i>C. lachryma-jobi</i> da atividade da fosfatase alcalina após a realização dos protocolos experimentais de 48 horas e 8 dias em ratos com inflamação intestinal induzida por TNBS. Os dados são expressos pela média ± E.P.M foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, em relação ao controle-TNBS.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos principais ingredientes das dietas dos grupos experimentais (100g).....	39
Tabela 2 Critério de avaliação da severidade da lesão cólica. (Bell et al., 1995).....	42
Tabela 3. Análise bromatológica da semente inteira.....	47
Tabela 4. Aparecimento de fezes diarreicas.....	50
Tabela 5. Parâmetros macroscópicos dos tratamentos com da dieta enriquecida com farinha <i>C. lachryma-jobi</i> nas proporções de 5%, 10% e 20% nos protocolos experimentais 48 horas inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos.....	52
Tabela 6. Parâmetros macroscópicos dos tratamentos com da dieta enriquecida com farinha <i>C. lachryma-jobi</i> nas proporções de 5%, 10% e 20% nos protocolos experimentais 8 dias inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos.....	52

LISTA DE ABREVIACÕES

- ACCGs** – Ácido graxo de cadeia curta
- AINEs** - Antiinflamatórios não-esteroidais
- ALFAC** – álcool 80%, formaldeído e ácido acético
- ANOVA** – Análise de variância de uma via
- CEEA** – Comitê de ética experimental
- COX-2** – Ciclo-oxigenase-2
- DC** – Doença de Crohn
- DII** – Doença inflamatória intestinal
- DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- DTNB** – ditiobisnitrobenzóico
- EPM** – Erro padrão médio
- ERN** – Espécies reativas de nitrogênio
- EROS** – Espécies reativas de oxigênio
- FA** – Fosfatase alcalina
- FitoFarmaTec** – Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia
- FOS** - Frutooligossacarídeos
- GSH** – Glutathiona
- GSSG** – Glutathiona oxidada
- GPx** – Glutathiona peroxidase
- GWAS** – Associação genômica ampla
- HCIO** - ácido hipocloroso
- HTAB** – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- IFN- γ** – Interferon gama
- IL-1** – Interleucina 1
- IL-4** – Interleucina 4
- IL-5** – Interleucina 5
- IL-6** – Interleucina 6
- IL-8** – Interleucina 8
- IL-9** – Interleucina 9
- IL-12** – Interleucina 12
- IL-13** – Interleucina 13

IL-17 – Interleucina 17

IL-18 – Interleucina 18

iNOS – isoforma indutível da óxido nítrico sintase

LDL -lipoproteína de baixa densidade

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo

NO – Óxido nítrico

pH – Potencial Hidrogeniônico

RCU – Retocolite ulcerativa

TCA – Ácido tricloroacético

TNBS – Ácido 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfônico

TNF- α – Fator de necrose tumoral

Th – T-helper

Th1 – T-helper 1

Th2 – T-helper 2

Th17 – T-helper 17

UNIPEX – Unidade de Pesquisa Experimental



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Material Vegetal.....	38
3.2 Análise Bromatológica.....	38
3.3 Preparo da ração.....	38
3.4 Animais.....	39
3.5 Delineamento experimental	39
3.4.1 <i>Protocolo de 48 horas.....</i>	39
3.4.2 <i>Protocolo de 8 dias.....</i>	40
3.6 Indução do Processo Inflamatório Intestinal.....	41
3.7. Avaliação do processo anti-inflamatória intestinal.....	42
3.7.1 <i>Avaliação Clínica.....</i>	42
3.7.2 <i>Avaliação macroscópica.....</i>	42
3.7.3 <i>Análises bioquímicas.....</i>	43
3.7.3.1 <i>Atividade da mieloperoxidase:.....</i>	43
3.7.3.2 <i>Determinação de proteína total e da atividade da fosfatase alcalina.....</i>	43
3.7.3.3 <i>Conteúdo de glutatona total.....</i>	44
3.8. Análise Estatística.....	44
RESULTADOS.....	46
4.1 Análise Bromatológica da semente de <i>C. lachryma-jobi</i>.....	47
4.2 Parâmetros Clínicos.....	47
4.3 Análises Macroscópicas.....	50
4.4 Análises Bioquímicas	52
DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	75



INTRODUÇÃO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é caracterizada pela inflamação crônica da mucosa intestinal, que compromete estrutural e funcionalmente o trato gastrointestinal (BOUMA & STROBER, 2003). O que distingue a resposta imunológica normal da resposta nos casos de DII é uma incapacidade de regulação dessas respostas (HANAUER, 2006). Em pessoas saudáveis, o intestino torna-se inflamado em resposta a um patógeno em potencial, retornando a um estado normal quando o patógeno é eliminado do intestino (HANAUER, 2006). No entanto, em indivíduos com DII, a inflamação decorre da resposta inapropriada e continua do sistema imune da mucosa à presença normal da flora intestinal ou de resíduos da dieta (PODOLSKY, 2002). Esse desequilíbrio imunológico da mucosa intestinal está associado principalmente às células do sistema imune adaptativo, que respondem contra antígenos da flora intestinal ou da dieta produzindo condições inflamatórias crônicas em portadores da doença (DE MATTOS et al., 2015).

A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são os subtipos mais comuns de DII, embora apresentem muitas similaridades, são clinicamente diferentes (PANACCIONE, 2013). A DC apresenta regiões lesionadas intercaladas por porções saudáveis e pode ocorrer em todo o trato gastrointestinal, sendo mais comum na região terminal do íleo, no ceco, na região perianal e no colón (BOUMA & STROBER, 2003, TORRES et al., 2017), e caracteriza-se pela formação de estenoses, fístulas, úlceras e granulomas ao longo da mucosa (DE MATTOS et al., 2015). A inflamação é tipicamente segmentar, assimétrica e transmural (TORRES et al., 2017). As manifestações clínicas da DC podem incluir diarreia ou diarreia sanguinolenta, desnutrição, dor abdominal e perda de peso (DE MATTOS et al., 2015).

Não há distribuição específica para o sexo na DC em adultos. O início da doença geralmente ocorre da segunda à quarta década de vida (TORRES et al., 2017). Entre os fatores ambientais que contribuem para o aparecimento da doença o tabagismo é o mais bem estudado, e está associado a um aumento de duas vezes no risco de DC (TORRES et al., 2017). Há evidências de predisposição genética, visto que aproximadamente 12% dos pacientes têm história familiar de DC (TORRES et al., 2017). Os judeus têm um risco três a quatro vezes maior de desenvolver a doença do que populações não judias, e as ascendências afro-americana e asiática estão associadas ao menor risco (TORRES et al., 2017).

A liberação localizada de certas citocinas, como interleucina-12 (IL-12), IL-17, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ), tem sido relacionada a inflamação

intestinal crônica observada em pacientes com DC (DE MATTOS et al., 2015). A produção de IL-12 e IL-18 por células apresentadoras de antígenos e macrófagos gera uma diferenciação polarizada em relação ao linfócito Th1, levando a uma liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IFN- γ . Além disso, as citocinas liberadas por células Th1 estimulam as células apresentadoras de antígenos a secretar um espectro mais amplo de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 (DE MATTOS et al., 2015).

Na RCU, diferente do que ocorre na DC, o processo inflamatório é contínuo e exclusivamente na região da mucosa do cólon (BOUMA & STROBER, 2003), geralmente, sem apresentação de granulomas (MAGRO et al., 2017). Além de envolver a mucosa intestinal, pode acometer também a submucosa promovendo áreas contínuas de inflamação, ulceração, edema e hemorragia ao longo do comprimento do cólon (ORDÁS, et al., 2012; BOUMA & STROBER, 2003). Diarreia sanguinolenta com ou sem muco é uma característica marcante da RCU podendo ocorrer também, dor abdominal, febre, mal-estar e perda de peso, dependendo da extensão e da gravidade da doença (DANESE & FIOCCHI, 2011).

A RCU apresenta-se principalmente no final da adolescência e início da idade adulta, embora o diagnóstico possa ser feito em qualquer idade, mas também ocorre um pequeno pico na incidência em algumas populações após a quinta década de vida e a doença parece afetar ambos os sexos igualmente (MAGRO et al., 2017). A utilização de tabaco protege e reduz a gravidade da RCU, mas pode não melhorar o curso natural da doença (ORDÁS, et al., 2012). Em contraste, ex-fumantes têm um risco aproximadamente 70% maior de desenvolver a doença, que é frequentemente mais extensa e refratária ao tratamento comparado com indivíduos que nunca fumaram (MAGRO et al., 2017). Assim como ocorre na DC, os judeus têm uma taxa de colite ulcerativa que é de três a cinco vezes maior que aquela de outros grupos étnicos, e também gêmeos monozigóticos têm taxas de concordância para RCU de 6–13% (ORDÁS, et al., 2012).

Na RCU ocorre um aumento substancial na secreção da IL-13, a principal interleucina responsável pela inflamação e cronicidade desta condição (DE MATTOS et al., 2015). Apesar do envolvimento de linfócitos Th1, os pacientes com RCU também apresentam resposta Th2 e aumento da secreção de IL-4, IL-5 e IL-9 (DE MATTOS et al., 2015). Assim como na DC,

as citocinas relacionadas ao Th17 também se encontram aumentadas (DE MATTOS et al., 2015).

Por ser uma doença que apresenta curso clínico prolongado e recorrente, a DII constitui um importante problema de saúde pública, atingindo principalmente a população jovem (HANAUER, 2006). A presença, a frequência e a gravidade dos sintomas da doença são preditivos de qualidade de vida relacionada à saúde dos pacientes (WILLIAN et al., 2018) comprometendo principalmente suas habilidades de trabalho, produtividade a longo prazo, educação e a vida social (VICTORIA et al., 2009).

Em 2017, a DII foi considerada a doença global com a maior prevalência nos países ocidentais, e os países recentemente industrializados têm documentando maiores índices na incidência com relação aos anos anteriores (KAPLAN & NG, 2017). Os dados epidemiológicos disponíveis apontam que a DII é mais frequente em países industrializados (HANAUER, 2006; WILLIAMS & GOH, 2011), sendo a maior incidência anual no Canadá, norte da Europa, Nova Zelândia e Austrália (KAPLAN & NG, 2017). A prevalência é mais elevada na Europa, no Canadá e nos Estados Unidos (KAPLAN & NG, 2017).

No Brasil, ainda são escassos os estudos sobre os aspectos epidemiológicos da DII, sendo que a maioria deles descreve apenas as características clínicas, bem como frequência de internação hospitalar por DII, sem referência à incidência e prevalência dessas doenças em termos populacionais (VICTORIA et al., 2009). Mas ainda assim, nos estados onde se tem dados epidemiológicos, tem se observado um súbito aumento na incidência de DC e RCU nos estados do Piauí, de 1988 a 2012, e de São Paulo, onde a incidência de DII dobrou de 4,5 a cada 100.000 habitantes no período de 1991–1995 para 9,7 a cada 100.000 habitantes, no período de 2001–2005 (KAPLAN & NG, 2017). Dados do Uruguai e Barbados mostraram padrões semelhantes aos do Brasil, indicando que a incidência de DII está aumentando na América Central e do Sul (KAPLAN & NG, 2017). Pode-se atribuir esta tendência ao aumento do número e aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos ou, até mesmo, a um real crescimento da população doente (STEINWURZ, 1999).

A etiologia da DII ainda não foi definitivamente esclarecida, entretanto, acredita-se que o desenvolvimento da doença seja resultado da interação entre fatores genéticos, fatores ambientais e o sistema imunológico (WILLIAMS & GOH, 2011). Tem sido sugerido que a DII pode resultar de: 1) um desequilíbrio entre as respostas de células T pró-inflamatórias e anti-inflamatórias; 2) uma resposta imune inata aberrante devido ao reconhecimento

bacteriano defeituoso, autofagia e apresentação de antígeno; 3) uma função de barreira epitelial alterada; e / ou 4) um desequilíbrio da microbiota intestinal com alterações nas relações mútuas entre os membros da microbiota e entre estes e o hospedeiro, levando a um estado denominado disbiose, caracterizado por mudanças na composição e diversidade de microbiota e comprometimento de suas funções (CAMMAROTA et al., 2015).

Entre os fatores genéticos relacionados à doença, estudos da associação genômica ampla (GWAS) identificaram mais de 160 loci/genes de susceptibilidade que foram significativamente associados à DII (PONDER & LONG, 2013). Apesar das características clínicas distintas, aproximadamente 30% dos loci/genes relacionados à DII são compartilhados entre a RCU e DC, indicando que ambas envolvem vias comuns e podem fazer parte de um processo contínuo (KHOR et al., 2011). Para DC, as descobertas de genes se concentraram no processamento defeituoso de bactérias intracelulares, autofagia e imunidade inata, enquanto que para RCU, o foco tem sido na função de barreira (PONDER & LONG, 2013). O gene NOD2 foi o primeiro gene a ser associado à doença, ele está envolvido no reconhecimento e na resposta bacteriana, e é o gene mais comumente associado a DII em suas duas formas clínicas (CONNELLY & KOLTUN, 2016).

