

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE

Pfaffia glomerata (SPRENG.) PEDERSEN

ALEXANDRE TANIMOTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

BOTUCATU – SP

2013

Lafit-Botu
IB-Unesp-Botucatu

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE

Pfaffia glomerata (SPRENG.) PEDERSEN

ALEXANDRE TANIMOTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

CO-ORIENTADOR: Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia.

BOTUCATU – SP

2013

Lafit-Botu
IB-Unesp-Botucatu

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Tanimoto, Alexandre

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Pfaffia glomerata*
(Spreng.) Pedersen / Alexandre Tanimoto. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Coorientador: Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

Capes: 21001006

1. Farmacologia. 2. Intestinos – doenças inflamatórias. 3. Plantas
medicinais – Uso terapêutico. 4. Ginseng-brasileiro.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; Ecdisterona; Ginseng brasileiro;
Pfaffia glomerata; TNBS.

Auxílio Financeiro



Proc. 130595/2011-0 (Bolsa)



Proc. 11/50512-2 (Auxílio financeiro – Responsável: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi)

Agradecimentos

Ao meu orientador e co-orientador Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa por terem dividido seus conhecimentos científicos e acadêmicos durante esta etapa;

À Dra. Juliana Severi pelo auxílio com as análises fitoquímicas e pela disposição e paciência infinitas ao ensinar;

Ao Prof. Dr. Ilio Montanari Júnior e ao CPQBA por fornecerem as raízes de *Pfaffia glomerata*.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro;

À banca examinadora por todas as colaborações e correções neste trabalho.

Dedicatória

Esta dissertação não teria sido escrita sem a companhia e o amparo constante de Deus e dos Espíritos mentores, nem sem o apoio de minha família e amigos. Sei que gostariam de ler seus nomes escritos aqui, eu sou grato a todos, mas com minha esquecida memória corro o grave risco de me esquecer de alguns nomes, saibam que todos foram importantes para mim, até mesmo aqueles com quem só encontro às vezes e só tenho tempo para um breve “oi”.

Contudo, é importante destacar aqueles que acompanharam com mais proximidade esta etapa, dentre eles posso citar meus pais, Roberto e Luísa Tanimoto; assim como minha irmã Marcela Tanimoto; meus companheiros de laboratório Juliana Severi, Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa, Aline Witaicenis Fantinati, Leonardo Noboru Seito, Ubirajara Lanza Júnior, Adriano Cressoni Araújo, Patrícia Rodrigues Orsi, Ana Elisa Valencise Quaglio, Juliana Tibério Checon, Luiz Domingues de Almeida Júnior, Alexandre da Silveira Chagas, Juliana Rocha Ribeiro, Adriana Del Ben, Laura Orsi Machado, Fabiana Masago, Tainan Freitas Salmeron Curimbaba e Camila Hiromi Chiba por me aturarem com tanta boa vontade no dia-a-dia; meus amigos Bianca Barbosa Gregório, Danilo Flávio Moraes Riboli, Evandro Katsui Utsunomia, Wesley Rodrigues Venturin e Neide M. Hartung Gottshalk que se arrependeram de perguntar “e o mestrado?” todas as vezes que vieram conversar comigo, pois sempre me empolgo quando converso sobre meu trabalho, mas que mesmo assim sempre me escutaram com um sorriso no rosto.

Por fim, agradeço ao Instituto de Biociências e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia) da UNESP pelo ensino de qualidade durante esses anos, estou muito agradecido aos docentes, discentes e a todos os outros funcionários desta instituição por todos os ensinamentos.

Todos vocês foram de extrema importância para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, não o teria feito sem vocês, considerem esta dissertação fruto do trabalho duro de cada um de vocês; no entanto, este trabalho é dedicado a todos os animais que deram suas vidas para que o que chamamos de ciência pudesse avançar um pouco mais.

Prólogo

Durante o período referente ao mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia) pude desenvolver diversas atividades junto ao Laboratório de Fitomedicamentos (LaFit) que enriqueceram minha formação como aluno de mestrado. Dentre elas, listo:

1. Prêmios de Pesquisas

- ❖ Menção Honrosa do Prêmio Jovem Investigador Michel Jamra, XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE 2011.

2. Disciplinas cursadas

- 2.1. Abordagem Estatística em Farmacologia I: Fundamentos
- 2.2. Abordagem Estatística em Farmacologia II: Aplicabilidade
- 2.3. Abordagem experimental e computacional para investigar a estrutura e função de macromoléculas biológicas e suas interações
- 2.4. Classificação de Receptores Farmacológicos
- 2.5. Farmacocinética
- 2.6. Farmacologia Avançada
- 2.7. Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia
- 2.8. Mediadores da Resposta Inflamatória
- 2.9. Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais
- 2.10. Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar
- 2.11. Tópicos Especiais em Toxicologia

3. Lista de resultados de pesquisa

3.1. Lista de artigos científicos publicados em periódicos

- 3.1.1. ROZZA, A. L.; HIRUMA-LIMA, C. A. ; **TANIMOTO, A.**; PELLIZZON, C. H. Morphologic and Pharmacological Investigations in the Epicatechin Gastroprotective Effect. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print), v. 2012, p. 1-8, 2012.
- 3.1.2. ROZZA, ARIANE LEITE; MORAES, THIAGO DE MELLO; KUSHIMA, HÉLIO; **TANIMOTO, ALEXANDRE**; MARQUES, MÁRCIA ORTIZ MAYO; BAUAB, TAÍS MARIA ; HIRUMA-LIMA, CLÉLIA AKIKO; PELLIZZON, CLÁUDIA HELENA. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. Chemico-Biological Interactions (Print), v. 189, p. 82-89, 2011.

3.2. Lista de trabalhos publicados em congressos

- 3.2.1. COSTA, C. A. R. A.; **TANIMOTO, A.**; WITAICENIS, A.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JÚNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; DI STASI, L. C. O Fim de uma panaceia: efeito negativo da *Pfaffia paniculata* no modelo de colite induzida por TNBS. In: III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos e III

- Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais, 2012, Aracaju, SE – Brasil. 2012, v. 3.
- 3.2.2. COSTA, C. A. R. A.; **TANIMOTO, A.**; WITAICENIS, A.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JÚNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; DI STASI, L. C. O Fim de uma panaceia: efeito negativo da *Pfaffia glomerata* no modelo de colite induzida por TNBS. In: III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticos e III Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais, 2012, Aracaju, SE – Brasil. 2012, v. 3.
- 3.2.3. CHAGAS, A. S.; ALMEIDA JÚNIOR, L. D.; WITAICENIS, A.; **TANIMOTO, A.**; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.; QUAGLIO, A. E. V. Effects of ethyl acetate of *Baccharis dracunculifolia* DC in TNBS-induced colitis in rats. In: XXII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves, RS – Brasil. 2012, v. 22.
- 3.2.4. ALMEIDA JÚNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; **TANIMOTO, A.**; QUAGLIO, A. E. V.; FANTINATI – WITAICENIS, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C. Avaliação dos efeitos preventivos de *Physalis angulata* L. e prednisolona no modelo experimental de doença inflamatória intestinal. In: XXII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves, RS – Brasil. 2012, v. 22.
- 3.2.5. QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JÚNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; **TANIMOTO, A.**; WITAICENIS, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C. Avaliação dos efeitos do extrato de *Bidens pilosa* L. no modelo experimental de doença inflamatório intestinal. In: XXII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves, RS – Brasil. 2012, v. 22.
- 3.2.6. CHAGAS, A. S.; WITAICENIS, A.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; **TANIMOTO, A.**; COSTA, C. A. R. A.; STASI, L. C. Ethyl acetate extract of *Baccharis dracunculifolia* dc inhibits TNF- α production in TNBS-induced colitis in rats. In: International Conference of Natural Products Research, 2012, Nova Iorque, NY - EUA. *Planta Medica*, 2012. v. 78.
- 3.2.7. ROZZA, A. L.; **TANIMOTO, A.**; PELLIZZON, C. H. Evaluation of gastric juice parameters and role of α_2 -receptors, K⁺ATP channels, nitric oxide and sulfhydryl compounds in the gastrioprotection of epicatechin. In: XX Congresso Italo-Latinoamericano de etnomedicina “Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos, 2011, Fortaleza, CE – Brasil. 2011, v. 20.
- 3.2.8. **TANIMOTO, A.**; ROZZA, A. L.; GREGORIO, B. B.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, HÉLIO; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Role of alpha-2 adrenoreceptors and sulfhydryl groupments on gastroprotective and antiulcerogenic action of epicatechin. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Águas de Lindóia, SP - Brasil. Programa XXVI Reunião Anual, 2011. v. 26.

4. Lista de financiamentos à pesquisa

4.1. Auxílios recebidos

4.1.1. CNPq: 130595/2011-0

Vigência: 03/2011-Atual

Título: Avaliação da atividade adaptógena e anti-inflamatória intestinal de *Pfaffia glomerata*.

Tipo: Bolsa

5. Eventos

5.1. Participação em eventos

- 5.1.1. XIV Jornada de Toxicologia. 2012.
- 5.1.2. XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2012.
- 5.1.3. XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Mini Curso: Como elaborar apresentações orais e de painéis. 2012.
- 5.1.4. Seminário "Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil e obter melhores resultados." 2012.
- 5.1.5. II Simpósio de Farmacologia da UNESP. 2012.
- 5.1.6. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2011.
- 5.1.7. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Mini-curso: Inflamação passo-a-passo. 2011.
- 5.1.8. II Simpósio do Centro de Microscopia Eletrônica. Mini-curso: Princípios em Microscopia Confocal. 2011.
- 5.1.9. VIII Congresso de Saúde e Espiritualidade. 2011.
- 5.1.10. I Simpósio de Farmacologia da UNESP. 2011.
- 5.1.11. II Simpósio do Centro de Microscopia Eletrônica. 2011.
- 5.1.12. Busca Profissional de Patentes: Técnicas, Estratégias e Aplicações Práticas Foco no Questel Orbit. 2011.

5.2. Organização de Eventos

- 5.2.1. XI Workshop da Pós-Graduação. 2012.

6. Outras informações

Também é importante destacar alguns fatos decorridos durante este período. O mestrado se iniciou com a mudança de orientador. Inicialmente fui orientado pela Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, com quem havia realizado Iniciação Científica. Contudo, pude verificar que poderia fortalecer minha formação como farmacologista, ainda na área do trato gastrointestinal, porém com outros enfoques e perspectivas. De fato, a mudança para o Laboratório de Fitomedicamentos, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, permitiram que eu ampliasse minha formação técnica e científica dentro da área.

O projeto inicialmente proposto ao programa de pós-graduação de Ciências Biológicas (Farmacologia) foi alterado devido à impossibilidade de execução das análises fitoquímicas do extrato de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae), por meio de colaborações com pesquisadores do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Sem as análises fitoquímicas, seria inexequível a avaliação da atividade da ação farmacológica da espécie

selecionada, pois não saberíamos quais componentes estariam presentes no extrato; fator que impossibilitaria a produção de um extrato idêntico.

Decorrido o fato, após 4 meses de início do Mestrado, foi selecionada uma nova planta para avaliação dos mesmos parâmetros descritos no projeto original. *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen da família Amaranthaceae é sabidamente uma espécie cujas propriedades denominadas adaptógenas assemelham-se às da *Solanum paniculatum* L., o que serviu de base para substituir a planta originalmente proposta. A *P. glomerata* também foi escolhida devido ao seu manejo e cultivo agrícolas padronizados realizados pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

As dificuldades na realização do modelo experimental foram provenientes da dificuldade em se encontrar animais de qualidade para a realização do mesmo. Pois verminoses, doenças concomitantes e estresse interferem no processo de indução da doença inflamatória intestinal. Estes fatores causaram um atraso adicional de 7 meses no cronograma proposto. Neste ínterim, colaborei na execução de diversos experimentos realizados pelos pós-doutorandos Leonardo Noboru Seito, Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa, Juliana Aparecida Severi e Aline Witaicenis Fantinati; pelos doutorandos Patrícia Rodrigues Orsi, Ana Elisa Valencise Quaglio e Adriano Cressoni Araújo; pelos mestrados Alexandre da Silveira Chagas e Luiz Domingues de Almeida Júnior, e pelas alunas de iniciação científica Laura Orsi, Juliana Rocha, Adriana Del Ben, Tainan Curimbaba, Camila Chiba e Fabiana Masago. Os experimentos realizados pelas pessoas citadas acima se referem a ensaios biológicos relacionados à obesidade, inflamação, gastroproteção, cicatrização gastrointestinal, doenças inflamatórias intestinais, toxicidade, citotoxicidade, atividade antioxidante, estresse, análise histopatológica da pele, anti-histamínicos e coleta de plantas para análise fitoquímica.

Portanto, inegavelmente, o mestrado permitiu enriquecer meus conhecimentos científicos e técnicos.

Resumo

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen (“ginseng brasileiro”) é uma planta medicinal que apresenta um amplo espectro de usos como tônico, antiestresse e afrodisíaco. Esta espécie pertence ao complexo grupo de plantas medicinais conhecidas como “ginseng” e compõe um grupo específico de plantas denominadas adaptógenas, definidas como produtos capazes de aumentar a resistência não específica do organismo frente a diferentes estímulos estressores; considerando-se tal definição, é previsível que os compostos fitoquímicos presentes na *P. glomerata* sejam úteis no controle e prevenção de doenças na qual o estresse é fator etiológico, como é o caso da Doença Inflamatória Intestinal (DII). Dessa forma, o presente trabalho possui como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da fração butanólica de *P. glomerata* (rica em saponinas), sobre o modelo de doença inflamatória intestinal induzida por ácido 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Para tal, foram estudados parâmetros macroscópicos (escore da lesão, extensão da lesão, relação peso/comprimento do cólon, diarreia e aderência) e bioquímicos (atividade da mieloperoxidase e da fosfatase alcalina e quantificação da glutatona total) do processo inflamatório intestinal. Análises fitoquímicas mostraram principalmente a presença de triterpenos e saponinas, incluindo a ecdisterona, e indícios de compostos fenólicos. Os tratamentos com a fração butanólica de *P. glomerata* não foram capazes de impedir a formação lesões induzidas pelo TNBS e nem de auxiliar na resolução de um quadro inflamatório intestinal pré-existente, que também foi causado pelo TNBS. Com base nestes dados, a hipótese inicial de que um produto adaptógeno modularia o sistema imune por meio de sua ação antiestresse foi rejeitada nas condições experimentais utilizadas.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; Ecdisterona; Ginseng brasileiro; *Pfaffia glomerata*; TNBS.

