

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
UNESP/ CAMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Tainan Freitas Salmeron Curimbaba**

**Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato das folhas jovens de  
*Triticum aestivum* L. obtido por cultivo em Casa de Vegetação**

**Botucatu-SP**

**2012**

**TAINAN FREITAS SALMERON CURIMBABA**

**Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato das folhas jovens de  
*Triticum aestivum* L. obtido por cultivo em Casa de Vegetação**

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da UNESP, Campus de Botucatu,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi  
Co-orientadora: Juliana A. Severi

**Botucatu-SP**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Curimbaba, Tainan Freitas Salmeron.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato das folhas jovens de *Triticum aestivum* L. obtido por cultivo em Casa de Vegetação / Tainan Freitas Salmeron Curimbaba. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Coorientador: Juliana Aparecida Severi

Capes: 21001006

1. Trigo – Uso terapêutico. 2. Agentes antiinflamatórios. 3. Intestinos – Doenças inflamatórias. 4. Doenças auto-imunes. 5. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidantes; Doença inflamatória intestinal; Fitoquímica; Produtos naturais; *Triticum aestivum* L.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a meus pais, Luiz Flavio Curimbaba e Maria Freitas, e a minha irmã Raira Freitas S. Curimbaba, que sempre me apoiaram na escolha da minha profissão.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Luiz Claudio Di Stasi pela oportunidade de trabalhar com essa equipe incrível com a qual pude aprender tanto.

À Professora Pricila Greyse dos Santos Julio pela orientação no cultivo do trigo.

Ao pessoal do LaFit pela recepção, paciência e pelo envolvimento com meu projeto.

Um agradecimento especial à Juliana Severi e à Aline Witaicenis por toda a dedicação, paciência e cuidado em me ensinar tanto ao longo desse ano.

# Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Doença Inflamatória Intestinal .....	8
1.2. <i>Triticum aestivum</i> .....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Cultivo de <i>T. aestivum</i> em casa de vegetação .....	15
3.2. Obtenção do extrato vegetal .....	16
3.3. Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato vegetal .....	16
3.4. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal.....	16
3.5. Determinação da atividade sequestradora de radicais livres .....	17
3.6. Animais .....	19
3.7. Indução da colite por administração retal de TNBS em ratos: .....	19
3.8. Avaliação clínica e macroscópica da doença anti-inflamatória intestinal .....	20
3.9. Avaliações bioquímicas relacionadas à atividade anti-inflamatória intestinal .....	21
3.10. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Cultivo de <i>T. aestivum</i> em casa de vegetação .....	23
4.2. Obtenção do extrato (suco) do trigo .....	23
4.3. Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato vegetal .....	24
4.4. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal.....	24
4.5. Determinação da atividade sequestradora de radicais livres .....	25
4.6. Avaliação clínica dos animais e macroscópica da lesão .....	25
4.7. Avaliações bioquímicas.....	28
5. CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## Resumo

O uso disseminado do suco de folhas jovens de trigo (*Triticum aestivum* L.) para diversos fins terapêuticos foi proposto por Dra. Ann Wigmore há mais de 40 anos nos Estados Unidos e popularizado de tal forma que é utilizado para o tratamento alternativo de doenças autoimunes e gastrointestinais, dentre outras. Baseado nessas informações populares, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição química e a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato aquoso de folhas jovens de trigo na fase aguda do modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em ratos. Os animais foram tratados durante cinco dias antes da indução do processo inflamatório, sendo testadas as doses de 100, 50, 25 e 5 mg/Kg e azatioprina como droga de referência. Após 48 horas da indução do processo inflamatório, os animais foram mortos e seus cólons extraídos para a realização dos estudos macroscópicos e bioquímicos. Paralelamente foi realizado um estudo para a caracterização da composição química do extrato, através de testes para a determinação das principais classes de substâncias presentes, bem como o doseamento de compostos fenólicos e atividade sequestradora de radicais livres. O estudo demonstrou que o extrato aquoso de folhas jovens de trigo a 5 mg/Kg apresentou uma tendência em melhorar os parâmetros macroscópicos e bioquímicos avaliados, porém sem diferenças estatísticas. A caracterização fitoquímica do extrato mostrou que o suco de trigo é uma fonte importante de compostos antioxidantes, os quais podem estar relacionados com a melhora no processo inflamatório colônico.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Doença Inflamatória Intestinal**