Dentre os fatores dietéticos associados a DII, alguns relatos sugeriram que o consumo de açúcar refinado pode ser um fator de risco para DC (TORRES et al., 2017), mas não RCU (DE MATTOS et al., 2015). Também foi relatado que o consumo de gordura está positivamente associado com a RCU, enquanto o consumo de frutas, vegetais e fibras parecem diminuir o risco de DII (DANESE et al., 2004). O uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) tem sido comumente associado com um aumento do risco de desenvolvimento de DII (CONNELLY & KOLTUN, 2016).

A desregulação das respostas imunes na mucosa intestinal tem sido associada à etiologia da DII (CAMMAROTA et al., 2015). O sistema imunológico tem o importante papel de promover a tolerância imunológica, de forma a evitar uma resposta imune específica contra a grande massa de bactérias comensais, sendo assim, o sistema imune da mucosa é essencial para o estabelecimento e controle da inflamação intestinal e da lesão, com citocinas desempenhando um papel central na modulação da DII (DE MATTOS et al., 2015). Alterações na autofagia, processamento de antígeno, regulação da sinalização celular e homeostase das células T geralmente resulta em redução da depuração de patógenos, contribuindo assim para o surgimento de distúrbios inflamatórios em indivíduos suscetíveis (FARIA et al., 2015).

Atualmente, os tratamentos para DII são sintomáticos e atuam na redução do processo inflamatório durante as recidivas até o período em que o doente é mantido em remissão dos sintomas clínicos (SALES-CAMPOS et al., 2015). Até a década de 1960 havia poucos tratamentos para a doença inflamatória intestinal, após esse período ocorreu uma mudança drástica na perspectiva dos pacientes com DII devido ao surgimento de três classes de fármacos destinados ao tratamento da doença, os aminossalicilatos, os glicocorticoides e os imunossupressores, (WILLIAMS & GOH, 2011).

Dentre os fármacos utilizados no tratamento, além dos aminossalicilatos como a mesalazina e a sulfasalazina, glicocorticoides como a prednisona e a prednisolona e imunossupressores como a azatioprina, destaca-se a terapia biológica, baseada principalmente no uso de anticorpos monoclonais anti-TNF- α (FIOCCHI, 2012). Contudo, alguns dos fármacos utilizados são de alto custo, sendo a maioria promotora de sérios efeitos colaterais, os quais se agravam pela necessidade de seu uso crônico (SCRIBANO, 2008). Em geral, estes medicamentos amenizam os sintomas da doença sem afetar sua etiologia, de modo que se considera que a DII ainda não possui uma cura farmacologia (DI STASI et al., 2015). Com base nestes aspectos e dificuldades, novas estratégias de tratamento, alternativas ou complementares a estes medicamentos, têm sido propostas especialmente com foco no desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais, moduladores do estresse oxidativo e da microbiota intestinal (DI STASI et al., 2015).

O intestino humano é colonizado por uma microbiota diversificada que inclui mais de 1000 espécies de bactérias (SOMMER & BÄCKHED, 2013). Esse complexo ecossistema é de grande importância para o bem-estar humano, sendo responsável por modular a fisiologia e o sistema imune do trato gastrointestinal (CAMMAROTA et al., 2015). Essa microbiota comensal utiliza substratos derivados principalmente da dieta do hospedeiro para o metabolismo fermentativo, e os metabólitos produzidos são determinados principalmente pelos compostos presentes na dieta (RUSSELL et al., 2013). Desta forma, a dieta pode modular a microbiota intestinal, reduzindo a população de micro-organismos prejudiciais e/ou a enriquecendo com bactérias benéficas ao hospedeiro (TAN et al., 2014). Considerando a importância que a microbiota intestinal tem no desenvolvimento de doenças do trato gastrointestinal e em outras doenças crônicas, o conceito de alterar esta comunidade bacteriana é uma das estratégias mais promissoras para a prevenção e tratamento dessas doenças (BOSSCHER et al., 2009).

Dentre os vários produtos alimentares usados na prevenção e tratamento da DII, e outras doenças crônicas, destacam-se os probióticos, prebióticos e os simbióticos, este último representando a administração conjunta de probióticos e prebióticos (DAMASKOS & KOLIOS, 2008). Os probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados por via oral e são capazes de sobreviver ao ácido do estômago e à bile, mantendo-se viáveis e seguros para o consumo humano por prolongados períodos de armazenamento (DAMASKOS & KOLIOS, 2008).

Prebióticos são definidos como ingredientes não digeríveis, seletivamente fermentados, que induzem mudanças específicas na atividade e composição da microbiota intestinal, proporcionando benefícios ao bem-estar e saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007). Esses constituintes alimentares não digeríveis agem no aumento da população de certas bactérias e, portanto, alteram quantitativamente a microflora intestinal (DAMASKOS & KOLIOS, 2008). Desde a sua introdução, o conceito de prebióticos tem atraído muita atenção, estimulando o interesse científico e industrial. No entanto, muitos componentes alimentares, especialmente muitos oligossacarídeos alimentares e polissacarídeos (incluindo fibra alimentar), têm sido reivindicados como tendo atividade prebiótica, mas para tanto se deve levar em consideração alguns critérios como: 1) resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção gastrointestinal; 2) fermentação pela microflora intestinal; e 3) estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade dessas bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem-estar (ROBERFROID, 2007).

Está claramente estabelecido que muitas das propriedades benéficas da microbiota intestinal são atribuídas à fermentação de prebióticos por bactérias, com consequente produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), como o acetato, propionato e principalmente o butirato (MACFARLANE & MACFARLANE, 2012). O ceco e o intestino grosso podem absorver de maneira eficiente e rápida os AGCCs pelos colonócitos, com apenas cerca de 5% de AGCCs sendo secretados nas fezes (FENG et al., 2018). Essas substâncias agem principalmente como agentes imunomoduladores e anti-inflamatórios, visto que são capazes de inibir importantes rotas da resposta imune e inflamatória (MACFARLANE & MACFARLANE, 2012). Os AGCCs agem inibindo o fator de transcrição NF- κ B e as enzimas ciclooxigenases, agentes responsáveis pela formação de mediadores da inflamação como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e os leucotrienos (MACFARLANE & MACFARLANE, 2012). Estes metabólitos agem também inibindo macrófagos e neutrófilos responsáveis pela produção de TNF- α e outras citocinas pró-

inflamatórias, o que confere a estes metabólitos um papel importante como agente antitumoral, anti-obesidade e no tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes e principalmente em doenças inflamatórias crônicas como a DII (MACFARLANE & MACFARLANE, 2012; HAVENAAR, 2011; WONG et al., 2006; HAMER et al., 2008).

Um importante prebiótico comum na dieta são as fibras alimentares, que formam um grupo de substâncias vegetais que resistem à hidrólise por enzimas digestivas do intestino delgado (GALVEZ et al., 2005), e constituem um ingrediente determinante da composição microbiana (BROTHERTON & TAYLOR, 2013). As fibras alimentares são carboidratos complexos que podem ser classificadas como solúveis, que são principalmente polissacáridos não celulósicos como pectina, gomas, mucilagem ou como insolúveis, que consistem principalmente em componentes da parede celular, como celulose, lignina, hemicelulose (DAI & CHAU, 2017), que têm uma ampla gama de efeitos fisiológicos e são considerados cruciais para a saúde humana (VERSPREET et al., 2016). As fibras solúveis, são facilmente fermentáveis pelas bactérias do cólon, enquanto as fibras insolúveis são apenas pouco ou nada fermentadas (JAMES et al., 2003).

Devido a estes efeitos, vários prebióticos são potenciais produtos complementares para a prevenção e tratamento da DII em humanos. Estudos com este enfoque têm sido realizados pelo nosso grupo de pesquisa, que tem se dedicado nos últimos anos a estudar diferentes produtos com base na hipótese de que atuem como prebióticos. Entre estes produtos, destacam-se a polidextrose (WITAICENIS et al., 2010), a lactulose (CAMUESCO et al., 2005), as farinhas das raízes de *Typha angustifolia* L. (taboa) (FRUET et al., 2012), das folhas de *Cnidioscolus aconitifolus* (Chaya) (DALMAU, 2018), dos frutos de *Musa* sp AAA (banana nanica verde) (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017a, SCARMINIO et al., 2012) de *Euterpe oleraceae* Mart. (açai) (CURIMBABA, 2014), *Musa* sp AAB (banana prata verde) (COSTA, 2018), *Hibiscus esculentus* L. (Quiabo) (OLIVA, 2018).

Coix lacryma-jobi L., uma espécie da família Poaceae é popularmente conhecida como adlay, lágrimas de Jó ou, ainda, no Brasil, como lágrima de Nossa Senhora (Figura 1), devido ao formato oval de seus frutos (DIAZ, 1987). As sementes dessa planta são amplamente utilizadas, sendo um importante alimento em algumas partes da Ásia (CORKE et al., 2016), onde são adicionadas em sopas e caldos sob a forma de farinha ou grãos inteiros sem casca (SCHAAFFHAUSEN, 1952). Podem ser ainda utilizadas em bebidas como chá ou serem fermentadas para a produção de cerveja e outras bebidas alcoólicas (CORKE et al., 2016). A semente *Coix lacryma-jobi* foi listada no *Bencao Gangmu* um popular livro de

herbologia chinês editado por Shi-zhen Li em 1596 e na edição de 2015 da Farmacopéia chinesa (YU et al., 2017), onde são indicadas para tratar artrite, diarreia, remoção de calor, diurese, ajudando na drenagem de pus, estimulando a função do pulmão e do baço, bem como agente estomacal, diurético, analgésico, antiespasmódico e anti-inflamatório (YIN et al., 2018, ZHU, 2017). As sementes são produzidas principalmente no Leste e Sudeste da Ásia, incluindo China, Japão, Filipinas, Birmânia e Tailândia (BHANDARI et al., 2012).



Figura 1. Fotografias das sementes da *C. lacryma-jobi* verdes e depois de colhidas. Fotografias de Thelma de Barros Machado.

Devido ao seu extenso uso pela comunidade oriental, a composição fitoquímica das sementes de *C. lacryma-jobi* é bem conhecida. Estudos demonstram que as sementes possuem em sua composição química 11,19% de umidade, 6,89% de lipídios, 12,2% de proteínas, 2,43% fibras e 2,16% de cinzas (WU et al., 2007). Deste conteúdo lipídico, como o ácido palmítico (12,8-13,7%), ácido oleico (43,8-49,3%) e ácido linoleico (34,7-40,3%) representaram mais de 90% da composição total de ácidos graxos, enquanto que os ácidos esteárico, linolênico e araquídico foram encontrados em menor quantidade (BHANDARI et al., 2012). Os frutos possuem 7,48% de frutooligossacarídeos (FOS) (MANOSROI et al., 2011). Esqualeno, tocoferol, campesterol, ergostanol e friedelina, entre outros terpenos esteroidais, também são encontrados em seus frutos (WU et al., 2007; BHANDARI et al., 2012). Diversos isômeros de vitamina-E, principalmente, γ -tocoferol (39,5 %) e γ -tocotrienol (37,9 %) foram descritos (BHANDARI et al., 2012). Também fazem parte da composição química das sementes alguns compostos fenólicos, como álcool coniferílico, ácido siríngico, ácido ferúlico e siringarossinol (KUO et al., 2001), bem como flavonoides, como isoliquiritigenina, quercetina, apigenina, luteolina, nobiletina, tangeretina, eriodictiol, naringenina, formononetina, rutina e kaempferol (ZHU, 2017). O teor total de carotenóides da *C. lacryma-jobi* foi de 10 mg de equivalente de β -caroteno por 100 g de grãos (CHOI et al.,

2007). As sementes são também, uma boa fonte de certos minerais como fósforo (299 mg/100g), magnésio (126 mg/100g), cálcio (49 mg/100g), ferro (2,9 mg/100g), zinco (1,89 mg/100g) e manganês (1,89 mg/100g) (CORKE et al. 2016).

A combinação destes componentes, muitos deles com importantes efeitos farmacológicos, e alguns com perfil de atuarem como agentes anti-inflamatórios orientaram-nos na seleção desta espécie para o presente estudo. Destacam-se entre estes compostos a presença de frutooligossacarídeos (FOS), ácidos graxos de cadeia longa tais como ácido linolênico, linoleico e oleico e, vários esteroides como o β -sitosterol e campesterol, os quais, por diferentes mecanismos, possuem importantes efeitos anti-inflamatórios, inclusive em modelos experimentais de inflamação intestinal (JOHNSON-HENRY et al., 2014). Os FOS são fibras consideradas prebióticas e usadas como substrato por *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* para produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) via processo de fermentação (LE BLAY et al., 1999; MURAD-REGADAS et al., 2006; JOHNSON-HENRY et al., 2014). Estes AGCCs tais como acetato, propionato e butirato promovem proteção da mucosa intestinal frente ao processo inflamatório, agindo por diferentes mecanismos de ação (MEIJER et al., 2010) de modo que produtos ricos nestes compostos podem ser benéficos na inflamação intestinal. Da mesma forma, está evidenciado que ácidos graxos de cadeia longa, especialmente o ácido α -linolênico, são importantes agentes anti-inflamatórios na DII (REIFEN et al., 2015), enquanto que compostos esteroidais tais como o β -sitosterol, campesterol e outros, devido sua estrutura química similar aos glicocorticoides, são potenciais produtos anti-inflamatórios (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017b).