Abstract

Pfaffia glomerata (Spreng.) Perdersen, also called Brazilian ginseng, is a medicinal plant which has a broad use as tonic, anti-stress, and aphrodisiac. This specie belongs to the medicinal plants complex known as ginseng and it is part of a specific group of plants called adaptogens, which are defined as products that are capable of increasing non-specific body resistance against different stressors; considering the definition of adaptogens it is possible to assume that phytochemical compounds present in *P. glomerata* are also useful in controlling and preventing diseases in which stress is an etiological factor, such as Inflammatory Bowel Disease (IBD). Thereby, this present work aims to study the intestinal anti-inflammatory activity from the butanolic extract of *P. glomerata* (enriched in saponins) in the TNBS-induced inflammatory bowel disease in rats. To this, macroscopic (score, lesion extension, weight/length ratio, diarrhea and adherence) and biochemical (myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities and total glutathione content) parameters of the inflammatory bowel disease were studied. Phytochemical analysis showed the presence of triterpens and saponins, including ecdysterone, and signs of phenolic compounds. Treatments with butanolic extract from *P. glomerata* were not able to prevent TNBS-induced lesions nor were able to ameliorate in the resolution of the pre-existing intestinal inflammatory process also caused by TNBS. According to these data, the initial hypothesis that an adaptogen product would modulate the immune system by its anti-stress action was rejected in the experimental conditions utilized.

Key words: Doença inflamatória intestinal; Ecdisterona; Ginseng brasileiro; *Pfaffia glomerata*; TNBS.

Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Prevalência e incidência combinadas de A. Doença de Crohn e B. Retocolite ulcerativa entre os anos de 1980 e 2008 (MOLODECKY et al., 2012).....	4
Figura 2: Coleta de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen no CPQBA. A. Partes aéreas da planta, B. Flores, C. Raízes. Fotografias tiradas por Costa e Tanimoto, 2011.....	9
Tabela 1: Critérios de avaliação da severidade e da extensão de lesões no cólon.	19
Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do EPg.....	24
Figura 3: Análise por CCD do EPG (G ₁) e FrButOH (G ₂). Sílicagel (60 F254 ηm, 0,22 μm). Fase móvel: n-BuOH:AcOEt:HAc:H ₂ O - 4:1:0,6:0,5 v/v. Visualização: nebulização com anisaldeído/H ₂ SO ₄ seguido de aquecimento (100° C).....	26
Tabela 3: Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos da FrBuOH nas doses de 25, 50, 100, 200 ou 400 mg/Kg no modelo experimental preventivo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.....	28
Tabela 4: Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos da FrBuOH nas doses de 25, 50, 100, 200 ou 400 mg/Kg no modelo experimental curativo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.....	28
Figura 4: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao no modelo experimental preventivo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em (consumo de ração (g))/(número de animais do grupo) e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste a posteriori de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de p<0,05.	29
Figura 5: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao no modelo experimental curativo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em (consumo de ração (g))/(número de animais do grupo) e analisados	

- pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste a posteriori de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$, onde ** para $p < 0,01$ 30
- Figura 6: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental **preventivo** de DII aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do ***(Peso inicial – Peso final)x100/Peso inicial*** \pm E.P.M. e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$, onde *** para $p < 0,001$ 31
- Figura 7: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental **curativo** de DII aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do ***(Peso inicial – Peso final)x100/Peso inicial*** \pm E.P.M. e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$, onde ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ 31
- Figura 8: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental **preventivo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ 33
- Figura 9: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental **curativo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ 34
- Figura 10: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental **preventivo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M.* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ 36

- Figura 11: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental **curativo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ****** $p < 0,01$ 36
- Figura 12: Esquema que representa a formação de radicais livres e a neutralização dos mesmos pelo sistema antioxidante (ROBERTS; SINDHU, 2009). 37
- Figura 13: Avaliação dos níveis de glutathiona colônica em animais submetidos ao modelo experimental **preventivo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ******* $p < 0,001$ 38
- Figura 14: Avaliação dos níveis de glutathiona colônica em animais submetidos ao modelo experimental **curativo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ****** $p < 0,01$ 39

Lista de abreviações

AcOEt	Acetato de etila
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância de uma via
ASRL	Atividade sequestradora de radicais livres
CCD	Cromatografia de camada delgada
CE ₅₀	Concentração eficiente
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
E.P.M.	Erro padrão médio
EAG	Equivalente de ácido gálico
ELL	Extração líquido-líquido
EPg	Extrato metanólico de <i>Pfaffia glomerata</i>
FA	Fosfatase alcalina
FrAq	Fração aquosa de <i>Pfaffia glomerata</i>
FrBuOH	Fração butanólica de <i>Pfaffia glomerata</i>
FT	Fenóis totais
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O	Água
HAc	Ácido fórmico
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IL-12	Interleucina – 12
IL-1β	Interleucina – 1 beta
LPS	Lipopolissacarídeos
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida
n-BuOH	n-butanol
P25	<i>Pfaffia glomerata</i> 25 mg/Kg
P50	<i>Pfaffia glomerata</i> 50 mg/Kg
P100	<i>Pfaffia glomerata</i> 100 mg/Kg
P200	<i>Pfaffia glomerata</i> 200 mg/Kg
P400	<i>Pfaffia glomerata</i> 400 mg/Kg
RCU	Retocolite ulcerativa
TCA	Ácido tricloro acético
TNBS	Ácido 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral

Índice

Resumo	xi
Abstract.....	xii
1 Introdução	1
1.1 Doença Inflamatória Intestinal	1
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Terapêutica atual	5
1.2 <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	8
2 Objetivos.....	11
3 Material e métodos.....	12
3.1 Obtenção da planta	12
3.2 Obtenção do extrato vegetal	12
3.3 Caracterização fitoquímica qualitativa	13
3.4 Identificação de ecdisterona por cromatografia de camada delgada	13
3.5 Determinação da atividade sequestradora de radicais livres	13
3.5.1 Determinação do teor de fenóis totais.....	15
3.6 Animais	16
3.7 Processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos	16
3.7.1 Atividade anti-inflamatória preventiva da <i>Pfaffia glomerata</i>	17
3.7.2 Atividade anti-inflamatória curativa da <i>Pfaffia glomerata</i>	18
3.7.3 Avaliação do processo inflamatório intestinal	18
3.7.4 Avaliação macroscópica.....	18
3.8 Análises bioquímicas.....	19
3.8.1 Atividade da mieloperoxidase.....	19
3.8.2 Determinação do conteúdo de glutathiona total.....	19
3.8.3 Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.....	20
3.9 Análise estatística	20
4 Resultados e discussão	22
5 Conclusão.....	41
6 Referências Bibliográficas	42
7 Anexos	50

1 Introdução

1.1 Doença Inflamatória Intestinal

As doenças conhecidas coletivamente como Doença Inflamatória Intestinal (DII) são representadas principalmente por duas condições patológicas - a Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). Burrill Crohn, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzbur descreveram a doença de Crohn (DC) em 1932 e, Wilks e Moxon descreveram a retocolite ulcerativa (RCU) em 1875 (AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION INSTITUTE, 2006). Ambas se apresentam como processos inflamatórios idiopáticos, crônicos e recidivantes do trato gastrointestinal; afetando, física e psicologicamente, a vida dos doentes prejudicando suas relações familiares e sociais (BOUMA; STROBER, 2003; PEYRIN-BIROULET et al., 2011). Apesar de possuírem muitas similaridades, importantes diferenças clínicas e patofisiológicas as distinguem (BOUMA; STROBER, 2003).

A DC pode afetar qualquer porção do trato gastrointestinal, havendo maior prevalência de casos no íleo terminal, ceco, cólon e a região perianal. Esta doença é descontínua, caracterizada pela presença de segmentos íntegros entre as regiões lesionadas. Enquanto a RCU caracteriza-se por um processo inflamatório que envolve, invariavelmente, o reto e estende-se em direção ascendente, de forma contínua e restrita ao cólon (BAUMGART; SANDBORN, 2007; BOUMA; STROBER, 2003).

A DC compromete toda a espessura da parede intestinal, da mucosa à serosa (lesão transmural). A infiltração de linfócitos e macrófagos constituem lesões com presença de granulomas em mais de 60% dos pacientes, além de ulcerações e fibroses na camada submucosa. Por sua vez, a RCU é representada por um processo inflamatório que acomete somente a camada mucosa do cólon, que apresenta infiltração de leucócitos e perda de células caliciformes. Adicionalmente, podem se

formar abscessos nas criptas, com presença de neutrófilos e ocorrência de ulcerações (BOUMA; STROBER, 2003).

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida e um único agente ou mecanismo isolado não parece ser suficiente para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais (estresse, dieta, uso de fármacos anticoncepcionais e anti-inflamatórios não-esteroidais entre outros), juntamente com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa células de origem imune e não-imune que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal, de modo que sua etiologia é considerada multifatorial (FIOCCHI, 1998). Por meio de uma resposta imune exagerada e inapropriada da mucosa à microbiota normal, a qual é facilitada por alterações na barreira epitelial intestinal e mediada principalmente por células T da mucosa, desencadeia-se uma intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, eicosanoides, fator de agregação plaquetária e inúmeras citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-12. Neste sentido, está descrito um grande aumento na síntese, no cólon, de leucotrieno B₄, o qual devido sua capacidade quimiotática e ativadora de neutrófilos pode ser o responsável por grande parte da destruição celular e necrose que caracterizam a DII (SHARMA; MOHAMMED, 2006). A destruição celular e necrose, por sua vez, ocorrem devido à atividade da fosfatase alcalina e à atividade da mieloperoxidase, assim como da geração de radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio, os quais têm sido implicados em diferentes fases do processo inflamatório (CHIVA-BLANCH; VISIOLI, 2012; HALLIWELL, 1996; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004).

Os radicais livres desempenham um papel chave na gênese e manutenção da DII, sendo que alguns estudos comprovam a existência de alterações nos níveis oxidativos em biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade (LIH-BRODY et al., 1996). Este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição

nas defesas antioxidantes fisiológicas, especialmente dos níveis de glutathione total (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004).

Para evitar o processo inflamatório causado pelos múltiplos fatores descritos anteriormente, as células linfoides e os nódulos presentes na lâmina própria e na submucosa são modulados para evitar a entrada de patógenos e agentes nocivos e não reagirem frente às bactérias comensais e antígenos provenientes da dieta, fenômeno denominado de tolerância oral (ANDERSEN et al., 2012; MUKHOPADHYA et al., 2012). Sabe-se que a perda da tolerância oral e o desenvolvimento de resposta imune contra as bactérias não patogênicas são os pontos chave para o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, porém o motivo pelo qual isso ocorre ainda permanece desconhecido (BOUMA; STROBER, 2003; HOU; ABRAHAM; EL-SERAG, 2011).

1.1.1 Epidemiologia

Dados epidemiológicos demonstram que a retocolite ulcerativa é mais comum que a Doença de Crohn, sendo que a incidência e prevalência da DII variam amplamente devido às diferentes metodologias de estudo utilizadas, mas a maioria destes estudos mostra que a RCU são mais frequentes que a DC (MARSHALL, 2008). O número de casos de DII está aumentando com o passar do tempo em diferentes regiões do mundo todo, indicando sua emergência como doença global (MOLODECKY et al., 2012).

As maiores incidências de DII foram relatadas em regiões desenvolvidas, como a Europa e América do Norte (Figura 1), onde, respectivamente afetam 2,2 milhões e 1,4 milhões de pessoas (PEYRIN-BIROULET et al., 2011). Porém, a RCU e DC começaram a aumentar em países em que raramente haviam sido relatados anteriormente, como Índia e China (COSNES et al., 2011; MOLODECKY et al., 2012). Dados sobre a prevalência da DII são escassos, contudo valiosos. A razão entre prevalência e incidência varia entre 6,6 e 23. A prevalência de DC na América do Norte e Europa varia de 44-201 e 8-214 casos para 100.000 habitantes, respectivamente. A prevalência de

casos de RCU para 100.000 habitantes, por sua vez, é de 37,5-238 na América do Norte e de 21-294 na Europa (COSNES et al., 2011).

No Brasil, apesar da inexistência de dados epidemiológicos oficiais, a incidência de RCU e da DC tem aumentado nos últimos anos e se aproxima de níveis de países desenvolvidos, como os Europeus (Figura 1) (MOLODECKY et al., 2012; VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009).

