



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE *CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* (MILL.) I.M. JOHNST NO MODELO DE INDUÇÃO POR TNBS EM RATOS

LESVI MOYA DALMAU

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor) no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: estrutura e função.

Luiz Claudio Di Stasi

**BOTUCATU – SP
2018**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ib.unesp.br

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500|

Dalmau, Lesvi Moya.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst no modelo de indução por TNBS em ratos / Lesvi Moya Dalmau. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Capes: 20100000

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Ácido Trinitrobenzenossulfônico. 3. Alimentos funcionais. 4. Plantas medicinais. 5. Fitoterapia.

Palavras-chave: *Cnidoscolus aconitifolius*; Doença Inflamatória Intestinal; TNBS; alimento funcional; chaya.

Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências – Campus de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

TESE DE DOUTORADO

Lesvi Moya Dalamu

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst no modelo de indução por tñbs em ratos

BANCA EXAMINADORA

1º Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Professor Titular no Depto. Farmacologia / Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu-SP

2º Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Professor livre docente na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP – Campinas – SP

3º Profa. Dra. Cintia Rabelo e Paiva

Departamento de Imunofarmacologia/ Faculdade de Medicina – USF – Bragança Paulista-SP

4º Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira

Professor Assistente no Depto. Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu-SP

5º Prof. Dr. Fernando Gomes Romeiro

Professora Assistente no Depto. Clínica Médica / FMB – UNESP – Botucatu-SP

Auxílio financeiro:



Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado

Tenha orgulho do quanto você andou.
Tenha fé em quão longe você pode chegar.

Dedicatória

A meu pai que sempre tem sido minha guia de vida. Minha mãe por ser amiga e minha ancora nas minhas dificuldades.

Ao Manolo, meu amor e companheiro de vida. Por sempre me dar forças e acreditar em mim ainda quando eu nem mesmo acredito.

Ao meu tio Lorenzo cujos conselhos sempre me lembram que tão importante quanto alcançar a meta é curtir o caminho percorrido até ela.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, por me permitir realizar o estudo e contribuir com minha formação profissional.

A meus amigos: Doutora Aline Witaicenis, por sempre estar sendo parte ativa de meus estudos e contribuir ativamente na minha formação como pesquisadora e me incentivar em ser melhor pesquisadora e, além de ser um modelo de pesquisadora, ser uma amiga incondicional. Doutor Celso Acácio Rodrigues A. Costa, por suas contribuições na minha pesquisa e se converter em um exemplo para mim como pesquisador.

Doutoranda Ellen de Oliveira, por crescermos juntas profissionalmente, incentivando-nos mutuamente e se converter em minha irmã.

Mestra Erika Costa, minha outra irmã e profissional dedicada, contribuído no meu desenvolvimento profissional.

Mestra Kessien Sander, pela ajuda no nível profissional e pela genuína amizade criada ao longo do tempo.

Ao Dr. Luiz D. Almeida-Junior pela amizade e o sincero apoio e ajuda em experimentos e dúvidas durante o trabalho. Ao Dr. Alexandre Chagas pela ajuda nos experimentos e a amizade. Doutora Flavia Bonamim, por suas contribuições na minha pesquisa, além da sua amizade.

Aos meus companheiros do laboratório durante o doutorado: Dra. Ana Elisa Valencise Quaglio, Dr. Alexander Tanimoto, Doutoranda Tainan Curimbaba, Mestras Cristiane Mori e Fabiana Masago, Mestrandas Ariane Guimaraes e Gabriela Ribeiro e os estudantes Vinicius Marques e Aida Vejspahic. Obrigada pela colaboração na realização dos experimentos e aprendizado tanto no profissional quanto pessoal.

Meus conterrâneos: Yahima Frion, Celia Casado, Hans Garcia, David Abreu, Aylin Venegas, Yadir González, Migdalia Arazo, Rafael Sout e Joel Mesa por sermos ao mesmo tempo terapeutas e pacientes no árduo caminho de estar longe da nossa terra. Meus amigos: Bertha Gastelbondo, Cris Murta, Fabiana Vasconcellos, Suelen Alves y Ariane Rocha.

Ao querido coletivo dos *Bostaurus*: Mariana Fernandes Machado, Fernanda Fagali, Priscila Santos, Elisa Pioltine, Michelle Pronunciate, Patrícia Fontes, Eduardo Razza, Ramon Botigelli, Dr. Anthony Castilho.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia: Cristina Murcia, Paulo Cesar Mioni, Luiz A. de Oliveira e Janete Teixeira.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp, pelo suporte, em especial David Müller e Fábio Sugano.

Aos membros titulares e suplentes da banca, pelo aceite e disponibilidade.

A Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado pelo apoio da mobilidade.

Prólogo

Uma vez formada em Licenciatura em Ciências Alimentares e posteriormente Mestra em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, sempre me imaginei pesquisando sobre como a dieta podia melhorar o quadro clínico de uma pessoa com problemas associados ao sistema gastrointestinal ou influir positivamente na saúde em sentido geral. Porém, em Cuba as carências materiais, dificulta na maioria dos casos, o início ou a culminação de estudos doutorais em um tempo consideravelmente curto. Graças à convocatória da Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP), pelo auxílio financeiro de mobilidade, e ao Professor Doutor Luiz Claudio Di Stasi, que me recebeu no Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), foi possível realizar e concluir sob sua orientação o presente trabalho.

A tese a seguir foi um grande desafio, como todo novo projeto a se desenvolver; porém, trabalhar com animais, sem prévios conhecimentos de manipulação dos mesmos, dificuldades de quantidade suficiente de material vegetal de estudo, procedente de Cuba, nova equipe de pesquisa, totalmente diferente em quanto a forma de trabalho e idioma, significou um crescimento em todos os sentidos da minha vida.

Durante o período referente ao doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada realizei as seguintes atividades:

Disciplinas cursadas	Ano	Carga Horária	Conceito
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	2014	45	A
Avanços em Biologia Celular, Molecular e Funcional	2014	90	A
Métodos Biofísicos de Avaliação da Motilidade Gastrintestinal	2014	60	A
Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura Celular	2015	60	A
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	2015	30	A
Alimentos funcionais	2016	20	A
Plantas Medicinais Abordagens de Estudo Interdisciplinar	2016	90	B
Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina	2016	30	A
Experimentos Clássicos em Biologia Molecular	2017	30	A
Mediadores da Resposta Inflamatória	2017	45	A
Total		455 h	

1. Participação em eventos científicos:

- o Bases da Carcinogênese: da célula às repercussões clínicas (2017).
- o 3ª Jornada Caipira da Doença Inflamatória Intestinal (2017).
- o XIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017).
- o XII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, Botucatu – SP (2016).
- o Simpósio de Ética e Integridade na Pesquisa, Araraquara – SP (2016).
- o XII Jornada Paulista de Plantas Medicinais. 2015. Botucatu-SP (2015).

2. Trabalhos em Congressos

- o **Avaliação da Atividade Anti-inflamatória da *Cnidocolus aconitifolius* no modelo Experimental de Doença Inflamatória Intestinal. Autores: DALMAU, L. M.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; MORI, C.; CURIMBABA, T. S. F.; DI STASI, L. C.** XIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017).
- o **Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de *Musa* sp AAB (Banana Prata) no Modelo de Indução por TNBS’,** na forma oral. **Autores:** COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. XIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017).
- o **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da farinha dos frutos de *Musa* spp AAB,** na forma de pôster. **Autores:** COSTA, E. F.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- o **Avaliação da atividade antioxidante e dos compostos secundários de *Hibiscus esculentus* L.,** na forma de pôster. **Autores:** OLIVA, K. R. S.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- o **Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como potencial protetor da inflamação intestinal,** na forma de pôster. **Autores:** CURIMBABA, T. F. S.; WITAICENIS, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; TANIMOTO, A.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).

- **Caracterização fitoquímica, quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante do fruto verde de *Musa* spp AAA. Autores:** MORI, C.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- **Anti-inflammatory activity of *Persea americana* Mill. (avocado) in TNBS-induced intestinal inflammation in rats. Autores:** OLIVEIRA, E.C.S; WITAICENIS, A. ALMEIDA JUNIOR, L.D; DALMAU, L.M; DI STASI, L.C. FESBE-SP (2015).
- **Avaliação da atividade anti-inflamatória da chaya no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Autores:** DALMAU, L.M; WITAICENIS, A; OLIVEIRA, E.C.S; ALMEIDA JÚNIOR, L. D; DI STASI, L. C. XII Jornada Paulista de Plantas Medicinais (2015).

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) inclui duas principais doenças: a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa, ambas caracterizadas por períodos de exacerbação dos sintomas acompanhados por intervalos prolongados de remissão. Apesar da etiologia ser pouco elucidada, sabe-se da influência de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. A terapia farmacológica atual não é eficaz para todos os pacientes, apresenta alto custo e desencadeia diversos efeitos colaterais, portanto é necessário o desenvolvimento de novas terapias sendo que as plantas medicinais e componentes presentes na dieta, devido as suas propriedades antioxidantes e/ou imunomoduladora, apresentam uma opção atrativa como terapia complementar. A espécie *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst, popularmente conhecida como chaya, foi selecionada dada sua composição química, rica em fibra e compostos antioxidantes e suas atividades antioxidante e anti-inflamatória testadas em outras afecções. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal das folhas escaldadas e desidratadas de chaya em duas formas: como extrato metanólico 70% (100, 200 e 300 mg/kg, via oral por gavagem) e como farinha incorporada na dieta nas concentrações 5, 10 e 20%, no modelo de indução de inflamação intestinal pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Para tanto, foram avaliados os parâmetros clínicos gerais (ingestão diária de alimentos, peso corporal, diarreia), parâmetros macroscópicos da lesão (score da inflamação, extensão da lesão relação peso/comprimento cólico e aderência), bioquímicos (avaliação da mieloperoxidase, glutatona total e fosfatase alcalina) e microscópicos (hematoxilina-eosina e PAS/Alcian Blue). No extrato metanólico, realizou-se análise fitoquímica, determinação do conteúdo de fenóis totais, capacidade de sequestro de radicais livres e a avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de lipoperoxidação lipídica em membranas de cérebros de ratos. Análises fitoquímicas mostraram principalmente presença de compostos fenóis, flavonoides, flavononas, xantonas, chalconas, auronas, flavononas, saponinas, cumarinas e bases quaternárias. O conteúdo de fenóis totais quantificou 160,555mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de extrato. No ensaio DPPH o extrato apresentou uma concentração eficiente (CE₅₀) de 28,3µg/ml vs. 1.90µg /ml do ácido gálico, mas fraca atividade antioxidante no modelo de lipoperoxidação lipídica, com uma concentração inibitória média (IC₅₀) de 703,28µg/ml vs. 0,71± 0,1µg/ml de quercetina. O tratamento com o extrato não melhorou o processo inflamatório cólico induzido pelo TNBS nos parâmetros macroscópico e bioquímicos avaliados. A dieta enriquecida em todas as concentrações testadas conseguiu evitar a depleção do conteúdo de GSH. A concentração de 20% conseguiu diminuir a atividade da MPO. Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da fosfatase alcalina. Todas as concentrações testadas melhoraram a citoarquitetura epitelial e mantiveram a camada de muco sobre o epitélio intestinal quando comparado com o grupo controle-TNBS. O presente estudo demonstrou que chaya quando incorporada na ração nas concentrações 5, 10 e 20%, mostra atividade antioxidante no processo inflamatório cólico induzido por TNBS em ratos. Esses efeitos podem estar relacionados à fibra e aos compostos fenólicos, sugerindo que este alimento pode ser útil para prevenir ou tratar a recidiva de DII.

Palavras-chaves: Doença Inflamatória Intestinal, TNBS, *Cnidoscolus aconitifolius*, chaya, alimento funcional.

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) comprise two major diseases, Crohn's disease and Ulcerative Colitis, both characterized by periods of exacerbation of symptoms accompanied by prolonged remission intervals. Although the etiology is not certain elucidated, the influence of genetic, immunological and environmental factors is well known. The current pharmacological therapy is not effective for all patients, due to a high cost and triggers several side effects. Therefore, it is necessary to develop new therapies and medicinal plants with their antioxidant and/or immunomodulatory properties are an attractive option as complementary therapy. *Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst, popularly known as chaya, was selected because of its chemical composition, rich in fiber and antioxidant compounds and its antioxidant and anti-inflammatory activity tested in other diseases. The aim of this study was to evaluate the intestinal anti-inflammatory activity of the blanched and dehydrated Chaya leaves in two preparations: as a 70% methanol extract (100, 200 and 300 mg/kg, oral route by gavage) and as flour incorporated in the diet at 5%, 10% and 20% concentrations in the experimental model of intestinal inflammation induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in rats. For that, clinical parameters (daily food intake, body weight, diarrhea), macroscopic damage (score, lesion extension, weight/length ratio and adherence), biochemical parameters (quantification of total glutathione content, myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities) and microscopic analysis (hematoxylin-eosin and PAS/ Alcian Blue for evaluation of mucins) were performed. On the methanol extract was made phytochemical analysis, determination of total phenol content, free radical scavenging activity using the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) model and an evaluation of antioxidant activity by lipid peroxidation assay in membranes of rat brains. Phytochemical analysis showed mainly the presence of phenols, flavonols, flavonones, xanthenes, saponins, coumarins and quaternary bases. The quantification of total phenols shows 160,555mg gallic acid equivalents (GAE)/g extract. In the DPPH assay the extract showed an EC_{50} of 28,3 $\mu\text{g/ml}$ vs. 1.90 $\mu\text{g/ml}$ of gallic acid and a model of lipid peroxidation, but weak antioxidant activity in lipid peroxidation model with an IC_{50} of 196.8 $\mu\text{g/ml}$ vs. $0,71 \pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$ of quercetin. The extract did not improve the colonic inflammatory process induced by TNBS on macroscopic and biochemical analysis. The enriched diet in all tested concentrations was able to avoid depletion of the GSH content. The concentration of 20 % was able to decrease MPO activity. No significant change was observed in alkaline phosphatase activity. All concentrations tested improved epithelial cytoarchitecture and maintained the mucus layer on intestinal epithelium by comparing with control-TNBS group. This study demonstrated that when chaya is incorporated to a diet at 5, 10 and 20% concentrations shows antioxidant activity. These effects may be related to the presence of dietary fiber and the phenolic compounds present in the species, suggesting that this food may be useful to prevent or avoid recurrence of IBD.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, TNBS, *Cnidoscopus aconitifolius*, chaya, functional food.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Avaliação do conteúdo de glutathione total (GSH) cólica na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 21
- Figura 2.** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) cólica na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p<0,01$, comparados ao grupo controle-TNBS..... 21
- Figura 3.** Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) cólica na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 22
- Figura 4.** Avaliação do conteúdo de glutathione total (GSH) cólica na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 22
- Figura 5.** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase cólica (MPO) na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 25
- Figura 6.** Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina cólica (FA) na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 25
- Figura 7.** Avaliação do conteúdo de glutathione total (GSH) cólica no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $*p<0,05$ e $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 28
- Figura 8** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase cólica (MPO) no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M.,

analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $*p<0,05$ e $**p<0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS..... 27

Figura 9. Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina cólica (FA) no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. com $**p<0,01$ comparados ao grupo controle-TNBS..... 28

Figura 10. Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais, 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta 5%, (D) Grupo dieta 10%, (E) Grupo dieta 20%. L=lúmen, M=mucosa, S=submucosa, CM=camada muscular, i= infiltração celular, seta preta= integridade da membrana, seta vermelha=vascularização..... 29

Figura 11. Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais, 7 dias após a administração do TNBS. **Cortes corados com PAS/Alcian Blue.** Fotomicrografias feitas com microscópio óptico Zeiss Axio Imager A2, no aumento 5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta 5%, (D) Grupo dieta 10%, (E) Grupo dieta 20%. m=mucosa, seta preta= células caliciformes..... 30

Figura 12. Escore microscópico expresso em mediana (intervalo interquartil), analisados por teste Kruskal-Wallis com teste a posteriori Dunn. Dados comparados ao grupo controle-TNBS, com $**p<0,01$ 31