Vários efeitos benéficos a saúde foram atribuídos a *C. lacryma-jobi* preparadas em diferentes formas. Muitos desses efeitos foram investigados por diversos ensaios *in vitro*. A atividade antioxidante tem sido a propriedade mais estudada por vários ensaios. O extrato de água quente rico em frutooligossacarídeos apresentou atividade de eliminação do radical livre semelhante à da vitamina C em ensaio de DPPH (MANOSROI et al., 2014). Frações de extratos e compostos isolados da casca, farelo e inteira apresentaram efeitos anti-inflamatórios, inibindo a produção e secreção de IL-6 e TNF- α e produção de óxido nítrico (NO), e inibindo a expressão de iNOS e COX-2 em células RAW264.7 ativadas por lipopolissacarídeos (HUANG et al., 2014, HUANG et al., 2009a, HUANG et al., 2009b). Determinadas frações, extratos e compostos isolados desta espécie também mostraram atividade anti-câncer contra uma gama de células cancerígenas humanas *in vitro* como câncer de mama, carcinoma de bexiga, pulmão, fígado, cólon, estômago, melanoma, carcinoma

epidérmico da boca, adeno carcinoma cervical (ZHU, 2017), carcinoma de colo do útero (CHANG et al., 2018) câncer de colón (MANOSROI et al., 2019). Algumas frações de *C. lacryma-jobi* também atuaram regulando produção de testosterona, como agentes terapêuticos para a síndrome do ovário policístico e também apresentaram propriedades de prevenção da osteoporose em testes *in vitro* (ZHU, 2017). O extrato da farinha de *C. lacryma-jobi* ainda apresentou efeitos anti-alérgicos reduzindo a liberação de histamina e citocinas e suprimindo a produção da proteína quinase B (CHEN et al., 2012).

Em um trabalho realizado por Lin & Tsai (2008), hamsters com hipercolesterolemia induzida pela dieta, foram tratados por 8 semanas com três diferentes dietas, contendo 40% de sementes inteiras, 38,05% de sementes sem óleo ou 1,95% de óleo de *C. lacryma-jobi*, onde as dietas com sementes inteiras e sementes sem óleo, todos os níveis lipídicos foram significativamente reduzidos, as três dietas reduziram os níveis de triacilglicerol, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) no soro, enquanto prolongavam a fase de retardamento da oxidação de LDL e aumentavam a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase em hamsters hiperlipidêmicos. As sementes inteiras e as sementes sem óleo apresentaram melhores efeitos hipolipidêmicos que o óleo (LIN & TSAI, 2008).

Em úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos o extrato etanólico das sementes sem casca de *C. lacryma-jobi* apresentou atividade anti-úlceras, atuando diminuindo biomarcadores oxidativos e o índice de úlcera nos animais tratados (CHUNG, et al., 2011). O isomaltooligossacarídeo, produto da hidrólise enzimática das sementes inteiras de *C. lacryma-jobi*, apresentou efeito prebiótico, aumentando a população fecal de Bacteroidetes em voluntárias saudáveis que realizaram o consumo diário de 1000 mg do produto por 4 semanas (NISHIMURA et al., 2014).

Guo et al, (2015) observaram que o extrato aquoso produzido a partir da decocção do endosperma das sementes de *C. lacryma-jobi* promoveu o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus in vitro*, indicando assim uma possível atividade prebiótica para esse extrato. Também foi observado nesse estudo, que diferentes concentrações do extrato aquoso do endosperma das sementes de *C. lacryma-jobi* promoveram a melhora na inflamação e da estrutura do intestino em ratos com colite induzida por TNBS, levando a melhora dos sintomas nos animais tratados (GUO et al.,2015).

Em outros trabalhos foram observadas diversas atividades anticâncer em modelos animais de câncer de pulmão e de colón, anti-obesidade, no alívio da dismenorréia, na

regulação imunológica alérgica e na terapia para a síndrome dos ovários policísticos, e ainda anti-hiperuricemia (ZHU, 2017). Testes com humanos as sementes apresentaram efeitos na melhora da condição da pele e na melhora do índice glicêmico baixo (ZHU, 2017).

Com base nestas informações, a *C. lacryma-jobi* mostra-se com um potencial enorme para ser estudada como um produto dietético para ser aplicado como terapia complementar na doença inflamatória intestinal, de modo que esta espécie foi selecionada para a realização de estudos voltados à determinação de sua potencial ação anti-inflamatória intestinal.



OBJETIVO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha das sementes inteiras de *C. lachrym-jobi* no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.



MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

A espécie foi cultivada em casas de vegetação por meio do Programa Fitoterápico Farmácia Viva da Universidade Federal Fluminense/RJ (22°53'47,6" S 43°07'52,9" W), sob coordenação da Profa. Dra. Thelma Machado. Após coleta, as sementes foram desidratadas em estufas de circulação de ar forçado, pulverizados em moinho de facas com malha de 20 mesh e embalados para envio até nosso laboratório. Um exemplar foi depositado no herbário da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), sob o número HUNI 4487 para futuras referências.

3.2 Análise Bromatológica

Foram utilizadas 500g da farinha das sementes inteiras de *Coix lacryma-jobi*, para a realização da análise bromatológica. A umidade foi determinada usando uma balança infravermelha (Scaltec modelo SMO01, Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Alemanha). As demais análises nutricionais foram realizadas de acordo com procedimentos da AOAC. Resumidamente, as cinzas foram quantificadas após a incineração a 500°C. Lipídios totais e proteína foram determinados pelos métodos Soxhlet e Kjeldahl, respectivamente. A fibra foi analisada através de procedimentos enzimático-gravimétricos. Os carboidratos não-fibrosos foram calculados pela diferença. A análise bromatológica foi realizada no Laboratório Associado para Química Verde na Universidade Nova de Lisboa, pela Profa. Dra. Thelma Machado.

3.3 Preparo da ração

A ração foi preparada misturando-se a farinha das sementes *C. lacryma-jobi* com a ração de ratos em pó (Nuvilab), nas proporções de 5 %, 10 %, e 20 % com agitação manual até obtenção de uma mistura homogênea. Após a mistura, o material obtido passou por uma peletizadora, obtendo assim a ração em forma de pellets enriquecida com a farinha dos frutos de *C. lacryma-jobi* nas diferentes proporções. Depois de peletizada, a ração foi levada à estufa a temperatura de 45°C por 48 horas para secagem. A peletização da ração foi realizada junto à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Após pronta, as rações foram armazenadas em sacos plásticos fechados e foram diariamente pesadas na quantidade de 200g e disponibilizadas na gaiola para os animais. A composição básica da ração pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos principais ingredientes das dietas dos grupos experimentais (100g)

Ingredientes	Dieta básica	Dieta Coix 5%	Dieta Coix 10%	Dieta Coix 20%
Proteína bruta	22.0	20.9	19.8	17.6
Material mineral	9.0	8.55	8.1	7.2
Fibra bruta	7.0	6.65	6.3	5.6
Gorduras	4.0	3.8	3.6	3.2
Farinha de <i>C. lacryma-jobi</i>	-	5.0	10.0	20.0

3.4 Animais

Ratos Wistar machos com 21 dias foram adquiridos do biotério Anilab, Paulínia/SP, foram utilizados neste projeto. Os animais foram alojados em caixas (4/caixa) e mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), localizado nas dependências do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências/UNESP, Botucatu/SP, durante 10 dias antes do início dos experimentos. O biotério dispõe de estantes climatizadas, com temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas controlado.

O protocolo e delineamento experimental foram submetidos à Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, sob o protocolo número CEUA 977/17.

3.5 Delineamento experimental

Foram realizados 2 protocolos experimentais onde foram testadas 3 dietas com ração enriquecida com diferentes proporções (5%, 10% e 20%) de farinha das sementes inteiras de *C. lacryma-jobi*.

3.5.1 Protocolo de 48 horas

Após aclimatação, os animais (n=8 por grupo), foram alimentados com a ração enriquecida por um total de 32 dias antes da indução do processo inflamatório (33º dia), e após 48 horas (35º dia), os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical (Figura 2).

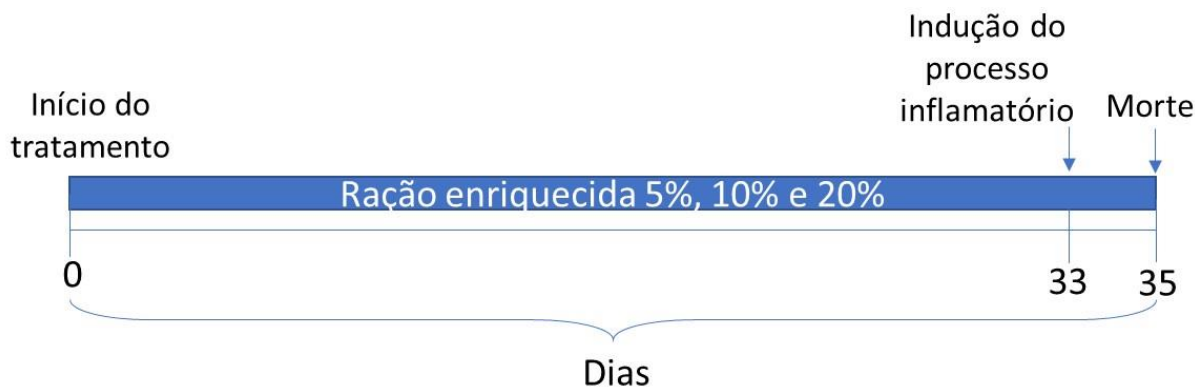


Figura 2. Esquema de tratamento de colite induzida por TNBS em ratos no protocolo de 48 horas.

Nesta fase foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- A) Grupo Saudável: animais sem indução do processo inflamatório intestinal que receberam ração normal por 35 dias;
- B) Grupo Controle-TNBS: animais que receberam ração normal por 35 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia;
- C) Grupo Coix 5%: animais que receberam ração enriquecida com 5% da farinha de *C. lachryma-jobi* por 35 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia.
- D) Grupo Coix 10%: animais que receberam ração enriquecida com 10% da farinha de *C. lachryma-jobi* por 35 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia.
- E) Grupo Coix 20 %: animais que receberam ração enriquecida com 20% da farinha de *C. lachryma-jobi* por 35 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia.

3.5.2 Protocolo de 8 dias

Após aclimatação, os animais (n=8 por grupo), foram alojados em caixas, e alimentados com a ração enriquecida por um total de 32 dias antes da indução do processo

inflamatório, que aconteceu no 33º dia, e após 8 dias (41º dia), os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical (Figura 3).

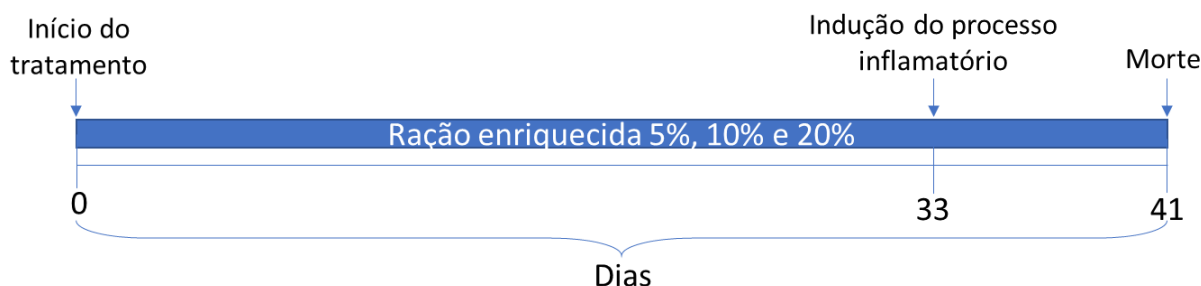


Figura 3. Esquema de tratamento de colite induzida por TNBS em ratos no protocolo de 8 dias.

Nesta fase foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- A) Grupo Saudável: animais sem indução do processo inflamatório intestinal que receberam ração normal por 41 dias;
- B) Grupo Controle-TNBS: animais que receberam ração normal por 41 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia;
- C) Grupo Coix 5%: animais que receberam ração enriquecida com 5% da farinha de *C. lachryma-jobi* por 41 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia.
- D) Grupo Coix 10%: animais que receberam ração enriquecida com 10% da farinha de *C. lachryma-jobi* por 41 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia.
- E) Grupo Coix 20 %: animais que receberam ração enriquecida com 20% da farinha de *C. lachryma-jobi* por 41 dias e foram submetidos ao processo de indução de inflamação intestinal no 33º dia.

3.6 Indução do Processo Inflamatório Intestinal

A indução do processo inflamatório foi realizada 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 uma solução de ketamina-xilazina na concentração de 116 mg/ml de ketamina e 23 mg/ml de xilazina, de modo a permitir a administração do anestésico na proporção ideal anestésica de 65 mg/kg de ketamina e 7mg/kg de xilazina por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracólica)

com a ajuda de um cateter (diâmetro de 2 mm, pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm) de 0,25 mL de uma solução contendo 10 mg de ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em etanol a 50 % v/v. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação da administração intracólica até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição a solução com TNBS.

3.7 Avaliação do processo anti-inflamatória intestinal

Durante a realização dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal. Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, os cólons extraídos e analisados quanto aos danos intestinais, considerando-se parâmetros clínicos, macroscópicos, microscópicos e bioquímicos.