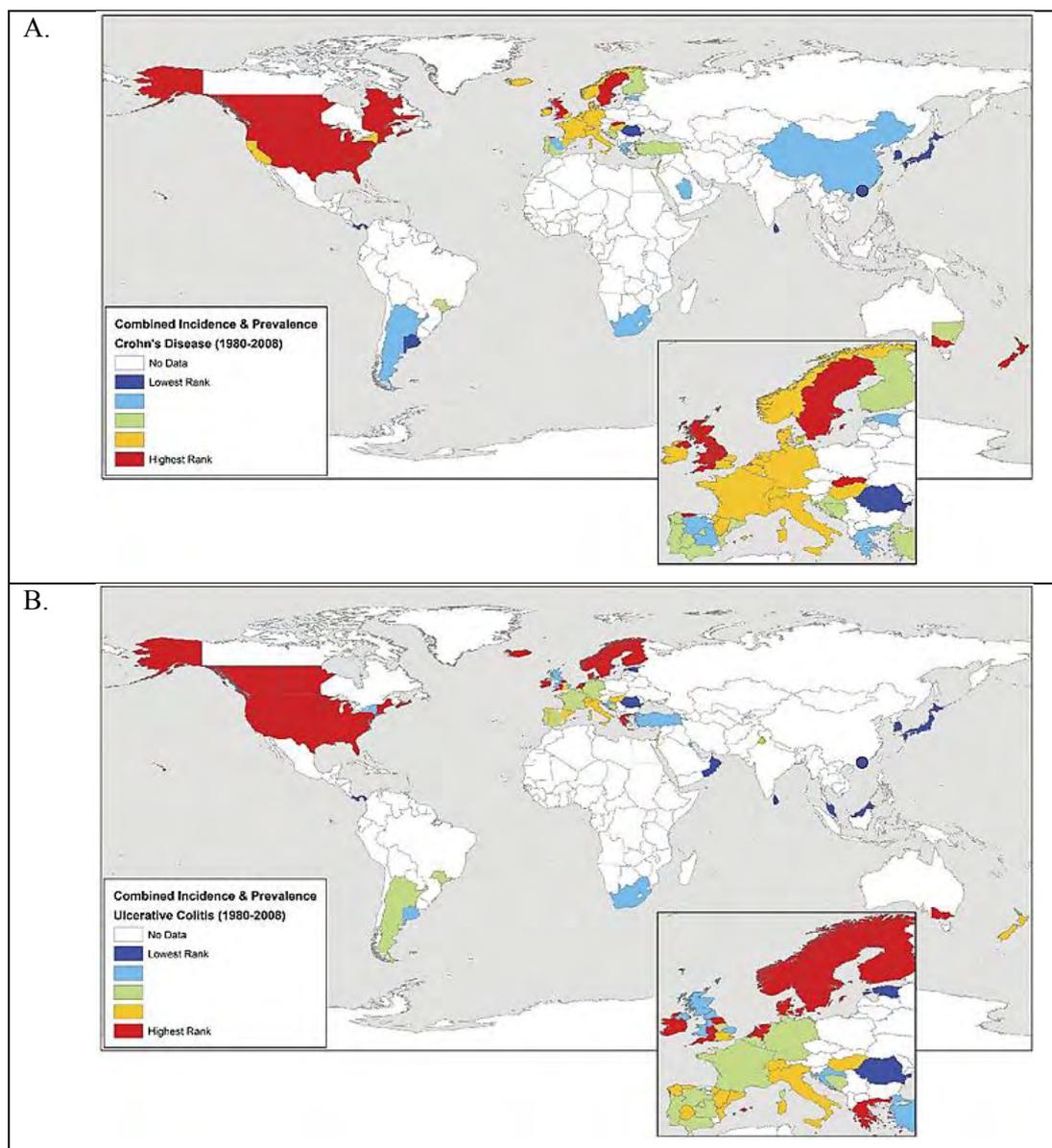


Figura 1: Prevalência e incidência combinadas de A. Doença de Crohn e B. Retocolite ulcerativa entre os anos de 1980 e 2008 (MOLODECKY et al., 2012)

Independentemente dos dados epidemiológicos, outros aspectos importantes estão associados a estas doenças e seu impacto sobre a população e os sistemas públicos de saúde. Um deles se baseia no alto custo envolvido no tratamento da RCU e da DC, estimado, nos Estados Unidos, respectivamente em US\$ 8.265,00 e US\$ 5.066,00, perfazendo um total anual aproximado de US\$ 137 milhões (BENCHIMOL et al., 2012; KAPPELMAN; RIFAS-SHIMAN, 2008). Um segundo fator, é a característica incapacitante destas doenças, que restringem os pacientes no desenvolvimento de suas atividades diárias, como estudar e trabalhar (PEYRIN-BIROULET et al., 2010, 2011). Terceiro, a RCU e a DC, são indiscutivelmente o principal fator de risco para o aparecimento de câncer colo-retal, sendo 19 vezes maior quando comparado com a população em geral (ONKEN, 2008). As informações apresentadas ressaltam, por um lado, a necessidade de busca de novas alternativas de tratamento e, por outro, a importância da realização de estudos tendo-se em vista o maior entendimento da fisiopatologia da DII e a pesquisa de novos alvos farmacológicos com consequente ampliação das possibilidades de estabelecimento de novas estratégias terapêuticas.

1.1.2 Terapêutica atual

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento da doença inflamatória intestinal inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos (sulfassalazina), glicocorticoides (prednisolona) e imunossupressores (azatioprina) (YAMAMOTO-FURUSHO, 2007) e a terapia biológica, tais como anticorpos monoclonais anti-TNF α (infliximab) (MORRISON, 2009; PLEVY; TARGAN, 2011). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura para a DII, sendo que os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais, como os corticosteroides, e/ou são de alto custo, como por exemplo, o infliximab. Tais fatores limitam imensamente sua utilização, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes (BENCHIMOL et al., 2012).

No Brasil, os medicamentos mais utilizados no tratamento destas doenças são os aminossalicilatos e os glicocorticoides, e menos frequentemente, os imunossuppressores ou a terapia biológica (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009).

Os elementos citados acima indicam que a necessidade da pesquisa de novos compostos que possam potencializar o efeito dos fármacos, diminuir a dose administrada e conseqüentemente o risco da ocorrência de efeitos colaterais. Tal pesquisa deve ser conduzida por análises macroscópicas e bioquímicas, tais como determinação de fatores inflamatórios e antioxidantes.

Além disso, a pesquisa de novos produtos ativos na DII vem sendo realizada por meio de diferentes estratégias, principalmente pela avaliação de produtos naturais com atividade antioxidante e anti-inflamatória (LUCHINI et al., 2008; ROMIER et al., 2009; WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010; WITAICENIS et al., 2012), assim como produtos prebióticos e/ou probióticos (FRUET et al., 2012; HOU; ABRAHAM; EL-SERAG, 2011; SCARMINIO et al., 2012). Portanto, a terapêutica atual associada à boa alimentação também pode ser um ponto crucial para a recuperação ou para a formação do processo inflamatório intestinal, pois alimentos podem auxiliar na patogênese da DII (ANDERSEN et al., 2012; FERGUSON et al., 2007), como também podem auxiliar em sua remissão (FRUET et al., 2012; ROMIER et al., 2009; SCARMINIO et al., 2012; WITAICENIS et al., 2010).

Como já foi descrito, radicais livres causam dano tecidual em pacientes com DII; de fato, foi demonstrado que os corticoides e a sulfassalazina possuem efeito anti-inflamatório intestinal e também inibem a formação de espécies reativas de oxigênio, contudo ambos causam inúmeros efeitos colaterais (CRONSTEIN; KIMMEL, 1992; MIYACHI et al., 1987). No entanto, inúmeras substâncias provenientes de plantas medicinais possuem atividade anti-inflamatória intestinal e atividade antioxidante sem evidência de toxicidade, auxiliando na prevenção e cicatrização do processo inflamatório intestinal. Dentre elas podem ser destacados os flavonoides e seus derivados, como a quercetina (MEDINA et al., 1996) e a epicatequina (VASCONCELOS et al., 2012); cumarinas e seus derivados, como a 4-metil-hidroxicumarina, 4-metil-esculetina, esculetina

(LUCINI et al., 2008; WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010; WITAICENIS et al., 2012) e a pepalantina (DI STASI et al., 2004).

Outra estratégia terapêutica é a associação de alimentos que modulam o sistema imune e a microbiota intestinal, como probióticos e prebióticos (FRUET et al., 2012; SCARMINIO et al., 2012). Os prebióticos, resistentes à digestão no trato gastrointestinal, são substratos para a fermentação anaeróbica da microbiota intestinal, processo que gera a produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais podemos citar o acetato, propionato e butirato. O butirato é um importante fator para a manutenção do funcionamento saudável da mucosa colônica, pois é a maior fonte energética dos colonócitos (FRUET et al., 2012).

A DII também pode ser influenciada por estresse psicológico, pois o estresse afeta o sistema imune, aumentando o risco de DII. Devido a essas características, plantas denominadas adaptógenas são possíveis candidatas para a prevenção e cura da DII, visto que os adaptógenos aumentam a capacidade do organismo de se adaptar contra fatores estressantes, prevenindo assim danos ao indivíduo (PANOSSIAN; WIKMAN; WAGNER, 1999).

Os adaptógenos representam uma fonte em potencial de novos produtos farmacologicamente ativos para terapêutica da DII, pois seu mecanismo de ação é parcialmente associado com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), cuja hiperativação resulta em vários estados fisiopatológicos, incluindo a DII (CAPURON; MILLER, 2011). De fato, o eixo HHA associado ao eixo simpático-adrenal medular modula os fatores de secreção, absorção e defesa do intestino e este complexo sistema transmite sinais ambientais que são produzidos pelo estresse ao intestino, tendo, portanto, importante papel na DII. Apesar da relação entre estresse e DII ser ainda limitada, reconhece-se que o estresse afeta o sistema imune, o sistema neuroendócrino e o epitélio intestinal, liberando citocinas próinflamatórias e neuropeptídeos, os quais alteram o epitélio intestinal induzindo a recidiva da DII (NIESS et al., 2002).

Com base nestas informações e por ser considerada no Brasil a sucedânea do *Panax ginseng* (ginseng) que é provavelmente a mais popular e bem conhecida planta medicinal documentada até hoje e considerada umas das mais importantes espécies adaptógenas utilizadas (RATES; GOSMANN, 2002), a espécie *Pfaffia glomerata* foi selecionada para o presente estudo.

1.2 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

O termo ginseng pode se referir a diversas plantas diferentes. O ginseng da Coreia, *Panax ginseng* C.A. Meyer, é considerada a espécie típica; entretanto outras espécies correlatas podem ser chamadas por ginseng, seja por pertencer ao mesmo gênero, ou ter características morfológicas e químicas semelhantes, ou ainda possuir semelhantes efeitos biológicos (RATES; GOSMANN, 2002).

As espécies conhecidas como ginseng são usadas há milhares de anos na medicina tradicional chinesa como revigorantes, imunorreguladoras, anti-estresse e anti-idade (BLOCK; MEAD, 2003; WANG; YUAN, 2008 *apud* LEMMON et al., 2012). O ginseng é utilizado para aumentar a resistência contra o estresse físico, químico e/ou biológico, proporcionando maior longevidade ao indivíduo (CHRISTENSEN, 2009).

O ginseng pode ser nativo da Coreia ou China (*Panax ginseng*), do Himalaia (*Panax pseudo-ginseng*), do Vietnã (*Panax vietnamensis*), do Japão (*Panax japonicus*), ou da América do Norte (*Panax quinquefolium* ou *Panax quinquefolius*) (KITTS; HU, 2000). No Brasil, a *Paffia paniculata* é o substituto verdadeiro do ginseng, contudo é comum a comercialização da *Pfaffia glomerata* como sua adulterante; tal fato ocorre devido às semelhanças morfológicas entre as plantas (GOSMANN et al., 2003; RATES; GOSMANN, 2002; VIGO et al., 2004). A diferenciação entre as espécies torna-se importante, pois as diferenças na composição química conferem efeitos farmacológicos e toxicológicos distintos entre as duas espécies (RATES; GOSMANN, 2002).

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen é uma planta medicinal pertencente à família Amaranthaceae, que é conhecida como “para tudo”, “fáfia”, “suma” ou “corango”. Esta espécie pode se apresentar como um arbusto ereto, com ramos esguios e pouco ramificados, ou ainda podem apresentar-se mais robustas e com muitas folhas, caso tenham sido cultivadas apropriadamente (Figura 2). A raiz tem espessura e comprimento que variam de acordo com a idade da planta, seu formato também varia de formas encurvadas, torcidas e espiraladas até a típica forma humanoide, de forma similar ao *Panax ginseng* (VIGO et al., 2004). Foram descritas aproximadamente 90 espécies do gênero *Pfaffia* na América Central e do Sul, das quais 27 estão distribuídas pelo Brasil (TANIGUCHI et al., 1997). Dentre todas as espécies citadas, a *P. glomerata*, *P. paniculata* e *P. iresinoides* são usadas em substituição do *Panax ginseng* e são chamados “ginseng brasileiro” (SHIOBARA et al., 1992).

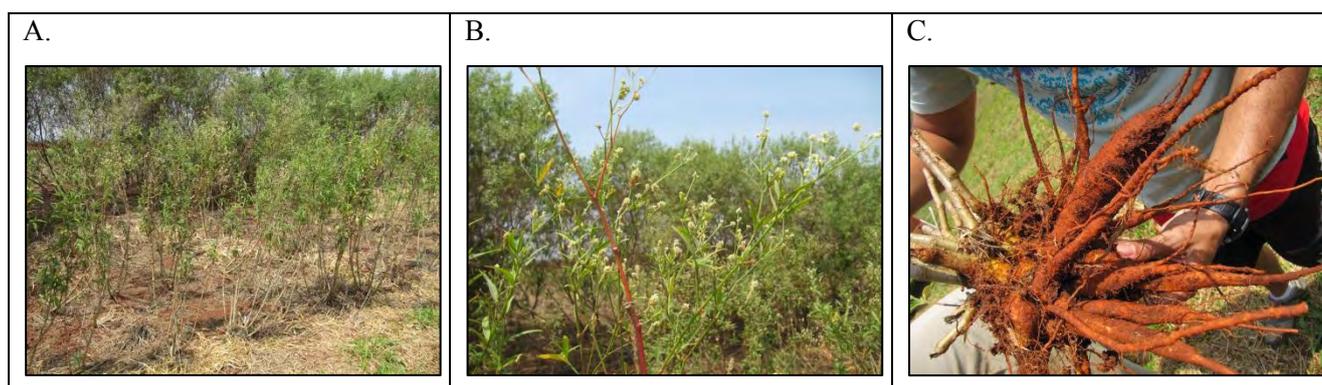


Figura 2: Coleta de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen no CPQBA. A. Partes aéreas da planta, B. Flores, C. Raízes. Fotografias tiradas por Costa e Tanimoto, 2011.