Lista de Tabelas

Tabela 1. Componentes da ração padrão Nuvilab® em pó, para roedores. Dados fornecidos pelo fabricante.....	10
Tabela 2. Principais ingredientes da composição da dieta oferecida aos ratos (g/100g).....	11
Tabela 3. Critérios da avaliação da gravidade e da extensão da lesão cólica.....	14
Tabela 4. Critério de avaliação microscópica de lesão cólica.....	16
Tabela 5. Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato metanólico de chaya.....	18
Tabela 6. Análise clínica dos animais administrados com extrato de chaya (100, 200 e 300mg/kg) no modelo agudo de inflamação intestinal induzida por TNBS.....	20
Tabela 7. Avaliação dos efeitos do extrato de chaya (100, 200 e 300mg/kg) sobre parâmetros macroscópicos no modelo agudo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.	20
Tabela 8. Análise clínica dos animais administrados com extrato de chaya (100, 200 e 300mg/kg) na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS.....	22
Tabela 9. Avaliação dos efeitos do extrato de chaya (100, 200 e 300mg/kg) sobre parâmetros macroscópicos no modelo crônico de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.	23
Tabela 10. Análise clínica dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com chaya (5, 10 e 20%) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.	25
Tabela 11. Avaliação da ração enriquecida com chaya sobre os parâmetros macroscópicos no processo de inflamação intestinal induzido por TNBS.....	26

Lista de abreviações

AGCC – ácido graxo de cadeia curta
ALFAC – álcool 80%, formaldeído e ácido acético
BHT – hidroxitolueno butilado
DC – Doença de Crohn
CE₅₀ – Concentração eficiente
DII – Doença Inflamatória Intestinal
DTNB – ditiobisnitrobenzóico
EAG– equivalente de ácido gálico
E.P.M. – erro padrão da média
EROS– espécies reativas de oxigênio
ERN– espécies reativas de nitrogênio
GPx– glutathione peroxidase
GSH – glutathione
GSSG – glutathione oxidada
HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio
IC₅₀ – concentração inibitória média
IL – interleucina
INF – interferon
MPO – mieloperoxidase
MUC– mucina
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
RPM – rotação por minuto
RCU – Retocolite ulcerativa
Th – célula T helper
TGI – trato gastrointestinal
TNBS – ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF – fator de necrose tumoral
TLR– *Toll-like receptor*
Treg – T reguladora

Sumário

I. Introdução	1
II. Materiais e Métodos	8
1. Material vegetal.....	8
2. Obtenção do Material Vegetal e Preparo do extrato	8
3. Análise fitoquímica qualitativa do extrato.....	8
4. Análise quantitativa do conteúdo de fenóis totais	8
5. Determinação da capacidade sequestradora de radicais livres do extrato	9
6. Determinação da capacidade antioxidante do extrato metanólico de <i>C. aconitifolius</i> no modelo de lipoperoxidação em membranas de cérebro de rato.....	10
7. Preparo das rações enriquecidas com folhas escaldadas de <i>C. aconitifolius</i>.....	10
8. Animais.....	11
9. Indução do processo inflamatório intestinal	12
10. Protocolos e grupos experimentais	13
10.1. Avaliação da atividade do extrato de <i>C. aconitifolius</i> na fase aguda do processo inflamatório intestinal.....	13
10.2. Avaliação da atividade do extrato de <i>C. aconitifolius</i> na fase crônica do processo inflamatório intestinal.....	14
10.3. Avaliação da atividade da dieta enriquecida com farinha de <i>C. aconitifolius</i> no processo inflamatório intestinal	14
11. Análise clínica e avaliação macroscópica	15
12. Determinações bioquímicas	16
12.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase	16
12.2. Determinação do conteúdo total de glutathiona	16
12.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.....	16
13. Avaliação microscópica das amostras de cólon	17

14. Análise estatística	18
III. Resultados	19
1. Análise fitoquímica qualitativa do extrato	19
2. Determinação do conteúdo de fenóis totais e da capacidade de sequestro do DPPH..	20
3. Determinação da capacidade antioxidante do extrato metanólico de <i>C. aconitifolius</i> no modelo de lipoperoxidação em membranas de cérebro de rato	20
4. Análise clínica dos animais e avaliação macroscópica dos efeitos do extrato de <i>C. aconitifolius</i> na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS.....	20
5. Avaliações bioquímicas dos efeitos do tratamento com extrato metanólico de <i>C. aconitifolius</i> na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS.....	22
6. Análise clínica dos animais e avaliação macroscópica dos efeitos do extrato de <i>C. aconitifolius</i> na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS....	23
7. Análise clínica dos animais e avaliação macroscópica dos efeitos do extrato de <i>C. aconitifolius</i> na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS....	24
8. Avaliações bioquímicas dos efeitos do tratamento com extrato metanólico de <i>C. aconitifolius</i> na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS....	24
9. Análises clínica e avaliação macroscópica dos efeitos do consumo da ração enriquecida com folhas de <i>C. aconitifolius</i> no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS ...	26
10. Avaliações bioquímicas dos efeitos do consumo da ração enriquecida com folhas de <i>C. aconitifolius</i> no processo inflamatório intestinal induzido por TNBS	27
11. Análises microscópicas.....	29
IV. Discussão.....	32
V. Conclusão	41
VI. Referências bibliográficas	42

I. Introdução

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é representada fundamentalmente por duas doenças idiopáticas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU); ambas caracterizadas pela inflamação crônica do trato gastrointestinal (TGI), com períodos de exacerbação intercalados com períodos de remissão dos sintomas. A distinção entre DC e RCU baseia-se em grande parte na distribuição da região afetada e nas características morfológicas da doença, bem como na combinação de exames clínicos, endoscópicos e patológicos (BAUMGART; SANDBORN, 2007; SHAH et al., 2011).

A DC é caracterizada pela inflamação severa em qualquer segmento do TGI, mas com predomínio da região do íleo terminal, sendo a extensão da lesão heterogênea e descontínua. No aspecto macroscópico, a parede intestinal apresenta lesões fibromusculares que inclui desde estenoses, abscessos e até fístulas. No aspecto microscópico é observado anormalidades descontínuas da citoarquitetura das vilosidades, inflamação transmural e granulomas. A apresentação clínica na fase ativa da doença pode incluir diarreia, dor abdominal, febre, perda de peso, sinais clínicos de obstrução intestinal e em alguns casos a presença de sangue nas fezes (GEBOES, 2008).

Na RCU o processo inflamatório é caracterizado por ulceração nas camadas mucosa e submucosa da parede do intestino grosso, sendo a extensão da lesão contínua. Embora o padrão da doença seja dependente de sua gravidade, microscopicamente, as características da RCU são infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos na lâmina própria, abscessos e/ou ruptura severa e generalizada da citoarquitetura das criptas de Lieberkühn, bem como depleção de muco, diminuição de células caliciformes e rupturas das criptas inflamadas. Os pacientes comumente têm manifestações clínicas como diarreia, dor abdominal, perda de peso e presença de sangue, muco e pus nas fezes (DEROCHE; XIAO; LIU, 2014; DI SABATINO et al., 2012; PATIL; MOSS; ODZE, 2016).

Sendo a DII uma enfermidade idiopática, as descobertas a respeito da etiologia da mesma constantemente evoluem, mas é de consenso clínico que acontece em indivíduos geneticamente susceptíveis, que apresentam perda da integridade da barreira epitelial e uma resposta imune intestinal inadequada frente à microbiota intestinal (ANANTHAKRISHNAN, 2015).

Em condições de homeostase, as reações inflamatórias na mucosa intestinal são bem controladas pelas células pertencentes tanto ao sistema imune inato quanto ao adquirido. Esse equilíbrio se consegue pelo balanço entre a expressão e secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-11) e citocinas pró-inflamatórias como (fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon (IFN), interleucinas (IL): IL-1, IL-6, IL-8 IL-17, IL-23) (CHO, 2008). Frente a estímulos como infiltração de microrganismos patógenos, ocorre a ativação de células do sistema imune inata e nas células epiteliais, mediado principalmente pela ativação de receptores de reconhecimento de padrões como os TLR (MOGENSEN, 2009). A estimulação dos TLR ativa várias cascatas de sinalização como a do NF- κ B, o qual modula a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, quimosinas e moléculas de adesão (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). Os TLR também se encontram nas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, e monócitos), as quais mediam tanto a proliferação de macrófagos quanto a diferenciação de células T CD4⁺ em células efectoras Th (T *helper*) através de citocinas (HANAUER, 2006).

Alterações da resposta imune acontece em pessoas como DII. As células dendríticas ou os macrófagos produzem IL-12 e se induz a diferenciação das células T virgem CD4⁺ em Th1, resposta imune que se associa às pessoas que desenvolvem DC, se produz excesso de IFN- γ , TNF- α IL-1, IL2 e IL6. Atualmente a resposta mediada pelo IL23 que leva a diferenciação das células TCD4⁺ em Th17 se tem identificado com importante na inflamação intestinal (CHO, 2008). Enquanto na RCU a diferenciação das TCD4⁺ em Th2 é mediada secreção IL-13 e produção inadequada de citocinas IL4, IL5, IL10 e IL13 (HANAUER, 2006). A inadequada supressão das células T reguladoras também se encontra entre os fatores que atentam contra uma resposta imune eficiente podem contribuir para anormalidades imunes em pessoas com DII (MAYNE; WILLIAMS, 2013).

A ocorrência de um estresse oxidativo, seja como causa ou consequência da inflamação, também está envolvida na patogênese da DII. Pessoas com DII apresentam um quadro de estresse oxidativo caracterizado pela geração excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, assim como de Espécies Reativas de Nitrogênio como óxido nítrico, e peróxido de nitrito, bem como pela depleção do sistema de defesa antioxidante, formado principalmente pelas enzimas glutatona, catalase e superóxido dismutase (TIAN;

WANG; ZHANG, 2017). Nos períodos de exacerbação da doença, os neutrófilos e macrófagos são os maiores produtores de espécies reativas. Essas células secretam superóxido e ácido nítrico pela ativação da NADPH oxidase e a óxido nítrico sintase induzível, os quais induzem citocinas pró-inflamatórias, que leva a produção de mais espécies reativas, provocando danos nas proteínas do citoesqueleto e das proteínas que mantêm interação célula-célula como as *tigh junctions*, bem como dano a outras estruturas como DNA e lipídios da membrana citoplasmática, provocando consequentemente, a perda da integridade da barreira intestinal (BANAN et al., 1999).

Além disso, os pacientes com DII ativa apresentam um desequilíbrio da microbiota intestinal, nomeada disbiose, onde a população de microrganismos com propriedades inflamatórias é maior que a de microrganismos com propriedades benéficas (FRANK et al., 2007; MYLONAKI et al., 2005). Dentre os microrganismos patógenos que se encontram aumentados estão os pertencentes aos gêneros *Proteobacteria*, *Fusobacterium*, (VANDEPUTTE et al., 2016) e as espécies *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* (BINION, 2016) e *Ruminococcus gnavus* (JOOSSENS et al., 2011); enquanto as espécies benéficas *Bifidobacterium adolescentes* e as pertencentes ao filo Firmicutes, como *Diaslister invisus*, *Roseburia intestinalis*, e *Faecalibacterium prausnitzii*, diminuem drasticamente (DEGRUTTOLA et al., 2016; FRANK et al., 2007).

Vários estudos reforçam a hipótese dos fatores ambientais como componente etiológico, capazes de modificar, modular ou regular o curso da DII (ANTONIOU et al., 2016; LEE et al., 2015; MAYER, 2010). Dentre eles, a dieta e/ou adoção do consumo alimentar mais semelhante à dos países ocidentais, onde prevalece a ingestão de alimentos processados e com alto conteúdo calórico, bem como o baixo consumo de alimentos vegetais (HASKEY; GIBSON, 2017), reforça a importância desse fator no aumento tanto da incidência quanto da prevalência dessa enfermidade em países em vias de desenvolvimento (HEIN et al., 2014; KAPPELMAN et al., 2013; MOLODECKY et al., 2012; NG et al., 2013, 2016; YE; CAO; CHENG, 2013). O Brasil, embora com poucos estudos, mostra essa mesma tendência (PARENTE et al., 2015; VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009)

A má nutrição é característica de pacientes com DII devido a vários fatores. A ocorrência de diarreia provoca perda de proteínas e eletrólitos e, quando associado a dor abdominal, reduz em muitos casos a ingestão de alimentos, levando a uma perda de peso

em um curto período de tempo. Além disso, alguns dos microrganismos prejudiciais que crescem durante a disbiose também fazem com que ocorram efeitos adversos (WĘDRYCHOWICZ; ZAJĄC; TOMASIK, 2016).

A terapia farmacológica convencional para tratar a DII compreende agentes anti-inflamatórios e/ou agentes que reduzem os sintomas associados à enfermidade, representados principalmente pelos aminossalicilatos, os corticoesteróides, agentes imunomoduladores e terapia biológica. A terapia está focada em restaurar a mucosa intestinal do paciente, através do bloqueio da progressão do dano intestinal, objetivando diminuição dos sintomas clínicos, dos marcadores de atividade de inflamação, das lesões endoscópicas, menor recidiva, hospitalização e procedimento cirúrgico, traduzindo-se em uma melhor qualidade de vida (COLOMBEL; NARULA; PEYRIN-BIROULET, 2017; VAKILI; TAHER; EBRAHIMI, 2012).

No entanto, todos esses tratamentos apresentam efeitos colaterais em uma porcentagem considerável dos pacientes, que vão desde manifestações como dores de cabeça, náuseas, anorexia, reações alérgicas, hepatite, má nutrição, pancreatites até a ocorrência de câncer (LOW; NGUYEN; MIZOGUCHI, 2013), o que leva a custos econômicos diretos, como de procedimentos de diagnóstico, aquisição de medicamentos, monitoramento de terapia, hospitalização e de pessoal médico e custos indiretos como perda da produtividade laboral, licença por doença, desemprego ou aposentadoria antecipada (PETRYSZYN; WITCZAK, 2016), indicando a importância da busca de novas estratégias farmacológicas e complementares para o tratamento destas doenças.

Para alcançar esse objetivo, uma das estratégias utilizadas é o uso de alimentos funcionais como terapia complementar ao tratamento. Esses são alimentos que, além de suas capacidades nutricionais, promovem efeitos metabólicos e fisiológicos positivos na manutenção de uma correta saúde física e mental (CLAUS, 2014; GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2002). Entre os candidatos a serem alimentos funcionais, as plantas têm sido amplamente pesquisadas, já que na sua composição apresentam metabólitos com potenciais benefícios à saúde, entre eles fibras e compostos químicos com potencial terapêutico.

As fibras dietéticas se definem como polímeros hidratos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado e que são parcial ou totalmente fermentadas no intestino (FAO; WHO, 2009). Os benefícios da degradação destas pela microbiota intestinal está associado com a saúde e bem-estar do hospedeiro, porque estimula o

crescimento e/ou atividade das bactérias benéficas (GIBSON et al., 2004). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), principalmente propionato, acetato e butirato são produtos finais da fermentação das fibras dietéticas e os principais responsáveis pelos benefícios promovidos ao hospedeiro (PITUCH-ZDANOWSKA; BANASZKIEWICZ; ALBRECHT, 2015). Tais benefícios, promovidos graças às suas propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora, já foram demonstrados tanto em modelos animais quanto em seres humanos (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; FERNÁNDEZ-BAÑARES et al., 1999; HANAI et al., 2004; RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2002)

Os compostos químicos, dentre eles os polifenóis, especialmente os flavonoides, são amplamente estudados, devido ao seu já reconhecido papel protetor frente a processos de dano no organismo. Propriedades biológicas conhecidas *in vitro* e *in vivo* são as antioxidantes, cardioprotetivas, anti-cancerígena, anti-microbianas e anti-inflamatórias (LI et al., 2014). Outra propriedade dos flavonoides que tem sido explorada é sua capacidade em melhorar a função de barreira do epitélio intestinal. Os flavonoides conseguem melhorar a permeabilidade seletiva do epitélio intestinal através da preservação das *tigh junctions* (SUZUKI; HARA, 2011).

Com base no exposto e considerando sua composição química, a espécie *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst, conhecida popularmente como chaya, foi selecionada para a realização do presente estudo. O gênero *Cnidoscolus* compreende um grupo de arbustos arbóreos distribuídos fundamentalmente na América Central e no Caribe. Atualmente existem discrepâncias na classificação botânica devido às características morfológicas das folhas, tendo quatro variedades, a *estrella*, *picuda*, *chayamansa* e *redonda* (ROSS-IBARRA; MOLINA-CRUZ, 2002). Popularmente conhecidas como “chaya”, encontram-se: *C. chaya* Lundell, *C. chayamansa* McVaugh, *C. napeifolius* (Desr.) Pohl, *Jatropha aconitifolia* Mill., *J. aconitifolia* var. *geninuia* Müll. Arg., *J. aconitifolia* var. *papaya* (Medik.) Pax, *J. napeifolia* Desr., *J. papaya* Medik., *J. urens* var. *inermis*” Calvino, entretanto todas citadas são sinônimas da espécie *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst (Tropicos, 2017).