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

A doença de Crohn tem distribuição transmural e pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal, mais comumente no íleo terminal, ceco, cólon e região perianal. É caracterizada por lesões intercaladas por segmentos de intestino normal (inflamação descontínua), formação de fibrose e granuloma. Seus sintomas incluem dor abdominal, diarreia, estreitamento da luz intestinal levando à estenose e obstrução intestinal, fistulização e formação de abscessos. Na Retocolite Ulcerativa a inflamação é superficial, atingindo exclusivamente a mucosa colônica; a lesão é contínua e a doença se manifesta por diarreia grave com perda de sangue e perda progressiva da função peristáltica, com conseqüente enrijecimento do tubo colônico.

Estima-se que na América do Norte e na Europa a Doença Inflamatória Intestinal tenha uma ocorrência de 10-200 casos por 100.000 indivíduos (Bouma & Strober, 2003) e dados indicam que cerca de 1,4 milhões de americanos sofrem da doença (Abraham & Cho, 2009). No Brasil, existem poucos estudos que reúnem dados e informações sobre a incidência e distribuição da doença na população, o que seria essencial para uma caracterização melhor da situação da mesma no país. Sabe-se ainda



que a incidência mundial de doenças inflamatórias intestinais é maior em regiões urbanizadas (o que se acredita ser devido ao fato de que em áreas urbanas a exposição a antígenos é menor, contribuindo para um desenvolvimento menos eficiente do sistema imune) e economicamente desenvolvidas (Bernstein et al., 2010), mas não se fala sobre uma possível relação dessa última informação com a precariedade dos sistemas de saúde e consequente ausência de registros em países subdesenvolvidos.

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

Entre os fatores ambientais pode-se citar a dieta, onde alguns alimentos já se mostraram relacionados com a progressão da inflamação como o álcool, o leite de vaca (Yamamoto et al., 2009), o açúcar refinado (Vind et al., 2008) e carboidratos em grandes quantidades. Já se sabe também que dietas ricas em fibras, frutas e vegetais podem ser preventivas para o agravamento do processo inflamatório. O tabagismo também afeta essas duas doenças, porém de formas diferentes: os fumantes apresentam aumento do risco de desenvolver a doença de Crohn e de sua gravidade, enquanto que ex-fumantes e não fumantes estão no grupo de risco para a Retocolite Ulcerativa (Abraham & Cho, 2009). A relação do uso de fármacos com o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais também vem sendo estudada, com foco nos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e contraceptivos orais. Os primeiros tendem a causar lesões na mucosa do trato gastrointestinal, incluindo o cólon, com o risco de

úlceras e injúrias mais severas, mas a relação entre o uso de contraceptivos orais e a inflamação ainda é pouco conhecida e sugerida principalmente pelas propriedades trombogênicas dessa classe de medicamentos. Assim como em muitas outras doenças autoimunes, o estresse psicológico também pode estar relacionado com o agravamento dos sintomas das doenças inflamatórias intestinais, o que pode ser devido à ativação do sistema nervoso entérico e expressão de citocinas pró-inflamatórias (Brandi et al., 2009).

Alterações da microbiota intestinal também estão diretamente relacionados com os processos inflamatórios: microorganismos e as substâncias que eles produzem são responsáveis pelo aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e desencadeamento de resposta imune. O aumento da permeabilidade também ocorre devido à progressão do processo inflamatório e aumenta a exposição do epitélio intestinal a possíveis antígenos (Bouma & Strober, 2003).

