

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO DE BACUPARI (*Garcinia  
brasilensis*) EM MODELO DE COLITE INDUZIDA POR TNBS**

**JANAÍNA MARIA DE ARAÚJO**

**Jaboticabal - SP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO DE BACUPARI (*Garcinia brasiliensis*)  
EM MODELO DE COLITE INDUZIDA POR TNBS**

**JANAÍNA MARIA DE ARAÚJO**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Girol  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino**

Trabalho apresentado à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,  
Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Jaboticabal-SP  
1º semestre/2022**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: Departamento de Biologia

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO : Análise dos efeitos do extrato de bacupari (*Garcinia brasiliensis*) em modelo de colite induzida por TNBS

ACADÊMICO: Janaína Maria de Araújo


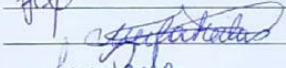
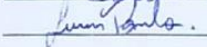
CURSO: Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Prof. Dr.ª Ana Paula Girol

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

**BANCA EXAMINADORA:**

	(Nomes)	(Assinaturas)
Presidente	Prof. Dr.ª Ana Paula Girol	
Membro	Prof. Dr.ª Sheila Cristina M. P. Freitas	
Membro	Prof. Dr. Lucas Possebon	

20 / 05 / 22

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 19 / 10 / 2022



Chefe do Departamento

A663a	<p>Araújo, Janaína Maria de</p> <p>Análise dos efeitos do extrato de bacupari (<i>Garcinia brasiliensis</i>) em modelo de colite induzida por TNBS / Janaína Maria de Araújo. -- Jaboticabal, 2022 26 p.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Ana Paula Girol Coorientador: Eduardo Custódio Gasparino</p> <p>1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. citocinas. 3. fitoterápicos. 4. anexina</p> <p>A1. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me concedido sabedoria, paciência e resiliência, para chegar até aqui.

Aos meus pais, **Leonice Alves Abrante de Araújo** e **Josimar Roberto de Araújo**, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me fornecerem subsídios suficientes para concluir a minha graduação. Em especial ao meu pai, que foi meu maior financiador até hoje, a ele devo minha total gratidão. Essa conquista é nossa!

Agradeço também aos meus amigos, tanto aos que conheci em Jaboticabal, como os que carreguei comigo desde antes da graduação em especial, **Leonardo Marson**, **Isabelle Olivieri Glozer**, **Nicole Maria de Souza** e **Milena Veiga**, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para a minha caminhada ser a mais leve possível, agradeço os momentos e as risadas que me proporcionaram.

Ao meu querido quarteto da Faculdade, **Arthur Vieira da Costa**, **Bianca Ferreira Castaldini** e **Daniela Ofélia Antonioli**, que compartilhamos e vivenciamos toda a experiência que a UNESP nos proporcionou juntos, vocês foram fundamentais e essenciais, sempre levarei vocês comigo.

Agradeço também toda a equipe do laboratório **Multidisciplinar**, que tomarei o cuidado de não citar nomes para não esquecer ninguém, no Centro Universitário Padre Albino, pela troca de conhecimento, apoio e auxílio durante todo o desenvolvimento do meu trabalho, em ressalva a professora **Ana Paula Giroi** que me acolheu e deu-me a oportunidade de desenvolver um projeto com ela.

Agradeço também ao professor **Eduardo Custódio Gasparino** que gentilmente aceitou ao meu pedido para ser meu co-orientador e por todos os ensinamentos compartilhados comigo, durante toda a graduação.

E por fim, **Helena Ribeiro Souza**, cérebro (apelido que a chamava carinhosamente), que com toda a sua delicadeza e paciência, às vezes nem tanto, (rs) segurou na minha mão e me ajudou em todas as etapas do projeto, muito obrigada pela troca de conhecimento, você é incrível e sentirei muitas saudades.

Gratidão a todos!

*“O vencedor não será o mais forte, será aquele que melhor se adaptar”*

*Charles Darwin*

## RESUMO

A colite ulcerativa (COU) é uma doença inflamatória intestinal (DII) de caráter crônico, desencadeada por uma resposta imunológica descontrolada. O seu tratamento ainda é pouco discutido e os que são aplicados apresentam resultados não muito satisfatórios. Com isso, estudos para desenvolverem tratamentos alternativos para os padrões já utilizados se fazem necessários. Por apresentar propriedades medicinais já conhecidas, o bacupari (*Garcinia brasiliensis*), se mostra um bom fitoterápico para tratar esse tipo de doença, uma vez que possui compostos pécticos, bioativos e metabólitos secundários com alta capacidade anti-inflamatória, com potencial para auxiliar no tratamento da DII. No presente trabalho, buscamos avaliar os efeitos do extrato da folha de *G. brasiliensis* em um modelo de colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). A partir do extrato bruto (20g das folhas secas em 100 ml de etanol a 70%, por 24h) e após rotaevaporação, foi obtida a fração acetato de etila (FAEB), que foi submetida a análises cromatográficas e de citotoxicidade. Para os protocolos experimentais, os animais foram divididos em quatro grupos: controle não induzido à colite (veículo, *SHAM*); induzido à colite sem tratamento (*I+*), induzido à colite e tratamento padrão com mesalazina (1mg/g, *TP*) e induzido à colite e tratado com a fração do extrato a 10% (*FAEB*). A colite foi induzida por TNBS, administrado por cateter via retal, sob anestesia. Os tratamentos foram iniciados logo após a indução e realizados por gavagem 1x/dia, por 7 dias grupo. No oitavo dia após a indução, os animais de todos os grupos foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico. Fragmentos do cólon foram coletados e processados para inclusão em parafina para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas e outros fragmentos foram macerados para obtenção de sobrenadantes e análises de citocinas e fatores de crescimento. Os resultados foram satisfatórios e mostraram que a FAEB bacupari foi capaz de combater a inflamação e restaurar os tecidos lesionados, reduzindo os níveis de mediadores pró-inflamatórios (COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e aumentando a expressão de fatores de crescimento (EGF, VEGF) e da proteína anti-inflamatória AnxA1. Portanto, os resultados indicam a potencialidade terapêutica da FAEB de folhas de *G. brasiliensis* e estimulam o aprofundamento de estudos com os compostos bioativos da *Garcinia brasiliensis* como alternativa terapêutica na colite ulcerativa.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais, citocinas, fitoterápicos, anexina A1.

## ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease (IBD) triggered by an uncontrolled immune response. Its treatment is still little discussed and those that are applied show not very satisfactory results. Thus, studies to develop alternative treatments for the patterns already used are necessary. Due to its already known medicinal properties, bacupari (*Garcinia brasiliensis*) is a good herbal medicine to treat this type of disease, since it has pectic, bioactive compounds and secondary metabolites with high anti-inflammatory capacity, with the potential to assist in the treatment of IBD. In the present work, we aimed to evaluate the effects of the leaf extract of *G. brasiliensis* in a model of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). From the crude extract (20g of the dried leaves in 100 ml of 70% ethanol for 24h) and after rotary evaporation, the ethyl acetate fraction (FAEB) was obtained, which was subjected to chromatographic and cytotoxicity analyses. For the experimental protocols, the animals were divided into four groups: control not induced to colitis (vehicle, SHAM); induced colitis without treatment (I+), induced colitis and standard treatment with mesalazine (1mg/g, TP) and induced colitis and treated with the 10% extract fraction (FAEB). Colitis was induced by TNBS, administered rectally via catheter, under anesthesia. Treatments were started soon after induction and performed by gavage 1x/day for 7 days in the group. On the eighth day after induction, animals from all groups were euthanized by an overdose of anesthetic. Colon fragments were collected and processed for embedding in paraffin for histopathological and immunohistochemical analysis and other fragments were macerated to obtain supernatants and analysis of cytokines and growth factors. The results were satisfactory and showed that FAEB bacupari was able to fight inflammation and restore injured tissues, reducing the levels of pro-inflammatory mediators (COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) and increasing the expression of growth factors (EGF, VEGF) and the anti-inflammatory protein AnxA1. Therefore, the results indicate the therapeutic potential of FAEB from leaves of *G. brasiliensis* and stimulate further studies with the bioactive compounds of *Garcinia brasiliensis* as a therapeutic alternative in ulcerative colitis.

Keywords: Inflammatory bowel diseases, cytokines, herbal medicines, annexin A1.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>X</b>
1.1 Colite ulcerativa (COU) .....	X
1.2 Garcinia brasiliensis .....	XI
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>XII</b>
2.1 Objetivo geral .....	XII
2.2 Objetivo específico .....	XII
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>XIII</b>
3.1 Preparação do extrato e seleção de dosagem .....	XIII
3.2 Análise de cromatografia (HPTLC) .....	XIV
3.3 Animais .....	XIV
3.4 Instilação retal de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e protocolo de tratamento .....	XIV
3.5 Análise de conteúdo fecal .....	XV
3.6 Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas .....	XV
3.7 Análise de Citocinas .....	XVI
3.8 Análises Estatísticas .....	XVII
<b>4. Resultados</b> .....	<b>XVII</b>
4.1 Análises de citotoxicidade e cromatográfica do extrato e do conteúdo fecal na colite induzida por TNBS .....	XVII
4.2 Estudos morfológicos e histopatológicos .....	XVIII
4.3 Avaliações imuno-histoquímicas .....	XIX
4.4 Dosagem de citocinas e fatores de crescimento .....	XX
<b>5. Discussão</b> .....	<b>XXI</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>XXIII</b>

## **1. Introdução**

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas por acometerem o intestino e o evento principal é o processo inflamatório crônico. Indivíduos com pré-disposição genética associada aos fatores ambientais, como a inalação de ar poluído (OPSTELTEN *et al.*, 2016), hábitos de tabagismo (MARTINMARTINS JÚNIOR, 1996), má alimentação (SANTOS, 2021) e estresse (DE CASTRO PAIS, 2016) desenvolvem gatilhos da doença que desencadeiam uma resposta imunológica descontrolada originando o processo inflamatório crônico intestinal. Em um estágio avançado da doença, podem surgir desde perfurações até tumores intestinais (ZALTMAN, 2007).

A prevalência das DII se deu nos países industrializados na segunda metade do século XX, depois estabilizou (ZALTMAN, 2007). No passado eram doenças consideradas raras no Brasil, mas com a implementação de novos hábitos alimentares, a ocorrência aumentou em todo o mundo. A região sudeste brasileira, área mais desenvolvida do país, é o local com maiores registros de DII (45,33%) (DE BRITO *et al.*, 2020), atingindo em maior parte mulheres jovens adultas. As informações sobre os perfis da doença no Brasil e no mundo ainda são pouco conhecidas, possivelmente, novos casos não são notificados, principalmente, em regiões mais carentes. Com o aumento e avanço de DII, faz-se necessário a experimentação por meio de estudos clínicos para implementar as melhores medidas de profilaxia, tratando adequadamente os pacientes e evitando complicações nos já acometidos.

### **1.1 Colite ulcerativa (COU)**

A colite ulcerativa (COU) é uma das principais DII, caracterizada por processo inflamatório crônico e restringe-se às camadas mucosa e submucosa do intestino grosso, iniciando no reto e podendo se estender cranialmente, comprometendo todo o cólon (FIGUEIRÊDO, 2004). A incidência da COU se deu nos países ocidentais desde a segunda guerra mundial e vem aumentando em áreas, previamente, de baixa incidência como Ásia e países em desenvolvimento.

Dentre os sintomas mais comuns da COU estão: diarreia, dor abdominal, vômitos, perda de peso, manifestações extra intestinais e febre (CAMBUI; NATALI, 2015).

Os tipos de tratamento ainda são limitados e na maioria dos casos são utilizados ácidos 5-aminosalicílicos, corticosteroides e imunossupressores, principalmente, mas todos possuem pouca ou baixa eficácia (BOZZA, *et al.* 2020), esses medicamentos promovem a remissão da doença, mas não a cura, podendo levar o indivíduo a perda parcial do órgão acometido. Sendo assim, evidencia-se a importância de estimular a busca por tratamentos menos invasivo possível. Outras abordagens terapêuticas para a COU envolvem redução do processo inflamatório e restauração da barreira intestinal por meio de compostos bioativos naturais (FARZAEI *et al.*, 2016; VARGAS-ROBLES *et al.*, 2019). Estudos anteriores, em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), mostraram efeitos benéficos da administração do extrato da casa de *Myrciaria jaboticaba*, com modulação do processo inflamatório e da microbiota (DA SILVA-MAIA *et al.*, 2019), evidenciando o potencial de fitoterápicos para auxiliar no tratamento e profilaxia de doenças inflamatórias intestinais.