A chaya é um arbusto frondoso, que pode atingir uma altura de aproximadamente 7 metros. Possui folhas lobadas verdes escuras perenes, de bordas serradas e pecíolo delgado e comprido com tricomas urticantes. A espécie propaga-se vegetativamente em qualquer época do ano, conseguindo se adaptar e prosperar em condições ambientais

adversas e caracteriza-se pela sua resistência a patógenos e a necessidade de pouco cuidado (VICTOR et al., 2016).

As folhas apresentam aminoácidos como alanina, arginina, glutamina, valina e ácido glutâmico. Entre os minerais presentes na chaya encontram-se o cálcio, sódio, ferro, iodo e potássio, bem como cobre, magnésio, flúor, zinco e selênio. As vitaminas presentes nas folhas são o ácido ascórbico, riboflavina, tiamina e β -caroteno (KUTI; KUTI, 1999). A fibra dietética se destaca entre os componentes da planta, com quantidades superiores a de outros vegetais usualmente consumidos (KUTI; KUTI, 1999; MOLINA-CRUZ, ALVARO; CIFUENTES, ROLANDO, 2003; MOYA et al., 2013).

Estudos fitoquímicos nas folhas relatam a presença de alcaloides, saponinas, taninos, fenóis e flavonoides em extratos aquosos e etanólicos (AWOYINKA, O. A., BALOGUN, I. O. AND OGUNNOWO, 2007; MORDI; AKANJI, 2012; MOYA et al., 2013). Dentre os flavonoides identificados se encontram os glicosídeos de kaempferol e de quercetina (GONZÁLEZ-LARREDO et al., 2003; KOLTERMAN; BRECKON; KOWAL, 1984). Os glicosídeos cianogênicos são antinutrientes presentes nas folhas, e precisam ser removidos por apresentarem atividade citotóxica, podendo, em alguns casos serem responsáveis por cianose crônica. Embora as concentrações reportadas nas folhas (2,89 μ g ácido cianídrico /g de folhas) não apresentem risco de efeitos adversos para as pessoas que as consomem (KUTI; KONORU, 2006), é necessário aplicar tratamento térmico (micro-ondas, água em ebulição ou vapor) para garantir um consumo mais seguro da planta (OBOH, 2005; MOYA, 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* com extratos de chaya tem demonstrado diversas atividades biológicas. A atividade mais explorada tem sido a hepatoprotetora. O extrato etanoico na dose 200 mg/kg inibiu os níveis de bilirrubina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) nos animais tratados no modelo de dano hepático induzido por paracetamol, evidenciando o papel protetor da planta ao manter a integridade dos hepatócitos, sendo esta atividade conferida às suas propriedades antioxidante e sequestradora de radicais (OYAGBEMI, A. A. AND ODETOLA, 2010). Os mesmos efeitos foram encontrados ao avaliar os parâmetros anteriores no extrato etanólico e dose 200 mg/kg, mas no modelo hepatotóxico induzido por rifampicina e isodiazida (PILLAI et al., 2012a). Outro estudo de hepatotoxicidade mediante o modelo animal de etanol absoluto concluiu que o extrato metanólico da chaya nas doses 100 e 200 mg/kg foi capaz de reduzir os níveis de colesterol e triacilglicerídeos

e na dose de 200 mg/kg, também ter sido capaz de evitar a depleção dos níveis de glutathiona, superóxido dismutase e catalase, restaurando assim o estado antioxidante dos ratos tratados, sendo esses últimos efeitos associados aos compostos antioxidantes presentes na planta (ADARAMOYE; ALUKO; OYAGBEMI, 2011).

A chaya quando administrada na dieta de animais (na concentração 10% e 20%) com dano renal e hepático induzido por má nutrição proteica-calórica conseguiu reduzir significativamente os níveis de ALP, ALT e AST; TAG, a LDL e a HDL; além de restaurar as concentrações dos eletrólitos plasmáticos (OYAGBEMI; ODETOLA, 2013).

O efeito hiperlipidêmico do extrato de chaya (100 e 250 mg/kg) foi demonstrado em ratos submetidos a uma dieta aterogênica, tendo um efeito similar ao fármaco Atorvastatin, ao diminuir os níveis séricos de LDL, VLDL, colesterol, triglicerídeos e aumentar os níveis de HDL (PILLAI et al., 2012b).

Outra atividade explorada tem sido a gastroprotetora. No modelo animal de úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto na concentração 200 mg/kg, o extrato teve o mesmo efeito que a droga de referência usada, o omeprazol, associando-se o efeito à presença de compostos fenólicos na planta, principalmente dos flavonoides (MENA LINARES; GONZÁLEZ MOSQUERA, et al., 2017).

Diante disso, há evidências claras de que esta espécie tem potencial atividade anti-inflamatória. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da espécie *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst, conhecida popularmente como chaya, no modelo de inflamação intestinal induzida pelo ácido 2,4,6- trinitobenzenosulfônico (TNBS).

II. Materiais e Métodos

1. Material vegetal.

Se usaram folhas de plantas adultas de *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I. M. Johnst identificada e depositada no Herbário do Instituto de Ecologia e Sistemática (IES) CITMA da Havana, com número de registro HAC 42669.

2. Obtenção do Material Vegetal e Preparo do extrato

As coletas foram realizadas no verão dos anos de 2014 e 2017. A coleta de *Cnidoscolus aconitifolius* forneceu 3,5 Kg de material fresco. As folhas foram cortadas em pedaços, escaldadas em água em ebulição (durante $2 \text{ min} \pm 1 \text{ minutos}$), submetidas a desidratação em estufa (40°C) durante 48 horas, pulverizadas, resultando em 700g de material seco. Posteriormente o produto foi macerado a frio com metanol (70%) na proporção 1:4 (m/v) em 3 filtrações para a obtenção do extrato metanólico 70%. Posteriormente, o extrato foi submetido a extração do álcool usando um rotaevaporador e ao final determinado a quantidade de sólidos totais por mililitro de extrato. Após esta etapa, o extrato foi armazenado até ser usado em testes posteriores.

3. Análise fitoquímica qualitativa do extrato

O perfil fitoquímico do extrato de *C. aconitifolius* foi analisado conforme metodologia descrita por MATOS (1988) e adaptada por GONZÁLEZ e DI STASI (2002), visando a detecção de fenóis, taninos, antiocianinas, flavonoides, leucoantiocianinas, xantonas, esteróides triterpenóides, heterosídeo saponínico, ácidos fixos fortes, bases quaternárias, alcaloides, glicosídeo cianogénico, quinonas, cumarinas e agliconas flavonoides.

4. Análise quantitativa do conteúdo de fenóis totais

A dosagem de fenóis totais foi realizada por meio do uso do reagente de Folin-Ciocalteu, que é constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico. Nesta solução o molibdênio e o tungstênio encontram-se em estado de oxidação 6+. Na presença de certos agentes redutores, como substâncias fenólicas, o

estado de oxidação média destes metais fica entre 5-6, adquirindo coloração azul, que pode ser monitorada em 750 nm (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENT, 1999).

Soluções do extrato foram preparadas nas concentrações de 20; 50; 100; 200; 400 e 800 µg/ml. Em cada poço da microplaca adicionou-se 50 µL de água, 12,5 µl das amostras-testes, 12,5 µL do reagente Folin (2N) e as misturas reacionais foram mantidas ao abrigo da luz por 5 minutos. Decorrido o período de incubação, adicionou-se 125µl de Na₂CO₃ (7%) e uma incubação adicional de 1,5h ao abrigo da luz. Como padrão se utilizou ácido gálico nas concentrações de 6,25,20, 25; 50; 100; 200; 400 e 800 µg/ml. Os testes foram realizados em triplicata. O teor de fenóis totais foi calculado por interpolação da absorbância da amostra-teste contra a curva de calibração construída com ácido gálico e expresso em mg de EAG (equivalente de ácido gálico).

5. Determinação da capacidade sequestradora de radicais livres do extrato

A atividade sequestradora de radicais livres foi avaliada segundo as metodologias de BLOIS (1958) e BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995), adaptado para microplaca de 96 poços. O método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante, o DPPH• é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional.

O extrato foi preparado nas concentrações finais de 5; 10; 15; 20; 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 800 e 900 µg/ml. Em cada poço microplaca adicionou-se 100 µL das amostras-testes, 200 µL da solução de DPPH (40 µg/mL), foram mantidas em incubação ao abrigo da luz por 30 minutos. Como controle se utilizou 200 µL de DPPH diluídos em 200 µL de metanol 70%.

As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 517 nm, tendo como controle positivo padrões de ácido gálico (0-15 µM/ml em metanol 70%). Os valores foram expressos na forma de

Concentração Eficiente (CE_{50}), o seja, a quantidade necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%.

6. Determinação da capacidade antioxidante do extrato metanólico de *C. aconitifolius* no modelo de lipoperoxidação em membranas de cérebro de rato

A atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas escaldadas de chaya verdes foi avaliada pelo método de lipoperoxidação em membranas de cérebro de ratos segundo o protocolo descrito por GÁLVEZ et al. (1995) com algumas modificações.

Membranas de cérebro de ratos machos *Wistar* saudáveis foram homogeneizadas em solução tampão PBS (pH 7.4) na proporção 1:4 (p/v) contendo 19 partes de fosfato monossódico (NaH_2PO_4 – 10 mM) e 81 partes de fosfato dissódico (Na_2HPO_4 – 10mM). O homogenado foi centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e diluído na proporção de 1:10 (v/v) na solução tampão utilizada para a homogeneização.

A peroxidação lipídica foi induzido com adição de uma solução de Ferro/Ácido Ascórbico (100 μ M/l). A atividade antioxidante do extrato foi determinada em um range de concentrações, de 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 e 4000 μ g/ml, concentração final na reação. As amostras contendo extrato, membrana de cérebro e solução de Ferro/Ácido Ascórbico foram incubadas a 37°C por 12 minutos em banho-maria com agitação. A reação foi interrompida com a adição do reativo tiobarbitúrico 0,5% preparado em ácido tricloroacético (TCA) 20%. O reativo tiobarbitúrico reage com o malondialdeído (MDA), que é um metabólito liberado durante a reação de lipoperoxidação, gerando uma cor cuja intensidade é determinada no espectrofotômetro. A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) a 532 nm. Posteriormente se foi calculada a Concentração inibitória média (IC_{50}), ou seja, a concentração do extrato capaz de inibir 50% da peroxidação lipídica induzida nas membranas de cérebro de ratos. A quercetina foi usada como padrão e se avaliada nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20 e 40 μ g/ml.

7. Preparo das rações enriquecidas com folhas escaldadas de *C. aconitifolius*

Folhas escaldadas em água em ebulição (entre 1 e 3 minutos) forma desidratadas em estufa (40°C) durante 48 horas, pulverizadas e incorporadas manualmente à ração para

roedores Nuvilab® (Tabela 1), baseando-se na técnica de diluição em série, garantindo o máximo de homogeneização possível, segundo a porcentagem desejada. Após o preparo, as misturas foram submetidas a um processo de peletização, em que se adiciona uma pequena quantidade de água que facilita a formação do pellet. Posteriormente os pellets foram submetidos ao processo de secagem em estufa (50 °C) por 12 horas para eliminar a umidade e seguidamente foram armazenados em sacos hermeticamente fechados para uso diário na alimentação dos animais.

A composição química da dieta com a farinha das folhas de *C. aconitifolius* (chaya) foi calculada a partir dos nutrientes contidos na ração Nuvilab® em pó com a adição de 5, 10 e 20% da farinha do produto (Tabela 2).

8. Animais

Ratos machos albinos Wistar com peso entre 180 e 220 g, disponibilizados comercialmente pela empresa Anilab®, foram utilizados para os testes de atividade anti-inflamatória intestinal. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), Instituto de Biociências, UNESP (Campus Botucatu), durante pelo menos 7 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 claro-escuro de 12 horas. Após o início do experimento os ratos foram separados em grupos, em caixas contendo de 3 a 4 animais, alimentados com ração peletizada de manutenção Nuvilab® e água *ad libitum*. Todo o estudo foi de acordo com o protocolo experimental nº 846 aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Tabela 1: Componentes da ração padrão Nuvilab® em pó, para roedores. Dados fornecidos pelo fabricante.

Níveis de garantia por quilograma de produto:

Umidade (máx)	125g/kg	Pantotenato de cálcio (min)	20mg/kg
Proteína bruta (min)	220g/kg	Ácido Fólico (min)	1mg/kg
Extrato etéreo (min)	40g/kg	Biotina (min)	0,05mg/kg
Material mineral (máx)	90g/kg	Colina (min)	1.900mg/kg
Fibra bruta (máx)	70g/kg	Sódio (min)	2.700mg/kg
Cálcio (min-máx)	10-14g/kg	Ferro (min)	50mg/kg

Fósforo (min)	8.000g/kg	Manganês (min)	60mg/kg
Vitamina A (min)	13.000UI/kg	Zinco (min)	60mg/kg
Vitamina D3 (min)	2.000UI/kg	Cobre (min)	10mg/kg
Vitamina E (min)	34UI/kg	Iodo (min)	2mg/kg
Vitamina K3 (min)	3UI/kg	Selênio (min)	0,05mg/kg
Vitamina B1 (min)	5mg/kg	Cobalto (min)	1,50mg/kg
Vitamina B2 (min)	6mg/kg	Fluor (máx)	80mg/kg
Vitamina B6 (min)	7mg/kg	Lisina (min)	12g/kg
Vitamina B12 (min)	22mg/kg	Metionina (min)	4.000mg/kg
Niacina (min)	60mg/kg	BHT (min)	100mg/kg

Composição básica do produto: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitaminas A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

Tabela 2. Principais ingredientes da composição da dieta oferecida aos ratos (g/100g).

Ingredientes	Controle - TNBS	Dieta 5%	Dieta 10%	Dieta 20%
Proteína bruta	22	20,9	19,8	17,6
Material mineral	9	8,55	8,1	7,2
Fibra bruta	7	6,65	6,3	5,6
Gordura	4	3,89	3,6	3,2
Chaya	-	5	10	20

9. 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 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 de (50 mg/kg de ketamina e 7 mg /kg de xilazina, por via intraperitoneal). Em seguida, foi administrado via retal (intracôlonica) 0,25 mL de uma solução contendo 40 mg/mL de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% (v/v), com ajuda de um cateter (diâmetro de 2 mm, pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm). Os animais anestesiados foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação da

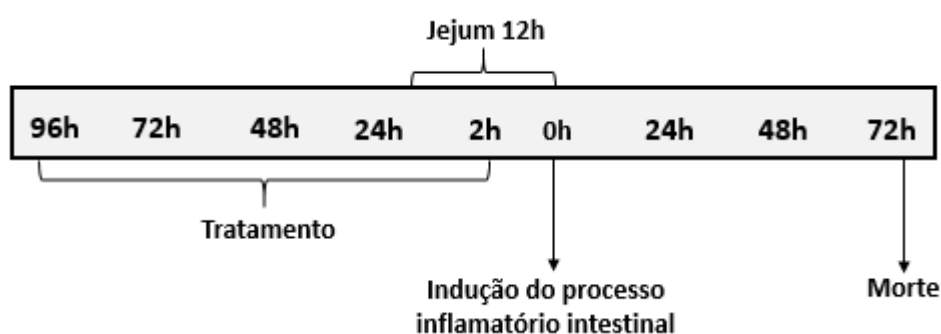
solução até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com a administração de solução salina em substituição ao TNBS. Todos animais foram mortos após a indução do processo inflamatório seguindo cada protocolo realizado.

10. Protocolos e grupos experimentais

Os estudos e animais foram realizados segundo os protocolos seguintes descritos:

10.1. Avaliação da atividade do extrato de *C. aconitifolius* na fase aguda do processo inflamatório intestinal

O tratamento foi administrado por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foi realizado seguindo o seguinte esquema:



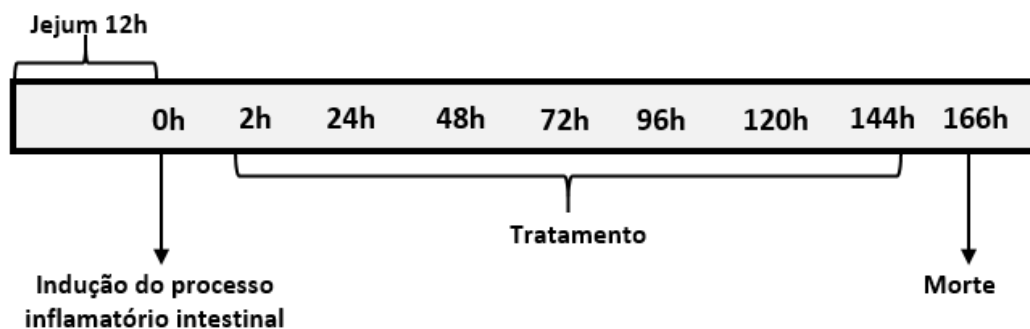
Todos os animais foram alimentados com ração peletizada de manutenção Nuvilab[®]. Os animais dos grupos controle e saudável receberam Tween 80 na concentração 1% por via oral. Todos os animais foram mortos 72 horas após a indução do processo inflamatório.