Raízes de *P. glomerata* são utilizadas para tratamento de diabetes e como tônicas pela medicina popular brasileira (NAKAMURA et al., 2010). Extratos hidroalcoólicos das raízes foram descritos como gastroprotetor (FREITAS et al., 2004), antioxidante (DE SOUZA DANIEL et al., 2005), anti-edematogênico (TEIXEIRA et al., 2006), anti-nociceptivo (FREITAS et al., 2009), anti-inflamatório, analgésico (NETO et al., 2005), além de melhorar o processo de aprendizagem e memória de camundongos idosos após tratamento crônico (MARQUES et al., 2004). MENDES e CARLINI (2007) destacaram que a *P. glomerata* e *P. paniculata* estão entre as plantas mais

utilizadas, popularmente, como tônicas e afrodisíacas e possuem grande potencial adaptogênico, mas apesar disso são pouco descritas na literatura.

Até onde se conhece, as raízes possuem em sua constituição fitoquímica os seguintes compostos: ácido famérico, ácido glomérico, ácido oleanólico, ecdisterona, rubrosterona, β -D-glicopiranosil-oleanolato, fafianol A, fafiaglicosídeo e seus derivados (NAKAMURA et al., 2010; SHIOBARA et al., 1993), sendo que a ecdisterona é um importante marcador na diferenciação interespecífica entre a *P. glomerata* e a *P. paniculata*, pois este composto está presente somente na *P. glomerata* (SHIOBARA et al., 1993).

Em vista das indicações de uso popular de *P. glomerata*, das propriedades farmacológicas já descritas e a carência de informações na literatura, estudos adicionais com esta espécie, no campo de pesquisa da DII, tornam-se de grande relevância na busca por novos produtos farmacologicamente ativos.

2 Objetivos

Avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da fração butanólica de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, sobre o modelo de doença inflamatória intestinal induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.

3 Material e métodos

3.1 Obtenção da planta

A coleta das raízes da *Pfaffia glomerata* foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) em Campinas-SP, no dia 23 de setembro de 2011 sob a supervisão do Dr. Ilio Montanari Júnior. Uma exsicata da planta é mantida no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), cujo número do voucher é CPQBA 0238.

Após coleta, o manejo do material vegetal foi realizado no Laboratório de Fitomedicamentos do Departamento de Farmacologia da UNESP/IB-Botucatu. As raízes (4,75 Kg) de *P. glomerata* foram lavadas sob água corrente, trituradas grosseiramente com o auxílio de um liquidificador industrial e secas em estufa com circulação de ar (45 °C, por 4 dias). Após a secagem, as raízes foram trituradas em moinho de facas, sendo que o pó resultante (1,801 Kg) foi acondicionado em embalagem de papel e armazenado ao abrigo da luz e umidade.

3.2 Obtenção do extrato vegetal

As raízes secas e trituradas foram submetidas à extração por maceração utilizando metanol 70% como líquido extrator. Onde as mesmas foram previamente intumescidas com metanol 70% e mantidas em maceração por 48h (1:4, Kg/L). O material resultante foi filtrado em papel de filtro com auxílio de vácuo e o processo de maceração repetido por mais três vezes, em ciclos de 24h. As soluções resultantes foram rotaevaporadas em pressão reduzida (45 °C) e o resíduo aquoso liofilizado. O pó resultante da liofilização (EPg) foi pulverizado em almofariz, transferido para vidro tarado e adequadamente armazenado ao abrigo da luz e umidade.

Uma alíquota do EPg (200,0 g) foi solubilizada em 500 mL de água. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas (Extração Líquido-Líquido - ELL) com n-BuOH (1:1 v/v, 2x), obtendo-se duas frações com polaridades distintas: fração butanólica (FrBuOH) e fração aquosa

(FrAq). Cada uma destas frações foi concentrada em rotaevaporador e liofilizada para completa remoção do solvente. Os pós resultantes foram transferidos para recipientes de vidro pesados e igualmente armazenados ao abrigo de luz e umidade.

3.3 Caracterização fitoquímica qualitativa

O EPg foi submetido à prospecção fitoquímica qualitativa, a fim de obter informações preliminares acerca dos principais grupos de metabólitos secundários presentes. Esta abordagem tem por base a observação de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característicos para algumas classes de substâncias. Dessa maneira, os testes visaram à verificação da presença – ou ausência – de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, cumarinas, terpenoides, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides, saponinas e glicosídeos cianogênicos (MATOS, 2009; WAGNER et al., 1984).

3.4 Identificação de ecdisterona por cromatografia de camada delgada

Complementarmente, o EPg e a FrBuOH foram caracterizados por Cromatografia em Camada Delgada. Para isso, cerca de 15 mg das amostras foram dissolvidos em 1 mL de MeOH 70% e estas aplicadas com auxílio de capilar em cromatoplasas de alumínio recobertas por sílica gel 60 (0,22 μ , de espessura, F₂₅₄). A fim de evidenciar a presença de ecdisterona foi realizada uma CCD (n-BuOH:AcOEt:HAc:H₂O - 4:1:0,6:0,5, v/v) seguindo as condições descritas por FLORES et al. (2009). A visualização da placa foi realizada por nebulização de anisaldeído/H₂SO₄ e observação sob luz UV-Vis após aquecimento.

3.5 Determinação da atividade sequestradora de radicais livres

A atividade sequestradora de radicais livres foi avaliada segundo as metodologias de BLOIS

(1958) e BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET (1995), com adaptações para microplaca de 96 poços. O procedimento consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura, que absorve a 517 nm. Por ação de uma substância antioxidante ou outra espécie radicalar, o DPPH• é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção. O monitoramento do decréscimo da absorvância após a reação fornece a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional).

As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 517 nm. Soluções aquosas do EPg foram preparadas nas concentrações de 0–900 µg/mL. Em cada cavidade da microplaca adicionou-se 100 µL das amostras-testes, 200 µL da solução de DPPH (40 µg/mL) e as misturas reacionais foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos. A mistura de água (100 µL) com DPPH (200 µL) foi utilizada como controle (Ac), enquanto que o ácido gálico foi usado como padrão positivo (0–3 µg/mL) para fins de comparação. Decorrido o período de incubação, realizou-se a leitura espectrofotométrica em 517 nm. Os testes foram realizados em triplicata. O percentual de atividade sequestradora de radicais livres (ASRL) é então determinado com base no decaimento da absorvância das amostras e do controle, segundo a equação:

$$ASRL = Ac - \frac{A_{amostra}}{Ac} \times 100$$

onde:

A_C = Média da absorvância do controle (DPPH + água)

$A_{amostra}$ = Média da absorvância da amostra (ou padrão) analisada

Em seguida, os dados encontrados foram expressos na forma de Concentração Eficiente (CE_{50}), ou seja, quantidade necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%. Para isso, foi

registrada a curva exponencial de primeira ordem, plotando-se na abscissa as concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$) e na ordenada a ASRL.

3.5.1 Determinação do teor de fenóis totais

O doseamento de compostos fenólicos totais no EPg foi realizado empregando-se o método com o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), adaptado para microplaca de 96 poços. O reagente é constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico. 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 .

As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 750 nm . Soluções aquosas do EPg foram preparadas nas concentrações de $0\text{--}10.000 \mu\text{g/mL}$. Em cada cavidade da microplaca adicionou-se $50 \mu\text{L}$ de água, $12,5 \mu\text{L}$ das amostras-testes, $12,5 \mu\text{L}$ do reagente Folin (2N) e as misturas reacionais foram mantidas ao abrigo da luz por 5 minutos. Decorrido o período de incubação, adicionou-se $125 \mu\text{L}$ de Na_2CO_3 7% e uma incubação adicional de 1,5 h ao abrigo da luz. Em seguida, realizou-se a leitura em 750 nm . O composto ácido gálico foi usado como controle ($0\text{--}3 \mu\text{g/mL}$). Os testes foram realizados em triplicata. O teor de fenóis totais (FT) é determinado por interpolação da absorvância da amostra-teste contra a curva de calibração construída com ácido gálico e expresso como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por g de extrato, segundo a equação:

$$FT = \frac{[F] \times 1000}{[A]}$$

onde:

FT: teor de fenóis totais

[F]: concentração de fenóis da amostra-teste ($\mu\text{g/mL}$), obtida pela leitura da absorvância da amostra e posterior interpolação da [] pela curva de calibração do padrão

[A]: concentração da amostra-teste ($\mu\text{g/mL}$)

3.6 Animais

Ratos Wistar machos (180 a 220g, n = 7) provenientes da ANILAB Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA, aclimatados às condições do biotério do Laboratório de Fitomedicamentos do Departamento de Farmacologia por pelo menos cinco dias antes dos procedimentos experimentais, sob temperatura ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram pesados diariamente e alimentados com ração Presence[®] peletizada com controle diário e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais n° 42/04-CEEA submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

3.7 Processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos

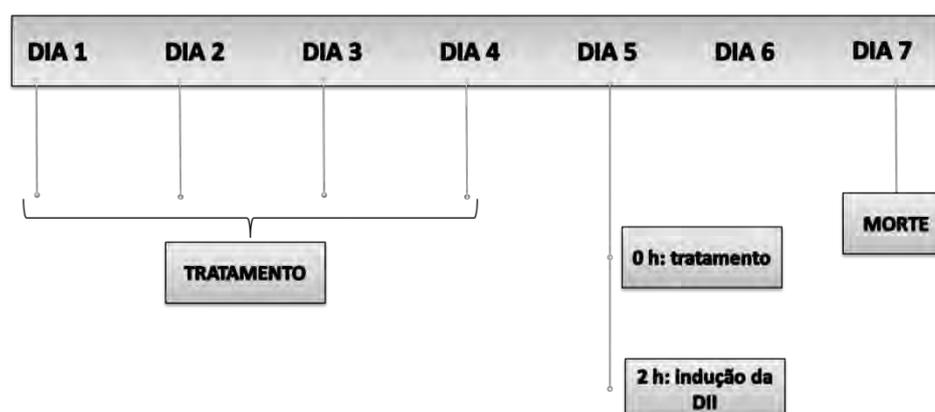
Os estudos foram feitos com os seguintes grupos experimentais:

- Grupo branco: animais sem indução do processo inflamatório Intestinal e sem tratamento
- Grupo controle: animais com indução do processo inflamatório intestinal e sem tratamento
- Grupos experimentais: animais com indução do processo inflamatório intestinal e tratados com fração butanólica de *Pfaffia glomerata* nas doses de 25 mg/Kg (P25), 50 mg/Kg (P50), 100 mg/Kg (P100), 200 mg/Kg (P200) ou 400 mg/Kg (P400).

3.7.1 Atividade anti-inflamatória preventiva da *Pfaffia glomerata*

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por MORRIS et al. (1989), com as seguintes modificações. Os animais foram tratados de acordo com as doses dos grupos experimentais descritos anteriormente (P25 a P400, grupo controle negativo recebeu salina (veículo)) 96, 72, 48, 24 e 2 h antes da indução do processo inflamatório intestinal. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 h e anestesiados com halotano imediatamente antes da indução.

Em seguida, foi realizada a administração intracolônica de 0,25 mL de uma solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% (v/v). A administração foi realizada com a ajuda de um cateter de 2 mm de diâmetro, que foi introduzido pelo ânus até uma distância de 8 cm. Os animais 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 os animais foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório, de acordo com o seguinte esquema:



3.7.2 Atividade anti-inflamatória curativa da *Pfaffia glomerata*

A indução do processo inflamatório também foi realizada através do método descrito por MORRIS et al. (1989) seguindo as mesmas especificações do modelo anterior com as seguintes modificações: os animais receberam sete tratamentos de acordo com as doses dos grupos experimentais descritos anteriormente (P25 a P400, grupo controle negativo recebeu salina (veículo)); sendo que o primeiro tratamento foi realizado 2 h após da indução do processo inflamatório intestinal e os demais em intervalos de 24 h.

Após 24 h do último tratamento, todos os animais foram mortos para a avaliação do processo inflamatório intestinal, de acordo com o esquema:



3.7.3 Avaliação do processo inflamatório intestinal

Durante o período de manipulação, os animais foram avaliados quanto ao consumo de ração, evolução do peso corpóreo e presença de diarreia.

Após a morte dos animais, os cólons foram extraídos e analisados quanto aos danos intestinais, considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos.

3.7.4 Avaliação macroscópica

Na análise macroscópica foram avaliados: a relação entre o peso e o comprimento do cólon, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da severidade,

extensão e características do dano intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por BELL; GALL; WALLACE (1995)(Tabela 1). Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em fragmentos longitudinais para análises bioquímicas.

Tabela 1: Critérios de avaliação da severidade e da extensão de lesões no cólon.

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

3.8 Análises bioquímicas

3.8.1 Atividade da mieloperoxidase

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase em amostras de cólon de ratos após a avaliação do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS foi realizada pelo método de KRAWISZ; SHARON; STENSON (1984). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. de unidades de mieloperoxidase por grama de tecido (U/g de tecido), onde 1 unidade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25 °C. A atividade da mieloperoxidase é utilizada como marcador de infiltração neutrofílica.