3.7.1 Avaliação clínica

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em dois parâmetros clínicos: consumo de alimento, peso corporal. O consumo de alimento por animal foi avaliado utilizando-se a média do consumo por caixa de criação onde os animais estavam alojados (4/caixa). Os animais foram pesados individualmente para obter o peso corporal individual, e posteriormente foi calculado a média do peso diária por grupo. A presença de fezes diarreicas foi avaliada diariamente nos dias após a indução do processo inflamatório.

3.7.2. Avaliação macroscópica

Na análise macroscópica, após a morte dos animais, foram avaliados o peso e o comprimento do cólon, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da gravidade e extensão do dano intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell et al., (1995), apresentada na Tabela 2. Todas as amostras foram fotografadas e as imagens armazenadas para posteriores análises.

Tabela 2. Critério de avaliação da severidade da lesão cólica. (Bell et al., 1995)

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
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 prejuízo cobrir mais de 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

3.7.3 Análises bioquímicas

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 8 fragmentos longitudinais congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para determinação de proteínas e atividade da fosfatase alcalina e da mieloperoxidase e dos níveis cólicos de glutathione total.

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogenatos de mucosa intestinal cólica, 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.

Na análise bioquímica foram avaliados a atividade da mieloperoxidase, conteúdo de glutathione total e determinação de proteína total e da atividade da fosfatase alcalina.

3.7.3.1 Atividade da mieloperoxidase

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras de cólon foi realizada pelo método de Krawisz; Sharon; Stenson (1984). A determinação foi realizada utilizando cortes longitudinais de cólon, que foram homogeneizados com tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), o qual funciona como um detergente, por sua capacidade de facilitar a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, locais nos quais estão armazenadas. Foi determinado o incremento de absorvância a 450 nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de mieloperoxidase (U) foi considerada como aquela que degrada 1nmol/min de peróxido de hidrogênio a 25°C . Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

3.7.3.2 Determinação de proteína total e da atividade da fosfatase alcalina

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina (FA) foi realizada pelos métodos clássicos descritos por Smith; Harris; Peters (1984) e Bessey; Lowry; Brook (1946). A determinação de proteínas foi determinada em um

espectrofotometro a 562 nm e foi realizada pela reação de ácido bicinchonínico e sulfato de cobre que forma coloração roxa após incubação a 37 °C por 25 minutos. A determinação de fosfatase alcalina foi realizada através do uso de p-nitrofenilfosfatodissódico como substrato na presença de tampão glicina 50 mM (pH 10,5) com 0,5 mM de MgCl₂ que adquire coloração amarelada após incubação a 37 °C por 25 minutos, que é detectada a 405nm. O cálculo da fosfatase alcalina é baseada na quantidade de proteínas totais e expressa em mU/mg de proteína.

3.7.3.3 Conteúdo de glutathiona total

A quantificação de glutathiona total foi realizada, utilizando uma tira do cólon coletada após a morte dos animais que foi imediatamente pesada e armazenada em 1 mL de ácido tricloro acético (TCA) a 5%. A dosagem foi realizada pelo método descrito por ANDERSON (1985) que está baseado na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra para a sua forma oxidada (GSSG), através da incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 412nm. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando assim, um ciclo, no qual a velocidade de redução do DTNB é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH + GSSG) (Figura 4). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. de nmoles de glutathiona total por grama de tecido (nmoles de glutathiona/g de tecido).

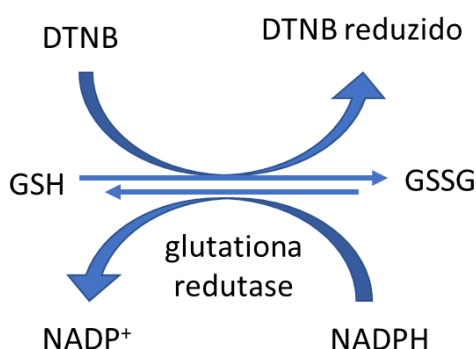


Figura 4. Mecanismo de redução cíclica do DTNB a partir da oxidação de GSH.

3.8 Análise Estatística

Dados paramétricos foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett ou Tukey. Dados não paramétricos foram expressos na forma de mediana (intervalo) e submetidos à ANOVA, seguida pelo teste *a posteriori* de Dunn. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.



RESULTADOS

4.1 Análise Bromatológica da semente de *C. lachryma-jobi*

A análise de bromatologia mostrou que as sementes de contém *C. lachryma-jobi* uma grande quantidade de fibra alimentar, e principalmente fibras insolúveis, e também, um alto teor de proteínas e baixa quantidade total de gorduras (Tabela 3).

Tabela 3. Análise bromatológica da semente inteira.

	Semente (%)
Fibras Alimentares Totais	56,4
<i>Fibras Insolúveis</i>	55,3
<i>Fibras Solúveis</i>	1,1
Carboidratos	20,3
Gorduras	2,2
Proteínas Totais	7,8
Cinzas	9,4
Umidade	7,1

4.2 Parâmetros Clínicos

Tanto durante o protocolo experimental de 48 horas quanto durante o protocolo experimental de 8 dias, os animais foram avaliados diariamente quanto ao peso corpóreo e ao consumo de ração. Em relação ao consumo de ração, durante o período anterior a indução do processo inflamatório, os grupos que receberam a dieta enriquecida com o produto apresentaram um consumo semelhante ao dos grupos saudável, que receberam da ração padrão, indicando que a dieta enriquecida com as sementes inteiras de *Coix lachryma-jobi* foi palatável.

No protocolo experimental de 48 horas, com exceção dos animais do grupo saudável que restabeleceram o consumo no mesmo dia, os demais grupos que passaram pelo procedimento de indução do processo inflamatório, apresentaram uma redução no consumo de ração desde o dia da indução da inflamação até a morte dos animais (Figura 5). Durante o protocolo de 8 dias, após o jejum, com exceção dos animais do grupo saudável que restabeleceram o consumo no mesmo dia, os demais grupos, que passaram pela indução por TNBS/etanol, os apresentaram uma redução no consumo de ração a partir do dia indução do processo inflamatório, o consumo chegou próximo ao apresentado antes do processo de indução após o 37º dia, nos grupos controle-TNBS, Coix 10% e 20%, o consumo do grupo Coix 5% teve foi normalizado somente após o 40º dia (Figura 6).

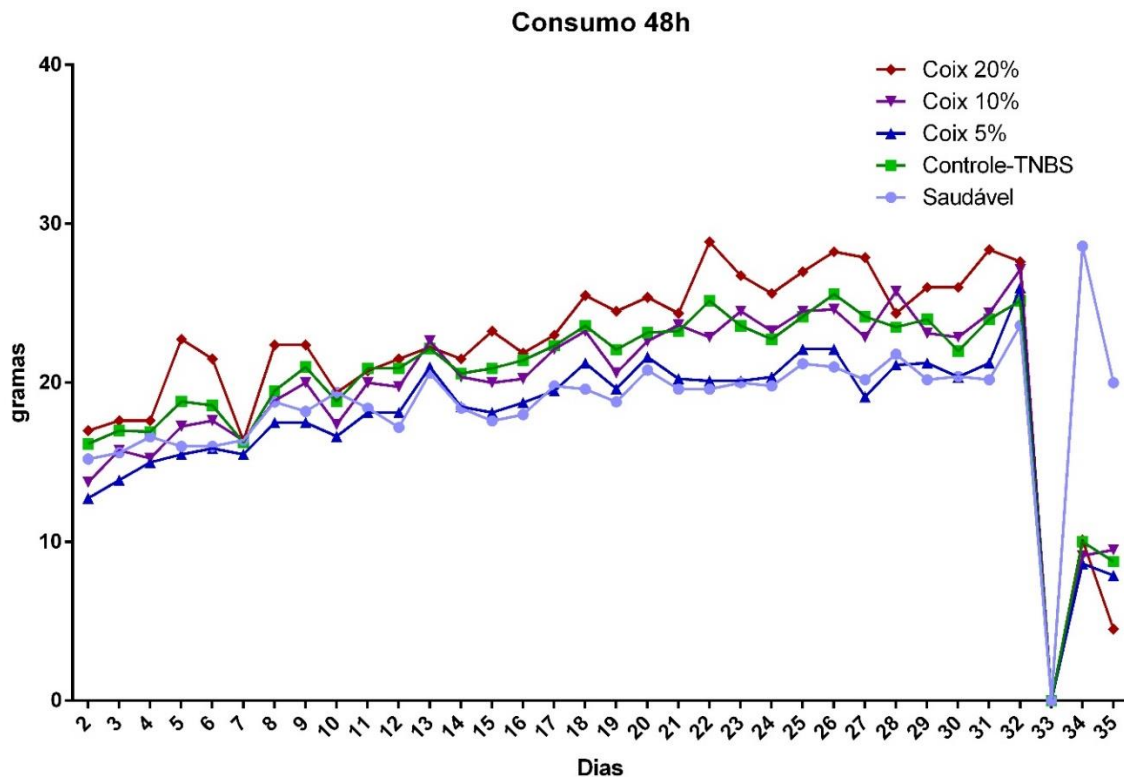


Figura 5. Consumo de ração por grupo no protocolo experimental de 48 horas. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=8).

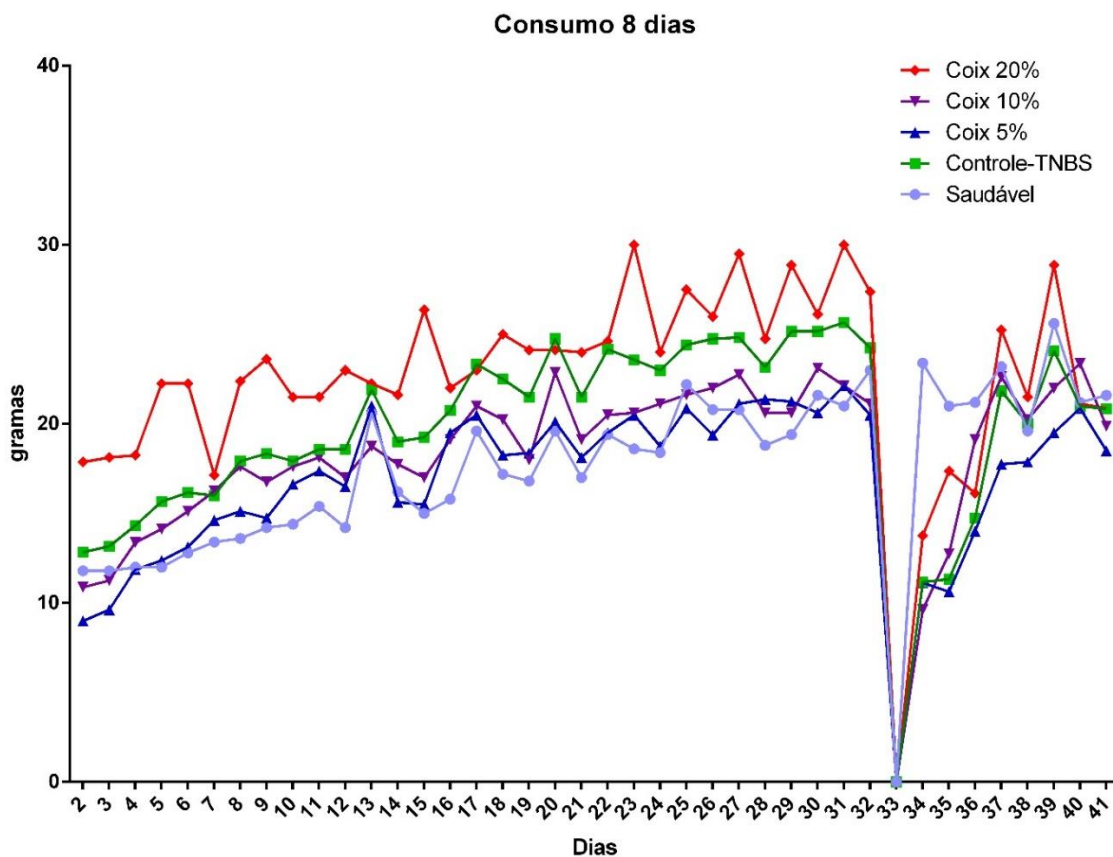


Figura 6. Consumo de ração por grupo no protocolo experimental de 8 dias. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=8).

Em relação ao peso corpóreo dos animais, foi observado que todos os grupos apresentaram ganho gradativo de peso semelhante aos animais do grupo saudável, desde o início do experimento (1º dia) até o dia anterior à indução do processo inflamatório intestinal (33º dia), em ambos os protocolos experimentais avaliados (Figura 7-8). Os animais que passaram pelo protocolo de 48 horas e que sofreram a indução do processo inflamatório intestinal, tanto o grupo controle-TNBS quanto os grupos que receberam dieta enriquecida nas proporções de 5%, 10% e 20% apresentam uma perda de peso até a morte dos animais, embora não seja diferente estaticamente do grupo saudável (Figura 7). Os animais que passaram pelo protocolo de 8 dias, tanto o grupo controle-TNBS quanto os grupos que receberam dieta enriquecida nas proporções de 5%, 10% e 20%, também apresentaram perda de peso nos primeiros dias após a indução, entretanto esses animais voltaram a ganhar peso após o 36º dia (Figura 8).