Os grupos experimentais utilizados foram os seguintes:

- A. Grupo saudável: animais sem colite e sem tratamento (n= 8).
- B. Grupo controle-TNBS: animais com inflamação intestinal e sem tratamento (n= 8).
- C. Grupo tratado com chaya (n= 7):
 - C1: Animais com inflamação intestinal tratados com 100 mg/Kg.
 - C2: Animais com inflamação intestinal tratados com 200 mg/Kg.
 - C3: Animais com inflamação intestinal tratados com 300 mg/Kg.

10.2. Avaliação da atividade do extrato de *C. aconitifolius* na fase crônica do processo inflamatório intestinal

O tratamento foi administrado por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foi realizado de acordo ao seguinte esquema:



Todos os animais foram alimentados com ração peletizada de manutenção Nuvilab[®]. Os animais dos grupos controle e branco receberam Tween 80 na concentração 1% por via oral. Todos os animais foram mortos 7 dias após a indução do processo inflamatório.

Os grupos experimentais utilizados foram os seguintes:

A: Grupo saudável: animais saudáveis e sem tratamento (n= 8).

B: Grupo controle-TNBS: animais com inflamação intestinal e sem tratamento (n= 8).

C: Grupo tratado com extrato de chaya:

C1: Animais com inflamação intestinal tratados com 100 mg/Kg (n= 7).

C2: Animais com inflamação intestinal tratados com 200 mg/Kg (n= 7).

C3: Animais com inflamação intestinal tratados com 300 mg/Kg (n= 7).

10.3. Avaliação da atividade da dieta enriquecida com farinha de *C. aconitifolius* no processo inflamatório intestinal

Os animais foram alimentados com as rações durante 21 dias, posteriormente foi induzido o processo inflamatório intestinal, continuando o consumo durante mais 7 dias após a indução, quando então os animais foram mortos.

Os grupos experimentais utilizados foram os seguintes:

A: Grupo saudável: animais saudáveis alimentados com ração peletizada de Nuvilab[®] (n= 8).

B: Grupo controle-TNBS: animais com inflamação intestinal e alimentados com ração peletizada de Nuvilab[®] (n= 8).

C: Grupo tratado com alimentados com ração enriquecida com chaya:

C1: Animais com inflamação intestinal alimentados com ração Nuvilab[®] enriquecida em 5% de farinha de chaya (n= 7).

C2: Animais com inflamação intestinal alimentados com ração Nuvilab[®] enriquecida em 10% de farinha de chaya (n= 7).

C3: Animais com inflamação intestinal alimentados com ração Nuvilab[®] (n= 7). enriquecida em 20% de farinha de chaya (n= 7).

11. Análise clínica e avaliação macroscópica

No transcurso dos experimentos, foi avaliado o consumo de alimentos dos animais, peso corporal e ocorrência de fezes diarreicas. Após a morte dos animais, foram avaliados o peso e comprimento do cólon, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da gravidade e extensão do prejuízo intestinal, de acordo com a escala descrita previamente por BELL; GALL e WALLACE (1995) (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios da avaliação da gravidade e da extensão da lesão cólica.

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

12. Determinações bioquímicas

Após a análise macroscópica e coleta de tecido para avaliação microscópica, o cólon foi dividido em fragmentos longitudinais e congelados a -80°C para posterior determinação do conteúdo total de glutatona (GSH) e da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA).

12.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase

A determinação da atividade da enzima MPO foi realizada seguindo o método de KRAWISZ; SHARON e STENSON (1984). As tiras dos cólons foram homogeneizadas em tampão HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (v/v) em tampão fosfato sódico 50 mM; pH 6,0), colocadas em banho com ultrassom por 10 segundos e posteriormente submetidas a triplo ciclo de congelamento e descongelamento. Após centrifugação, foi adicionada uma solução que continha peróxido de hidrogênio e o-dianisidina, cuja função é permitir a detecção da atividade de MPO devido à mudança de cor causada pela formação de radicais livres, no comprimento de onda 450nm. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de MPO por grama de tecido, onde 1 unidade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C .

12.2. Determinação do conteúdo total de glutatona

A quantificação de glutatona total foi realizada através do método descrito por ANDERSON (1985). O protocolo é baseado na oxidação da glutatona 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 412 nm. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutatona 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 glutatona (GSH + GSSG). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de nmoles de glutatona total por grama de tecido.

12.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina

A determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina (FA) foi feita segundo os métodos de SMITH; HARRIS e PETERS (1984) e BESSEY; LOWRY

e BROCK (1946), respectivamente. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão glicina na proporção de 1:10. O homogenato foi centrifugado a 300 rpm durante 5 minutos a 4°C. Para determinar a proteína foram utilizados 4µl de sobrenadante e adicionados 200 µl de ácido bicinchônico. A leitura espectrofotométrica se realiza a 450nm e para a curva padrão usou-se entre 1 e 5 µl de albumina. Para determinar a atividade da FA se tomaram 5 µl do homogenato, 25 µl de água destilada, 50 µl de p-nitrofenilfosfato e 120 µl de hidróxido de sódio (2N) sob as mesmas condições espectrofotométricas. Os resultados foram expressos como unidades de FA por mg de proteína.

13. Avaliação microscópica das amostras de cólon

Após avaliação macroscópica do processo inflamatório cólico, amostras de tecido (0,5 cm) adjacentes à área de lesão foram coletadas para processamento histológico. As amostras foram fixadas em formalina 4% por 24 horas, lavadas em água corrente por igual período, desidratadas em série alcoólica etílica crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609) e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6 micrometros de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando serie alcoólica etílica decrescente. Depois foram submetidas à coloração em eosina-hematoxilina para a análise morfológica das lesões e determinação do índice de lesão microscópica segundo o método de STUCCHI et al. (2000) (Tabela 4).

Tabela 4. Critério de avaliação microscópica de lesão cólica.

Parametro	Critérios para avaliação
Mucosa	Infiltração de neutrófilos
	Infiltração de linfócitos
Criptas	Atividade mitótica
	Infiltração de neutrófilos
Submucosa	Depleção de muco
	Infiltração de plasmócitos
	Infiltração de neutrófilos
	Vascularização

Ulceração	Ulceração
	Deposição de fibrina
	Neutrófilos na submucosa
	Edema na submucosa

Escala de pontuação: 0; nenhum; 1, leve; 2, moderado; 3, severo. Escore máximo: 36

Para análise da presença de muco foi utilizado o método de PAS/Alcian Blue, segundo o protocolo de LINDEN, FLORIN e MCGUCKIN (2008). As amostras desparafinizadas foram reidratadas utilizando etanol absoluto e água por 10 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram imersas em ácido acético 3% por 2 minutos e coradas em solução de Alcian Blue 8GX 1% e ácido acético 3% (pH 2,5) durante 2,5 h. A coloração inespecífica foi removida com ácido acético 3% e lavada em água durante 10 minutos. As lâminas foram então oxidadas em ácido periódico 1% em água à temperatura ambiente durante 10 minutos, lavadas em água durante 5 minutos, imersas no reagente de Schiff durante 10 minutos, lavadas em água durante 5 minutos e posteriormente lavadas três vezes em meta bissulfeto de sódio 0,5% antes da lavagem final feita em água. Para revelar as seções de oligossacarídeos O-acetilados as amostras foram primeiro tratadas com KOH 0,1 M durante 30 minutos e depois com ácido periódico 1 mM, antes do reagente de Schiff.

Após as colorações, as imagens foram submetidas a análise e fotomicrografia realizadas com microscópio Zeiss Axio Imager A2 em aumento de 5X.

14. Análise estatística

Resultados expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (E.P.M.), foram analisados por teste de Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. As proporções foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Dados não paramétricos foram expressos como mediana e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido por teste a posteriori de Dunn. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.

III. Resultados

1. Análise fitoquímica qualitativa do extrato

A Tabela 5 mostra os resultados da marcha fitoquímica do extrato das folhas escaldadas de chaya.

Tabela 5. Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato metanólico de chaya.

Classe de compostos	Ensaio	Tipo de observação	Chaya
Fenóis	FeCl ₃	Precipitado c/oração variável entre azul e vermelho	+
Flavonoides	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH 1N	Coloração amarela	+
Flavononas	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH	Coloração vermelho-laranja	-
Xantonas	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH 1N	Coloração amarela	+
Chalconas	HCl	Coloração vermelha	+
		Coloração vermelha-púrpura	+
Auronas	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH 1N	Coloração vermelha-púrpura	+
Flavonas	NaOH 1N	Coloração amarela	+
Leucoantocianidinas	HCl	Coloração vermelha	-
	HCl	Coloração vermelha	+
Antocianinas	NaOH 0,2 %	Coloração lilás	-
	NaOH 1N	Coloração azul púrpura	-
	HCl	Coloração vermelha	+
Antocianidinas	NaOH 0,2 %	Coloração lilás	-
	NaOH 1N	Coloração azul púrpura	-
	HCl	Coloração pardo-amarelada	+
Catequinas	HCl	Precitado escuro de tonalidade azul (taninos pirogálicos)	-
Taninos	FeCl ₃	Precipitado verde (taninos flobatênicos)	-
	Albumina	Formação de precipitado	-
	KOH N	Fluorescência azulada em exposição à luz UV (360 nm)	+
Terpenoides	Liebermann-Buchard	Coloração azul evanescente seguida de verde permanente (esteroides)	+
		Coloração entre pardo e vermelho (triterpenoides)	-
Saponinas	Agitação	Espuma persistente e abundante	+
		Espuma persistente	+
Alcaloides	Hager- Mayer- Dragendorff	Precipitado característico	-
	Hager- Mayer- Dragendorff	Precipitado flaculoso	+
Bases quaternárias	Hager- Mayer- Dragendorff		
Glicosídeos cianogénicos	Guignard	Coloração rosa do papel	-

Leyenda: +: detectado; -: não detectado

Como se observa foi detectada a presença de metabólitos secundários como os fenóis, flavonóis, flavonas, xantonas, chalconas, uronas, flavonas, antocianinas, antiocianidinas, catequinas, cumarinas, terpenoides, saponinas, e bases quaternárias. O metabólito glicosídeo cianogênico, não foi detectado, demonstrando que o tratamento térmico foi eficiente na sua remoção.

2. Determinação do conteúdo de fenóis totais e da capacidade de sequestro do DPPH

A dosagem dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu quantificou 160,555 mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/g de extrato.

A potencial capacidade sequestradora do extrato de chaya foi comparada com o padrão de referência ácido gálico ($CE_{50} = 1,90 \mu\text{g/mL}$), sendo que o extrato de chaya apresentou uma $CE_{50} = 28,3 \mu\text{g/mL}$.

3. Determinação da capacidade antioxidante do extrato metanólico de *C. aconitifolius* no modelo de lipoperoxidação em membranas de cérebro de rato

O extrato metanólico no modelo de lipoperoxidação na membrana de cérebro de rato induzida por ferro e ácido ascórbico apresentou uma fraca atividade antioxidante quando comparada à quercetina, pois sua IC_{50} foi de $703,28 \pm 70,35 \mu\text{g/ml}$ enquanto que da quercetina foi de $0,71 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$.

4. Análise clínica dos animais e avaliação macroscópica dos efeitos do extrato de *C. aconitifolius* na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS

Durante todo o protocolo experimental os animais foram avaliados quanto ao consumo de ração, evolução do peso corpóreo e aparecimento de fezes diarreicas. Como se mostra na Tabela 6, os grupos de animais com inflamação intestinal tratados com chaya nas diferentes concentrações tiveram pouco ganho de peso corpóreo quando comparados ao grupo saudável. No entanto, esta diferença não foi significativa.

Tabela 6. Análise clínica dos animais administrados com extrato de chaya (100, 200 e 300 mg/kg) no modelo agudo de inflamação intestinal induzida por TNBS.

	Saudável	Controle-TNBS	Chaya 100	Chaya 200	Chaya 300
Ingestão (g/dia/animal)	22,49 ± 0,84	19,29 ± 1,64	21,54 ± 1,23	22,97 ± 1,06	17,87 ± 1,97
Peso corpóreo inicial^a (g)	209,00 ± 11,35	220,00 ± 4,77	236,28 ± 3,39	247,14 ± 2,16*	226,42 ± 3,08
Peso corpóreo final^a (g)	235,5 ± 16,42	229,50 ± 2,62	242,42 ± 5,20	254,85 ± 4,88	231,00 ± 3,91
Ganho corporal^a (g)	26,5 ± 17,12	11,00 ± 12,79	6,14 ± 11,36	7,71 ± 14,20	4,57 ± 13,96
Diarreia^b (%)	0**	100	100	100	100

^a Valores expressos em média ± E.P.M, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com **p<0,01.

^b Diarreia analisado pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo Controle-TNBS, onde * p<0,05 e ** p<0,01.

Às 72h após a administração do TNBS, evidenciou-se a instalação do processo inflamatório desenvolvido no cólon por meio do aparecimento de necrose na camada mucosa, em alguns casos com hiperemia e a ocorrência de espessamento da parede intestinal. A lesão no grupo controle-TNBS se estendeu de 3,17 ± 0,35 cm. Na Tabela 7, nenhum dos tratamentos com o extrato de chaya foi capaz de promover uma melhora estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros macroscópicos.

Tabela 7. Avaliação dos efeitos do extrato de chaya (100, 200 e 300 mg/kg) sobre parâmetros macroscópicos no modelo agudo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore macroscópico (0-10) ^a	Extensão da lesão (cm) ^b	Relação Peso/Comprimento (mg/cm) ^b	Aderência (%) ^c
Saudável	0**	0**	117,55 ± 3,36**	0
Controle-TNBS	7 (5-9)	3,17 ± 0,35	179,21 ± 8,72	0
Chaya 100mg/kg	7 (4-8)	3,14 ± 0,44	171,04 ± 11,36	0
Chaya 200mg/kg	6 (4-7)	2,34 ± 0,33	177,85 ± 7,75	0
Chaya 300mg/kg	7 (5-7)	2,48 ± 0,3	197,16 ± 9,81	0

^a Valores de escore expressos em mediana (intervalo interquartil), analisados por teste Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn. ^b Extensão da lesão e relação peso/comprimento cólico expressos em média ± E.P.M, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett. ^c Aderência analisado pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo Controle-TNBS onde ** p<0,01.

5. Avaliações bioquímicas dos efeitos do tratamento com extrato metanólico de *C. aconitifolius* na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, GSH, MPO e FA, nenhuma das concentrações do extrato de chaya promoveu uma melhora nesses mediadores de inflamação como mostram as Figuras.1, 2 e 3 respectivamente.

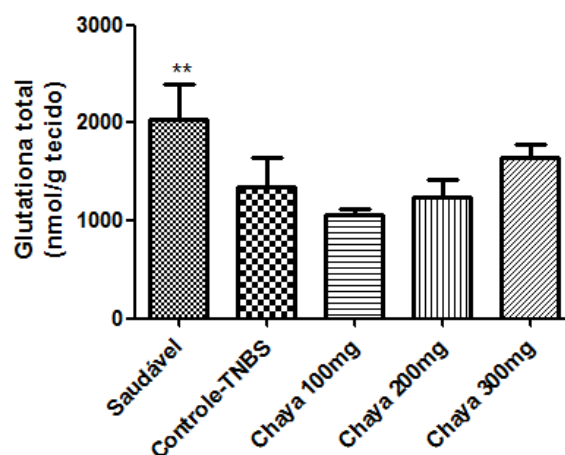


Figura 1. Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH) cólica na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com ** $p < 0,01$. Comparados ao grupo controle-TNBS.

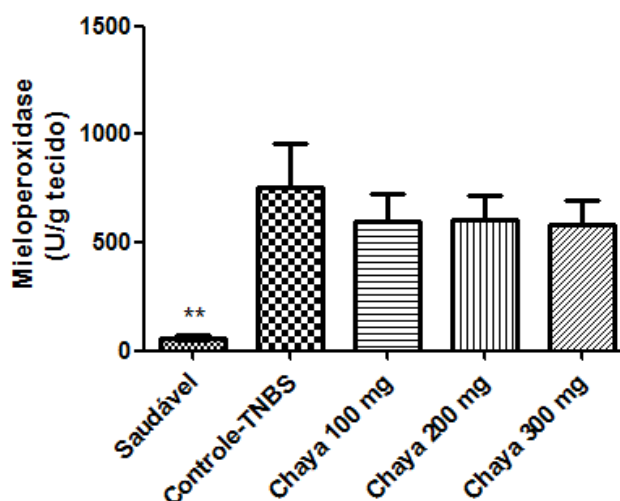


Figura 2. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) cólica na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, com ** $p < 0,01$, comparados ao grupo controle-TNBS.