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é regulamentada pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (ANVISA 5813/16) e pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Sistema Único de Saúde (SUS). A publicação destas políticas no país tem fomentado iniciativas acadêmicas e governamentais a favor de um reconhecimento e fortalecimento dessas terapias como forma científica e segura de tratamento, da mesma forma como já são vistas em diversos países (DE MORAES MELLO BOCCOLINI, SIQUEIRA BOCCOLINI, 2020). Nesse cenário, uma planta nativa do Brasil com grande potencial medicinal é a *Garcinia brasiliensis*.

### **1.2 *Garcinia brasiliensis***

Conhecida popularmente como bacupari, a *Garcinia brasiliensis* é uma árvore de origem amazônica encontrada em diversos biomas tropicais, da família Clusiaceae, usada na medicina popular como anti-inflamatório do trato urinário e antinociceptivo, isto é, atua anulando ou reduzindo a percepção e transmissão de estímulos que causam dor. Já na medicina tradicional, o extrato dessa planta é

utilizado para tratamentos de inflamações, úlceras, diarreias e doenças do trato digestivo (RIBEIRO, 2017).

A *G. brasiliensis* é uma planta que apresenta grande quantidade de substâncias bioativas (ARWA, 2013), compostos pécicos (PAIVA *et al.*, 2014) e metabólitos secundários (RIBEIRO, 2017). Dentre os metabólitos, destaca-se o Garcinol que apresenta propriedades anti-inflamatórias (LIAO *et al.*, 2004), antibióticas (LINUXA *et al.*, 1996), antioxidantes e antitumorais (YAMAGUCHI *et al.*, 2000), além de atuar na supressão de úlceras (YAMAGUCHI *et al.*, 2000) e deformações das criptas do cólon (TANAKA *et al.*, 2000).

Portanto, a *G. brasiliensis* pode produzir resultados satisfatórios se manipulada e administrada de forma correta. Nesse sentido, estudos com experimentação animal são úteis para avaliar o potencial anti-inflamatório de extratos obtidos das folhas de *G. brasiliensis* na COU, como possível ampliação de opções terapêuticas nas doenças inflamatórias intestinais que emergem de maneira gradativa no nosso país.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da administração da fração acetato de etila das folhas de *Garcinia brasiliensis* no modelo de colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

### **2.2 Objetivo específico**

Em animais induzidos, tratados ou não com o extrato, verificar:

- As características histopatológicas do cólon,
- A expressão das proteínas Anexina A1 (AnxA1) e Ciclo-oxigenase 2 (COX 2),
- No sobrenadante do macerado intestinal as citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-1 $\beta$  e (IL)-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), citocina anti-inflamatória interleucina (IL)-10 e os fatores de crescimento epidérmicos (EGF) e endoteliais vasculares (VEGF).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Preparação do extrato e seleção de dosagem

Para a obtenção do extrato bruto, 20g das folhas secas da *G. brasiliensis* (exsicata depositada no herbário Irina Delanova Gemtchújnicov - BOTU nº33511), foram infundidas por 24 horas em 100 ml de etanol a 70% (Figura 1A). Após, o material foi filtrado e condensado no rotaevaporador (Figura 1B), sendo a porção etanólica eliminada. A seguir, a solução extrativa concentrada foi fracionada por partição líquido/líquido (Figura 1C), ao ser misturada em igual proporção com acetato de etila por mais 24 horas. Após, o solvente foi eliminado da porção orgânica e esta foi reeluída em água e filtrada, para obtenção da fração acetato de etila do extrato do bacupari (FAEB) (Figura 1D).

Para seleção da dosagem a ser usada no modelo animal de COU, foi realizado teste de citotoxicidade *in vitro*, para o qual foram misturadas diferentes porcentagens da FAEB (2-10%) em solução glicosilada (5%) de sangue humano (4%) para avaliação da hemólise. Para os controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, solução salina e 0,1% de Triton. As amostras e os controles foram levados ao banho-maria a 37° C por 15 minutos. centrifugados à 2.000 RPM por 10 min e, posteriormente, levados para leitura no espectrofotômetro a 540 nm, após zerar-se o aparelho com a solução glicosilada.



**Figura 1:** A- Percolador com etanol e as folhas trituradas. B- rotaevaporador. C- Solução extrativa concentrada. D- Fração FAEB a 10%.

### **3.2 Análise de cromatografia (HPTLC)**

A cromatografia de camada delgada de alta performance (HTPLC, *high-performance thin layer chromatography*) foi realizada com o aplicador automático CAMAG Linomat 5 (Lab. Multidisciplinar II/UNIFIPA), com gás N (60 psi) e em placas delgadas (0,2 mm) de sílica 4X10 cm (LXA) (Ref. 818333 - Macherey-Nagel/Alemanha - ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254). O método de aplicação foi feito utilizando seringa Hamilton de 100 µL, velocidade da dosagem 50 nL/s, pré-dosagem de descarte de 0,2 µL, bandas feitas com aplicação de 10 µL e tamanho de 8 mm e distância entre bandas de 5 mm.

O padrão de comparação utilizado foi o Garcinol (CS-T-79265, Clearsynth®) (100ug/mL de Etanol), com eluente Tolueno/Acetato de Etila/Ácido Fórmico (6:2:0,5).

### **3.3 Animais**

Ratos da linhagem Wistar (n=13) foram obtidos da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) de Catanduva-SP. Os animais ficaram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios Multidisciplinares, UNIFIPA, com acompanhamento de médico veterinário. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA UNIFIPA), com o número de aprovação 07/20.

### **3.4 Instilação retal de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e protocolo de tratamento**

Para os protocolos experimentais, os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controle não induzido à colite, no qual o animal passou pelo mesmo método de indução, mas apenas o soro fisiológico foi administrado (*SHAM* n=1 animal); grupo induzido à colite com tratamento padrão com mesalazina (*TP*, n=5 animais), grupo induzido à colite e tratado com a fração de acetato de etila do

bacupari (FAEB,  $n=5$  animais) e o grupo induzido à colite sem tratamento (I+,  $n=2$  animais).