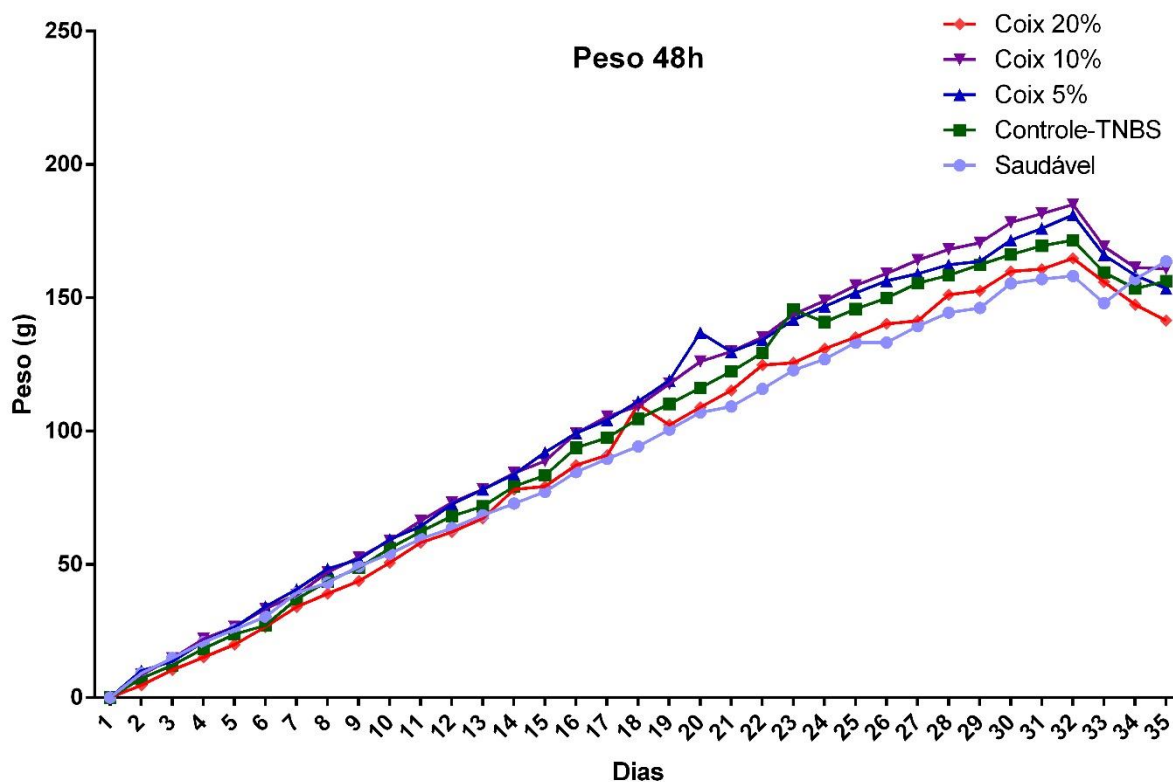


Figura 7. Média do ganho de peso corpóreo dos animais protocolo experimental de 48 horas. Dados expressos em média em gramas (n=8).

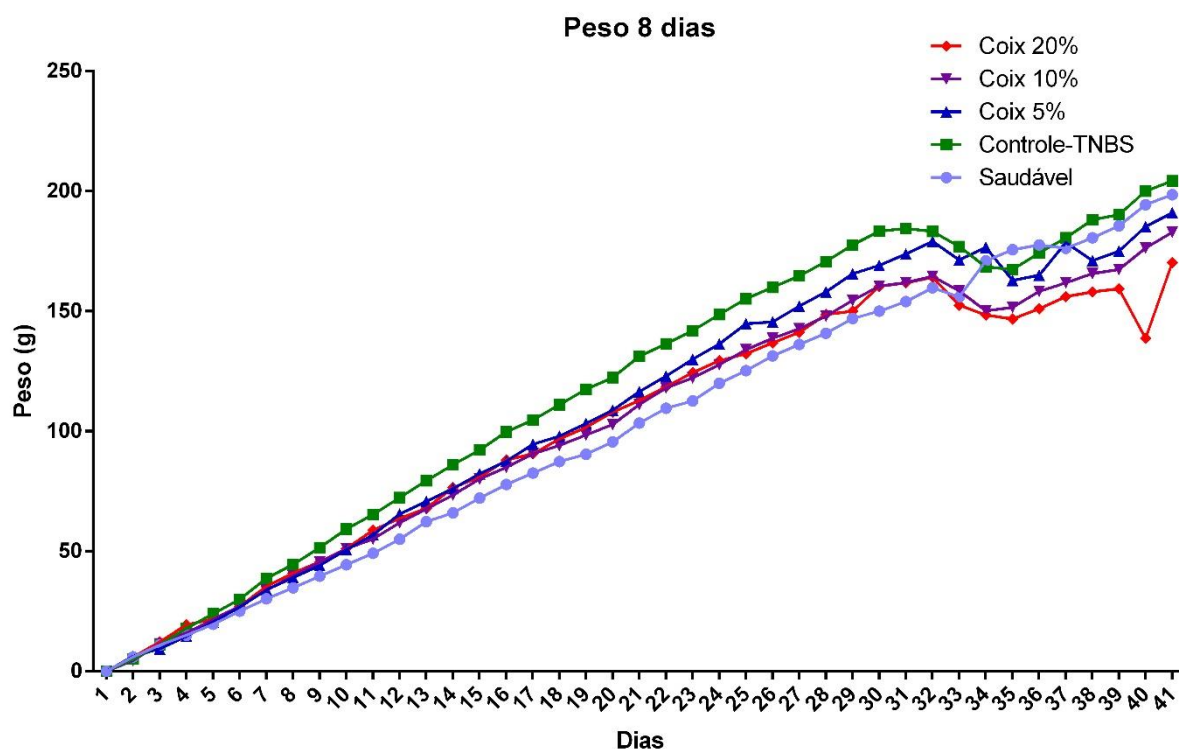


Figura 8. Média do ganho de peso corpóreo dos animais protocolo experimental de 8 dias. Dados expressos em média em gramas (n=8).

No período após a indução do processo inflamatório os animais tendem a apresentar fezes diarreicas (Tabela 4).

Tabela 4. Aparecimento de fezes diarreicas

Grupo	48h ^a (%)	8 dias ^a (%)
Saudável	0**	0**
Controle-TNBS	91,7	83,3
Coix 5%	100	100
Coix 10%	87,5	85,7
Coix 20%	75	87,5

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, em relação ao controle-TNBS.

^a Os dados de aderência e diarreia foram expressos em porcentagem e analisados pelo teste de Fisher.

4.3 Análises Macroscópicas

Os animais mortos após 48 horas da administração retal de TNBS apresentaram inflamação cólica severa, com a presença de lesão de 2,3-7,4 cm de extensão, espessamento da parede intestinal e hiperemia (Figura 9 B). Quanto aos animais mortos após 8 dias da

administração retal de TNBS apresentaram inflamação cólica, com presença 1,3-6,2 cm de extensão (Figura 9 C), espessamento da parede intestinal, hiperemia e aumento significativo na relação peso/comprimento, no grupo controle. Esse processo inflamatório foi associado com perda de peso corporal e redução do consumo de ração.

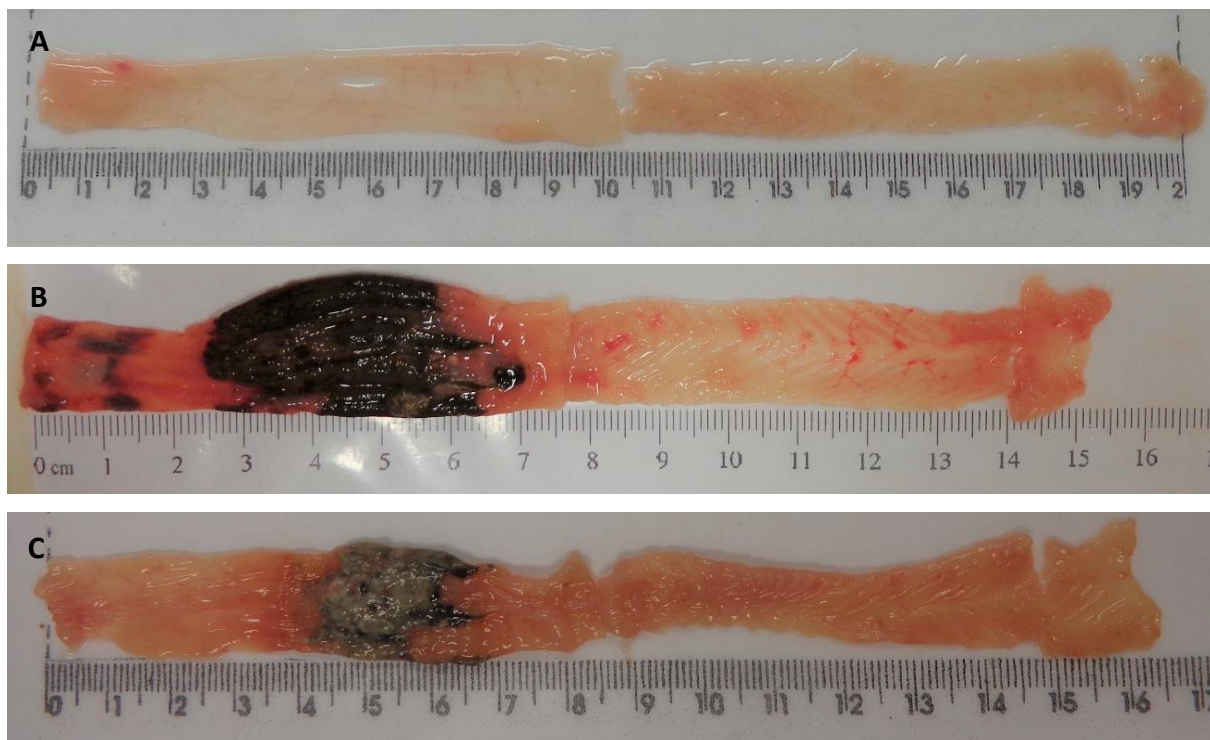


Figura 9. A) Aparência macroscópica do colón de um animal do grupo saudável. B) Aparência macroscópica do colón de um animal do grupo controle-TNBS no protocolo de 48 horas. C) Aparência macroscópica do colón de um animal do grupo controle-TNBS no protocolo de 8 dias.

O tratamento com as dietas enriquecidas com 5% e 20% de farinha das sementes inteiras de *C. lachryma-jobi* não apresentou diferença significativa nos parâmetros de escore, relação peso/comprimento, extensão da lesão, diarreia e aderência (Tabela 5 e 6). Entretanto, a dieta enriquecida com 10% das sementes inteiras de *C. lachryma-jobi*, em ambos os protocolos, apresentou uma diminuição significativa com relação ao grupo controle-TNBS no parâmetro aderência do cólon a outros órgãos em ambos os protocolos experimentais.

Tabela 5. Parâmetros macroscópicos dos tratamentos com da dieta enriquecida com farinha *C. lachryma-jobi* nas proporções de 5%, 10% e 20% nos protocolos experimentais 48 horas inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos.

Grupo	Escore (0-10)^a	Peso/Comprimento (g/cm)^b	Extensão da Lesão (cm)^b	Aderência (%)^c
Saudável (10)	0,0 **	95,7 ± 2,8**	0,0±0,0**	0**
Controle-TNBS (12)	7,5 (6-10)	150,4 ±5,9	4,3±0,6	75
Coix 5% (8)	8,0 (6-10)	158,1 ±5,8	3,7±0,4	100
Coix 10% (8)	7,0 (5-10)	153,5 ±4,4	3,6±0,4	12,5*
Coix 20% (8)	9,0 (1-7)	157,06 ± 5,7	5,2±0,6	100

* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, em relação ao controle-TNBS.

^a Os dados de escore são expressos com a mediana (intervalo range) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. ^b A extensão das lesões e os dados da razão de peso/comprimento cólico são expressos como a média ± E.P.M. e foram analisados usando Análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett teste. ^c Os dados de aderência foram expressos em porcentagem e analisados pelo teste de Fisher.

Tabela 6. Parâmetros macroscópicos dos tratamentos com da dieta enriquecida com farinha *C. lachryma-jobi* nas proporções de 5%, 10% e 20% nos protocolos experimentais 8 dias inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos.

Grupo	Escore (0-10)^a	Peso/Comprimento (g/cm)^b	Extensão da Lesão (cm)^b	Aderência (%)^c
Saudável (10)	0,0 **	95,7 ± 2,8**	0,0 ± 0,0 **	0**
Controle -TNBS (9)	6 (5-10)	217,2 ± 61,1	2,8 ± 0,7	66,7
Coix 5% (8)	5,5 (3-7)	150,3 ± 8,3	2,3 ± 0,4	50
Coix 10% (7)	5,0 (1-6)	138,2 ± 6,6	1,4 ± 0,2	0**
Coix 20% (8)	4 (1-7)	169,8 ± 24,4	1,6 ± 0,4	100

* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, em relação ao controle-TNBS.

^a Os dados de escore são expressos com a mediana (intervalo range) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. ^b A extensão das lesões e os dados da razão de peso/comprimento cólico são expressos como a média ± E.P.M. e foram analisados usando Análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett. ^c Os dados de aderência foram expressos em porcentagem e analisados pelo teste de Fisher.