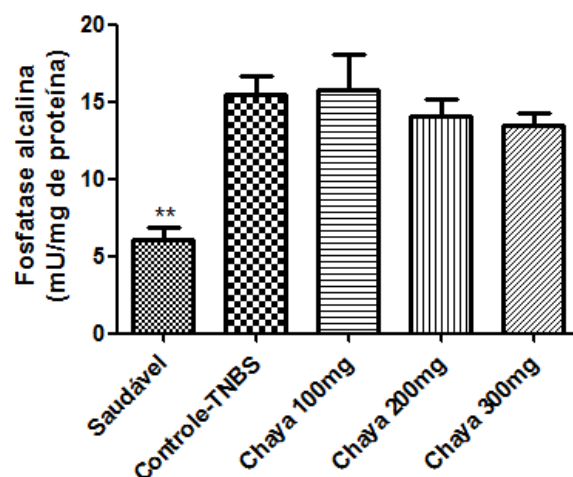


Figura 3. Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) cólica na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, com $**p < 0,01$, comparados ao grupo controle-TNBS.

6. Análise clínica dos animais e avaliação macroscópica dos efeitos do extrato de *C. aconitifolius* na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzida por TNBS

Após 7 dias, ainda com aparecimento de diarreia, os grupos que receberam indução do processo inflamatório, conseguiram manter o consumo de ração similar ao do grupo saudável, embora, nas primeiras 24h depois da indução houve queda da ingestão devido dor abdominal e desconforto nos animais. Com o parâmetro ganho de peso corpóreo, não houve diferença estatística entre todos os grupos experimentais foi similar.

Tabela 8. Análise clínica dos animais administrados com extrato de chaya (100, 200 e 300mg/kg) na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS.

	Saudável	Controle-TNBS	Chaya 100	Chaya 200	Chaya 300
Ingestão (g/dia/animal)	23,78 $\pm$ 0,84	20,57 $\pm$ 1,40	20,73 $\pm$ 1,66	20,99 $\pm$ 1,46	22,83 $\pm$ 0,86
Peso corpóreo inicial (g)	194,25 $\pm$ 11,10	219,00 $\pm$ 12,64	203,42 $\pm$ 3,62	210,85 $\pm$ 5,51	244,71 $\pm$ 3,17
Peso corpóreo final (g)	237,62 $\pm$ 8,76	250,87 $\pm$ 12,46	244,14 $\pm$ 6,56	246,00 $\pm$ 3,93	275,00 $\pm$ 7,47
Ganho corporal (g)	43,37 $\pm$ 5,07	31,00 $\pm$ 3,43	40,71 $\pm$ 3,87	35,14 $\pm$ 2,26	30,28 $\pm$ 5,69
Diarreia (%)	0**	100	100	100	100

^a Valores expressos em média $\pm$ E.P.M, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p < 0,01$.

^b Diarreia analisado pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo Controle-TNBS, onde

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

7. Análise clínica dos animais e avaliação macroscópica dos efeitos do extrato de *C. aconitifolius* na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS

No grupo controle, a extensão da lesão se estendeu $1,47 \pm 0,19$ cm, e se apreciou aderências entre o cólon e os órgãos adjacentes em todos os grupos com indução do processo inflamatório, sendo os grupos tratados com chaya os que tiveram valores superiores nos parâmetros extensão da lesão, relação peso/comprimento e aderência quando comparados como grupo controle-TNBS (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação dos efeitos do extrato de chaya (100, 200 e 300 mg/kg) sobre parâmetros macroscópicos no modelo crônico de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore macroscópico (0-10) ^a	Extensão da lesão (cm) ^b	Relação Peso/Comprimento (mg/cm) ^b	Aderência (%) ^c
Não colítico	0**	0**	113,66 $\pm$ 3,55	0**
Controle-TNBS	5 (2-6)	1,47 $\pm$ 0,19	151,78 $\pm$ 10,12	12,5
Chaya 100mg/kg	6 (2-7)	1,77 $\pm$ 0,29	178,99 $\pm$ 10,24	75
Chaya 200mg/kg	6 (1-7)	1,90 $\pm$ 0,30	165,69 $\pm$ 15,10	28,57
Chaya 300mg/kg	5 (1-7)	1,57 $\pm$ 0,42	180,34 $\pm$ 18,55	28,57

^a Valores de escore expressos em mediana (intervalo interquartil), analisados por teste Kruskal-Wallis com teste a posteriori Dunn. ^b Extensão da lesão e relação peso/comprimento cólico expressos em média $\pm$ E.P.M, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett. ^c aderência analisado pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo Controle-TNBS onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

8. Avaliações bioquímicas dos efeitos do tratamento com extrato metanólico de *C. aconitifolius* na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, nenhuma das concentrações do extrato de chaya foi capaz manter o conteúdo de GSH, ou impedir o aumento da atividade da MPO e da FA (Figuras.4, 5 e 6).

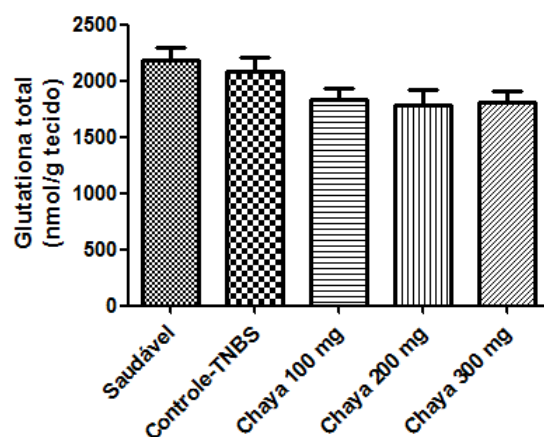


Figura 4. Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH) cólica na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, comparados ao grupo controle-TNBS.

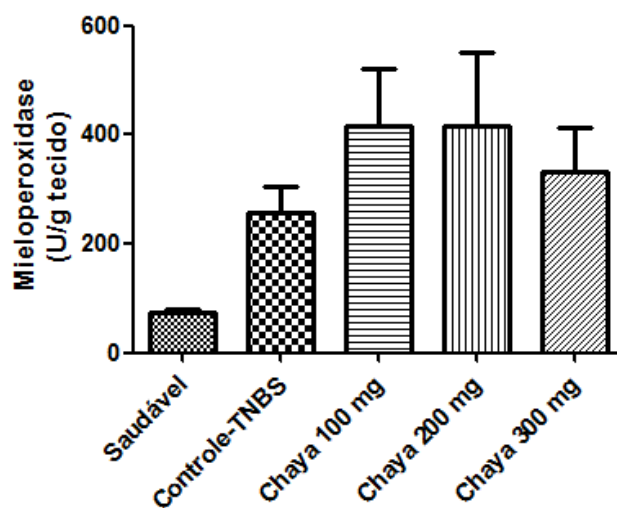


Figura 5. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase cólica (MPO) na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, comparados ao grupo controle-TNBS.

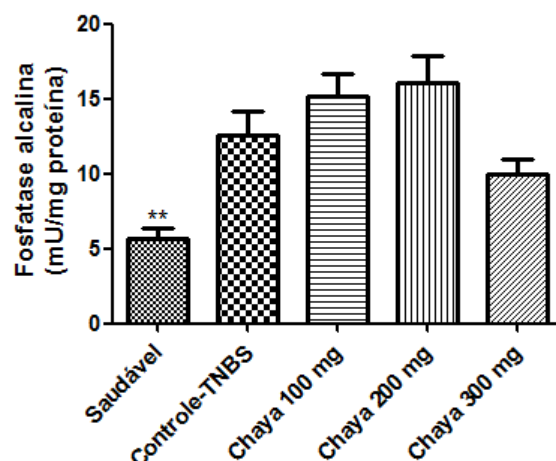


Figura 6. Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina cólica (FA) na fase crônica de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, com $**p < 0,01$, comparados ao grupo controle-TNBS.

9. Análises clínica e avaliação macroscópica dos efeitos do consumo da ração enriquecida com folhas de *C. aconitifolius* no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS

Todos os grupos que consumiram a dieta enriquecida com chaya na ração padrão tiveram uma ingestão similar ao grupo saudável, e no caso do grupo 20%, o qual apresentou um dos valores menores no peso corpóreo ao início do protocolo, obteve um ganho de peso corpóreo similar ao do grupo saudável no fim do estudo, embora com ocorrência de diarreia (Tabela 10).

Tabela 10. Análise clínica dos animais que receberam dieta enriquecida com chaya (5, 10 e 20%) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

	Saudável	Controle-TNBS	Dieta 5%	Dieta 10%	Dieta 20%
Ingestão (g/dia/animal)	21,93 $\pm$ 0,56**	16,41 $\pm$ 0,66	20,18 $\pm$ 0,64**	18,88 $\pm$ 0,676*	21,00 $\pm$ 0,73**
Peso corpóreo inicial (g)	128,37 $\pm$ 9,19	131,57 $\pm$ 10,43	144,62 $\pm$ 4,83	110,42 $\pm$ 3,48	116,33 $\pm$ 3,58
Peso corpóreo final (g)	288,5 $\pm$ 6,64	264,57 $\pm$ 22,07	252,62 $\pm$ 6,27	247,28 $\pm$ 9,41	268,33 $\pm$ 12,65
Ganho corporal^a (g)	160,12 $\pm$ 4,7	133,00 $\pm$ 17,94	108,00 $\pm$ 1,97**	136,85 $\pm$ 6,45	152,00 $\pm$ 9,68
Diarreia^b (%)	0**	100	100	100	100

^a Valores expressos em média $\pm$ E.P.M, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett com $**p < 0,01$.

^b Diarreia analisado pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo Controle-TNBS, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A avaliação macroscópica do cólon mostrou que após 7 dias da indução do processo inflamatório intestinal por TNBS, a mucosa ainda apresentou necrose, com uma lesão com média de $2,9 \pm 0,40$ cm ao longo do cólon, no grupo controle-TNBS, além do espessamento da parede intestinal, hiperemia e significativo aumento da relação peso/comprimento do cólon, e ocorrência de aderência. As concentrações de 5%, 10% e 20% de chaya na dieta administrada aos ratos não foram capazes de reduzir significativamente nenhum dos danos macroscópicos observados no cólon, quando comparado com o grupo controle-TNBS (tabela 11).

Tabela 11. Avaliação da ração enriquecida com chaya sobre os parâmetros macroscópicos no processo de inflamação intestinal induzido por TNBS.

Grupo	Escore macroscópico (0-10) ^a	Extensão da lesão (cm) ^b	Relação Peso/Comprimento (mg/cm) ^b	Aderência (%) ^c
Saudável	0**	0**	$105,63 \pm 5,31^{**}$	0**
Controle-TNBS	6 (2-9)	$2,90 \pm 0,40$	$196,28 \pm 26,22$	28,57
Dieta 5%	6,5 (6-8)	$2,63 \pm 0,25$	$162,61 \pm 7,61$	0**
Dieta 10%	5,5 (1-8)	$2,43 \pm 0,59$	$193,34 \pm 14,49$	0**
Dieta 20%	7 (3-8)	$2,50 \pm 0,54$	$193,71 \pm 13,95$	0**

^a Valores de escore expressos em mediana (intervalo interquartil), analisados por teste Kruskal-Wallis com teste a posteriori Dunn. ^b Extensão da lesão e relação peso/comprimento cólico expressos em média $\pm$ E.P.M. ^c Aderência analisado pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo Controle-TNBS onde ** $p < 0,01$.

10. Avaliações bioquímicas dos efeitos do consumo da ração enriquecida com folhas de *C. aconitifolius* no processo inflamatório intestinal induzido por TNBS

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, como mostra a Figura 7, todas as concentrações da dieta enriquecida com folhas de chaya conseguiram evitar a depleção do conteúdo de GSH em comparação com o grupo controle-TNBS. A dieta enriquecida com folhas de chaya na concentração 20% reduziu a atividade da MPO (Figura 8), no entanto nenhuma das concentrações afetou a atividade da FA (Figura 9).

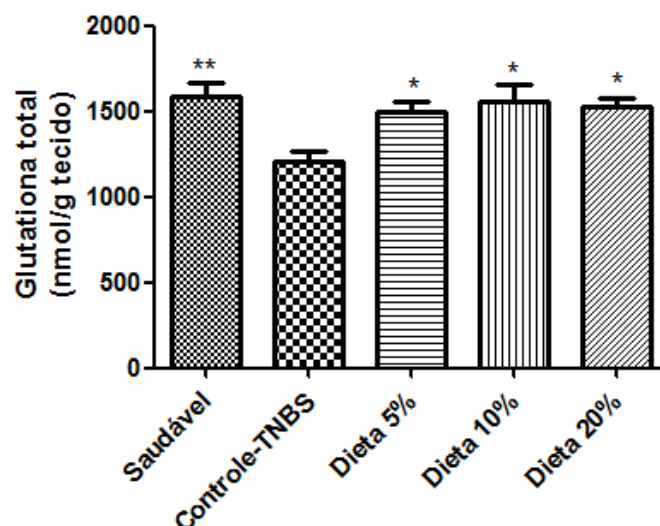


Figura 7. Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH) cólica no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$, comparados ao grupo controle-TNBS.

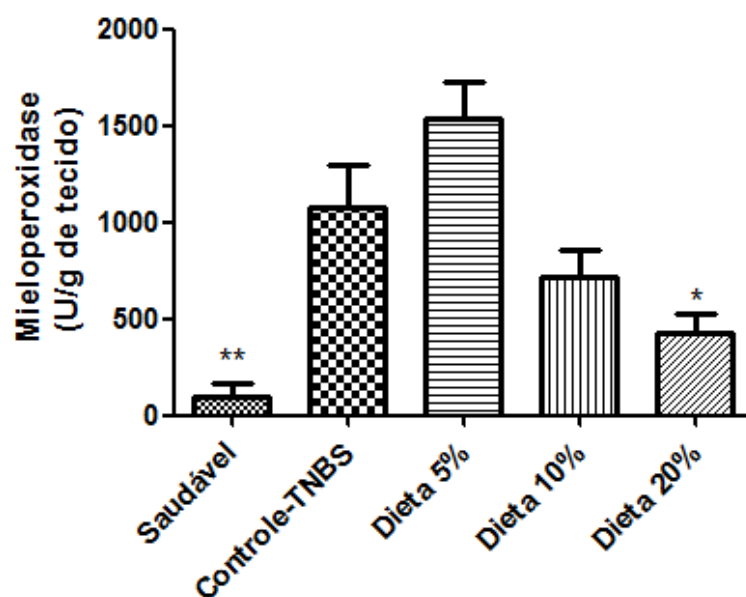


Figura 8. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase cólica (MPO) no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M., analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$, comparados ao grupo controle-TNBS.

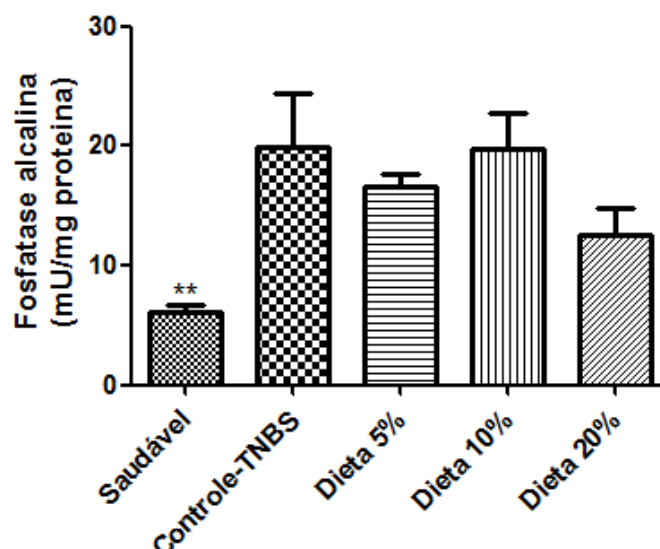


Figura 9. Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina cólica (FA) no modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. com $**p < 0,01$ comparados ao grupo controle-TNBS.