Para a indução, os animais, ficaram mantidos em jejum por 24 horas, com água *ad libitum*. Após foram anestesiados intraperitonealmente (i.p) com 0,2ml/100g de ketamina e 0,05ml/100g de xilasina e submetidos a uma única instilação retal de 0,2 ml de 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) a 5% em etanol a 50%, (190  $\mu$ l de etanol a 50% e 10  $\mu$ l de TNBS), com uso de um cateter de punção arterial de 6 centímetros (Intra Special Catheter®, REF305063), a fim de provocar o processo inflamatório característico da colite (DO NASCIMENTO *et al.*, 2021). Após a introdução do cateter e da droga, os animais ficaram 2 minutos com o cateter ainda inserido no reto e depois mais 5 minutos suspensos pela cauda, com o intuito de impedir o retorno do líquido.

Em um dos grupos de animais induzidos, a fim de avaliar a eficácia do extrato na proteção contra os processos inflamatórios, foi administrada 1 ml da fração acetato de etila da *G. brasiliensis* por gavagem, 1x/dia, por sete dias, na concentração de 10% (previamente selecionada no teste de citotoxicidade). Já para os animais do grupo de tratamento padrão, foi feita uma diluição do fármaco mesalazina® com concentração de 400 mg em 4ml de água destilada e 300  $\mu$ l do produto final da diluição foi ministrado por gavagem 1x/dia por sete dias. Ao final do experimento, no oitavo dia após a indução, os animais de todos os grupos foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico (Isoflurano®).

### **3.5 Análise de conteúdo fecal**

O conteúdo fecal foi removido e mantido de forma refrigerada. Este material foi devidamente diluído em água peptonada e espalhado em placas de ágar com os meios de Salmonella S., MacConkey, EMB e Nutriente, apropriados para o crescimento de *Salmonella*, *E. coli.*, bactérias gram negativas e positivas, Enterobactérias e bactérias aeróbias totais. As placas foram então incubadas por 24–48hrs para analisar os tipos de bactérias que cresceram em cada meio.

### **3.6 Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas**

Fragmentos do cólon foram retirados, fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Secções de 5 $\mu$ m foram usadas para análises

histopatológicas e imuno-histoquímicas no microscópio Leica (DM500) do Laboratório Multidisciplinar, UNIFIPA. Para as análises histopatológicas, os fragmentos de cólon foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliações gerais e pelo Azul de Toluidina para quantificação dos mastócitos.

Nos estudos imuno-histoquímicos foram avaliadas as expressões da proteína anti-inflamatória AnxA1 e da enzima pró-inflamatória COX-2. Para avaliar a expressão dessas proteínas as secções foram processadas para recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena e incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti ANXA1 (1:1000) (*Zymed Laboratories, Cambridge, UK*) e anti- COX-2 (1:500) (*Abcam, Cambridge, UK*) *overnight*. A seguir, incubadas com o anticorpo secundário biotilado e imersas em complexo estreptavidina peroxidase conjugada. O substrato diaminobenzidina (DAB) foi usado para revelação (*Kit DAB, Invitrogen*) e, após, as secções foram contra coradas com Hematoxilina. As proteínas foram quantificadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador de imagens (*software Leica Image Analysis*).

### **3.7 Análise de Citocinas**

Os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, EGF e VEGF foram analisados no sobrenadante do macerado intestinal com o kit *Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead* (Merck/EUA; Cat. nº RECYTMAG-65k) e todas as instruções do fabricante foram seguidas. Após adição das *beads* magnéticas que se conectam aos analitos por meio de anticorpos específicos, das amostras e de incubação pelo tempo indicado, foi adicionado o anticorpo biotilado de detecção e depois o complexo estreptavidina-ficoeritrina. A análise foi realizada por meio da tecnologia de leitura Luminex xMAP, que se baseia em fluxo de laser duplo, sendo um desses específico à *bead* e identifica o analito em análise, e o outro capaz de determinar a magnitude do sinal emitido pela ficoeritrina ligada ao imunocomplexo formado na reação. A leitura foi comparada com curva de concentração de padrões fornecidos pelo kit e os resultados foram expressos em pg/mL.

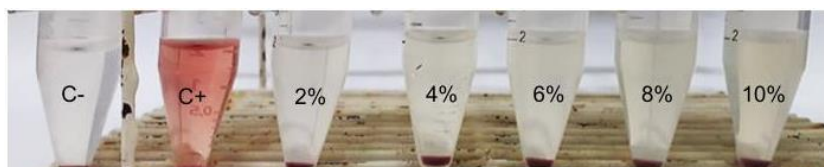
### 3.8 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva e determinação da normalidade. Para as amostras com distribuição normal, foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0, a Análise de Variância (ANOVA) - *one way*, seguida do teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significantes.

## 4. Resultados

### 4.1 Análises de citotoxicidade e cromatográfica do extrato e do conteúdo fecal na colite induzida por TNBS

O teste de citotoxicidade *in vitro*, com avaliação qualitativa da hemólise provocada por diferentes concentrações das amostras, indicou que nenhuma das amostras apresenta alta citotoxicidade nas concentrações testadas (Figura 2).



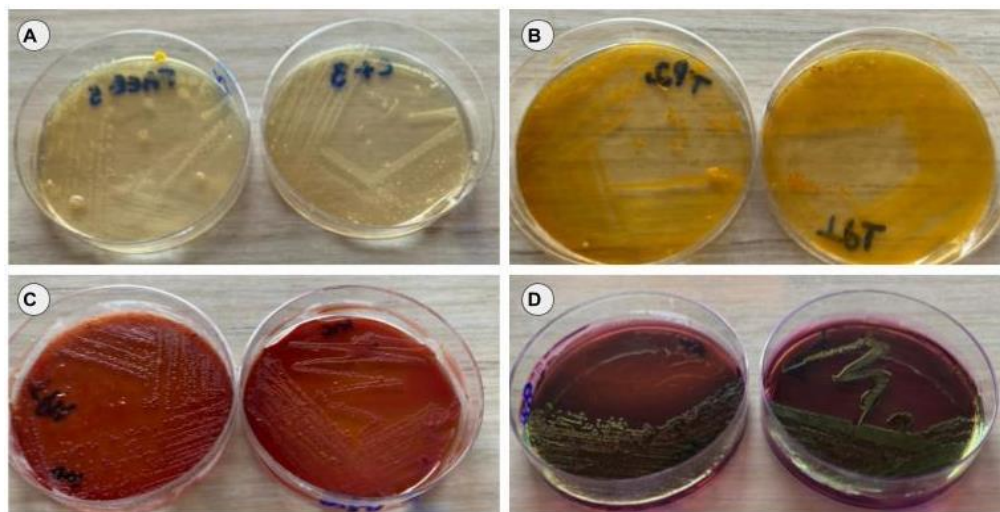
**FIGURA 2:** Exemplicação do teste de citotoxicidade da fração acetato de etila em 10%.