3.8.2 Determinação do conteúdo de glutathiona total

A quantificação de glutathiona total em amostras de cólon coletadas após a morte dos animais que foram imediatamente armazenadas em 1 mL de ácido tricloro acético (TCA) foi realizada pelo método descrito por ANDERSON (1985). O protocolo é baseado na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra para a sua forma oxidada (GSSG), através da

incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 412 nm. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathione 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 glutathione (GSH + GSSG). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. de μ moles de glutathione total por grama de tecido (μ moles de glutathione/g de tecido).

3.8.3 Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos clássicos descritos por SMITH; HARRIS; PETERS (1984) e BESSEY; LOWRY; BROOK (1946), respectivamente. A determinação de proteínas foi espectrofotometricamente determinada a 562 nm e foi realizada pela reação de ácido bicinchonínico e sulfato de cobre que forma coloração roxa após incubação a 37 °C por 25 minutos. A determinação de fosfatase alcalina foi realizada através do uso de p-nitrofenilfosfato dissódico como substrato na presença de tampão glicina 50 mM (pH 10,5) com 0,5 mM de MgCl₂ que adquire coloração amarelada após incubação a 37 °C por 25 minutos, que é detectada a 405 nm. O cálculo da fosfatase alcalina é baseada na quantidade de proteínas totais e expressa em mU/ mg de proteína.

3.9 Análise estatística

Dados paramétricos estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett ou à análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Dados não paramétricos estão expressos na forma de mediana (range) e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunn. As

proporções foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Todas as análises foram feitas pelo software *GraphPad Prism*[®] com nível de significância mínimo de $p < 0,05$ comparados ao grupo controle.

4 Resultados e discussão

A etiopatologia da DII não está totalmente elucidada, além da interação entre fatores genéticos e ambientais, juntamente com a microbiota intestinal e a presença de radicais livres (BOUMA; STROBER, 2003; FIOCCHI, 1998), há evidências crescentes do envolvimento do estresse psicológico e doenças relacionadas aos fatores psicológicos, tais como depressão e ansiedade, na DII. Tais evidências justificam-se, pois fatores emocionais podem afetar o sistema imune e alterar a susceptibilidade às doenças. Devido a essas características, plantas denominadas adaptógenas são possíveis candidatas para a prevenção e cura da DII. Os adaptógenos aumentam a capacidade do organismo de se adaptar contra fatores estressantes, prevenindo assim danos ao indivíduo (PANOSSIAN; WIKMAN; WAGNER, 1999).

O Brasil possui uma vasta gama de plantas com propriedades adaptógenas (MENDES; CARLINI, 2007), dentre elas pode-se citar a *Pfaffia glomerata*, popularmente conhecida como “ginseng-brasileiro” ou ainda “para-tudo” (RATES; GOSMANN, 2002).

A coleta de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen forneceu 4,75 Kg de material fresco, que após secagem em estufa de circulação de ar resultou em 1,801 Kg. Um quilograma de planta foi utilizado para preparo de extrato hidroalcoólico por maceração, o que resultou em 316,269 g (31,63 %) de extrato liofilizado.

Os líquidos extratores mais utilizados para preparo de extrato de *Pfaffia* sp são soluções hidroalcoólicas, principalmente metanol e etanol misturados à água. O percentual de álcool:água (v:v) varia de 60 % (DE-PARIS et al., 2000; GOSMANN et al., 2003) até uso de álcool puro (BOUZADA et al., 2009). Pode-se observar na literatura que os maiores rendimentos foram obtidos com álcool 70% (FREITAS et al., 2009), contudo seu rendimento ainda apresenta variação importante, sendo esta de 19 a 64,1 % do peso da planta seca (FREITAS et al., 2009; NETO et al., 2005). Apesar de tal variação, foi utilizado uma solução de metanol:água (7:3, v:v) para preparo de EPg, de onde foi obtido um rendimento total de 31,63 % do peso da planta seca.

Após o preparo do EPg, foi realizada uma prospecção fitoquímica qualitativa do extrato. Os resultados obtidos demonstraram que o EPg contém essencialmente triterpenos e saponinas, e indícios da presença de compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides, o que está em concordância com os dados da literatura (FLORES et al., 2009; NAKAMURA et al., 2010; SHIOBARA et al., 1993). As demais classes de substâncias investigadas não foram detectadas (Tabela 2).

Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do EPg.

Classe de compostos	Ensaio	Tipo de observação	EPg
Compostos fenólicos			
	FeCl ₃ 5%	Precipitado c/ coloração variável entre azul e verde	+
Flavonoides			
	AlCl ₃ 5%	Intensificação de fluorescência e cor verde-amarelada	+
	Taubock	Fluorescência amarela- esverdeada	+
	Shinoda	Coloração róseo-avermelhada	+
	Pew	Coloração vermelha-violeta	-
	Pacheco	Coloração avermelhada	+
Taninos			
	Gelatina 2%	Precipitado floculoso	-
	FeCl ₃ 5%	Coloração azul (taninos hidrolisáveis) ou coloração verde (taninos condensados)	-
	Pb(AcO) ₂	Precipitado esbranquiçado	-
	Cu(AcO) ₂		-
Antraquinonas			
	Bornträger	Coloração róseo-avermelhada na fase inferior	-
Cumarinas			
	KOH 10%	Fluorescência azul-esverdeada em exposição à luz UV (360 nm)	-
Terpenoides			
	Liebermann-Buchard	Anel azul-esverdeado (esteroide) ou róseo (triterpeno)	+++ (triterpeno)
Saponinas			
	Agitação	Espuma persistente e resistente à adição de ácido	+++
Alcaloides			
	Hager	Precipitado característico	+
	Mayer	Precipitado característico	-
	Bertrand	Precipitado característico	-
	Dragendorff	Precipitado característico	-
	Bouchardat/Wagner	Precipitado característico	-
	Sonnenschein	Precipitado característico	-
	Murexida	Precipitado característico	-
Glicosídeos cianogênicos			
	Guignard	Coloração rosa do papel	-

Os sinais (+) e (-) indicam, respectivamente, a presença ou ausência do grupo de substância investigada.

É importante destacar a presença de outros compostos secundários como flavonoides e compostos fenólicos, pois estes apresentam importantes ações biológicas. Todavia, estudos na literatura realizados com espécies de *Pfaffia* dão destaque às saponinas, aos fitoesteróis e triterpenoides; como descrito por autores que apontam as saponinas como compostos ativos do ginseng (RATES; GOSMANN, 2002). Até onde se sabe, os trabalhos mostram que as raízes possuem em sua constituição fitoquímica os seguintes compostos: ácido famérico, ácido glomérico, ácido oleanólico, ecdisterona, rubrosterona, β -D-glicopiranosil-oleanolato, fafianol A, fafiaglicosídeo e seus derivados (NAKAMURA et al., 2010; SHIOBARA et al., 1993).

Tendo em vista a relevância destes constituintes nos efeitos terapêuticos observados nos extratos de ginseng brasileiro, foi realizado o fracionamento por partição do EPg a fim de ser obtida uma fração enriquecida em saponinas e terpenoides de *Pfaffia*. Para isso, uma alíquota de 200 g do EPg foi submetida ao fracionamento por extração líquido-líquido (particionamento) com n-butanol e água. As frações resultantes butanólica (FrBuOH) e aquosa (FrAq), renderam 16,18 g (8,09 %) e 183,82 g (91,91 %), respectivamente. FREIRE et al. (2005) realizaram processo de particionamento semelhante ao utilizado neste trabalho e obtiveram um rendimento da fração butanólica de seu extrato de 5,4 %; neste estudo, entretanto houve um rendimento total de 8,09 % de fração butanólica.

Observa-se que na fração FrBuOH proveniente da extração líquido-líquido houve a concentração de saponinas e terpenoides, conforme esperado. Além disso, dentre as bandas reveladas, a de $R_f = 0,78$ é característica da observada por FLORES et al. (2009) e VIGO et al. (2004) para a presença da ecdisterona no EPg (G_1) e FrButOH (G_2) (Figura 3).

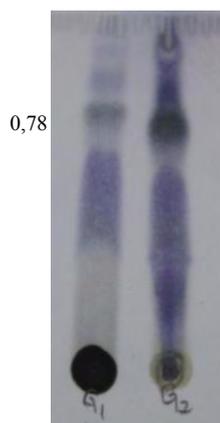


Figura 3: Análise por CCD do EPG (G₁) e FrButOH (G₂). Sílicagel (60 F254 η m, 0,22 μ m). Fase móvel: n-BuOH:AcOEt:HAc:H₂O - 4:1:0,6:0,5 v/v. Visualização: nebulização com anisaldeído/H₂SO₄ seguido de aquecimento (100° C).

A ecdisterona, também chamada de ecdisona, é um importante marcador na diferenciação entre a *P. glomerata* e *P. paniculata*, pois este composto está presente somente na *P. glomerata* (SHIOBARA et al., 1993; VIGO et al., 2004). A identificação deste composto é utilizada como controle de qualidade de comercialização de *P. glomerata*, tendo em vista que esta é comercializada como *P. paniculata* ou ambas são vendidas em conjunto, caracterizando uma fraude (VIGO et al., 2004). Dessa forma, a identificação de ecdisterona é de grande relevância para confirmação da identidade da espécie, bem como para a caracterização do extrato vegetal obtido. A ecdisterona também é descrita por possui ação sequestradora de radicais livres (DE SOUZA DANIEL et al., 2005).

É amplamente descrito que os radicais livres exercem efeitos deletérios por oxidação de moléculas essenciais ao organismo, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (EVANS; HALLIWELL, 2007). Os radicais livres podem também induzir dano oxidativo em membranas celulares, tecidos e enzimas, o que pode levar a diversas doenças, como aterosclerose, doenças neurológicas, câncer e outras (NIKI, 2012). Portanto, a investigação da avaliação sequestradora de radicais livres de plantas medicinais torna-se de extrema importância. No entanto, avaliar tal atividade torna-se difícil se se considerar a falta de um bom biomarcador *in vivo* (CHIVA-BLANCH; VISIOLI, 2012); devido a isto neste estudo foi avaliada a atividade sequestradora de radicais livres

de EPg e a quantificação de fenóis totais presentes no EPg e na FrBuOH *in vitro* para auxiliar na elucidação dos resultados obtidos nos experimentos de DII.

A FrBuOH mostrou fraca atividade sequestradora de radicais livres ($EC_{50} = 6,88$ mg/mL) em comparação ao controle ácido gálico ($EC_{50} = 1,89$ µg/mL).

Outra maneira de diminuir a formação de radicais livres ou neutralizar seus efeitos deletérios em processos fisiopatológicos, como na inflamação (FERRER; MORENO, 2010), é através da ingestão de substâncias com potente ação antioxidante (LUCHINI et al., 2008), como os polifenóis (CHIVA-BLANCH; VISIOLI, 2012).

Os polifenóis também são anti-inflamatórios; estimulam vias de sinalização celulares relacionados ao estresse, que por sua vez aumentam a expressão de genes que codificam genes citoprotetores, ativando por fim enzimas de fase II; e modulam a microbiota intestinal (CHIVA-BLANCH; VISIOLI, 2012). Os doseamentos de fenóis totais realizados com o EPg e a FrBuOH demonstraram teores de 3,19 mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/g de extrato e 1,85 mg de EAG/g de fração, respectivamente.

Quanto a avaliação da atividade anti-inflamatória da FrBuOH, a administração intracolônica de TNBS resultou em inflamação no epitélio colônico, que pode ser evidenciada após 48 horas como uma lesão necrótica na camada mucosa, que se estendeu de 2,7 a 4,6 cm ao longo do cólon, e promoveu a ocorrência de espessamento e hiperemia na parede intestinal. Esses parâmetros foram analisados e expressos na forma de score e relação peso/comprimento. O processo inflamatório intestinal também causa aderência entre os órgãos adjacentes ao cólon e diarreia.

Dois dias após a indução da inflamação intestinal, os animais foram mortos e os cólons foram retirados. As avaliações dos fatores macroscópicos demonstraram que o tratamento com a FrBuOH nas doses de 25 (P25), 50 (P50), 100 (P100) ou 200 (P200) mg/Kg não foram capazes de diminuir o score macroscópico, extensão da lesão, relação peso/comprimento e nem a diarreia. A

única dose capaz de diminuir a aderência entre os órgãos adjacentes ao cólon foi a dose de 400 mg/Kg (P400), as demais não diminuíram a aderência e nem a diarreia (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos da FrBuOH nas doses de 25, 50, 100, 200 ou 400 mg/Kg no modelo experimental **preventivo** de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore Macroscópico (0-10 (range)) ^a	Extensão da Lesão (cm) ^b	Relação Peso/comprimento (mg/cm) ^b	Diarreia (%) ^c	Aderência (%) ^c
Branco	0 *	0 **	91,545±4,70 **	0 ***	0 ***
Controle	8 (6-9)	3,07±0,34	162,88±8,08	100,00	100,00
P25	10 (9-10)	3,95±0,29	156,60±8,54	100,00	71,43
P50	8 (7-10)	4,15±0,45	157,44±3,50	100,00	57,14
P100	8 (7-9)	3,93±0,33	149,52±4,57	100,00	85,71
P200	8 (7-9)	3,96±0,42	148,16±11,13	100,00	100,00
P400	10 (7-10)	4,04±0,33	174,80±3,15	100,00	28,57 *

^a Os valores de escore estão expressos em mediana (range) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste *a posteriori* de Dunn. ^b a extensão da lesão e a relação peso (mg)/comprimento (cm) estão expressos em média ± E.P.M. e foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett. ^c os valores de diarreia e aderência estão expressos em frequência (%) e foram analisados pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de p<0,05, onde * para p<0,05, ** para p<0,01 e *** para p<0,001. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco com p<0,01 (significância não demonstrada na tabela)

Os sete dias de tratamento com FrBuOH após a indução do processo inflamatório também não foram capazes de diminuir nenhum dos parâmetros macroscópicos avaliados no modelo experimental curativo de DII.