11. Análises microscópicas

As análises microscópicas feitas nos animais pertencentes ao modelo inflamatório intestinal induzido por TNBS com ração enriquecida com chaya nas concentrações 5, 10 e 20% mostraram que após 7 dias ainda persiste um dano tecidual nos cólons dos animais do grupo controle-TNBS, o que pode ser observado através da marcada infiltração de células inflamatórias em todas as camadas do cólon, bem como a perda da citoarquitetura e da integridade da membrana, presença de edema, ulceração (Figura 10B) e marcada depleção camada de muco sobre o epitélio intestinal (Figura 11B), quando comparado com os animais do grupo saudável (Figura 10A e 11A). Embora sem diferença estatística no escore microscópico em relação ao grupo controle-TNBS (Figura 12), nos grupos alimentados com chaya foi observado uma menor infiltração celular e menor desestruturação da citoarquitetura cólica, (Figura 10 C, D, E), foi ainda observado com os tratamentos a manutenção da secreção de muco na superfície do epitélio intestinal (Figura 11 C, D, E).

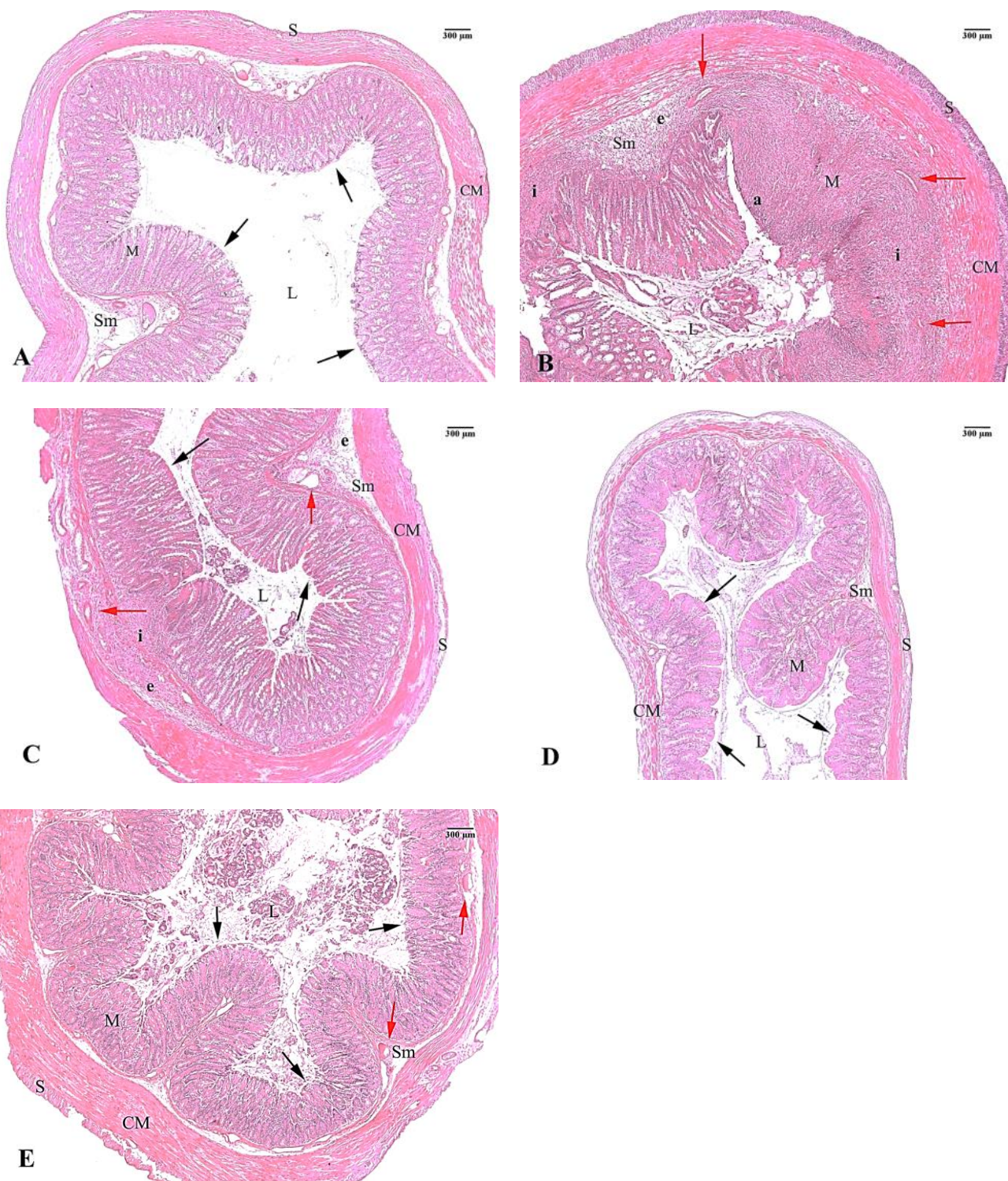


Figura 10. Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais, 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias feitas com microscópio óptico Zeiss Axio Imager A2, no aumento 5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta 5%, (D) Grupo dieta 10%, (E) Grupo dieta 20%. L=lúmen, M=mucosa, Sm=submucosa, CM=camada muscular, S=serosa, a=alteração da citoarquitetura, e=edema, i= infiltração celular, seta preta= integridade da membrana, seta vermelha=vascularização.

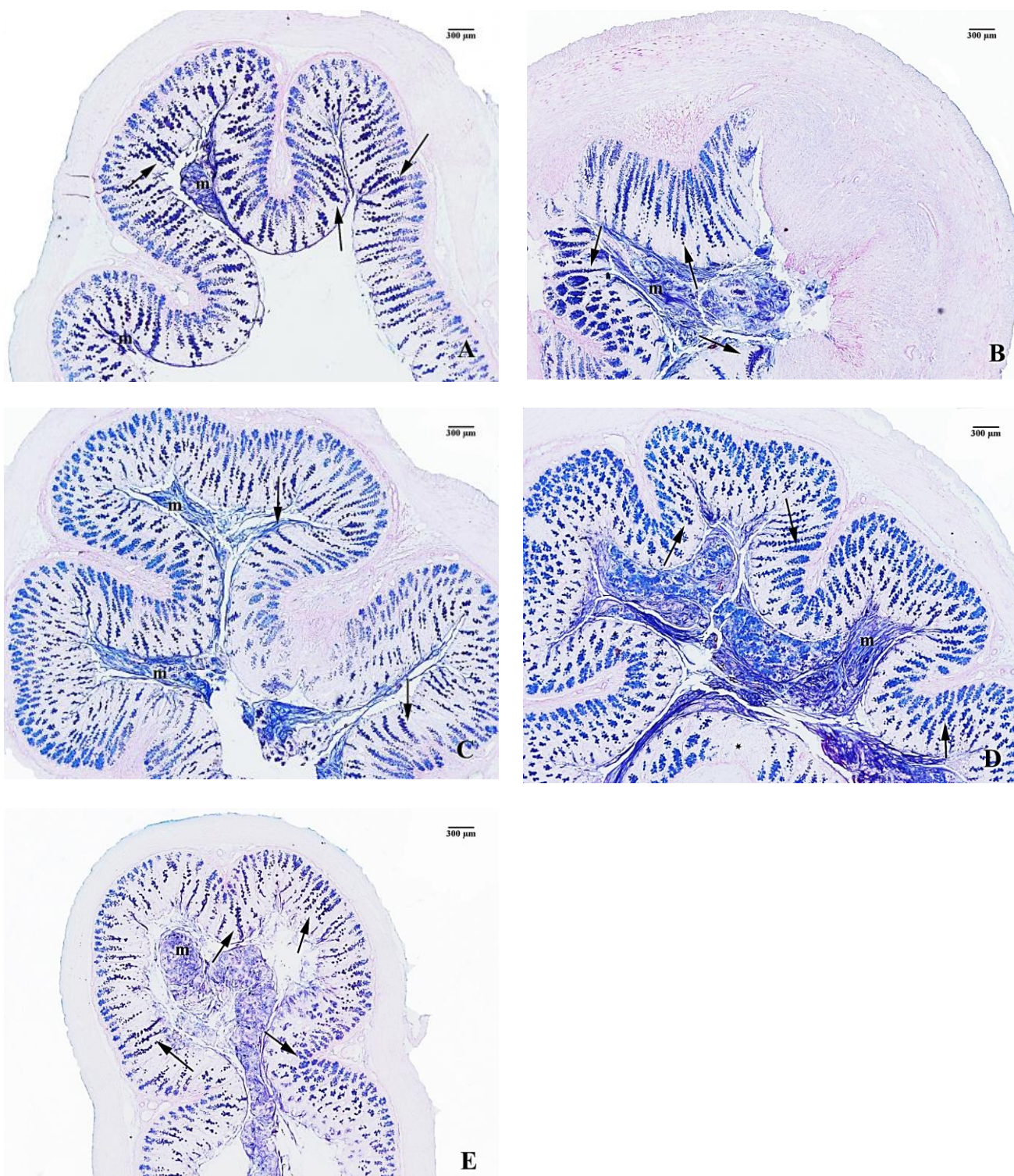


Figura 11. Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais, 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com PAS/Alcian Blue. Fotomicrografias feitas com microscópio óptico Zeiss Axio Imager A2, no aumento 5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta 5%, (D) Grupo dieta 10%, (E) Grupo dieta 20%. m=mucosa, seta preta= células caliciformes.

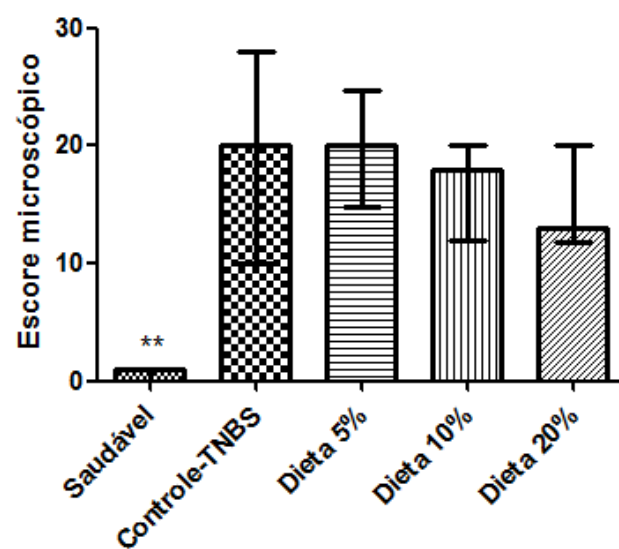


Figura 12. Escore microscópico expresso em mediana (intervalo interquartil), analisados por teste Kruskal-Wallis com teste a posteriori Dunn. Dados comparados ao grupo controle-TNBS, com $**p < 0,01$.

IV. Discussão

Considerando que a DII é uma doença multifatorial, recidivante e sem um tratamento efetivo, a busca de estratégias que sejam eficazes, e ao mesmo tempo que apresentem poucos efeitos adversos, tem se mostrado importante, especialmente quando foca-se em diminuir a gravidade do curso clínico da enfermidade, prolongar os tempos de remissão com consequente melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Os modelos animais da DII são muito úteis, pois conseguem mimetizar em maior ou menor grau o processo fisiopatológico (sintomatologia, morfologia e histopatologia) que ocorre no ser humano. Eles permitem avaliar, na fase pré-clínica, compostos ativos, medicamentos ou alimentos, como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, bem como propor possíveis mecanismos de ação de uma droga em particular (ANTONIOU et al., 2016; LEE et al., 2015; MIZOGUCHI & MIZOGUCHI, 2010; RANDHAWA, SINGH, SINGH, & JAGGI, 2014).

O modelo de indução química de inflamação intestinal pelo TNBS tem sido usado para estudar o dano agudo e crônico no cólon, bem como fenômenos associados ao processo inflamatório gerado pelo indutor químico, o qual age como um hapteno (ANTONIOU et al., 2016; NEURATH, 2012), tornando as proteínas altamente imunogênicas, o que ativa o sistema imune do animal (JIMINEZ, UWIERA, DOUGLAS INGLIS, & UWIERA, 2015). Neste modelo também ocorre uma intensa produção de EROs, decorrente de alterações da resposta imune e do metabolismo oxidativo induzidas pelo TNBS (GRISHAM et al., 1991)

O estresse oxidativo é um dos eventos envolvidos no processo fisiopatológico da doença inflamatória intestinal, na qual um aumento da produção de EROS/ERN está associado à geração de um processo inflamatório, devido à redução das defesas antioxidantes endógenas do organismo, perpetuando o dano gerado no epitélio intestinal (TIAN; WANG; ZHANG, 2017).

Inúmeras pesquisas com compostos polifenólicos de origem vegetal têm sido focadas em avaliar suas potenciais atividades protetoras frente a doenças crônicas como a DII (DRYDEN; SONG; MCCLAIN, 2006). Estudos com modelos animais de DII, onde se avaliam as propriedades anti-inflamatórias dos compostos polifenólicos, principalmente os flavonoides, mostram que ocorre uma diminuição do estresse oxidativo

e de diferentes marcadores de inflamação, bem como redução da peroxidação lipídica (SEIBEL et al., 2009), acompanhados de atividade imunomoduladora (CAMUESCO et al., 2006; CUI et al., 2014; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2002; TAO et al., 2013; WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010). Os compostos polifenólicos são capazes de melhorar a permeabilidade seletiva do epitélio intestinal através da preservação das tight junctions (SUZUKI; HARA, 2011). Além disso, sugere-se que os flavonoides são capazes de modificar a composição da microbiota intestinal ao regular a expressão gênica e proteica dos TLR presentes nas células epiteliais intestinais (PÉREZ-CANO et al., 2014).

Estudos feitos por nosso grupo e por outros pesquisadores no modelo de inflamação intestinal pelo TNBS, indicam que a administração de compostos polifenólicos, como flavonoides (ORSI; SEITO; DI STASI, 2014), cumarinas (WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010), flavonas (SEITO et al., 2015), taninos (FARIA et al., 2012), é efetiva na prevenção e no tratamento da inflamação intestinal (COSTA et al., 2015).

Nossos resultados demonstraram que na prospecção fitoquímica da espécie *Cnidoscopus aconitifolius* foi encontrado principalmente compostos do grupo polifenóis, como flavonoides, xantonas, chalconas, auronas, flavonas, cumarinas, bases quaternárias e também saponinas, corroborando com outros estudos fitoquímicos (ADERIAN et al., 2013; MOYA et al., 2013). A riqueza nestes metabólitos secundários era um indicativo de que esta espécie apresentasse potencial propriedade sequestradora de radicais livres e, portanto, uma promissora atividade biológica antioxidante e/ou anti-inflamatória. No entanto, nossos resultados demonstraram que o extrato metanólico, rico em compostos polifenólicos, obtido a partir das folhas escaldadas e desidratadas de chaya na fase aguda e crônica do processo inflamatório intestinal, não exerceram uma atividade antioxidante ou anti-inflamatória capaz de proteger e/ou melhorar o processo inflamatório induzido pelo TNBS. Esse resultado está reforçado pelas fracas atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres *in vitro*, no modelo *in vitro* de lipoperoxidação no cérebro de rato e DPPH, respectivamente.

Considerando que a espécie *Cnidoscopus aconitifolius* tem sido utilizada como alimento pelo seu alto conteúdo nutricional e disponibilidade, ao crescer em qualquer condição agroecológica (MOYA et al., 2013; ROS-IBARRA; MOLINA-CRUZ, 2002), a mesma foi testada no processo inflamatório intestinal pela indução do TNBS como um possível alimento que melhorasse a condição fisiopatológica.

Clinicamente, após a indução do processo inflamatório intestinal, os animais têm uma evidente perda de peso corpóreo, associada a pouca ingestão de alimento, e a ocorrência de diarreia e dor abdominal. A ocorrência de diarreia, como parâmetro clínico, se associa à gravidade da doença em humanos (TANG; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2011) e instalação do processo inflamatório em ratos (WITAICENIS et al., 2010), o que foi constatado no protocolo da fase aguda da inflamação intestinal, no qual os animais com inflamação intestinal tiveram pouco ganho de peso, pois o processo inflamatório após 72h ainda é intenso. Já na fase crônica do processo inflamatório intestinal e os que consumiram chaya nas diferentes concentrações, mostraram que após 7 dias de indução do processo inflamatório intestinal os animais conseguem recuperar a ingestão de alimentos e o peso corpóreo, ainda com a ocorrência de diarreia (SANCHEZ DE MEDINA et al., 1996). Os animais que foram tratados com a dieta enriquecida com chaya, em todas as concentrações, apresentaram consumo similar aos animais que receberam ração padrão, o que sugere que a dieta enriquecida com farinha de folhas de chaya foi palatável e bem aceita pelos animais.