4.4 Análises bioquímicas

Os animais do grupo controle-TNBS apresentaram um aumento significativa dos níveis da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em comparação com o grupo saudável

nos dois protocolos realizados. Os tratamentos com a dieta enriquecida com farinha das sementes inteiras de *Coix lachryma-jobi* nas três proporções (5%, 10% e 20%) analisadas não foram capazes de promover uma diminuição significativa da atividade da enzima MPO em relação ao grupo controle-TNBS em ambos os protocolos realizados (Figura 10),

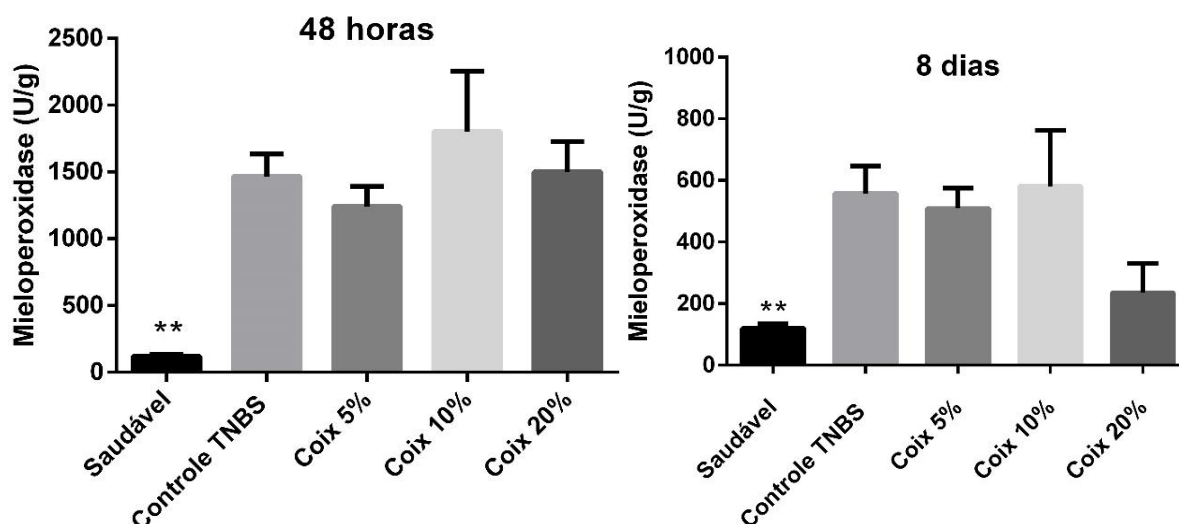


Figura 10. Efeitos da dieta enriquecida com 5%, 10% e 20% de farinha de *C. lachryma-jobi* na atividade cólica da mieloperoxidase após a realização dos protocolos experimentais de 48 horas e 8 dias em ratos com inflamação intestinal induzida por TNBS. Os dados são expressos pela média \pm E.P.M foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, em relação ao controle-TNBS.

Em relação aos níveis cólicos de glutathiona total (GSH), pode-se observar que a indução do processo inflamatório por TNBS promoveu uma depleção dos mesmos quando comparado com o grupo saudável no protocolo de 48 horas, entretanto o mesmo não foi observado no protocolo de 8 dias. Os grupos tratados não evitaram a depleção no conteúdo de GSH quando comparados com o grupo controle-TNBS no protocolo de 48 horas (Figura 11). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de GSH entre os grupos no protocolo de 8 dias.

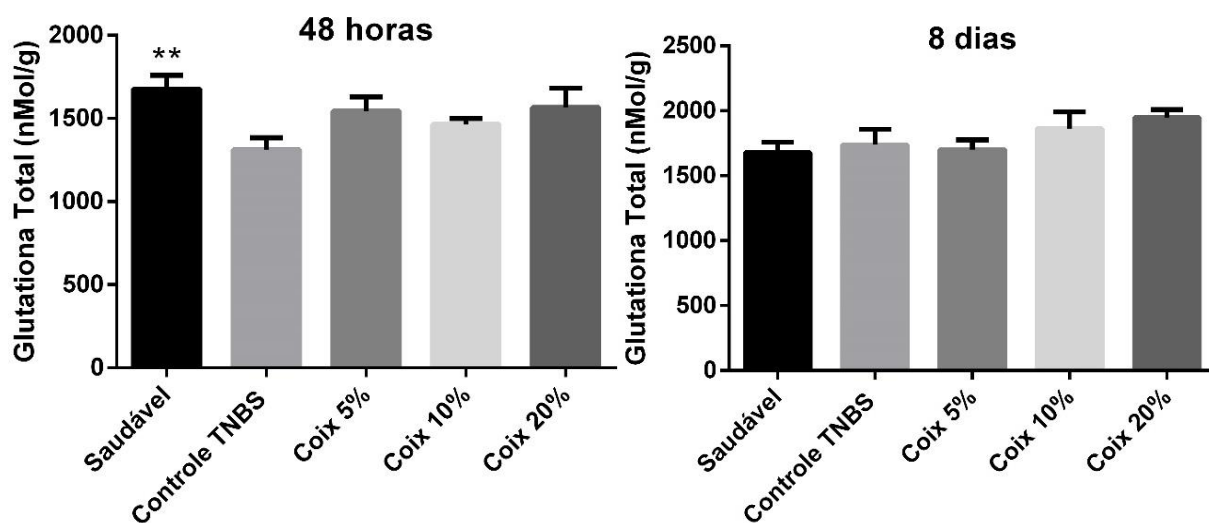


Figura 11. Efeitos da dieta enriquecida com 5%, 10% e 20% de farinha de *C. lachryma-jobi* do conteúdo total de glutatona após a realização dos protocolos experimentais de 48 horas e 8 dias em ratos com inflamação intestinal induzida por TNBS. Os dados são expressos pela média \pm E.P.M foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, em relação ao controle-TNBS.

Quanto a atividade da enzima fosfatase alcalina houve diferença significativa entre os grupos saudável e o grupo controle-TNBS em ambos os protocolos, no entanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com a dieta e o grupo controle-TNBS em ambos os protocolos avaliados (Figura 12).

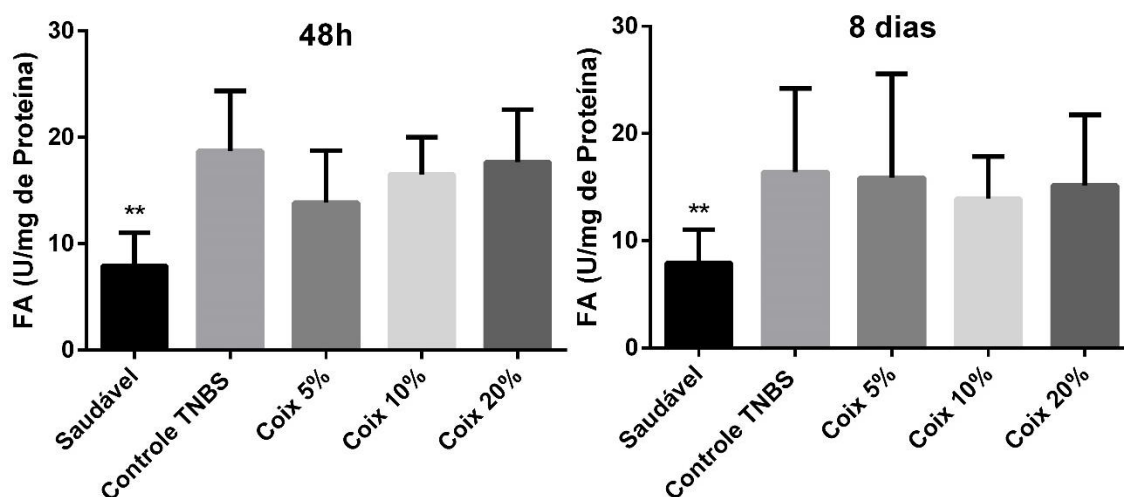


Figura 12. Efeitos da dieta enriquecida com 5%, 10% e 20% de farinha de *C. lachryma-jobi* da atividade da fosfatase alcalina após a realização dos protocolos experimentais de 48 horas e 8 dias em ratos com inflamação intestinal induzida por TNBS. Os dados são expressos pela média \pm E.P.M foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, em relação ao controle-TNBS.



DISCUSSÃO

Inúmeros estudos reportam diversos efeitos para as sementes de *C. lachryma-jobi* em suas mais variadas formas de preparo, dentre os quais se destacam os efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e prebióticos (ZHU, 2017). Do mesmo modo, a composição fitoquímica das sementes desta planta, já extensamente descrita anteriormente, apresenta uma variedade de compostos com comprovadas propriedades terapêuticas incluindo vários compostos polifenólicos de variada estrutura molecular (ZHU, 2017), indicando sua potencialidade no controle da inflamação intestinal.

Para tanto, foi realizada a indução do processo inflamatório intestinal por meio da administração intracólica de uma solução de TNBS/etanol. O etanol é utilizado como um meio para romper a barreira intestinal e permitir a interação do TNBS com proteínas do tecido do cólon, agindo como um hapteno e induzindo uma resposta imunológica que caracteriza o processo inflamatório (MORRIS et al, 1989). Uma única administração das substâncias combinadas leva ao desenvolvimento de uma resposta imune mediada por Th1 e caracterizada pela infiltração da lâmina própria com células T CD4⁺, neutrófilos e macrófagos (KIESLER, FUSS & STROBER 2015). Esse modelo de inflamação também induz uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-12, causando também uma inflamação transmural que se assemelha as lesões histopatológicas que se desenvolvem em humanos portadores da Doença de Crohn (ANTONIOU et al, 2016).

Neste trabalho, a avaliação da inflamação provocada pela solução de TNBS/etanol foi realizada em duas condições experimentais distintas, primeiramente 48 horas após a indução do processo inflamatório. Já foi extensamente relatado que 48 horas após a administração de TNBS os ratos que passaram por este processo de indução apresentam uma maior perda de peso corporal, maior incidência de diarreia grave e a menor vitalidade, sendo esses fatores indicadores de que durante esse período o processo inflamatório induzido por esse modelo experimental seja mais grave (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017a, ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017b, ANTONIOU et al, 2016, LIU et al., 2016, WITAICENIS et al., 2012, WITAICENIS et al., 2010, LUCHIN et al., 2008, DI STASI et al., 2004, ELSON et al, 1995). Neste protocolo é possível avaliar os efeitos de diferentes tratamentos o estágio mais grave do processo inflamatório.

Para a segunda condição experimental avaliada, os animais foram mortos 8 dias após a indução da inflamação por TNBS. Após 7 dias da indução por TNBS/etanol, pode-se observar a formação de úlceras, edema e a perda de células caliciformes, enquanto que em alguns animais pode ocorrer a recuperação parcial ou morte (JONES-HALLA & GRISHAM,

2014). Neste protocolo é possível avaliar os efeitos de diferentes tratamentos sobre a fase de recuperação do processo inflamatório induzido por TNBS.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a indução por TNBS resultou em ulceração e inflamação do cólon dos animais do grupo controle-TNBS e dos grupos tratados com as diferentes proporções (5, 10 e 20%) da dieta enriquecida com a farinha das sementes inteiras de *C. lachryma-jobi*. Esse dano foi caracterizado pelo acentuado espessamento da parede cólica, presente tanto no protocolo de 48 h, quanto no protocolo de 8 dias. No presente estudo, não foi observada nenhuma melhora na inflamação, nos parâmetros macroscópicos e clínicos analisados, em animais tratados com as dietas enriquecidas com a farinha das sementes inteiras de *Coix lachryma-jobi* em nenhum dos dois protocolos avaliados, embora a dieta contendo 10% de farinha das sementes foi capaz de diminuir significativamente a aderência do colón inflamado a outros órgãos. O processo inflamatório intestinal pode promover aderências mesentéricas, que são resultado da inflamação transmural característica da DC em humanos (LEVINE et al., 1994) e observada também no modelo experimental de inflamação induzida por TNBS. A aderência apresentada pelo colón inflamado é a formação de pontes de tecido fibroso neoformado que ligam o colón a outras estruturas (BRAGA et al., 2011). Apesar dos resultados demonstrarem uma melhora significativa nesse parâmetro do processo inflamatório, este critério não pode ser considerado de maneira isolada, sendo necessário ser corroborado por análises macroscópicas e bioquímicas, efeitos protetores que não foram observados.

Uma característica da DII é a infiltração de neutrófilos na parede do trato gastrintestinal, bem como a liberação de proteínas neutrofílicas para o lúmen intestinal (HANSBERRY et al., 2017). A mais abundante proteína presente nos neutrófilos é a mieloperoxidase (MPO), encontrada nos grânulos azurófilos infiltrados. Essa enzima está envolvida na geração de ácido hipocloroso (HOCl), um composto bactericida e potente oxidante capaz de provocar lesão tecidual (KLEBANOFF 2005). A MPO é frequentemente utilizada como um índice quantitativo de inflamação no tecido cólico (ZHENG et al. 2000), onde o aumento da atividade da enzima está associado a inflamação devido a migração de neutrófilos que ocorre em direção à área tecidual inflamada (KRAWISZ et al., 1984). Sendo assim, sua atividade se encontra elevada em modelos experimentais da inflamação intestinal (ZHENG et al. 2000), assim como em pacientes com DII (HANSBERRY et al., 2017). Neste trabalho, foi avaliada a atividade da MPO no tecido cólico e não foram observadas diferenças

significativas entre os grupos tratados e o grupo controle-TNBS em nenhum dos protocolos analisados.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima que catalisa a remoção hidrolítica do fosfato em pH alcalino, de uma grande variedade de moléculas (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Nos mamíferos essas enzimas consistem em várias isoformas que podem ser classificadas como FAs não específicas de tecido que são expressas no tecido ósseo, no fígado e rim e as FAs tecido específicas, que são específicas de célula intestinal, placentária e células germinativas (BILSKI et al., 2017). A FA específica do intestino é expressa em todo o trato gastrointestinal com maior expressão no duodeno e em menor extensão no jejuno, íleo e cólon (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). No intestino grosso, a principal FA expressa é a enzima não específica de tecido, que é secretada pelos colonócitos em partículas semelhantes a surfactantes (ELIAKIM et al., 1997). Esta isoforma parece ser importante na manutenção e/ou função de algumas estruturas intestinais (SHAO et al., 2000).