Tendo por base os fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento e progressão da inflamação intestinal, pode-se concluir que o sistema imune intestinal desregulado e comprometido é o principal responsável por essa doença multifatorial, já que o seu bom funcionamento seria capaz de tornar o intestino protegido de agentes patogênicos sem deixar de distingui-los de forma eficiente dos não patogênicos. Sabe-se que durante a fase aguda da doença ocorre a migração de células inflamatórias (mastócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos) para a região da inflamação e há grande incidência da doença em pacientes que apresentam alteração da imunidade inata (Mayer, 2010).

Um dos processos que pode ser incluído nesse mau funcionamento do sistema imune intestinal é o estresse oxidativo, que se dá devido ao desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (produto do metabolismo) e sua eliminação através da

produção de antioxidantes pelo sistema imune (Rezaie et al., 2007). Essas substâncias oxidantes são responsáveis por morte celular, alterações no metabolismo das células e mutações genéticas, podendo estar diretamente relacionadas com as lesões da mucosa gastrointestinal.

Estudos incluindo famílias afetadas pela doença e gêmeos mostraram que os fatores genéticos desempenham um papel importante na ocorrência das doenças inflamatórias intestinais e mais proeminente na doença de Crohn do que na Retocolite Ulcerativa. Outra observação importante foi de que os casos em que ambas as doenças ocorrem na mesma família sugerem que alguns genes podem ser comuns aos dois distúrbios (Abraham & Cho, 2009).

Inúmeros fármacos compreendem a terapêutica atual e dentre eles destacam-se algumas classes: aminossalicilatos, glicocorticoides, imunossupressores e imunomoduladores. Nenhuma delas promove a remissão total dos sintomas e tampouco a cura dessas doenças, além de poderem apresentar intensos efeitos colaterais, diferentes resultados em cada paciente (alguns não respondem a nenhum dos fármacos) e normalmente alto custo. No Brasil os fármacos mais utilizados são os aminossalicilatos e os glicocorticoides (Abraham & Cho, 2009; Souza et al., 2002). Os aminossalicilatos (sais de ácido 5-aminossalicílico) englobam, principalmente, a sulfassalazina, a balsalazina, a olsalazina e a mesalazina, sendo que a sulfassalazina é a mais comumente utilizada para casos mais brandos da Retocolite Ulcerativa e da doença de Crohn. Ela possui atividade anti-inflamatória por inibição da síntese de prostaglandinas. Porém apresenta uma série de efeitos colaterais, tais como, dores de cabeça, diarreia, tonturas, anorexia e náusea (Biondo-Simões et al, 2003). Os glicocorticóides também apresentam efeito anti-inflamatório e são mais utilizados no tratamento de casos severos de ambas as doenças. Sua ação se dá por meio da ligação com receptores proteicos intracelulares,

modulando a síntese de algumas proteínas envolvidas no processo inflamatório. Em contrapartida, devido ao seu mecanismo de transativação gênica, seu uso prolongado acarreta em inúmeros e graves efeitos colaterais, muitas vezes irreversíveis e principalmente relacionados com o desbalanço eletrolítico e de fluidos corpóreos, distúrbios ácido-base, anormalidades metabólicas, alterações nos sistemas hepático, cardiovascular, mental e músculo-esquelético, hiperglicemia, aumento do risco de diabetes, desenvolvimento de hipertensão arterial e edema. Esses sintomas são consequências da retenção de sódio promovida por esses fármacos (Shanahan, 2002).

Os principais imunossupressores utilizados são a azatioprina e a 6-mercaptopurina, apresentando efeitos na doença ativa e eficientes para manter a remissão, mas não são efetivos no controle dos casos agudos. A mercaptopurina, metabólito ativo, possui ação citotóxica por meio da inibição da síntese de DNA. Entre os efeitos colaterais relata-se a supressão medular, desenvolvimento de leucopenia e trombocitopenia e associados com o desenvolvimento de linfomas (Navarro & Hanauer, 2003).