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos da FrBuOH nas doses de 25, 50, 100, 200 ou 400 mg/Kg no modelo experimental **curativo** de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore Macroscópico (0-10 (range)) ^a	Extensão da Lesão (cm) ^b	Relação Peso/comprimento (mg/cm) ^b	Diarreia (%) ^c	Aderência (%) ^c
Branco	0 **	0 ***	104,6±3,64 *	0 ***	0 ***
Controle	8 (7-9)	2,62±0,32	193,4± 9,82	85,71	100,00
P25	6 (1-9)	1,66±0,36	178,3±20,64	71,43	71,43
P50	8 (5-9)	2,47±0,28	253,5±26,13	42,86	100,00
P100	7 (4-9)	2,93±0,38	207,1±25,70	42,86	100,00
P200	8 (4-9)	2,39±0,31	176,1±18,13	71,43	42,86
P400	8 (4-9)	2,37±0,35	186,1±25,39	28,57 *	85,71

^a Os valores de escore estão expressos em mediana (range) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste *a posteriori* de Dunn. ^b a extensão da lesão e a relação peso (mg)/comprimento (cm) estão expressos em média ± E.P.M. e foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett. ^c os valores de diarreia e aderência estão expressos em frequência (%) e foram analisados pelo teste exato de Fisher. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de p<0,05, onde * para p<0,05, ** para p<0,01 e *** para p<0,001. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco com p<0,01 (significância não demonstrada na tabela)

O tratamento com FrBuOH sobre a DII induzida por TNBS, mostrou que o tratamento com as frações não alterou significativamente o consumo de ração (Figura 4 e Figura 5). Apesar disto, é importante observar que após a indução da DII, o consumo de ração diminuiu e que os animais não reestabeleceram totalmente o consumo anterior à indução da DII comparados ao grupo Branco (Figura 4). Já no modelo experimental curativo da doença, os animais voltaram a consumir a mesma quantidade de ração que o grupo branco após 2 dias da indução do processo inflamatório (Figura 5).

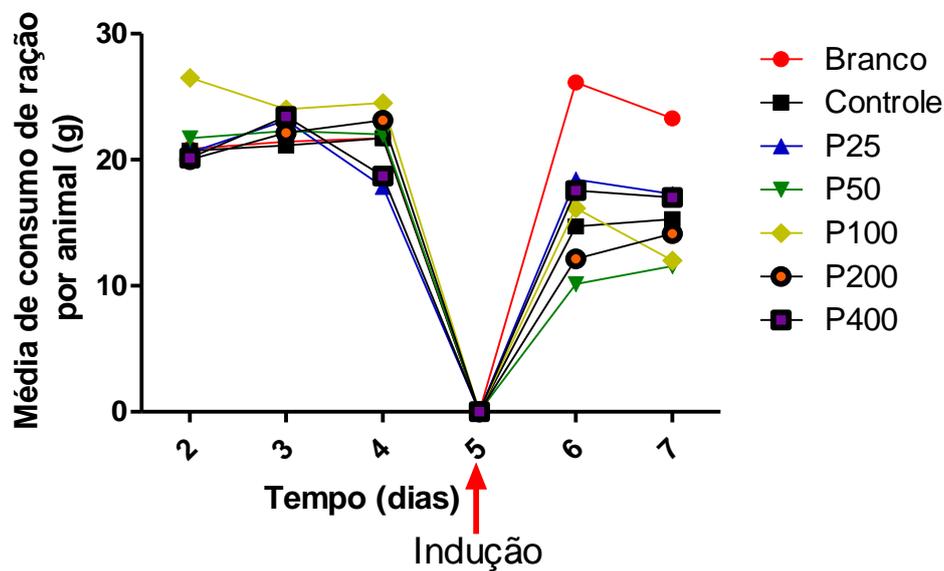


Figura 4: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao no modelo experimental **preventivo** de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em (consumo de ração (g))/(número de animais do grupo) e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$.

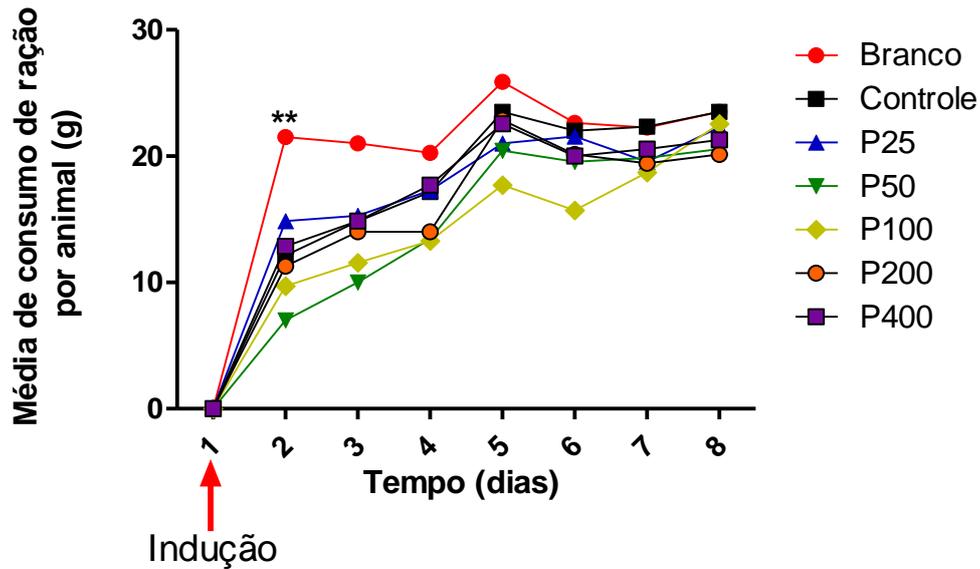


Figura 5: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao no modelo experimental **curativo** de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em (consumo de ração (g))/(número de animais do grupo) e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$, onde ** para $p < 0,01$

A diminuição do consumo de ração e a frequência de diarreia após a indução da DII é refletida na variação de massa corpórea dos animais (Figura 7). Na Figura 6, pode-se observar queda de peso corporal após o jejum (dia 5) e queda significativa após a administração de TNBS (dias 6 e 7), a queda de peso após a administração do TNBS também pode ser observada na Figura 7.

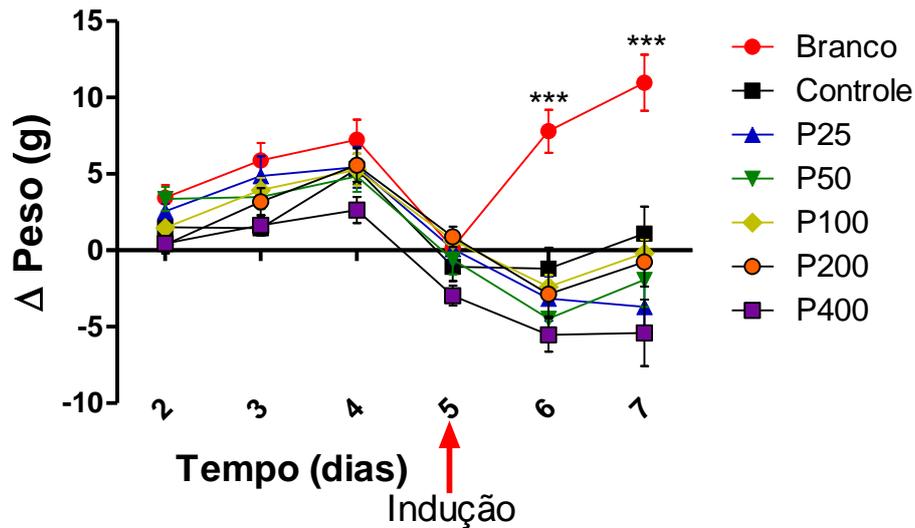


Figura 6: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental **preventivo** de DII aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do $\frac{(\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{final}}) \times 100}{\text{Peso}_{\text{inicial}}}$ \pm E.P.M. e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$, onde *** para $p < 0,001$.

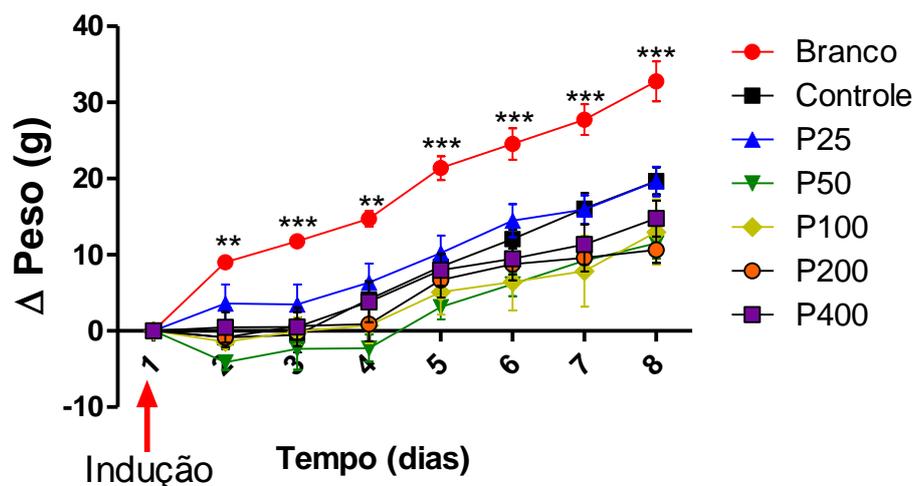


Figura 7: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental **curativo** de DII aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do $\frac{(\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{final}}) \times 100}{\text{Peso}_{\text{inicial}}}$ \pm E.P.M. e analisados pela análise de variância de duas vias, seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Bonferroni. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle com significância mínima de $p < 0,05$, onde ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

O processo inflamatório intestinal induzido por TNBS caracteriza-se por danos na mucosa do cólon, após a administração de TNBS há uma lesão intensa do cólon, que chegou a 4,6 cm (Tabela 3); tal lesão é, histologicamente, caracterizada por infiltração de polimorfonucleados,

macrófagos e mastócitos na mucosa e submucosa do cólon (FIORUCCI; WALLACE, 2004; HOFFMANN et al., 2001). Devido a esta infiltração, há um aumento de mieloperoxidase (MPO) (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2007) e há um aumento na fosfatase alcalina (FA) (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004), causando uma produção de radicais livres que causam uma diminuição de glutathiona.

A MPO é uma enzima presente nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos (NAKAMUTA et al., 1993; OBERG et al., 1983) e nos monócitos circulantes (BOS; WEVER; ROOS, 1978), sendo que mais de 95 % da MPO está localizada nos neutrófilos (BOS; WEVER; ROOS, 1978).

Esta enzima é liberada após estimulação por imunocomplexos, catecolaminas ou morte celular (BOS; WEVER; ROOS, 1978). Esta enzima constitui o sistema antimicrobiano mais importante e mais eficiente dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, atuando como catalizador da oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e um halogênio: $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O$ (KATO et al., 2003), que resulta na ligação H_2O_2 -halogênio-MPO, um sistema altamente tóxico para microrganismos (OBERG et al., 1983; PEDRO et al., 2003).

Apesar da importante capacidade antimicrobiana da MPO, a ativação do sistema imune em excesso causa dano tecidual pela produção dos radicais livres formados (BOS; WEVER; ROOS, 1978; OBERG et al., 1983; PEDRO et al., 2003), além disso, o aumento da liberação de MPO pode formar radicais tirosil, que por sua vez podem causar peroxidação lipídica, tirosilação de HDL (high density lipoproteins) e reação cruzada com outras proteínas (KATO et al., 2003). A correlação entre atividade de MPO e doenças inflamatórias já é constatada (KATO et al., 2003) e a inibição desta atividade de MPO proveniente do excesso de neutrófilos ativados durante a inflamação crônica e aguda pode prevenir danos teciduais.

A atividade de MPO está significativamente elevada em diversos modelos experimentais de DII (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004), portanto é um marcador interessante para este estudo.

Os tratamentos com FrBuOH não diminuíram a atividade da MPO nem no modelo preventivo (Figura 8) e nem no cicatrizante (Figura 9). Resultados que corroboram com os dados macroscópicos encontrados (Tabela 3 e Tabela 4).

Sabe-se que o extrato hidroalcoólico de *P. glomerata* possui efeitos anti-inflamatório, anti-edematogênico e analgésico periférico semelhante à indometacina (anti-inflamatório não esteroidal) (NETO et al., 2005). Porém esta planta não inibiu a migração de células polimorfonucleadas (NETO et al., 2005), justificando os resultados obtidos na análise da atividade de MPO (Tabela 3 e Tabela 4).

NETO et al. (2005) sugerem que o mecanismo de ação do extrato estudado inibe a síntese de prostaglandinas E_2 e F_2 , porém não inibe a formação de leucotrieno B_4 que é um potente agente quimiotático de células polimorfonucleadas e também é um importante alvo para doenças inflamatórias como a DII (SHARMA; MOHAMMED, 2006).

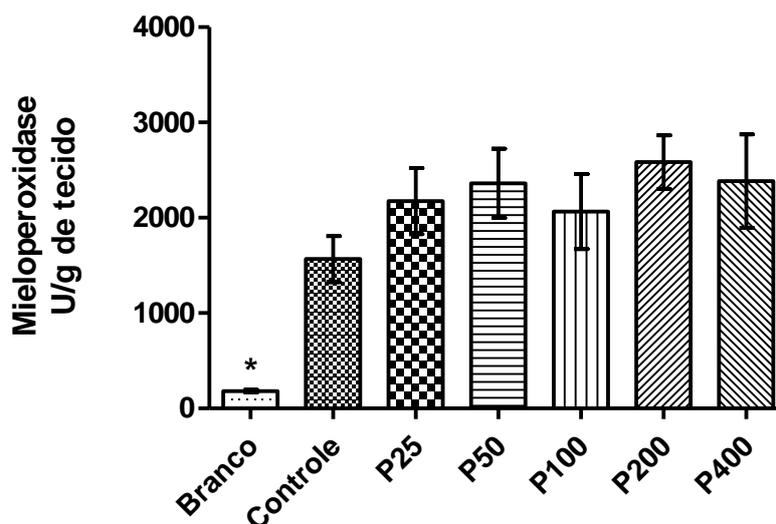


Figura 8: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental preventivo de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$.