Nos modelos de colite experimental há um aumento na atividade da FA no tecido inflamado, o que possibilita o uso dessa enzima como um marcador bioquímico da inflamação intestinal experimental e sua inibição pode ser interpretada como uma propriedade anti-inflamatória dos compostos testados (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Esse aumento na FA resulta tanto de células epiteliais do cólon quanto do influxo de neutrófilos, sendo este último conhecido por expressar FA e acumular-se no cólon inflamado, o que pode ser uma adaptação protetora contra o estresse oxidativo e a inflamação (LALLÈS et al. 2014). Nos experimentos realizados houve um aumento na atividade da FA nos grupos controle-TNBS em relação ao grupo saudável, tanto no protocolo de 48h quanto no protocolo de 8 dias, no entanto, os grupos tratados com as diferentes dietas não promoveram diferença significativa em relação ao grupo controle-TNBS.

Evidências substanciais sugerem que a inflamação intestinal crônica está associada à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs) (ZHU & LI, 2012). A mucosa do cólon contém vários sistemas antioxidantes, entre eles o tripeptídeo GSH. O GSH é o antioxidante celular mais abundante sintetizado pelas células animais e desempenha um papel essencial na célula, modulando a resposta celular às alterações de óxido-redução associadas às espécies reativas de oxigênio (ASAKURA & KITAHORA, 2018). A depleção de GSH é considerada um evento crucial de dano cólico tanto na DII humana quanto no animal (LOGUERCIO et al., 2002). Na forma oxidada, a GSH é facilmente difundida para fora da célula, levando à depleção do conteúdo de glutathiona

intracelular, de modo que o estresse oxidativo também pode ser avaliado pelos níveis de GSH (CIRCU & AW, 2012). Neste estudo, o TNBS foi capaz de reduzir os níveis cólicos de GSH apenas no protocolo de 48 horas, enquanto que nenhum dos tratamentos foi eficaz em evitar esta depleção.

As dietas enriquecidas analisadas neste estudo não demonstraram melhora significativa no modelo de inflamação utilizado. Os animais que receberam a dieta nas proporções de 10 e 20% apresentaram fezes diarreicas após o décimo quinto (15^o) dia de tratamento, ou seja, dias antes da indução do processo inflamatório. Essa alteração na consistência das fezes dos animais destes grupos tratados é um indicativo da alta concentração de fibra alimentar insolúvel presente na planta, tendo em vista que o consumo de fibras alimentares insolúveis ajuda na retenção de água no cólon, resultando em fezes que são menos secas e mais fáceis de eliminar (DAI & CHAU, 2017).

Nas últimas três décadas, diversos estudos avaliaram as associações de ingestão de fibra alimentar com a DC e RCU com base na hipótese de que o consumo regular de fibra alimentar poderia diminuir os riscos de RCU e DC. Em uma revisão sistemática, Galvez et al., 2005 apresentaram uma série de estudos que concluíram que a fibra dietética confere benefícios clínicos em pacientes com DII porque mantém a remissão e reduz o dano cólico, provavelmente pelo aumento da produção de AGCCs e alterando a flora intestinal beneficiando bactérias predominantemente não patogênicas (RAJENDRAN & KUMAR, 2010). Em uma meta-análise realizada por Liu et al, (2015), com diversos estudos que tinham como objetivo avaliar a influência da ingestão de fibras em pacientes com DII, foi observado que há uma associação inversa entre maior ingestão de fibra e risco de DC e RCU.

Desde 1978, no que foi, provavelmente, o primeiro estudo realizado com a suplementação de fibra dietética como uma opção terapêutica potencial na DII, Davies e Rhodes (1978) avaliaram a suplementação dietética de farelo de aveia em pacientes com DC na manutenção da remissão clínica, no entanto os autores concluíram que essa fibra dietética não prolongou o tempo de remissão. Entretanto, o tipo de fibra utilizada pode ter sido a principal responsável pela falta de efeito benéfico observado uma vez que o farelo de aveia é composto principalmente de componentes insolúveis (GALVEZ et al., 2005).

Em um segundo estudo, Hallert et al. (1991) observaram a diminuição dos sintomas e a normalização do trânsito intestinal de pacientes com RCU em remissão que utilizaram a casca de *Plantago ovata* Forssk., porém não foi observada relação entre o uso da planta e um

prolongado tempo de remissão. Em um trabalho posterior realizado por Fernandez-Bañares et al. (1999), a administração controlada de uma dose oral diária de fibra alimentar das sementes de *P. ovata* em pacientes com RCU foi eficaz na manutenção da remissão desses pacientes. Os diferentes resultados encontrados podem estar relacionados ao fato de que as sementes de *P. ovata* são compostas de uma combinação de fibras solúveis com fibras insolúveis, sendo assim lentamente fermentados ao longo do cólon, o que pode permitir a produção de AGCCs nas partes distais do colo, e não apenas no cólon proximal, de modo que ocorra uma exposição mais uniforme de todo o epitélio do cólon aos produtos de fermentação, como ocorreu quando a casca de *P. ovata*, composto principalmente de fibra solúvel fermentável (GALVEZ et al., 2005).

As frações de fibra que compõem a dieta são muito importantes, particularmente na gestão de distúrbios gastrointestinais (PITUCH-ZDANOWSKA et al., 2018). Após a realização dos experimentos *in vivo*, foi realizada a análise dos macronutrientes presentes nas sementes inteiras de *C. lachryma-jobi* e demonstraram que a semente contém uma alta quantidade de fibra alimentar, como já descrito por outros autores (WU et al., 2007). Em nossa análise, as sementes de *C. lachryma-jobi* contem 56,4% de fibras totais, das quais 55,3% são fibras insolúveis e apenas 1,1% de fibras solúveis.

A presença majoritária de fibras insolúveis, e uma baixa porcentagem de fibras solúveis, indicam que mesmo apresentando uma alta porcentagem de fibras, as sementes inteiras de *C. lachryma-jobi* não constituem uma boa alternativa de tratamento complementar para ser aplicado para pacientes com DII, já que as fibras insolúveis têm sido associadas a um aumento da absorção de água, no cólon distal, redução do trânsito intestinal, e baixo nível de fermentação pelas bactérias da microbiota intestinal (JAMES et al., 2003). Desta forma, as fibras insolúveis comprometem a formação de AGCCs que em baixas concentrações não promove seus efeitos protetores sobre a inflamação intestinal. Estudos recentes realizados por Guo et al., (2015) mostram que as sementes desta planta produziram efeitos protetores sobre a inflamação intestinal induzida por TNBS, os quais foram associados à modulação de algumas bactérias da microbiota intestinal. No entanto tais efeitos foram discretos e promovidos pela administração oral de 1g/ml na proporção de 4 ml/Kg de um extrato aquoso obtido por aquecimento, cuja composição química e protocolo de experimentação são completamente distintos dos realizados no presente estudo. Embora Guo et al., (2015) associem os efeitos protetores sobre a inflamação intestinal à modulação de algumas bactérias da microbiota intestinal, tais resultados não são conclusivos, visto que os estudos sobre a microbiota foram

realizados *in vitro*, enquanto que os efeitos protetores sobre a inflamação intestinal foram realizados no modelo *in vivo* de indução de inflamação intestinal por TNBS.



CONCLUSÃO

A dieta enriquecida com a farinha das sementes de *C. lachryma-jobi* não promoveu efeitos protetores sobre os parâmetros clínicos, macroscópicos e bioquímicos alterados pela lesão intestinal induzida por TNBS em ratos. A ausência de efeitos protetores está associada à baixa quantidade de fibras solúveis presentes na farinha das sementes desta espécie. Considerando-se os efeitos observados é possível afirmar que a farinha das sementes inteiras de *C. lachryma-jobi* incorporadas na dieta dos animais não atua como um agente protetor do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos, não se mostrando como um produto útil como terapia complementar para a DII em humanos.



REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-JUNIOR, L. D. et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp AAA) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 38, n. A, p. 497-504, 2017a.
- ALMEIDA-JUNIOR, L.D. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of ground cherry (*Physalis angulate* L.) standardized CO₂ phytopharmaceutical preparation. **World Journal of Gastroenterology**. v.28, n.24, p.4369-4380. 2017b.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- ANTONIOU, E., et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Annals of Medicine and Surgery**, v.11, p.9–15. 2016.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. ed.19, Arlington VA, USA. 2012.
- ASAKURA, H.; KITAHORA, T. Antioxidants and Polyphenols in Inflammatory Bowel Disease: Ulcerative Colitis and Crohn Disease. In: **Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease**. Academic Press, p. 279-292. 2018.
- BAO, Y. Neutral lipid isolated from endosperm of Job's tears inhibits the growth of pancreatic cancer cells via apoptosis, G2/M arrest, and regulation of gene expression. **Gastroenterol. Hepatol.**, v.20, p.1046-1053. 2005.
- BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. G622-G630, 1995.
- BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROOK, M. J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **The Journal Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-329, 1946.
- BILSKI, J. et al. The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.
- BHANDARI, S. R.; PARK, S-K.; CHO, Y-C.; LEE, Y-S. Evaluation of phytonutrients in Adlay (*Coix lacryma-jobi* L.) seeds. **African Journal of Biotechnology** v.11, n.8, p.1872-1878, 2012.
- BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G. Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. **Molecular Endocrinology**, v. 23, p. 281-291, 2009.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 521-533, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **The Journal Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-329, 1976.
- BRAGA, A. et al. Doença inflamatória intestinal - Doença de Crohn e gravidez: relato de caso. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 196-204, 2011.

- CAMMAROTA, G. et al. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, p. 191–212. 2015.
- CAMUESCO, D. et al. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflammatory bowel diseases**. v. 11, n. 3, p. 265-271, 2005.
- CHANG, C-C et al. Hexane fraction of adlay (*Coix lachryma-jobi* L.) testa ethanolic extract inhibits human uterine sarcoma cancer cells and chemosensitizes human uterine sarcoma cells to doxorubicin. **Phytomedicine**, 2018.
- CHEN, H-J.; LO, Y-C.; CHIANG, W. Inhibitory effects of adlay bran (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) on chemical mediator release and cytokine production in rat basophilic leukemia cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 119-127, 2012.
- CHEN, H. J. et al. Mast cell-dependent allergic responses are inhibited by ethanolic extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. Var. ma-yuen Stapf) testa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.58, n.4, p.2596–2601. 2010.
- CHEN, H. J. et al. Antiinflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran **Food Chemistry**, v.126, n.1741–1748. 2011.
- CHOI, G., et al. Comparative Study on Hulled Adlay and Unhulled Adlay through Evaluation of Their LPS-Induced Anti-Inflammatory Effects, and Isolation of Pure Compounds. **Chemistry & Biodiversity**, v.12, n.3, p.380–387. 2015
- CHOI, Y., JEONG, H. S., LEE, J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. **Food Chemistry**, v.103, p.130-138. 2007.
- CHUNG, C-P et al. Gastroprotective activities of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6025-6033, 2011.
- CIRCU, M. L., AW, T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1823, n.10, p.1767–1777. 2012.
- CONNELLY, T. M., KOLTUN, W. A. Inflammatory Bowel Disease: Pathobiology. In: **The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery**, Springer, Cham, p.749–769. 2016.
- CORKE, H., HUANG, Y., LI, J. S. Coix: Overview. In C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, & J. Faubion (Eds.), **Encyclopedia of Food Grains** Oxford: Academic Press. p. 184-189. 2016.
- COSTA, E. F. **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com banana prata verde (*Musa sp* AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Biotecnologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.

- CURIMBABA, T. F. S. **Efeitos da dieta enriquecida com frutos das palmeiras *Euterpe oleraceae* Mart., e *Mauritia flexuosa* L.f na inflamação intestinal em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Farmacologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.
- DAI, F. J., CHAU, C. F. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. **Journal of food and drug analysis**, v.25, n.1, p.37-42. 2017.
- DALMAU, L. M. **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst no modelo de indução por TNBS em ratos.** Tese de Doutorado (Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.
- 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. 2008.
- DANESE, S., FIOCCHI, C. Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v.365, n.18, p.1713–1725. 2011.
- DANESE, S., SANS, M., FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity reviews**, v.3, n.5, p.394-400. 2004.
- DE MATTOS, B. R. R. et al. Inflammatory bowel disease: an overview of immune mechanisms and biological treatments. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.
- DI STASI, L. C. et al. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Paepalantine, an Isocoumarin Isolated from the Capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. **Planta Medica**, v.70, n.4, p.315–320. 2004.
- DI STASI, L. C.; COSTA, C. A. R. A.; WITAICENIS, A. Products for the treatment of inflammatory bowel disease: a patent review (2013 - 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n.6, p. 629-642, 2015.
- DIAZ, N. M. Utilização da Farinha de Adlay (*Coix lagrima jobi* L.) na Produção de Biscoitos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. 51-60. Jul/dez. 1987.
- ELIAKIM, R., et al. Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. **Am J Physiol**. v.272, p. G425–G434. 1997.
- ELSON, C. O., SARTOR, R. B., TENNYSON, G. S., RIDDELL, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.109, n.4, p.1344–1367. 1995.
- FARIA, A. M. C. et al. Tolerance and inflammation at the gut mucosa. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012. 2012.
- FENG, W; AO, H; PENG, C. Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018.