Frente a essa grande dificuldade em se combater os principais sintomas das doenças inflamatórias intestinais sem se deparar com os graves e diversos efeitos colaterais, a busca por novos compostos que apresentem eficácia perante os sintomas e patogênese dessas doenças deposita esperança para quem sofre com elas e seus tratamentos convencionais. A pesquisa de novos agentes terapêuticos a partir de espécies vegetais representa uma estratégia promissora para a busca de novos tratamentos da Doença Inflamatória Intestinal (Witaicenis, 2010), visando a obtenção de produtos mais eficientes na cura e remissão dos sintomas, a minimização de efeitos colaterais e a ação multi-alvo pela possibilidade de efeito sinérgico de diversos constituintes quando se trata de extratos vegetais, fator muito relevante quando se trata

de doenças multifatoriais como a Retocolite Ulcerativa e a doença de Crohn.

## **1.2. *Triticum aestivum***

A espécie *Triticum aestivum* L. foi descrita por Lineu em 1753 na primeira edição de "Species Plantarum", juntamente outras 6 espécies de trigo. É um cereal cultivado há milênios, tendo como áreas originais, o Norte da África, Europa e Ásia Menor. Pertencente à família Poaceae, o gênero *Triticum* engloba diversas espécies conhecidas como trigo e milhares de variedades, sendo o *Triticum aestivum* L. a espécie mais cultivada no Brasil. Acredita-se que o trigo vem sendo cultivado pelo homem há cerca de 10.000 anos, sendo um dos mais importantes alimentos da história da humanidade.

A planta de trigo jovem é verde brilhante e adquire uma cor dourada quando madura, podendo crescer até 1,5 m (Castro, 1999). Após a germinação ocorre o crescimento do perfilho, um tipo de colmo primário composto de folhas e gemas axilares que constitui a unidade de crescimento da planta. É inicialmente envolto pela bainha da folha superior adjacente e dependente da mesma. Nessa primeira fase a plântula de trigo possui um tipo primário de raízes originadas do embrião, denominado raízes seminais ou embrionárias e desenvolve três folhas primárias. Após o desenvolvimento das folhas primárias (cerca de 15 dias após a germinação) os perfilhos se tornam independentes, desenvolvendo os primeiros nós basais e, a partir deles, o sistema radicular permanente da planta composto pelas raízes caulinares ou adventícias.

O alongamento do caule, seguindo a iniciação floral, geralmente causa a cessação do perfilhamento (Castro, 1999). O colmo principal é oco e cilíndrico, diminuindo de diâmetro desde a base até a extremidade que suporta a espiga e constituído de nós e entrenós, sendo que cada nó possui sua folha correspondente. O colmo do trigo é do tipo cespitoso ereto, seus entrenós basais são muito curtos, porém

não chegam a formar touceiras. As folhas do trigo nascem na base dos nós, são amplexicaules (abraçam o colmo), alternas, possuem bainha (região basilar e alargada da folha que abraça o caule), lígula (região membranosa de natureza estipular localizado entre o limbo e a bainha) com aurículas pequenas a médias e limbo de formato linear e paralelinérveo. As inflorescências são do tipo espiga terminal de 6 a 18 cm de comprimento, constituídas por espiguetas mutiflorais, dispostas alternadamente nos lados opostos de uma ráquis contínua. As espigas podem ser aristadas (presença de folha modificada) ou não aristadas (múticas) dependendo da variedade. Cada espiguetas é uma pequena inflorescência constituída de 5 a 9 flores hermafroditas. O fruto é do tipo cariopse como em todas as espécies da família, onde o tegumento da semente é totalmente ligado ao pericarpo, sincárpico (formado por diversos carpelos fundidos) e monospérmico.