Macroscopicamente, o dano provocado pela indução do processo inflamatório intestinal pelo TNBS se caracteriza pelo engrossamento da parede intestinal do cólon e aumento da relação peso/comprimento (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; SCARMINIO et al., 2012), assim como observado em nossos resultados nos protocolos agudo e crônico. Este último parâmetro tem relação com a extensão da lesão, e a gravidade do processo desenvolvido.

Estudos demonstram que a diminuição das defesas antioxidantes em pacientes com DII, como o conteúdo de GSH, provoca uma susceptibilidade da mucosa gastrointestinal ao ataque de EROS/ERN, e por sua vez impede que esta se regenere e restabeleça a integridade da barreira epitelial (BUFFINTON; DOE, 1995; OLGUIN et al., 2005; SIDO et al., 1998). A significativa diminuição do conteúdo de GSH também se constata em modelos animais nos grupos que recebem TNBS (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; ORSI; SEITO; DI STASI, 2014; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004; SCARMINIO et al., 2012; WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010).

A glutatona é um tripeptídeo que se encontra em todos os tecidos de mamíferos, e particularmente no fígado. Sua atividade antioxidante está ligada à glutatona peroxidase (GPx), que age como catalisador ao reduzir os peróxidos de hidrogênio endógenos e formar água, oxidando a GSH à forma GSSG. Para manter a atividade da

GPx é necessária a atividade da glutathione redutase. Esta enzima depende de NADPH para catalisar a redução da GSSG na forma GSH, formando um ciclo redox. Em condições fisiológicas, a glutathione se encontra nas células na forma reduzida e oxidada em uma relação de equilíbrio, mas em condições de estresse oxidativo, como ocorre na DII, a produção elevada de EROS supera a capacidade da célula de reduzir GSSG a GSH, o que provoca depleção do conteúdo de GSH e, portanto, sua capacidade de detoxificação celular, o que leva um acúmulo de EROS (LU, 2013).

A glutathione e outras enzimas endógenas são as principais linhas de defesa celulares na regulação da excessiva atividade das EROS, regulando processos de oxidação-redução celular (CHIURCHIU; MACCARRONE, 2011). Estudos com ratos demonstraram que além de agir na captura de EROS, a glutathione participa na imunocompetência do organismo, visto que quando ocorre depleção de GSH em células apresentadoras de antígenos há uma interferência do tipo de resposta imune que predominará frente um processo danoso (PETERSON et al., 1998). Em adição, a GSH modula a proliferação e função de linfócitos T e macrófagos na secreção de citocinas (ROBINSON et al., 1993).

A modulação do estresse oxidativo, através do uso de compostos ou produtos que impeçam a redução dos níveis de glutathione, caracteriza-se como potenciais no tratamento das DII (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; SCARMINIO et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que o consumo de chaya em todas as concentrações testadas evitou a depleção do conteúdo de GSH, indicando atividade antioxidante e efeito protetivo da planta por este mecanismo antioxidante.

Nos pacientes acometidos com DII, principalmente durante os períodos de exacerbação da DII, ocorre uma intensa circulação de células polimorfonucleadas e monócitos na mucosa quando comparados a indivíduos saudáveis, sendo isto uma característica fisiopatológica característica da doença (MUTHAS et al., 2017). Os neutrófilos agem como uma excelente defesa celular frente a patógenos, pois dentro dos seus grânulos azurófilos, se encontra a enzima MPO, a qual é liberada para catalisar a reação do peróxido de hidrogênio e o ânion cloreto na produção de ácido hipocloroso, que atua como um potente agente antimicrobiano (DAVIES, 2011). No entanto, a liberação excessiva desta enzima provoca danos ao tecido, devido a geração do ácido hipocloroso e sua reação com lipídios, DNA e lipoproteínas, o que perpetua o processo inflamatório (BIRBEN et al., 2012).

Em estudos experimentais de inflamação intestinal, uma medida da infiltração de neutrófilos é a atividade da MPO cólica, que está relacionada à gravidade das lesões na colite induzida por TNBS (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; COSTA et al., 2015; WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010). Quando animais são tratados com produtos que promovem uma diminuição da atividade da MPO, se infere que o produto avaliado apresenta atividade anti-inflamatória (COSTA et al., 2015; WITAICENIS et al., 2014). Nossos resultados demonstram que o grupo tratado com chaya, como alimento, na concentração de 20% apresentou uma diminuição significativa na atividade da enzima MPO (Figura 8).

Por outro lado, a atividade da FA, como biomarcador de processo inflamatório intestinal, está relacionada com a defesa do organismo, pois essa enzima desfosforila moléculas pró-inflamatórias e ligantes de TLR como os lipolissacarídeos presentes nas paredes celulares das bactérias patogênicas (BILSKI et al., 2017; MARTÍNEZ-AUGUSTIN et al., 2010). Também se associa como modulador da população da microbiota intestinal e sua translocação na barreira epitelial (LALLÈS, 2014). A FA se encontra tanto em neutrófilos quanto em macrófagos e células epiteliais intestinais. Também se sabe que em modelos murinos de inflamação intestinal como o do TNBS, a atividade desta enzima está aumentada como consequência do processo inflamatório gerado, portanto pode ser considerada um biomarcador de processo inflamatório intestinal (LALLÈS; SUESCUN, 2014; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004).

Um estudo feito por TUIN et al. (2008), mostrou que há maior conteúdo e atividade da isoforma intestinal da FA no intestino delgado em relação ao cólon e que isso está associado à função dessa enzima segundo a porção intestinal. Eles hipotetizaram que a FA no intestino delgado exerce um papel protetor, pela detoxificação dos lipopolissacarídeos; e no cólon, quando o epitélio está intacto, a atividade de defosforilação da FA está suprimida e só quando a barreira epitelial é quebrada, essa enzima exerce sua função protetora, na tentativa de diminuir o processo inflamatório.

Embora sem diferenças estatísticas, só foi possível correlacionar essa pressuposição, no protocolo do processo inflamatório intestinal no grupo de animais que consumiram chaya na proporção 20%, que mostrou uma tendência em diminuir (62%) a atividade desta enzima, e, portanto, valores mais próximos aos do grupo saudável (Figura 9).

Sabe-se que o TNBS provoca um severo dano tecidual devido à excessiva infiltração de células mono e polimorfonucleadas como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, o que leva uma desestruturação do mesmo, com aumento de ulcerações na camada mucosa e edema em todas as camadas, vascularização e depleção de células caliciformes, e incorreta secreção de muco na zona apical do epitélio intestinal (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; PATIL; MOSS; ODZE, 2016; TORRES et al., 1999).

A melhora nos parâmetros bioquímicos promovidos pelo consumo de chaya foram acompanhadas pelos estudos microscópicos. As avaliações histológicas no presente estudo mostraram que nos cólons dos animais que consumiram chaya nas diferentes concentrações, houve uma melhora tecidual, assemelhando-se a um epitélio saudável, refletido no aumento da cicatrização da mucosa cólica, presença de glândulas tubulares, menor ulceração e edema nas camadas (COSTA et al., 2015). Estes resultados também foram acompanhados pela manutenção da produção do muco, especialmente após tratamento dos animais com chaya na concentração de 20%.

Desde que a espécie *Cnidoscolus aconitifolius* é rica em fibras (KUTI; KUTI, 1999; MOYA et al., 2013) e as fibras podem ser fonte, via fermentação microbiana, de ácidos graxos de cadeia curta é possível sugerir que a melhora na citoarquitetura cólica seja decorrente da ação destes ácidos, especialmente butirato, o qual tem sido descrito como metabólito que contribuiu para o bom funcionamento intestinal (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; VANHOUTVIN et al., 2009).

A principal função da camada de muco é agir como barreira física entre as células epiteliais e os microrganismos presente no lúmen (tanto benéficos quanto potencialmente patógenos), e outros produtos luminiais potencialmente danosos (LINDEN et al., 2008). Sabe-se que uma correta produção de muco faz com que a espessura dessa camada sobre o epitélio intestinal, evite que o conteúdo luminal provoque um dano sobre as células epiteliais (BROWNLEE et al., 2007). Em condições fisiopatológicas, como a DII, ocorre alteração na expressão de genes como MUC2, MUC3 e MUC4 o que impede uma correta propriedade de barreira da camada de muco (DOROFYEV et al., 2013), causando sua depleção.

Parte de proteção feita pelo muco sobre a mucosa intestinal também pode estar relacionada à sua capacidade de sequestrar radicais livres (PARKS, 1989). Essa atividade está associada alguns dos constituintes deste, como os açúcares que compõem a parte glicídica das mucinas. Sabe-se que açúcares como a glucose ou manitol tem se mostrado

como sequestradores de radicais livres e o muco é rico em N-acetyl-glucosamine, N-acetylgalactosamine, fucose e galactose, açúcares que já tem mostrado essa atividade (BROWNLEE et al., 2007; GRISHAM et al., 1987)(BROWNLEE et al., 2007)(BROWNLEE et al., 2007)(BROWNLEE et al., 2007)(BROWNLEE et al., 2007)(BROWNLEE et al., 2007)(BROWNLEE et al., 2007).

Com base nos resultados, algumas considerações tornam-se pertinentes na análise dos resultados contrastantes entre a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato e a incorporação de chaya na dieta.

Primeiro, a planta em estudo apresenta baixa concentrações de glicosídeos cianogênicos e tradicionalmente, as folhas e outras partes aéreas da mesma, têm sido submetidas a tratamento térmico (como o escaldado em água em ebulição), tanto para retirar estes compostos e microrganismos indesejados, bem como para melhorar a textura antes do seu consumo (BAMIDELE, O. P., FASOGBON, M. B. ADEBOWALE, O. J AND ADEYANJU, 2017). Estudos anteriores mostram que 10 e 15 minutos em água em ebulição se eliminam os glicosídeos cianogênicos das folhas, porém também leva a uma diminuição da qualidade nutricional destas (ROSS-IBARRA; MOLINA-CRUZ, 2002). Outros pesquisadores demonstraram que o escaldado das folhas entre 1 até 3 minutos elimina esses compostos (MOYA, 2013;STEPHENS,2009) como foi constatado na marcha fitoquímica (Tabela 5); o que reflete em uma maior retenção de compostos nutritivos e metabólitos secundários de interesse para a saúde (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2003).

Em segundo lugar, é possível que as doses testadas com o extrato da chaya, onde não houve melhora do quadro inflamatório, foram inativas, mesmo tendo a presença de compostos polifenólicos antioxidantes, devido a uma extração incompleta dos compostos presentes no produto; (SAURA-CALIXTO, 1998), ausência no processo de extração de fibra dietética, sendo este composto um dos destaques da planta (KUTI; KUTI, 1999), ou pela própria dose utilizada. Entretanto, no caso das folhas de chaya adicionadas na dieta, a matriz alimentar incorporada garantiu que todos os compostos presentes na planta após o tratamento térmico pudessem exercer uma atividade biológica significativa nos animais, com maior ênfase para a fibra dietética.

Atualmente a fibra dietética, principalmente, aquelas que apresentam efeitos prebióticos, tem se mostrado como candidatos terapêuticos no tratamento da DII (PITUCH-ZDANOWSKA; BANASZKIEWICZ; ALBRECHT, 2015). Estudos com

pacientes com RCU mostram que o consumo de plantas com elevado conteúdo de fibra dietética, como *Plantago ovata*, aveia e germe de cevada, quando associadas à terapia farmacológica convencional, foram capazes de manter por mais tempo a remissão dos sintomas com eficácia e segurança. Os pesquisadores associaram os resultados aos produtos gerados na fermentação da fibra no cólon dos pacientes (FERNÁNDEZ-BAÑARES et al., 1999; HALLERT et al., 2003; HANAI et al., 2004).

Em estudos com o modelo animal de inflamação intestinal induzido pelo TNBS, o uso de alimentos ricos em fibra dietética mostraram atividade anti-inflamatória (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; LARA-VILLOSLADA et al., 2006; RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2002; SCARMINIO et al., 2012). Estes estudos descrevem uma melhora na integridade da mucosa, processo chave na regulação da resposta exacerbada que caracteriza o processo inflamatório intestinal (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; LARA-VILLOSLADA et al., 2006). Vários destes produtos também exerceram atividade anti-inflamatória por meio da diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, fatores envolvidos no dano tecidual (RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2002; SEGAIN et al., 2000), bem como dos níveis de óxido nítrico sintetase (RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2002). Em adição, em modelos experimentais *in vivo*, a fibra foi capaz de estimular produção de muco (BARCELO et al., 2000; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2003; MCCULLOUGH et al., 1998; SHIMOTOYODOME et al., 2000; WILLEMSSEN et al., 2003) ou evitar a depleção da camada de muco (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017).

Por outro lado, os efeitos antioxidantes induzidos pela uso da chaya como alimentos, podem também estar relacionados à presença de compostos polifenólicos (SAURA-CALIXTO, 2011). Embora parte destes compostos são absorvidos no intestino delgado, graças à ação de enzimas remove o glicosídeo associado a eles, quantidade significativa destes compostos consegue chegar ao intestino grosso sem sofrer degradação, podendo neste local serem metabolizados pelas bactérias intestinais (AURA, 2008) em ácidos fenólicos simples e exercer atividade antioxidante no ambiente intestinal (BRYAN et al., 2016), sequestrando radicais livres e neutralizando efeitos pro-oxidantes de outros componentes da dieta (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009).

Sabe-se que pacientes tanto na fase aguda da doença (D'ODORICO et al., 2001) quanto nos períodos de remissão (HENGSTERMANN et al., 2008), apresentam diminuídos os níveis plasmáticos de vitaminas e minerais como carotenoides,

especialmente beta caroteno, zinco, selênio, quando comparados com pessoas saudáveis. Estes resultados estão associados aos efeitos da inflamação a baixa ingestão de alimentos de origem vegetal (HENGSTERMANN et al., 2008). Uma via para melhorar essa condição clínica é ingerir mais frutas e vegetais como fontes naturais desses nutrientes. A chaya apresenta na sua composição alguns desses compostos como beta caroteno, vitamina C, ambos com reconhecidas atividades sequestradoras de radicais livres e quanto à estimulação do sistema imune (CARR; MAGGIGI, 2017; PALOZZA et al., 2009).

Enfatizando que o consumo da planta foi semelhante ao dos animais do grupo saudável e que o consumo regular da planta junto com uma alimentação equilibrada poderia ajudar na recuperação dos níveis basais desses nutrientes e na manutenção da glutathione, um dos principais antioxidantes endógenos. Além disso, a disponibilidade deste produto durante todo o ano, faz da espécie um potencial alimento na terapia complementar de pacientes com DII.

V. Conclusão

A espécie *Cnidoscolus aconitifolius* nas concentrações de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 300mg/kg, quando administrada em ratos na forma de extrato, nas fases aguda e crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos, não apresenta atividades antioxidante ou anti-inflamatória frente ao dano provocado.

A espécie *Cnidoscolus aconitifolius* quando incorporada na ração padrão dos animais, mostra efeitos protetores relacionados às propriedades antioxidantes, como evidenciado *in vivo* pela manutenção do conteúdo da glutatona cólica, redução da ação da mieloperoxidase na concentração de 20% e efeitos protetores da mucosa, promovendo manutenção da camada de muco sobre o epitélio intestinal. Tais efeitos podem ser atribuídos à presença tanto de fibra dietética como de compostos fenólicos.

VI. Referências bibliográficas

- ADARAMOYE, O. A.; ALUKO, A.; OYAGBEMI, A. A. Cnidoscopus aconitifolius Leaf Extract Protects against Hepatic Damage Induced by Chronic Ethanol Administration in Wistar Rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 46, n. 4, p. 451–458, 2011.
- ADERIAN, O. et al. Phytochemical constituents , antimicrobial and antioxidant potentials of tree spinach [Cnidoscopus aconitifolius (Miller) I . M . Johnston]. **Journal of medicinal plants research**, v. 7, n. 19, p. 1317–1322, 2013.
- 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, p. 497–504, 2017.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. April, p. 205–217, 2015.
- ANDERSON, M. E. Determination of Glutathione and Glutathione Disulphide in Biological Samples. **Annual review of biochemistry**, v. 113, n. 1983, 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.
- AURA, A.-M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 3, p. 407–429, 2008.
- AWOYINKA, O. A., BALOGUN, I. O. AND OGUNNOWO, A. A. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscopus aconitifolius (Euphorbiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n. 3, p. 63–65, 2007.
- BAMIDELE, O. P., FASOGBON, M. B. ADEBOWALE, O. J AND ADEYANJU, A. A. Effect of Blanching Time on Total Phenolic, Antioxidant Activities and Mineral Content of Selected Green Leafy Vegetables. **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 1–8, 2017.
- BANAN, A. et al. Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 291, p. 1075–1085, 1999.
- BARCELO, A. et al. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. **Gut**, v. 46, p. 218–224, 2000.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Infl ammatory bowel disease : clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, p. 1641–1657, 2007.
- BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 4, p. G622–G630, 1995.
- BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROCK, M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **J Biol. Chem.**, 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, p. 9, 2017.
- BINION, D. ADVANCES IN IBD: Clostridium difficile Infection and Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology and hepatology**, v. 12, n. 5, p. 334–337, 2016.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, p. 9–19, 2012.
- BLOIS, M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–

1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BROWNLEE, I. A. et al. Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. **Free radical biology & medicine**, v. 43, p. 800–808, 2007.