A análise cromatográfica (HPTLC) evidenciou a presença do Garcinol (Figura 3), composto que apresenta diversas propriedades, como a anti-inflamatória.



**FIGURA 3:** HTPLC da FAEB confirmando a presença de garcinol no extrato da folha a 10%.

Do conteúdo fecal semeado nas placas com os diferentes meios foi observado crescimento apenas de *E. coli* (Figura 5).

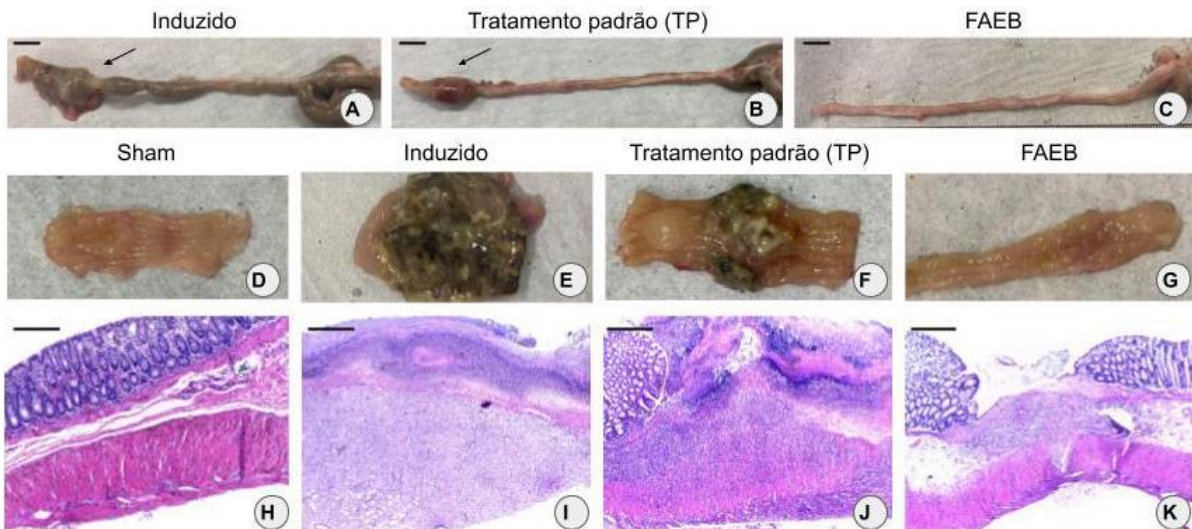


**FIGURA 4:** A- Meio ágar nutriente, B- Meio ágar Salmonella S., C- Meio ágar Macconkey e D- Meio ágar EMB. Todos evidenciando o crescimento da bactéria *E. coli*.

#### 4.2 Estudos morfológicos e histopatológicos

Nas análises morfológicas, macroscopicamente, foi possível evidenciar grande disparidade entre os grupos, principalmente, pela reversão do processo inflamatório observada no grupo tratado com a fração acetato de etila (FAEB) quando comparado ao induzido sem tratamento (I+) e ao tratado com medicamento padrão (TP) (Figura 5A-G). Os animais tratados com FAEB apresentam processo de cicatrização do órgão, com aparência muito próxima a de um animal saudável, representado pelo SHAM. Tanto os animais TP como os induzidos à colite sem tratamento (I+), apresentam constrições pelo cólon, o que bloqueou a passagem de fezes desses animais.

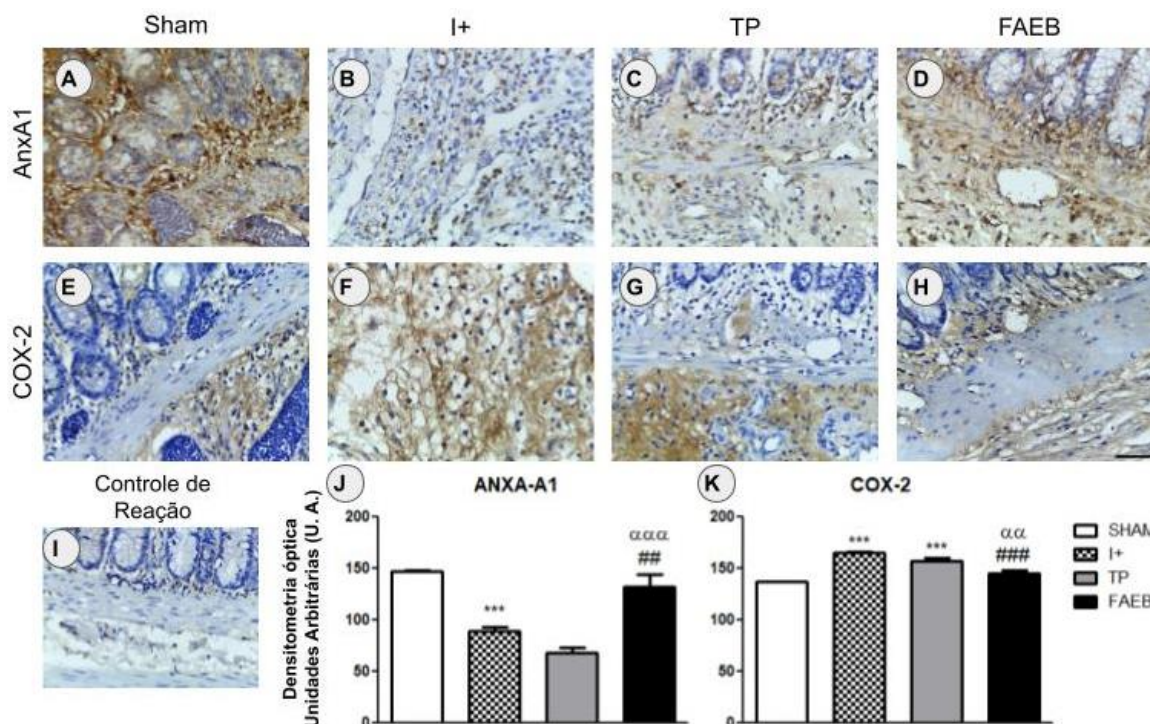
Os grupos I+ e TP apresentam grandes sinais de inflamação e fibrose, além da presença de pus e descontinuidade das camadas do órgão, dificultando a visualização e classificação de cada camada da parede intestinal, o que foi corroborado pelas análises histopatológicas. Já no grupo tratado com FAEB é possível observar sinais de cicatrização, permitindo delimitar as camadas do órgão. Visivelmente, o tratamento com FAEB mostrou eficácia, comparado aos grupos I+ e TP, onde a integridade do órgão não foi mantida (Figura 5H-K).