- FERNANDEZ-BAÑARES, F., HINOJOSA, J. L., SANCHEZ-LOMBRAA, J. L., NAVARRO, E., et al., Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.** v.94, p.427–433. 1999.
- FIOCCHI, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, p. 182–205, 1998.
- 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. **Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- GABURRI, P.D., et al. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn: estudo de 60 casos. **Arquivo Gastroenterologia** v.35, p.240-266, 1998.
- GALVEZ, J., RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E., ZARZUELO, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. **Molecular nutrition & food research**, v.49, n.6, p.601-608. 2005.
- GARCÍA-VILLALBA, A. G. Kidanemariam and M. Uhlmann. DNS of vertical plane channel flow with finite size particles: Voronoi analysis, acceleration statistics and particle-conditioned averaging. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 46, p. 54-74, 2012.
- GUO, M., et al. Red Ginseng and Semen Coicis can improve the structure of gut microbiota and relieve the symptoms of ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.162, p.7–13. 2015.
- HA, D.T., et al. Adlay seed extract (*Coix lachryma-jobi* L.) decreased adipocyte differentiation and increased glucose uptake in 3T3-L1 cells. **J. Med. Food.** v.13, n.6. p.1331-1339. 2010.
- HALLERT, C., KALDMA, M., PETERSSON, B. G., Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission. **Scand. J. Gastroenterol**, v.26, p.747–750. 1991.
- HALLERT, C., et al. Increasing faecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. **Inflamm Bowel Dis.** 9:116–121. 2003.
- HAMER, H. M. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 104-119, 2008.
- HANAUER, S. B. Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities **Inflammatory Bowel Disease**, v. 12, n. 1, p. 3-9, 2006.
- HANSBERRY, D. R. et al. Fecal myeloperoxidase as a biomarker for inflammatory bowel disease. **Cureus**, v. 9, n. 1, 2017.
- HAVENAAR, R. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. **Wagenigen Academic Publishers**, p. 103-114, 2011.

- HIDAKA, Y., KANEDA, T., AMINO, N., MIYAI, K. Chinese medicine, Coix seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells. **Biotherapy**, v.5, p. 201-203. 1992.
- HSU, H.Y. et al. Suppression of allergic reactions by dehulled adlay in association with the balance of Th1/Th2 cell responses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 51, p.3763-3769. 2003.
- HUANG, C. J. et al. Prophylactic treatment with adlay bran extract reduces the risk of severe acute radiation dermatitis: a prospective, randomized, double-blind study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015. 2015.
- HUANG, D. W et al. Application of the solvent extraction technique to investigation of the anti-inflammatory activity of adlay bran. **Food Chemistry**, v.145, p.445-453. 2014.
- HUANG, D.W., et al. Identification of compounds in adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.10651-10657. 2009a.
- HUANG, D. W. et al. Effect of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) testa and its phenolic components on Cu²⁺-treated low-density lipoprotein (LDL) oxidation and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 2259-2266. 2009b.
- JAMES, S. L. et al. Dietary fibre: a roughage guide. **Internal medicine journal**, v. 33, n. 7, p. 291-296, 2003.
- JOHNSON-HENRY, K. C., et al. Short-Chain Fructo-oligosaccharide, Inulin Modulate Inflammatory Responses, and Microbial Communities in Caco2-bbe Cells and in a Mouse Model of Intestinal Injury¹⁻³ **Journal of Nutrition**. v. 144, n. 11, p.1725-1733. 2014.
- JONES-HALL, Y. L., GRISHAM, M. B. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: comparison to human disease. **Pathophysiology**, v.21, n.4, p.267-288. 2014.
- KAPLAN, G. G., NG, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v.152, n.2, p.313-321.e2. 2017.
- KHOR, B., GARDET, A., XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.474, n.7351, p.307. 2011.
- KIESLER, P., FUSS, I. J., STROBER, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v.1, n.2, p.154-170. 2015.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**. v. 77, n.598-625. 2005.
- 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.

- KUO, C. C.; SHIH, M.C.; KUO, Y. H.; CHIANG, W. Antagonism of freeradical-induced damage of adlay seed and its antiproliferative effect in human histolytic lymphoma U237 monocytic cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.49, n.3, p.1564–1570. 2001.
- LALLÈS, J-P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects, **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 2, p. 82–94, 2014.
- LE BLAY, G., MICHEL, C., BLOTTIERE, H. M., CHERBUT, C. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent in cecal butyrate in rats. **Journal of Nutrition**. v.129, n. 12, p.2231-2235. 1999.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583-593, 1994.
- LIN, M. H. A., WU, M. C., LU, S., & LIN, J. Glycemic index, glycemic load and insulinemic index of Chinese starchy foods. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, n.39, p. 4973. 2010.
- LIN, Y., TSAI, C. E. A study of adlay on lowering serum and liver lipids in hamsters. **Journal of Food Lipids**, v.15, p.176-189. 2008
- LIU, X., WU, Y., LI, F., ZHANG, D. Dietary fiber intake reduces risk of inflammatory bowel disease: result from a meta-analysis. **Nutrition Research**, v.35, n.9, p.753–758. 2015.
- LIU, T., et al. Vitamin D treatment attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis but not oxazolone-induced colitis. **Scientific Reports**, v.6, n.1. p. 32889 2016.
- LOGUERCIO, C. et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Digestive and liver disease**, v. 35, n. 9, p. 635-641, 2003.
- LUCHINI, A.C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1343-1350, 2008
- MACFARLANE, G.; MACFARLANE, S. Bacteria, colonic fermentation and gastrointestinal health. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 1, p. 50-60, 2012.
- MAGRO, F. et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 6, p. 649-670, 2017.
- MANOSROI, A. et al. Potent Anti-Proliferation on the Colon Cancer Cell Line (HT-29) of Liposomal Formulations Entrapped with Semi-Purified Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* Linn.) Fractions. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 19, n. 4, p. 1996-2007, 2019.

- MANOSROI, J., KHOSITSUNTIWONG, N., MANOSROI, A. Biological activities of fructooligosaccharide (FOS)-containing *Coix lachryma-jobi* Linn. extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 341-346. 2014.
- MEIJER, K., VOS, P., PRIEBE, M.G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 13, n.15, p.715-721. 2010.
- MORRIS, G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p.795–803. 1989.
- MURAD-REGADAS, S. M. et al. Efeito da suplementação de fibra solúvel ou frutooligosacarídeo na colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n. 5, p.315-320. 2006.
- NISHIMURA, M., et al. Alteration of intestinal flora by the intake of enzymatic degradation products of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) with improvement of skin condition. **Journal of Functional Foods**, v.7, p. 487-494. 2014.
- NORDGAARD, I., et al. Colonic production of butyrate in patients with previous colonic cancer during long-term treatment with dietary fiber (*Plantago ovata seeds*). **Scand J Gastroenterol**. v.31, p.1011–20. 1996.
- PANACCIONE, R. Mechanisms of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Hepatol**, v.9, p. 529-532. 2013.
- PERSSON, P.G., AHLBOM, A., HELLERS, G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. **Epidemiology**. v. 3, p.47–52. 1992.
- PITUCH-ZDANOWSKA, A., ALBRECHT, P., BANASIUK, M., BANASZKIEWICZ, A. Dietary Fiber Intake in Children With Inflammatory Bowel Disease. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v.66, n.4, p.624-629. 2018.
- PODOLSKY, D. K. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine** v. 347, n. 6, p. 417-419, 2002.
- PONDER, A., & LONG, M. D. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. **Clinical epidemiology**, v.5, p. 237. 2013.
- OLIVA, K. R. S. **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Biotecnologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.
- ORDÁS, I.; ECKMANN, L.; TALAMINI, M.; BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 380, p. 1606–1619. 2012.
- RAJENDRAN, N., & KUMAR, D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, v.16, n.12, p.1442. 2010.

- REIF, S., KLEIN, I., LUBIN, F., FARBSTEIN, M., HALLAK, A., GILAT, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut**. v.40, p.754–60. 1997.
- REIFENA, R. et al., α -Linolenic acid (ALA) is an anti-inflammatory agent in inflammatory bowel disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 26, n. 12, p.1632–1640. 2015.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **J. Nutr**, v. 137, p. 830-837. 2007.
- ROBERFROID, M et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br. J. Nutr**, v. 104, n. 2, p. 61-63. 2010.
- RUSSELL, W. R. et al. Colonic bacterial metabolites and human health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 246–254. 2013.
- SÁNCHEZ DE MEDINA, F., et al Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, v.68, n.12, p.2317–2326. 2004.
- SAKAMOTO, N. et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. **Inflamm Bowel Dis**. v..11. p.154–63. 2005.
- SALES-CAMPOS, H. et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 48, n.2, p. 96-10. 2015.
- SCARMINIO, V. et al. 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. 2002.
- SCHAAFFHAUSEN, R. V. Adlay or Job's Tears--A Cereal of Potentially Greater Economic Importance. **Economic Botany** v.6, p. 216-227. 1952.
- SCRIBANO, A. O. **El proceso de investigación social cualitativo**. Prometeo Libros Editorial, 2008.
- SHAO, J.S. et al. Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach. **Microsc Res Tech**. v.51, p.121–128. 2000.
- 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 international journal of clinical chemistry**, v. 142, n. 2, p. 221-230, 1984.
- SOMMER, F., BÄCKHED, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nat Rev Microbiol**, v.11, p. 227-238. 2013.
- SOUZA, M. H., et al. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in an university hospital in the southeastern Brazil. **Arquivo Gastroenterologia**. v.39, n.2, p.98-105. 2002.
- STEINWURZ, F. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn. **Arquivo Gastroenterologia**. v. 35, n. 4, p.237-239. 1998.

- STUCCHI, A. F.; et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 279, p. 298-306. 2000.
- 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. 91-112. 2014.
- TORRES, J., MEHANDRU, S., COLOMBEL, J.-F., PEYRIN-BIROULET, L. Crohn's disease. **The Lancet**, v.389. n.10080, p.1741–1755. 2017.
- VERSPREET, J. et al. A Critical Look at Prebiotics Within the Dietary Fiber Concept. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.7, p.167–190. 2016.
- VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, CARVALHO, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivo Gastroenterologia**. v. 46, n.1, p.20-25. 2009.
- WALKER, A. W., et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. **The ISME journal**, v.5, n.2, p. 220. 2011.
- WANG, L.; CHEN, J.; XIE, H.; JU, X.; LIU, R. H. Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Adlay Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.61, p.5103–5113. 2011.
- WILLIAMS, I.; GOH, J. Investigational new drugs in the treatment of inflammatory bowel disease: a review **Journal of Experimental Pharmacology** v.3 p. 13–19. 2011.
- WILLIAN, M. K., D'HAENS, G., YARLAS, A., JOSHI, A. V. Changes in health-related quality of life and work-related outcomes for patients with mild-to-moderate ulcerative colitis receiving short-term and long-term treatment with multimatrix mesalamine: a prospective, open-label study. **Journal of patient-reported outcomes**, v.2, p.1-16. 2018.
- WITAICENIS, A., FRUET, A. C., SALEM, L., DI STASI, L. C. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Journal of Medicine Food**, v. 13, n. 6, p. 1391-1396. 2010.
- WITAICENIS, A. et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 1, p. 76-85. 2012.
- WONG, J. M. W. et al. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235–243. 2006.
- WU, T-T.; CHARLES, A. L.; HUANG, T-C. Determination of the contents of the main biochemical compounds of Adlay (*Coxi lachrymal-jobi*). **Food Chemistry**, v.104, p. 1509–1515. 2007.
- YE, M. Effects of water extracts from *Coix lachryma-jobi* on immune function in immune suppressive mice. **Anhui Med Pharm Journal**, v.10, n.10, p.727–729. 2006.

- YIN, H. M., WANG, S. N., NIE, S. P., XIE, M. Y. Coix polysaccharides: gut microbiota regulation and immunomodulatory. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. 2018.
- YU, F. et al. Research and application of adlay in medicinal field. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n. 2, p. 126-133, 2017.
- ZHENG, L., GAO, Z. Q., WANG, S. X. Chronic ulcerative colitis model in rats. **World journal of gastroenterology**, v.6, n.1, p.150. 2000.
- ZHU, F. Coix: Chemical composition and health effects. **Trends in Food Science & Technology**, v.61, p.160–175. 2017.



ANEXO

Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos", Protocolo nº 977-CEUA, sob a responsabilidade de **Luiz Carlos Di Stasi**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 5/6/2017	Término: 10/7/2017
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	42	
Peso:	180-250g	Idade: 40 dias
Sexo:	Macho	
Origem	Anilab – Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda.	

Botucatu, 2 de junho de 2017.


Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA



Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: secdta@ibb.unesp.br