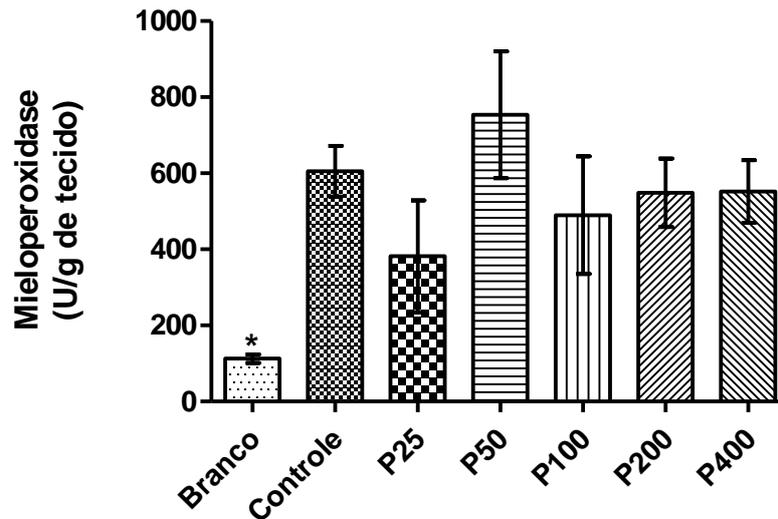


Figura 9: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental curativo de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$.

Outro mediador inflamatório importante da DII é a fosfatase alcalina (FA), que é uma enzima de distribuição ubíqua nos tecidos do organismo (BOL-SCHOENMAKERS et al., 2010; MOSS, 1982); em pH alcalino, sua função é clivar fosfatos (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Existem inúmeras isoformas desta enzima, as quais são classificadas em duas subfamílias, as de “tecido inespecífico” e “tecido específico” (fosfatase alcalina intestinal, hepática, renal, placentária, óssea, etc.). Todas as isoformas são glicoproteínas que diferem em seu resíduo glicídico e também no seu acoplamento proteico (VAN HOOFF; DE BROE, 1994).

A função fisiológica da FA ainda não está totalmente elucidada, sabe-se que a FA-óssea tem importante papel na assimilação do fosfato nos ossos (NARISAWA; FRÖHLANDER; MILLÁN, 1997; ZURUTUZA et al., 1999); a FA-intestinal está localizada nas microvilosidades do intestino e em células residentes da lâmina própria como neutrófilos e outros leucócitos (SMITH; HARRIS; PETERS, 1984; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Acredita-se que a FA-intestinal participa na absorção de nutrientes (YOUNG et al., 1981); BOL-SCHOENMAKERS et al. (2010) e TUIN et al. (2009) sugeriram que a FA-intestinal desfosforila fosfatos de lipopolissacarídeos (LPS) provenientes

de bactérias entéricas e que a administração de FA-intestinal pode contribuir para a melhora do quadro de inflamação intestinal.

SÁNCHEZ DE MEDINA et al. (2004) demonstraram que há um aumento significativo da atividade de FA nos modelos de DII induzidos por TNBS, sulfato de dextrano, ácido acético, iodoacetamida e HLA-B27 (colite espontânea). Tais resultados corroboram com os dados obtidos neste estudo, onde houve um significativo aumento de FA nos cólons após a administração de TNBS (Figura 10 e Figura 11).

Somente os tratamentos de FrBuOH na dose de 400 mg/Kg antes da indução da colite foram capazes de diminuir a atividade de FA (Figura 10), apesar disso não houve melhora nos parâmetros macroscópicos avaliados (Tabela 3).

O estudo da função fisiopatológica da FA é difícil, pois as inúmeras isoformas podem estar presentes num único tecido, o intestino, por exemplo, pode expressar a FA-inespecífica, FA-intestinal, FA-renal e FA-óssea (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004).

Há uma expressão de FA-hepática em cólons de ratos saudáveis e de FA-renal em condições inflamatórias (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004) e o aumento de FA-intestinal é benéfico em situações de danos teciduais intestinais (BOL-SCHOENMAKERS et al., 2010). A administração de inibidores de FA diminuiu significativamente a atividade de MPO, contudo não há melhora nos parâmetros macroscópicos (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Considerando tais informações, a diminuição de FA por si só não é capaz de reverter ou prevenir o quadro de inflamação intestinal.

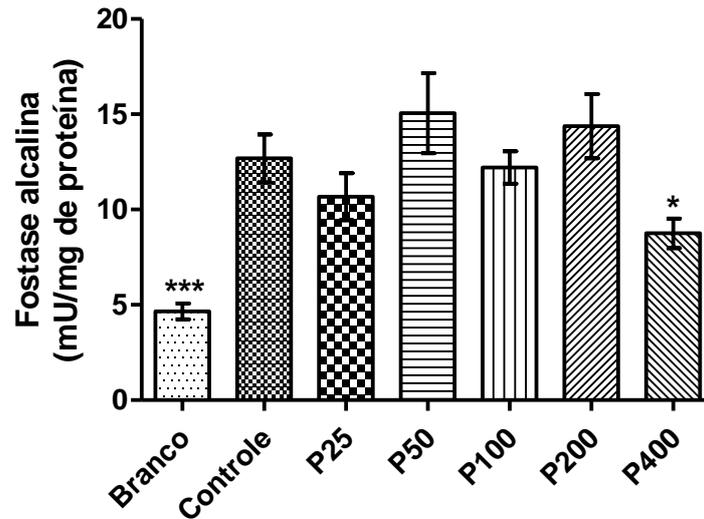


Figura 10: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental preventivo de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

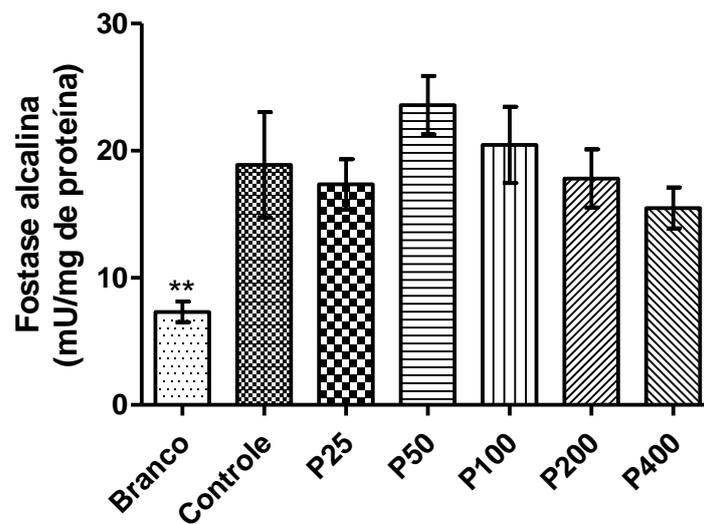


Figura 11: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental curativo de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$.

Como dito anteriormente, a aumento da atividade de MPO e FA causa aumento dos radicais livres e para neutralizar estes radicais formados, o organismo contém um sistema antioxidante nato que é constituído por diversas enzimas antioxidantes e numerosos compostos endógenos (glutaciona) e outros antioxidantes provenientes da dieta (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA,

2008; ROBERTS; SINDHU, 2009). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e muitas outras constituem a defesa antioxidante enzimática primária do organismo; enquanto o ácido ascórbico, o tocoferol, β -caroteno, glutathione e numerosas substâncias químicas ingeridas fazem parte da defesa antioxidante não-enzimática do organismo (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Radicais livres por sua vez podem ser originados da respiração celular, inatividade física, alimentação inadequada, tabagismo entre outros. Eles originam o radical superóxido que é metabolizado pela SOD, que dá origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode ser transformado em água e oxigênio pela catalase, ou transformado em água pela GPx na presença de glutathione (GSH), ou ainda originar o radical hidroxila (OH^\bullet) que causa dano ao DNA, peroxidação lipídica e dano proteico. Portanto, se este sistema enzimático exceder sua capacidade, a presença de substâncias antioxidantes não enzimáticas endógenas ou exógenas para neutralizarem os radicais livres torna-se necessária (Figura 12) (ROBERTS; SINDHU, 2009).

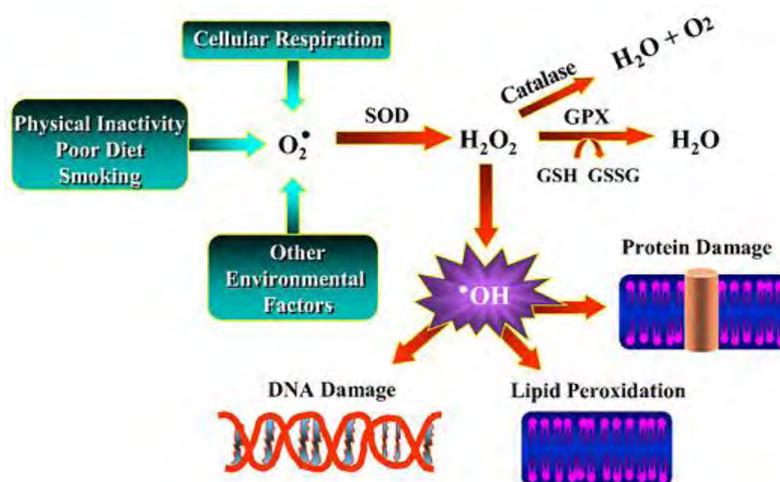


Figura 12: Esquema que representa a formação de radicais livres e a neutralização dos mesmos pelo sistema antioxidante (ROBERTS; SINDHU, 2009).

A L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina ou glutathione é um tripeptídeo ubíquo de baixo peso molecular, que é biologicamente ativo em sua forma reduzida (CIRCU; AW, 2012). A reação entre

radicais livres e glutathione reduzida resulta na neutralização dos radicais livres e aumento da forma oxidada da glutathione no citoplasma; a glutathione oxidada, por difusão, sai da célula com mais facilidade, portanto quadros patológicos que produzem grandes quantidades de radicais livres, como a DII, podem esgotar a glutathione intracelular (KARP; KOCH, 2006; WHITE, 1994).

A indução de DII por TNBS diminui significativamente os níveis de glutathione no cólon (CHOUCHANA et al., 2012; KARP; KOCH, 2006; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004), como também observado em nosso estudo (Figura 13 e Figura 14). Contudo substâncias com alto potencial antioxidante podem evitar a depleção de glutathione (LUCHINI et al., 2008; WITAICENIS et al., 2012).

Apesar do potencial antioxidante da fração butanólica de *P. glomerata* descrito por DE SOUZA DANIEL et al. (2005) as doses testadas não foram capazes de manter os níveis normais de glutathione em nenhum dos modelos pesquisados (Figura 13 e Figura 14). Tais resultados podem ser explicados pela fraca atividade sequestradora de radicais livres da FrBuOH ($EC_{50} = 6,88 \text{ mg/mL}$) em comparação ao controle ácido gálico ($EC_{50} = 1,89 \text{ } \mu\text{g/mL}$).

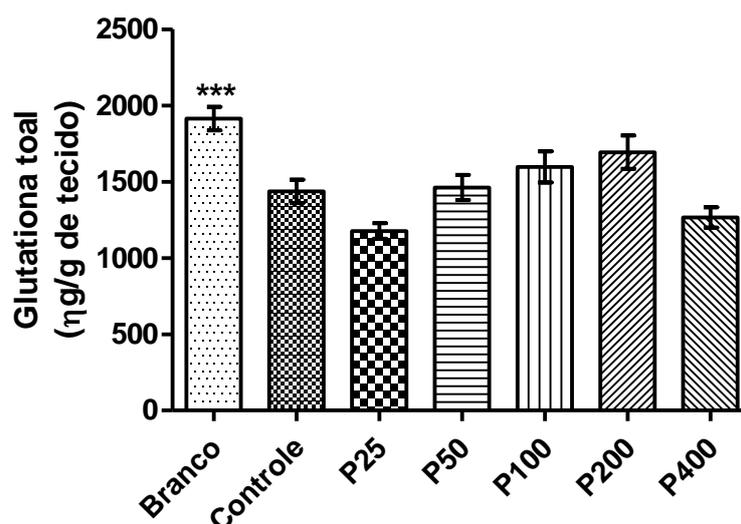


Figura 13: Avaliação dos níveis de glutathione colônica em animais submetidos ao modelo experimental preventivo de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$.

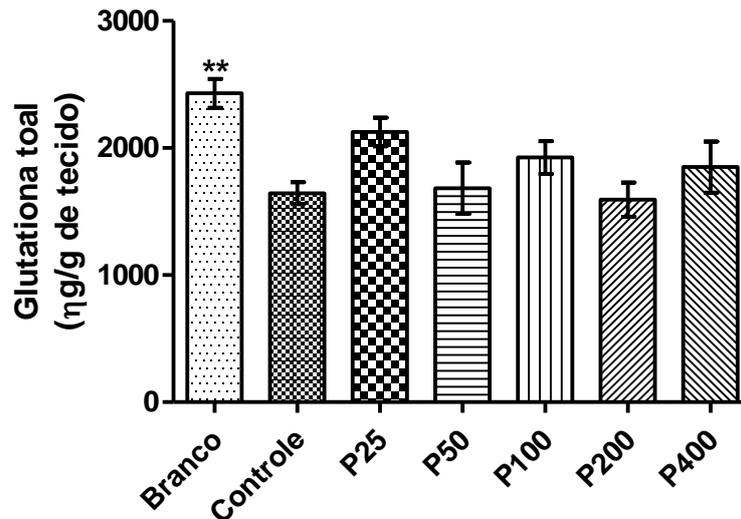


Figura 14: Avaliação dos níveis de glutathiona colônica em animais submetidos ao modelo experimental **curativo** de DII induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$.