**Figura 5: Análises Macroscópicas e Histopatológicas** **A-** Fragmento de intestino grosso, exemplificando o grupo I+, que apresenta constrição (seta) na porção mais cranial, **B-** Fragmento de intestino grosso, exemplificando o grupo TP, com constrição na porção mais cranial, **C-** Fragmento de intestino grosso, exemplificando o grupo FAEB, com a ausência de constrição, aparência muito semelhante a de um órgão normal, **D-** Secção longitudinal do intestino grosso do animal SHAM, **E-** Secção longitudinal do intestino grosso, do grupo I+ com a presença de necrose e pus, **F-** Secção longitudinal do intestino grosso, do grupo TP com a presença de necrose e pus, **G-** Secção longitudinal do intestino grosso, do grupo FAEB com a presença de sinais de cicatrização, **H-** visão microscópica do cólon de animal SHAM, com todas as estruturas preservadas, **I-** visão microscópica do grupo I+, com a desorganização tecidual impossibilitando a classificação de cada camada do intestino, **J-** visão microscópica exemplificando o grupo TP, com algumas estruturas preservadas, mas grande desorganização tecidual e **K-** visão macroscópica exemplificando o grupo FAEB, com as estruturas preservadas e certa descontinuidade causada pela cicatrização do órgão. Barra de 50µm.

### 4.3 Avaliações imuno-histoquímicas

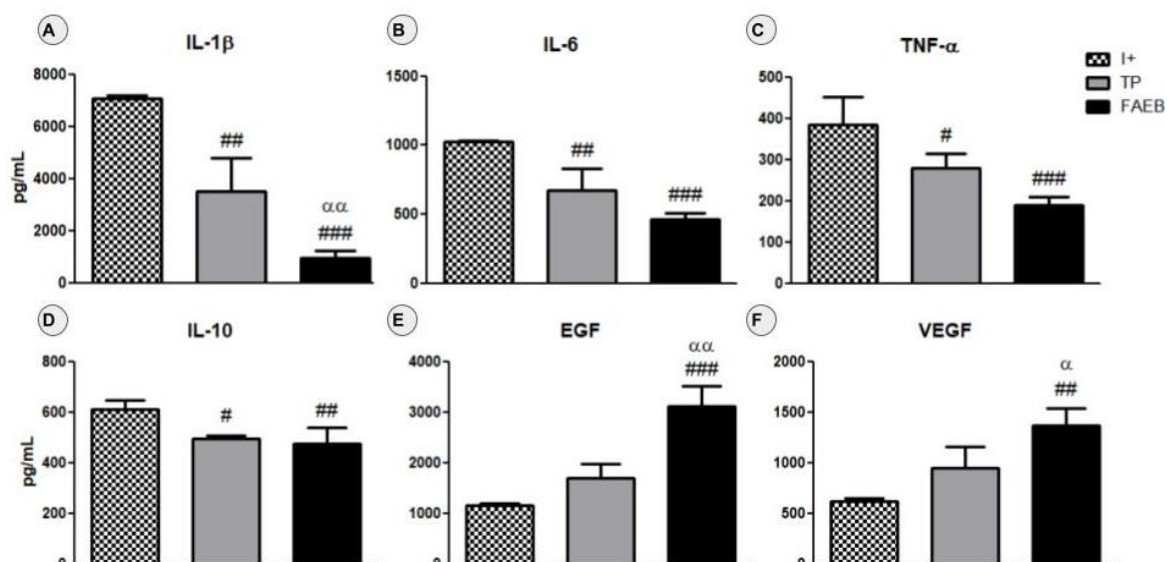
Pelas análises de imuno-histoquímica foi observada modulação nas expressões da AnxA1 e COX-2 (Figura 6A-I), confirmadas pelas análises densitométricas (Figura 6K, J). Os animais dos grupos I+ e TP mostraram pouca expressão de AnxA1 e expressão aumentada de COX-2. De maneira interessante, o tratamento com a FAEB aumentou a expressão da proteína AnxA1 e reduziu a imunorreatividade da COX-2 em comparação com os grupos I+ e TP. As expressões de AnxA1 e COX-2 no grupo FAEB foram similares as observadas no SHAM.



**FIGURA 6: Expressão de AnxA1 e COX-2** A- forte expressão AnxA1 no animal SHAM, B- redução da expressão da AnxA1 no grupo I+, C- redução da expressão da AnxA1 no grupo TP, D- elevada expressão da AnxA1 no grupo FAEB, E- forte imunorreatividade para COX-2 no animal SHAM, F- expressão aumentada da COX-2 no grupo I+, G- alta expressão da COX-2 no grupo TP, H- redução da imunorreatividade para COX-2 no grupo FAEB, I- Ausência de imunorreatividade no controle da reação. Barras de 50 µm. J- gráfico da análise de densitometria para AnxA1., K- gráfico da análise de densitometria para COX-2. \*\*\* p<0,001 vs SHAM; ### p<0,001 e ## p<0,01 vs I+; ααα p<0,001 e αα p<001 vs TP.

#### 4.4 Dosagem de citocinas e fatores de crescimento

As citocinas pró inflamatórias, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , mostraram níveis aumentados nos animais dos grupos I+ e TP comparados aos animais tratados com a FAEB. (Figura 7A-C). Níveis elevados de IL-10 foram observados nos três grupos avaliados (Figura 7D). Os fatores de crescimento, EGF e VEGF, relacionados com o processo de cicatrização, mostraram níveis altos nos animais tratados com a FAEB, comparado aos demais grupos (Figura 7E, F).