BRYAN, G. et al. Flavonoid – gastrointestinal mucus interaction and its potential role in regulating flavonoid bioavailability and mucosal biophysical properties. **FRIN**, v. 88, p. 342–347, 2016.

BUFFINTON, G. D.; DOE, W. F. Depleted mucosal antioxidant defense in inflammatory bowel disease. **Free Radical biology & Medicine**, v. 19, n. 6, p. 911–918, 1995.

CAMUESCO, D. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 466–476, 2006.

CARR, A. C.; MAGGIGI, S. Vitamin C and Immune Function. **Nutrients**, v. 9, n. 1211, p. 1–25, 2017.

CHIURCHIU, V.; MACCARRONE, M. Chronic Inflammatory Disorders and Their Redox Control : From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 9, p. 2605–2641, 2011.

CLAUS, S. P. Development of personalized functional foods needs metabolic profiling. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 17, n. 6, p. 567–573, 2014.

COLOMBEL, J.-F.; NARULA, N.; PEYRIN-BIROULET, L. Management Strategies to Improve Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 152, p. 351–361, 2017.

COSTA, C. A. R. A. et al. Anti-inflammatory effects of Brazilian ginseng (*Pfaf fi a paniculata*) on TNBS-induced intestinal inflammation : Experimental evidence. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 459–469, 2015.

CUI, L. et al. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF- κ B pathway activation. **International Immunopharmacology**, v. 23, p. 294–303, 2014.

D’ODORICO, A. et al. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 36, n. 11, p. 6, 2001.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J Clin Biochem Nutr.**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2011.

DEGRUTTOLA, A. K. et al. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, 2016.

DEROCHE, T. C.; XIAO, S.; LIU, X. Review Histological evaluation in ulcerative colitis. **Gastroenterology Report**, v. 2, n. June, p. 178–192, 2014.

DI SABATINO, A. et al. Recent advances in understanding ulcerative colitis. **Internal and emergency medicine**, v. 7, n. 2, p. 103–11, 2012.

DOROFYEV, A. E. et al. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn’s disease. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2013, p. 431231, 2013.

DRYDEN, G. W.; SONG, M.; MCCLAIN, C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 22, n. 2, p. 165–170, 2006.

FAO; WHO. **Codex alimentarius commission**. Report of the 30th session of the codex committee on nutrition and foods for special dietary uses. **Anais...**2009Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/710/al32_26e.pdf>

- FARIA, F. M. DE et al. Effects of Rhizophora mangle on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternayitive Medicine**, v. ID 753971, p. 11, 2012.
- FERNÁNDEZ-BAÑARES, F. et al. Randomized clinical trial of Plantago ovata seeds (Dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 2, p. 427–433, 1999.
- FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **PNAS**, v. 104, n. 34, p. 13780–13785, 2007.
- GALVEZ, J. P.; CRUZ, A.; ZARZUELO, F.; SANCHES DE LA CUESTA. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differ from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v. 51, p.127-133, 1995.
- GEBOES, K. Histopathology of Crohn ' s Disease and Ulcerative Colitis. **J Clin Pathol**, n. 44, p. 255–276, 1991.
- GEBOES, K. What histologic features best differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis? **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, n. S2, p. S168–S169, 2008.
- GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259–275, 2004.
- GONZÁLEZ, F. G.; DI STASI, L. C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of ilbrandia ebracteata in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 125-134, 2002
- GONZÁLEZ-LARREDO, R. F. et al. Flavonoid and Cyanogenic Contents of Chaya (Spinach Tree). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 1–8, 2003.
- GRISHAM, M. B. et al. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. **American Physiological Society**, v. 253, p. G93–G96, 1987.
- GRISHAM, M. B. et al. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. **Gastroenterology**, v. 101, p. 540–547, 1991.
- HALLERT, C. et al. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: Controlled pilot study. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 9, n. 2, p. 116–121, 2003.
- HANAI, H. et al. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 13, p. 643–647, 2004.
- HASKEY, N.; GIBSON, D. L. An examination of diet for the maintenance of remission in inflammatory bowel disease. **Nutrients**, v. 9, n. 3, 2017.
- HEIN, R. et al. Prevalence of inflammatory bowel disease: Estimates for 2010 and trends in Germany from a large insurance-based regional cohort. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 49, n. May, p. 1325–1335, 2014.
- HENGSTERMANN, S. et al. Altered status of antioxidant vitamins and fatty acids in patients with inactive inflammatory bowel disease. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 571–578, 2008.
- JIMINEZ, J. A. et al. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. **Gut Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 29, 2015.
- JOOSSENS, M. et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. **Gut**, v. 60, p. 631–637, 2011.
- KAPPELMAN, M. D. et al. Recent trends in the prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in a commercially insured US population. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 2, p. 519–525, 2013.
- KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal

mucosal architecture , released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 597–606, 2003.

KOLTERMAN, D. A.; BRECKON, G. J.; KOWAL, R. R. Chemotaxonomic Studies in *Cnidioscolus* (Euphorbiaceae). II . Flavonoids of *C. aconitifolius* , Author (s): Duane A . Kolterman , Gary J . Breckon and Robert R . Kowal Published by : American Society of Plant Taxonomists Stable URL : <http://www.jstor.or>. **American Society of Plant Taxonomists**, v. 9, n. 1, p. 22–32, 1984.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative Assay for Acute Intestinal Inflammation Based on Myeloperoxidase Activity Assessment of Inflammation in Rat and Hamster Models. **Gastroenterology**, v. 87, p. 1344–1350, 1984.

KUTI, J. O.; KONORU, H. B. ARTICLE IN PRESS Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidioscolus* spp .). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 556–561, 2006.

KUTI, J. O.; KUTI, H. O. Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidioscolus* (tree spinach). **Plant Foods for Human Nutrition** 53:, v. 53, p. 275–283, 1999.

LALLÈS, J.-P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 2, p. 82–94, 2014.

LALLÉS, J.-P.; SUESCUN, J. P. Intestinal alkaline phosphatase : an enzyme with anti-inflammatory properties. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 9, n. 1, p. 94–103, 2014.

LARA-VILLOSLADA, F. et al. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. **European Journal of Nutrition**, v. 45, p. 418–425, 2006.

LEE, D. et al. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1087–1106, 2015.

LI, A.-N. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020–6047, 2014.

LINDEN, S. K. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 3, p. 183–197, 2008.

LOW, D.; NGUYEN, D. D.; MIZOGUCHI, E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1341–57, 2013.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3143–3153, 2013.

MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. et al. It may not be intestinal, but tissue non-specific alkaline phosphatase. **Gut**, n. 4, p. 560, 2010.

MATOS F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Ceará: Ed. Universidade do Ceará, p. 37-65, 1998.

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

MCCULLOUGH, J. S. et al. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. **Gut**, v. 42, n. 6, p. 799–806, 1998.

MENA LINARES, Y., GONZÁLEZ MOSQUERA, D.M., VALIDO DIAZ, A., ESCOBAR ROMÁN, R., PIZARRO ESPÍN, A., CASTILLO ALFONSO, O. Actividad gastroprotectora y toxicidad aguda del extracto de hojas de *Cnidioscolus chayamansa* Mc Vaugh. **Medicent Electron**, v. 21, n. 1, p. 11–21, 2017.

MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E. Animal models of IBD: Linkage to human disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 578–587, 2010.

MOLINA-CRUZ, ALVARO; CIFUENTES, ROLANDO, ET. AL. Evaluación de cuatro selecciones de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*; Euphorbiaceae) y dos niveles de defoliación en cuatro regiones de Guatemala, y aceptabilidad de sus hojas y cogollos en humanos. 2003.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46–54.e42, 2012.

MORDI, J. C.; AKANJI, M. A. Phytochemical Screening of the Dried Leaf Extract of *Cnidoscolus aconitifolius* and Associated Changes in Liver Enzymes Induced by its Administration in Wistar Rats. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 153–158, 2012.

MORRIS, G. P. et al. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 2, p. 795–803, 1989.

MOYA, L. Evaluación de la potencialidad de las hojas de *Cnidoscolus aconitifolius* (chaya) como alimento en Cuba. 2013. Tesis en opción al título en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba

MOYA, L. et al. Composición cualitativa y cuantitativa de las hojas frescas de chaya. **Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 60–62, 2013.

MUTHAS, D. et al. Neutrophils in Ulcerative Colitis: A review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 52, n. 2, p. 125–135, 2017.

MYLONAKI, M. et al. Molecular Characterization of Rectal Mucosa-associated Bacterial Flora in Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 11, p. 481–487, 2005.

NEURATH, M. F. Animal models of inflammatory bowel diseases: Illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer. **Digestive Diseases**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 91–94, 2012.

NG, S. C. et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. **Gastroenterology**, v. 145, p. 158–165, 2013.

NG, S. C. et al. Early Course of Inflammatory Bowel Disease in a Population-Based Inception Cohort Study from 8 Countries in Asia and Australia. **Gastroenterology**, v. 150, p. 86–95.e3, 2016.

OBOH, G. Effect of Some Post-Harvest Treatments on the Nutritional Properties of *Cnidoscolus aconitifolius* Leaf. v. 4, n. 4, p. 226–230, 2005.

OLGUIN, F. et al. Prebiotic ingestion does not improve gastrointestinal barrier function in burn patients. **Burns**, v. 31, n. 4, p. 482–488, 2005.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 380–385, 2014.

OYAGBEMI, A. A. AND ODETOLA, A. A. Hepatoprotective effects of ethanolic extract of *Cnidoscolus aconitifolius* on paracetamol-induced hepatic damage in rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 4, p. 164–169, 2010.

OYAGBEMI, A. A.; ODETOLA, A. A. Hepatoprotective and nephroprotective effects of *Cnidoscolus aconitifolius* in protein energy malnutrition induced liver and kidney damage. **Pharmacognosy Research**, v. 5, n. 4, p. 260–264, 2013.

PALOZZA, P. et al. Modulation of Intracellular Signalling Pathways by Carotenoids. **Carotenoids**, v. 5, n. Nutrition and Health, p. 211–234, 2009.

- PARENTE, J. M. L. et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1197–1206, 2015.
- PARKS, D. A. Leading article Oxygen radicals : mediators of gastrointestinal pathophysiology. **Gut**, v. 30, p. 293–298, 1989.
- PATIL, D. T.; MOSS, A. C.; ODZE, R. D. Role of Histologic Inflammation in the Natural History of Ulcerative Colitis. **Gastrointest Endoscopy Clin N Am**, v. 26, p. 629–640, 2016.
- PÉREZ-CANO, F. J. et al. Flavonoids affect host-microbiota crosstalk through TLR modulation. **Antioxidants**, v. 3, p. 649–670, 2014.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: Plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 102–107, 2009.
- PETERSON, J. D. et al. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3071–3076, 1998.
- PETRYSZYN, P. W.; WITCZAK, I. Costs in inflammatory bowel diseases. **Prz Gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 6–13, 2016.
- PILLAI, K. K. et al. Hepatoprotective Activity of Cnidoscopus Chayamansa against Rifampicin and Isoniazide Induced Toxicity in Wistar Rats. **Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 577–585, 2012a.
- PILLAI, K. K. et al. Hypolipidemic activity of ethanolic extract of leaves of Cnidoscopus chayamansa in hyperlipidemic models of Wistar albino rats. **Acta Chimica & Pharmaceutica Indica**, v. 2, n. 1, p. 24–31, 2012b.
- PITUCH-ZDANOWSKA, A.; BANASZKIEWICZ, A.; ALBRECHT, P. The role of dietary fibre in inflammatory bowel disease. **Prz Gastroenterol**, v. 10, n. 3, p. 135–141, 2015.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1389–1402, 2003.
- RANDHAWA, P. K. et al. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, p. 279–288, 2014.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. S105-10, 2002.
- ROBINSON, M. K. et al. Glutathione depletion in rats impairs T-cell and macrophage immune function. **Archives of Surgery**, v. 128, p. 29–35, 1993.
- RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E. et al. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor (alpha) ... **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3263–3271, 2002.
- ROS-IBARRA, J.; MOLINA-CRUZ, A. The Ethnobotany of Chaya (Cnidoscopus aconitifolius ssp. aconitifolius Breckon): A Nutritious Maya Vegetable. **Economic Botany** **56(4)**, v. 56, n. 4, p. 350–365, 2002.
- ROSS-IBARRA, A. J.; MOLINA-CRUZ, A. The Ethnobotany of Chaya (Cnidoscopus Aconitifolius ssp . Aconitifolius Breckon): A Nutritious Maya Vegetable. **Economic Botany**, v. 56, n. 4, p. 350–365, 2002.
- 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.

- SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 70, p. 3097–3108, 2002.
- 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, p. 2317–2326, 2004.
- SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4303–4306, 1998.
- SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 43–49, 2011.
- 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, n. 3, p. 202–209, 2012.
- SEGAIN, J.-P. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF B inhibition : implications for Crohn ' s disease. **Gut**, v. 47, p. 397–403, 2000.
- SEIBEL, J. et al. Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. **European Journal of Nutrition**, v. 48, p. 213–220, 2009.
- SEITO, L. N. et al. Zeyheria montana Mart . (Bignoniaceae) as source of antioxidant and immunomodulatory compounds with. **Journal of Pharmacy And Pharmacology**, v. 67, p. 597–604, 2015.
- SHAH, S. N. et al. Original Article Atypical histological features of ulcerative colitis. **Tropical Gastroenterology**, v. 32, n. 2, p. 107–111, 2011.
- SHIMOTOYODOME, A. et al. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 125, p. 525–531, 2000.
- SIDO, B. et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 485–92, 1998.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENT, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.
- SMITH, G. P.; HARRIS, H.; PETERS, T. J. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinica Chimica Acta**, v. 142, p. 221–229, 1984.
- STEPHENS, M. Chaya - Chayamansa McVaugh de Cnidoscolum. Universidad de la extensión de la Florida IFAS. 2009. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- 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 and Liver Physiology**, v. 279, n. 6, p. G1298–G1306, 2000.
- SUZUKI, T.; HARA, H. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 401–408, 2011.
- TANG, Y.; FORSYTH, C. B.; KESHAVARZIAN, A. New molecular insights into inflammatory bowel disease-induced diarrhea. **Expert review Gastroenterology Hepatology**, v. 5, n. 5, p. 615–625, 2011.
- TAO, F. et al. Inhibition of Th1/Th17 responses via suppression of STAT1 and STAT3 activation

contributes to the amelioration of murine experimental colitis by a natural flavonoid glucoside icariin. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 798–807, 2013.

TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Review Article Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 18, 2017.

TORRES, M. I. et al. Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study. **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 12, p. 2523–2529, 1999.

TUIN, A. et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. **Gut**, p. 379–387, 2008.

VAKILI, S. T. T.; TAHER, M.; EBRAHIMI, D. N. Update on the management of ulcerative colitis. **Acta Medica Iranica**, v. 50, n. 6, p. 363–372, 2012.

VANDEPUTTE, D. et al. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. **Gut**, v. 65, p. 57–62, 2016.

VANHOUTVIN, S. A. L. W. et al. Butyrate-Induced Transcriptional Changes in Human Colonic Mucosa. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6759, 2009.

VICTOR, M. et al. An underexploited tropical plant with promising economic value and the window of opportunities for researchers : *Cnidocolus aconitifolius*. **American Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 3, n. 6, p. 177–187, 2016.

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

WĘDRYCHOWICZ, A.; ZAJĄC, A.; TOMASIK, P. Advances in nutritional therapy in inflammatory bowel diseases: Review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 3, p. 1045–1066, 2016.

WILLEMSSEN, L. E. M. et al. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E 1 and E 2 production by intestinal myofibroblasts. **Gut**, v. 52, p. 1442–1447, 2003.

WITAICENIS, A. et al. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1391–6, 2010.

WITAICENIS, A. et al. Phytomedicine Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, p. 240–246, 2014.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, p. 211–218, 2010.

YE, L.; CAO, Q.; CHENG, J. Review of inflammatory bowel disease in China. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.