Finalmente, a soma dos resultados apresentados demonstra que a hipótese da *Pfaffia glomerata* por ser considerada uma espécie adaptógena e conseqüentemente com potencial de atuar na inflamação intestinal não se sustenta para as doses e condições experimentais propostas, pois apesar da atividade gastroprotetora (FREITAS et al., 2004), antioxidante (DE SOUZA DANIEL et al., 2005), anti-edematogênica (TEIXEIRA et al., 2006), anti-nociceptiva (FREITAS et al., 2009), anti-inflamatória e analgésica (NETO et al., 2005), a espécie não preveniu e nem auxiliou na resolução do processo inflamatório intestinal previamente instalado. Tais resultados permitiriam o questionamento da utilização da espécie *P. glomerata* como adulterante comercializado no lugar da *P. paniculata*, no entanto ainda é necessária a realização de estudos para avaliar se a *P. glomerata* é mesmo uma planta adaptógena.

Para verificar se *Pfaffia glomerata* apresenta efeitos que a caracterizem como um produto adaptógeno experimentos estão em andamento. Dentre eles podemos citar: tempo de exaustão no nado forçado e avaliação do estresse físico e psicogênico por meio da quantificação de lesões gástricas, dosagens de ACTH e corticosterona (HEINRICHS; KOOB, 2005; PANOSSIAN;

WIKMAN; WAGNER, 1999). Complementarmente, estudos comportamentais (testes da caixa claro/escuro, suspensão pela cauda e barra giratória) e de toxicidade (avaliação dos principais órgãos e dosagens bioquímicas de aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, ureia, albumina, creatinina, proteínas totais, colesterol total e triglicérides) também estão sendo realizados.

No mais, este trabalho também contribuiu para o desenvolvimento e a implantação de um modelo diferente de indução de DII. Para melhor avaliar plantas com perfil adaptógeno, em procedimentos experimentais que envolvam processos inflamatórios, em especial a DII, um novo protocolo de indução de colite por estresse está em processo de padronização (COLÓN et al., 2004). Assim que o modelo estiver padronizado para as condições experimentais do laboratório, novos testes poderão ser realizados com o extrato de *P. glomerata*.

5 Conclusão

Com base nos objetivos propostos, foi possível concluir que o extrato metanólico de *P. glomerata* é constituído essencialmente por triterpenos e saponinas, incluindo a ecdisterona, os quais foram concentrados na fração butanólica de *P. glomerata*, que por sua vez foi avaliada no processo de inflamação intestinal induzida por TNBS. Tratamentos prévios com a fração butanólica de *P. glomerata* não foram capazes de impedir a formação de lesões, não mantiveram os níveis de glutathione total e nenhuma delas foi capaz de reduzir a atividade de mieloperoxidase e fosfatase alcalina exceto a dose de 400 mg/Kg que diminuiu a atividade de fosfatase alcalina. Os tratamentos também não auxiliaram a resolução de um quadro inflamatório já instalado, pois não houve melhora nos parâmetros macroscópicos e bioquímicos avaliados. Ou seja, para as condições experimentais avaliadas, a hipótese inicial de que um produto adaptógeno modularia o sistema imune por meio de sua ação antiestresse foi rejeitada, em vista da não atividade do extrato no modelo e nas doses propostas.

6 Referências Bibliográficas

- AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION INSTITUTE. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 130, p. 940-987, 2006.
- ANDERSEN, V. et al. Diet and risk of inflammatory bowel disease. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 44, n. 3, p. 185-94, mar. 2012.
- ANDERSON, M. Glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1641-57, 12 maio. 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, abr. 1995.
- BENCHIMOL, E. I. et al. International variation in medication prescription rates among elderly patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's & colitis**, 24 set. 2012.
- BESSEY, O.; LOWRY, O.; BROOK, M. A METHOD FOR THE RAPID DETERMINATION OF ALKALINE PHOSPHATASE WITH FIVE CUBIC MILLIMETERS OF SERUM. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-329, 1946.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 172-182, 2003.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 26 abr. 1958.
- BOL-SCHOENMAKERS, M. et al. Intestinal alkaline phosphatase contributes to the reduction of severe intestinal epithelial damage. **European journal of pharmacology**, v. 633, n. 1-3, p. 71-7, 10 maio. 2010.
- BOS, A; WEVER, R.; ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 525, n. 1, p. 37-44, 7 jul. 1978.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-33, jul. 2003.
- BOUZADA, M. L. M. et al. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 1, p. 44-52, jan. 2009.

- 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.
- CAPURON, L.; MILLER, A. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 130, n. 2, p. 226-238, 2011.
- CHIVA-BLANCH, G.; VISIOLI, F. Polyphenols and health: Moving beyond antioxidants. **Journal of Berry Research**, v. 2, p. 63-71, 2012.
- CHOUCHANA, L. et al. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 15-36, jan. 2012.
- CHRISTENSEN, L. P. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. **Advances in food and nutrition research**, v. 55, n. 08, p. 1-99, jan. 2009.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 10, p. 1767-77, out. 2012.
- COLÓN, A. L. et al. Stress increases susceptibility to oxidative/nitrosative mucosal damage in an experimental model of colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 49, n. 10, p. 1713-21, out. 2004.
- COSNES, J. et al. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785-1794, maio. 2011.
- CRONSTEIN, B.; KIMMEL, S. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 9991-9995, 1992.
- DE SOUZA DANIEL, J. F. et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 174, 2005.
- DE-PARIS, F. et al. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 261-269, 2000.
- DI STASI, L. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta medica**, v. 70, n. 4, p. 315-20, abr. 2004.
- EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. S2, p. S67, 9 mar. 2007.
- FERGUSON, L. R. et al. Genes, diet and inflammatory bowel disease. **Mutation research**, v. 622, n. 1-2, p. 70-83, 1 set. 2007.

- FERRER, R.; MORENO, J. J. Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 4, p. 431-8, 15 ago. 2010.
- FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 182-205, jul. 1998.
- FIORUCCI, S.; WALLACE, J. A β -oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15736-15741, 2004.
- FLORES, R. et al. Análise de β -ecdisona em plantas in vivo e in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, através da Cromatografia em Camada Delgada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 368-371, 2009.
- FREITAS, C. S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167-1179, 16 jan. 2004.
- FREITAS, C. S. et al. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 468-72, 21 abr. 2009.
- FRUET, A. C. et al. Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia* L.) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 62, p. 1-11, jan. 2012.
- GOSMANN, G. et al. Botanical (morphological, micrographic), chemical and pharmacological characteristics of *Pfaffia* species (Amaranthaceae) native to South Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 141-147, jun. 2003.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, v. 16, p. 33-50, jan. 1996.
- HEINRICHS, S. C.; KOOB, G. F. Application of experimental stressors in laboratory rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 34S, p. 8.4.1 - 8.4.17, 2005.
- HOFFMANN, J. C. et al. Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 489-95, abr. 2001.
- HOU, J. K.; ABRAHAM, B.; EL-SERAG, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. **The American journal of gastroenterology**, v. 106, n. 4, p. 563-73, abr. 2011.
- HUBER, P.; ALMEIDA, W.; FÁTIMA, Â. DE. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 4-7, 2008.

- KAPPELMAN, M.; RIFAS-SHIMAN, S. Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in United States children and adults. **Gastroenterology**, v. 135, n. 6, p. 1907-1913, 2008.
- KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Disease-a-month : DM**, v. 52, n. 5, p. 199-207, maio. 2006.
- KATO, Y. et al. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1136-9, maio. 2003.
- KITTS, D.; HU, C. Efficacy and safety of ginseng. **Public health nutrition**, v. 3, n. 4A, p. 473-85, dez. 2000.
- 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, n. 6, p. 1344-50, dez. 1984.
- LEMMON, H. R. et al. High molecular weight polysaccharides are key immunomodulators in North American ginseng extracts: Characterization of the ginseng genetic signature in primary human immune cells. **Journal of ethnopharmacology**, 12 abr. 2012.
- LIH-BRODY, L. et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 41, n. 10, p. 2078-86, out. 1996.
- LUCHINI, A. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1343-1350, 2008.
- MARQUES, L. C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 566-572, 2004.
- MARSHALL, J. K. Are there epidemiological differences between Crohn's disease and ulcerative colitis? **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, p. S1, out. 2008.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009, 148 p.
- MEDINA, F. S. DE et al. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v. 278, n. 2, p. 771-779, 1996.
- MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 12 fev. 2007.
- MIYACHI, Y. et al. Effect of sulphasalazine and its metabolites on the generation of reactive oxygen species. **Gut**, v. 28, n. 2, p. 190-5, fev. 1987.

- 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, jan. 2012.
- MORRIS, G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 795-803, mar. 1989.
- MORRISON, G. Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**, v. 38, n. 12, p. 956-961, 2009.
- MOSS, D. Alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinical chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2007-2016, 1982.
- MUKHOPADHYA, I. et al. IBD-what role do Proteobacteria play? **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 4, p. 219-30, abr. 2012.
- NAKAMURA, S. et al. Brazilian natural medicines. IV. New noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 5, p. 690-5, maio. 2010.
- NAKAMUTA, M. et al. High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism. **Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 1377-1383, 1993.
- NARISAWA, S.; FRÖHLANDER, N.; MILLÁN, J. L. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. **Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 208, n. 3, p. 432-446, 1997.
- NETO, A G. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 87-91, 4 jan. 2005.
- NISS, J. H. et al. Review on the influence of stress on immune mediators, neuropeptides and hormones with relevance for inflammatory bowel disease. **Digestion**, v. 65, p. 131-140, 2002.
- NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS letters**, v. 586, n. 21, p. 3767-70, 2 nov. 2012.
- OBERG, G. et al. The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy. **British Journal of Haematology**, v. 55, n. 4, p. 701-708, 1983.
- ONKEN, J. E. Is colorectal cancer surveillance cost-effective in patients with ulcerative colitis? **Inflammatory bowel diseases**, v. 14 Suppl 2, p. S196-7, out. 2008.
- PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G.; WAGNER, H. Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 287-300, 1999.
- PEDRO, A. J. et al. Mieloperoxidase como marcador de stress oxidativo na cirrose hepática. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 10, n. 3, p. 209-214, 2003.

- PEYRIN-BIROULET, L. et al. Disability in inflammatory bowel diseases: developing ICF Core Sets for patients with inflammatory bowel diseases based on the International Classification of Functioning, Disability, and Health. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 1, p. 15-22, jan. 2010.
- PEYRIN-BIROULET, L. et al. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. **Gut**, v. 61, n. 2, p. 241-247, 5 jun. 2011.
- PLEVY, S. E.; TARGAN, S. R. Future Therapeutic Approaches for Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1838-1846, maio. 2011.
- RATES, S.; GOSMANN, G. Gênero Pfaffia: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-93, 2002.
- ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life sciences**, v. 84, n. 21-22, p. 705-12, 22 maio. 2009.
- ROMIER, B. et al. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. **Nutrition reviews**, v. 67, n. 7, p. 363-78, jul. 2009.
- 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, mar. 2012.
- SHARMA, J. N.; MOHAMMED, L. A. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 1-2, p. 10-6, mar. 2006.
- SHIOBARA, Y. et al. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1737-1740, 1 maio. 1992.
- SHIOBARA, Y. et al. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.
- SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, 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 international journal of clinical chemistry**, v. 142, n. 2, p. 221-230, 1984.
- 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. 2317-26, 15 dez. 2004.

- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. **European journal of pharmacology**, v. 563, n. 1-3, p. 216-223, 1 jun. 2007.
- TANIGUCHI, S. F. et al. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. July, p. 568-571, 1997.
- TEIXEIRA, C. G. L. et al. Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 667-75, maio. 2006.
- TUIN, A et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. **Gut**, v. 58, n. 3, p. 379-87, mar. 2009.
- VAN HOOFF, V. O.; DE BROE, M. E. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 31, n. 3, p. 197-293, 1994.
- VASCONCELOS, P. C. D. P. et al. Epicatechin Used in the Treatment of Intestinal Inflammatory Disease: An Analysis by Experimental Models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12, 2012.
- VICTORIA, C.; SASSAK, L.; NUNES, H. 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.
- VIGO, C. L. S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius - *Amaranthaceae*.pdf. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 1984. 320 p.
- WHITE, A. Glutathione deficiency in human disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 218-226, 1994.
- 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, dez. 2010.
- WITAICENIS, A. et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-biological interactions**, v. 195, n. 1, p. 76-85, 5 jan. 2012.
- 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, n. 2, p. 211-8, 30 jul. 2010.
- YAMAMOTO-FURUSHO, J. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 13, p. 1893-1896, 2007.

- YOUNG, G. P. et al. Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum. **American Journal of Physiology**, v. 241, n. 6, p. G461-G468, 1981.
- ZURUTUZA, L. et al. Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 6, p. 1039-1046, 1999.



Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

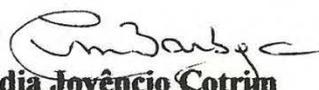
Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP - fone (014) 6802 6014/ 6802 6013 - fax(014)68213744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 042/04-CEEA, sobre *“Inflamação intestinal aguda, crônica com recidiva induzida por Ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos”*, sob a responsabilidade de **LUIZ CLAUDIO DI STASI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado nesta data *“Ad referendum”* **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**.

Botucatu, 15 de junho de 2004.


Prof. Dr. Sílvio Luís de Oliveira
Presidente - CEEA


Nádía Jovêncio Cotrim
Secretária - CEEA