O uso disseminado do suco de folhas jovens de trigo (*Triticum aestivum* L.) para diversos fins terapêuticos foi proposto por Dra. Ann Wigmore há mais de 40 anos nos Estados Unidos. A partir de então, popularizou-se de tal forma que é utilizado para o tratamento alternativo de doenças auto-imunes, vários tipos de câncer, colesterol alto, anemia, doenças do trato gastrointestinal, entre outras. Acredita-se que o suco possua qualidades terapêuticas apenas quando fresco, portanto é consumido imediatamente após a sua extração. O grão é rico em gorduras poli-insaturadas, vitaminas, sais minerais, proteínas e carboidratos, dentre outros. Suas propriedades foram atribuídas devido ao seu rico valor nutricional: alto teor de clorofila, vitaminas A, B, C, E e K, cálcio, potássio, ferro, magnésio, enxofre de sódio, e 17 tipos de aminoácidos (Mujoriya, 2011).

Diversos estudos já demonstraram alguns dos efeitos benéficos do extrato (suco) de folhas jovens de trigo no tratamento de muitos problemas de saúde, tais como, na

talassemia  $\beta$ , reduzindo a necessidade de transfusão de sangue, anemia hemolítica, cancro, melhorando os níveis de hemoglobina e proteínas totais do paciente, carcinoma hepatocelular, feridas e queimaduras (Singh, 2011), câncer de mama (Tandon, 2011), colesterol alto (Kothari, 2008), asma, aterosclerose, diabetes, obesidade (Mujoriya, 2011), além de ter demonstrado propriedades antioxidantes (Aydos, 2011; Kulkarni, 2006) e imunomoduladoras (Hemalata, 2012), constituindo um instigante alvo de investigação química e farmacológica.

## **2. OBJETIVOS**

Avaliação da composição química e atividade anti-inflamatória intestinal do extrato (suco) das folhas jovens de *Triticum aestivum* L., frente ao modelo agudo de colite induzida por administração intracolônica de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico) em ratos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Cultivo de *T. aestivum* em casa de vegetação**

O cultivo de *T. aestivum* foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. As sementes de *T. aestivum* foram adquiridas comercialmente da marca Jasmim Produtos Naturais, validade até 12/10/2012. A semeadura foi feita no mês de setembro, utilizando-se 10 bandejas de polietileno de 28,0 × 44,0 × 7,5 cm preenchidas por uma mistura de Vermiculita e substrato Bioplant® (1:2, p/p). O espaçamento adotado foi de cerca 0,5 cm entre plantas. Ao final, as bandejas foram mantidas por 17 dias sob irrigação diária, em condições controladas de temperatura (21–29 °C) e umidade relativa do ar (60

-70%) até o momento da coleta.

### **3.2. Obtenção do extrato vegetal**

Após 10 dias de germinação as folhas jovens foram seccionadas com o auxílio de tesoura a uma distância de 0,5 cm da base. Em seguida o material foi submetido à extração em água desmineralizada com auxílio de liquidificador (50:3, p/v). A solução extrativa foi coada, imediatamente congelada a -80° C e submetida à liofilização a fim de remover a água utilizada na extração, obtendo-se assim o suco das folhas jovens de Trigo (ST).

### **3.3. Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato vegetal**

O ST 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 a verificação da presença – ou ausência – de compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas, taninos, quinonas, cumarinas, terpenóides, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides, saponinas e glicosídeos cianogênicos (Matos, 2009; Wagner et al., 1984).

### **3.4. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal**

O doseamento de compostos fenólicos totais no ST foi realizado empregando-se o método com o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e LAMUELA-RAVENTOS, 1999), adaptado para microplaca de 96 poços. O reagente é constituído por uma mistura os ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico. 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 extrato foram preparadas nas concentrações de 0–10.000 µg/mL. Em cada cavidade da microplaca adicionou-se 50 µL de água, 12,5 µL das amostras-testes, 12,5 µL do reagente Folin (2N) e as misturas reacionais foram mantidas ao abrigo da luz por 5 minutos. Decorrido o período de incubação, adicionou-se 125 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% e uma incubação adicional de 1,5h ao abrigo da luz. Em seguida, realizou-se a leitura em 750 nm. O composto ácido gálico foi usado como controle (0–3 µg/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:

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

onde:

FT: teor de fenóis totais

[F]: concentração de fenóis da amostra-teste (µg/mL), obtida pela leitura da absorvância da amostra e posterior interpolação da [ ] pela curva de calibração do padrão

[A]: concentração da amostra-teste (µg/mL)

### **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-WILLIANS et al. (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 extrato 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:

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

onde:

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

$A_{\text{amostra}}$  = 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.