**FIGURA 7:** Dosagem de citocinas e fatores de crescimento no macerado intestinal. **A-** IL-1 $\beta$ , I+ (7056 $\pm$ 116), TP (3503 $\pm$ 915,85). **B-** IL-6, I+ em relação ao FAEB (465,38 $\pm$ 31,2), TP (674,67 $\pm$ 110,7). **C-** TNF- $\alpha$ , I+ em relação ao FAEB (188,92 $\pm$ 15,06), TP (279,25 $\pm$ 25,44). **D-** IL-10, I+ em relação ao FAEB (472,78 $\pm$ 46,2), TP (494 $\pm$ 8,2). **E-** EGF; I+ em relação ao FAEB (3121 $\pm$ 272,27). **F-** VEGF; I+ em relação ao FAEB (1364 $\pm$ 122,38). ### p<0,001, ## p<0,01 e # p<0,05 vs I+;  $\alpha\alpha$  p<0,01 e  $\alpha$  p<0,05 vs TP.

## 5. Discussão

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal que vêm afetando de maneira gradual jovens adultos brasileiros (DE BRITO *et al.*, 2020), o que estimula a busca por opções terapêuticas, entre elas os bioativos naturais de *G. brasiliensis*. As propriedades terapêuticas do gênero *Garcinia* e o seu potencial medicinal pelo uso de extratos obtidos especialmente da casca dos frutos desta árvore foram demonstradas em vários trabalhos (LIAO *et al.*, 2004; NALDONI *et al.*, 2009; SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011; ARWA *et al.*, 2015; ZAN *et al.*, 2018; ESPIRITO SANTO *et al.*, 2020). Nesta investigação mostramos importantes efeitos anti-inflamatórios pela administração de extrato obtido das folhas de *G. brasiliensis* em modelo de colite ulcerativa.

Para a presença apenas de *E. coli* como resultado encontrado nas placas semeadas com as fezes dos animais, evidencia-se um padrão em todos os grupos, o que não destoa do normal, uma vez que embora seja patogênica, essa bactéria ocorre no intestino em condições homeostáticas (KAPER *et al.*, 2004). Pelas análises morfológicas e histopatológicas, o tratamento com a fração acetato de etila do extrato de folhas de *G. brasiliensis* mostrou reversão do processo inflamatório, com reestruturação tecidual das camadas do intestino. Esse efeito anti-inflamatório

pode ser relacionado ao Garcinol, uma benzofenona identificada pela análise cromatográfica da fração do extrato nesta investigação. O Garcinol é conhecido por sua ação anti-inflamatória via inibição do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B (LIAO *et al.*, 2004). O bioativo isolado mostrou efeitos na redução das criptas do cólon (TANAKA *et al.*, 2000), inibição da expressão da proteína COX-2 e IL-1 $\beta$  (SAMAD *et al.*, 2001) e da ativação do NF- $\kappa$ B, atuando concomitantemente, com outras modulações metabólicas que podem diminuir ou inibir ativação das vias JAK-STAT (HEMSHEKHAR *et al.*, 2011).

Na continuidade do trabalho avaliamos a expressão de mediadores inflamatórios. As análises de imuno-histoquímica mostraram que o tratamento com a FAEB aumenta a expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 e, concomitantemente, reduz a expressão da enzima pró-inflamatória COX-2. Esses resultados são similares aos encontrados para o tratamento com *Camellia sinensis* (chá verde) em células de câncer pulmonar (LU *et al.*, 2012). A expressão aumentada da AnxA1 no epitélio intestinal comprometido com colite ulcerativa, foi relacionada ao fechamento da lesão e à adesão da matriz celular (LEONI *et al.*, 2012). Em modelo de doença de Crohn, animais com os níveis reduzidos de AnxA1 apresentaram resolução incompleta do quadro inflamatório, correlacionado ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  (SENA *et al.*, 2013). A AnxA1 está relacionada ao processo de reparação e cicatrização da inflamação (LEONI *et al.*, 2015), sendo um mediador pró-resolutivo, na promoção da homeostase entre os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (GOBBETTI *et al.*, 2016).

Além disso a AnxA1 está relacionada a atividades antifibróticas (NEYMEYER *et al.*, 2015; TRENTIN *et al.*, 2015). No nosso estudo a fibrose e constrição do tubo intestinal foram observadas nos animais induzidos à colite e não tratados e naqueles tratados com mesalazina, mas essas características não estiveram presentes nos animais tratados com a FAEB, correlacionado a altos níveis de AnxA1. Dessa forma o aumento na expressão da AnxA1 e redução da COX-2 causado pelo tratamento com a FAEB sustentam sua potencialidade anti-inflamatória e promotora de cicatrização.

Além disso, o tratamento com a FAEB reduziu as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mediadores que atuam de maneira sinérgica,

de forma que a perpetuação da expressão de um confere na perpetuação da expressão do outro, amplificando então o sinal da inflamação (BARRIENTOS *et al.*, 2008), e promovendo a inflamação crônica, o que foi revertido pela administração da FAEB.

O TNF- $\alpha$  atua ainda como principal estimulador da angiogênese, o que resulta na migração das células endoteliais e na formação dos capilares, essencialmente importantes para o processo de cicatrização (CAMPOS *et al.*, 2007), essas ações são mediadas por fatores de crescimento que irão reparar o tecido lesionado. No presente trabalho foram verificados os efeitos de dois fatores de crescimento que atuam no processo de cicatrização, os fatores de crescimento epidérmico (EGF) e derivados do endotélio vascular (VEGF). O primeiro produzido por plaquetas, células epiteliais e macrófagos, já o segundo é produzido e secretado por fibroblastos e macrófagos (TRAVI-CARNEIRO *et al.* 2013). O grupo FAEB apresentou valores mais elevados para esses fatores de crescimento e também resultados mais satisfatórios quanto a cicatrização tecidual.

## **6. Conclusão**

No conjunto, nossos dados indicam a presença de Garcinol na fração acetato de etila do extrato de folhas da *G. brasiliensis* e os efeitos benéficos promovidos pela administração desta fração do extrato em modelo de colite ulcerativa. O tratamento com a FAEB reduziu os níveis de mediadores pró-inflamatórios e aumentou a expressão de fatores de crescimento e da proteína anti-inflamatória AnxA1. Esses resultados estimulam o aprofundamento de estudos com compostos bioativos de *G. brasiliensis* como alternativa terapêutica na colite ulcerativa.

## **Referências bibliográficas**

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5.813, de 22 de Junho de 2006. **Regulamento de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.**

ARWA, Phaniel Saroni et al. Biflavonóides redox-ativos de *Garcinia brasiliensis* como inibidores da explosão oxidativa de neutrófilos e danos à membrana de eritrócitos humanos. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 174, p. 410-418, 2015.

ARWA, Phaniel Saroni. Estudo químico e busca de substâncias bioativas de *Garcinia brasiliensis*. 2013.

BARRIENTOS, Stephan et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BOZZA, Marcela Jorge; VILAR, Julia Maria Moreira; KOZUSNY-ANDREANI, Dora Inés. A eficácia do transplante de microbiota fecal no tratamento de colite ulcerativa: revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e1269119648-e1269119648, 2020.

CAMBUI, Yan Robert Santos; NATALI, Maria Raquel Marçal. Doenças inflamatórias intestinais: revisão narrativa da literatura. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 17, n. 3, p. 116-119, 2015.

CAMPOS ACL, BORGES-BANCO A, GROTH AK. **Cicatrização de feridas**. Arq. Bras. Cir. Dig. 2007; 20(1): 51–8.

DA SILVA-MAIA, Juliana Kelly et al. Extrato aquoso da casca da baga brasileira (*Myrciaria jaboticaba*) melhora parâmetros inflamatórios e modula *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em ratos com colite induzida. **Nutrientes** , v. 11, n. 11, pág. 2776, 2019.

DE BRITO, Renata Cristina Vieira et al. Doenças inflamatórias intestinais no Brasil: perfil das internações, entre os anos de 2009 a 2019. 2020.

DE CASTRO PAIS, Joana Filipa. Doença inflamatória intestinal: influência do tabagismo, stress e depressão na qualidade de vida do doente. 2016.

DE MORAES MELLO BOCCOLINI, Patricia; SIQUEIRA BOCCOLINI, Cristiano. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use in Brazil. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2020.

DO NASCIMENTO, Roberto de Paula et al. A quimioprevenção com um chá de folhas e flores de espinheiro (*Crataegus oxyacantha*) atenua a colite em ratos, reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo. **Food Chemistry: X**, v. 12, p. 100139, 2021.

ESPIRITO SANTO, Bruna Larissa Spontoni do et al. Potencial medicinal de espécies de *Garcinia* e seus compostos. **Moléculas**, v. 25, n. 19, pág. 4513, 2020.

FARZAEI, Mohammad Hosein et al. A mechanistic review on plant-derived natural compounds as dietary supplements for prevention of inflammatory bowel disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 745-758, 2016.

FIGUEIRÊDO, Adelma A. de et al. Colite ulcerativa inespecífica em crianças e adolescentes: análise de casuística. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, p. 309-315, 2004.

GOBBETTI, Thomas; COORAY, Sadani N. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. **Biological chemistry**, v. 397, n. 10, p. 981-993, 2016.

HEMSHEKHAR, M. et al. An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 325-351, 2011.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. *Escherichia coli* patogênica. **Nature revisa microbiologia**, v. 2, n. 2, pág. 123-140, 2004.

LEONI, G. et al. Wound repair: role of immune–epithelial interactions. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 5, p. 959-968, 2015.

LEONI, Giovanna et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 1, 2012.

LIAO, Chiung-Ho et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. **Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center**, v. 41, n. 3, p. 140-149, 2004.

LINUMA M, Tosa H, Tanaka T, et al. Atividade antibacteriana de alguns derivados de Garcinia benzofenona contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. *Biol Pharm Bull* 1996;19: 311-314.

LU, Qing-Yi et al. O chá verde inibe a ciclooxigenase-2 em células de câncer de pulmão de células não pequenas através da indução de anexina-1. **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica**, v. 427, n. 4, pág. 725-730, 2012.

MARTINMARTINS JÚNIOR, Elson Vidal et al. Tabagismo e doença inflamatória intestinal: estudo epidemiológico caso-controle. **Arq. gastroenterol**, p. 74-8, 1996.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.

NEYMEYER, H. et al. Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. **Acta Physiologica**, v. 215, n. 3, p. 144-158, 2015.

OPSTELTEN, Jorrit L. et al. Exposure to ambient air pollution and the risk of inflammatory bowel disease: a European nested case–control study. **Digestive diseases and sciences**, v. 61, n. 10, p. 2963-2971, 2016.

PAIVA, José Cezar de et al. Estudo químico de compostos pécnicos obtidos dos frutos de *Garcinia brasiliensis* e avaliação de suas propriedades biológicas. 2014.

RIBEIRO, Leonardo Bergamasco. Extração, isolamento, caracterização e avaliação das atividades biológicas de metabólitos secundários das folhas de *Garcinia brasiliensis*. 2017.

SAMAD, Tarek A. et al. Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471-475, 2001.

SANTA-CECÍLIA, Flávia V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 467-473, 2011.

SANTOS, Amanda Luizy Camara et al. Terapia nutricionais nas doenças inflamatórias intestinais: Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e11410716660-e11410716660, 2021.

SENA, Angela et al. Dysregulation of anti-inflammatory annexin A1 expression in progressive Crohns Disease. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76969, 2013.

TANAKA, Takuji et al. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p. 1183-1189, 2000.

TRAVI-CARNEIRO MC, CARNEIRO-TRAVI MI, BOCK PM. **Fatores de crescimento na cicatrização de úlceras diabéticas**. Revista Brasileira de Ciências da Saúde 2013; 38: 64-73.

TRENTIN, P. G. et al. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 12, p. 3058-3071, 2015.

VARGAS-ROBLES, Hilda et al. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 30, p. 4181, 2019.

YAMAGUCHI, Fumio et al. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2320-2325, 2000.

ZALTMAN, Cyrla. Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 992-993, 2007.

ZAN, Renato André et al. Bioactive properties and phytochemical assessment of Bacupari-anão (*Garcinia brasiliensis* Mart.) leaves native to Rondônia, Brazil. **Food & function**, v. 9, n. 11, p. 5621-5628, 2018.