### **3.6. Animais**

Ratos machos albinos *Wistar* de 180 a 220 g, adquiridos comercialmente da empresa Anilab, foram utilizados para os testes de atividade anti-inflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, localizado nas dependências do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências da UNESP, durante 11 dias antes do início dos experimentos. Este biotério dispõe de estantes climatizadas, com temperatura controlada de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos ficaram alojados em 7 caixas, separados por grupo, com 7 animais por caixa e foram alimentados com ração de manutenção PanLab S.I. e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (Protocolo n. 42/04 – CEEA).

### **3.7. Indução da colite por administração retal de TNBS em ratos:**

Para a realização do experimento de colite induzida por TNBS em ratos foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- A. Grupo branco: animais sem indução de colite e sem tratamento;
- B. Grupo controle: animais com indução de colite e sem tratamento;
- C. Grupos experimentais e doses testadas:
  - C1. Animais tratados com o ST a 5 mg/Kg;
  - C2. Animais tratados com o ST a 25 mg/Kg;

- C3. Animais tratados com o ST a 50 mg/Kg;
- C4. Animais tratados com o ST a 100 mg/Kg;
- D. Grupo tratado com azatioprina a 2 mg/Kg.

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris et al., (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados com éter etílico por inalação em cuba de vidro fechada. Em seguida, foi realizada a administração retal (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 catéter (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Os tratamentos foram administrados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foram realizados às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite. Os animais dos grupos controle e branco receberam solução salina 0,9% por via oral. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório.

### **3.8. Avaliação clínica e macroscópica da doença anti-inflamatória intestinal**

Durante o desenvolvimento dos distintos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral, tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas. Ao final da etapa de tratamento, os animais foram mortos, os cólons extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais

considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos. Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell et al., 1995 (Tabela 1).

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

<b>Escala</b>	<b>Critério</b>
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)

### **3.9. Avaliações bioquímicas relacionadas à atividade anti-inflamatória intestinal**

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica, sendo estes realizados a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflon e um recipiente de vidro de 10 mL de capacidade.

#### *Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)*

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

### Determinação do conteúdo de glutathiona total

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985), que está baseado na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra à sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzólico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu consequente incremento de absorbância a 412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido.

### 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 et al., (1985) e Bessey et al., (1946), respectivamente.

### **3.10. Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Dados descontínuos foram analisados pelo teste  $X^2$ . Significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Cultivo de *T. aestivum* em casa de vegetação

Ao fim dos 17 dias de cultivo (7 de germinação e 10 de crescimento, 10 bandejas) as plântulas possuíam um tamanho homogêneo de cerca de 20 cm, estavam saudáveis e apresentavam cerca de três folhas jovens cada uma, característica da plântula nessa idade (Figura 1).



**Figura 1.** Cultivo de plântulas de *Triticum aestivum* L. com 9 dias na casa de vegetação do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

### 4.2. Obtenção do extrato (suco) do trigo

A coleta do *T. aestivum* forneceu cerca de 480 g de material fresco, que foi utilizado para obtenção do ST. Após liofilização do ST, o extrato obtido foi pulverizado em almofariz, transferido para vidro tarado e adequadamente armazenado ao abrigo da luz e umidade. Verificou-se que o rendimento global da extração foi 6,5 %, em relação ao peso fresco do material de partida.

### 4.3. Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato vegetal

Os resultados obtidos demonstraram que o ST é constituído por compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides, terpenos e esteróis. As demais classes de substâncias investigadas não foram detectadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato (suco) de *Triticum aestivum*

Classe investigada	Ensaio	Tipo de observação	Resultado
<i>Compostos fenólicos</i>	FeCl <sub>3</sub> 5%	Precipitado c/ coloração variável entre azul e verde	++
<i>Flavonóides</i>	AlCl <sub>3</sub> 5%	Intensificação de fluorescência e cor verde-amarelado	+
	Taubock	Fluorescência amarelo-esverdeada	+
	Shinoda	Coloração róseo-avermelhada	+
<i>Taninos</i>	Pacheco	Coloração avermelhada	-
	Gelatina 2%	Precipitado floculoso	-
<i>Antraquinonas</i>	Bornträger	Coloração róseo-avermelhada na fase inferior	-
<i>Cumarinas</i>	KOH 10%	Fluorescência azul-esverdeada em exposição à luz UV (360 nm)	+
<i>Terpenos, esteróis</i>	Liebermann-Buchard	Anel azul-esverdeado (esteróide) ou róseo (triterpeno)	+++
<i>Saponinas</i>	Agitação	Espuma persistente e resistente à adição de ácido	+++
<i>Alcalóides</i>	Hager	Precipitado característico	+
	Mayer	Precipitado característico	+
	Bertrand	Precipitado característico	+

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

### 4.4. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal

A determinação do teor de fenóis revelou que o suco de *T. aestivum* apresenta 12,8 mg de EAG (equivalente de ácido gálico)/g de extrato. O resultado encontrado é quatro vezes superior à determinação feita por Tandon e colaboradores (2011), o que pode ser devido às diferenças de procedência dos grãos, cultivo e/ou forma de preparo do ST.

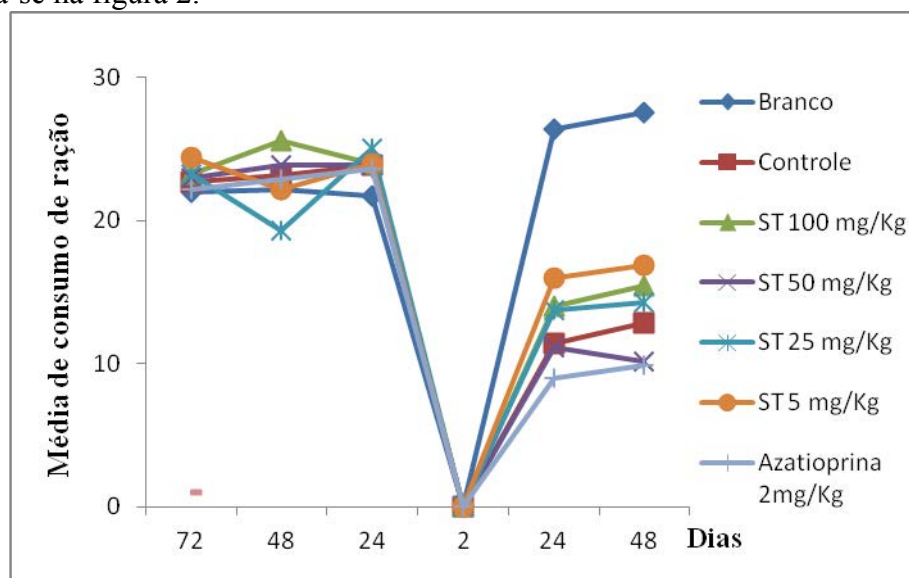


#### 4.5. Determinação da atividade sequestradora de radicais livres

A avaliação da atividade sequestradora de radicais livres pelo uso do DPPH indicou que o extrato de *T. aestivum* apresenta  $CE_{50}$  269,05  $\mu\text{g/mL}$  (padrão de ácido gálico 1,89  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando ser uma importante fonte de compostos com atividade antioxidante.

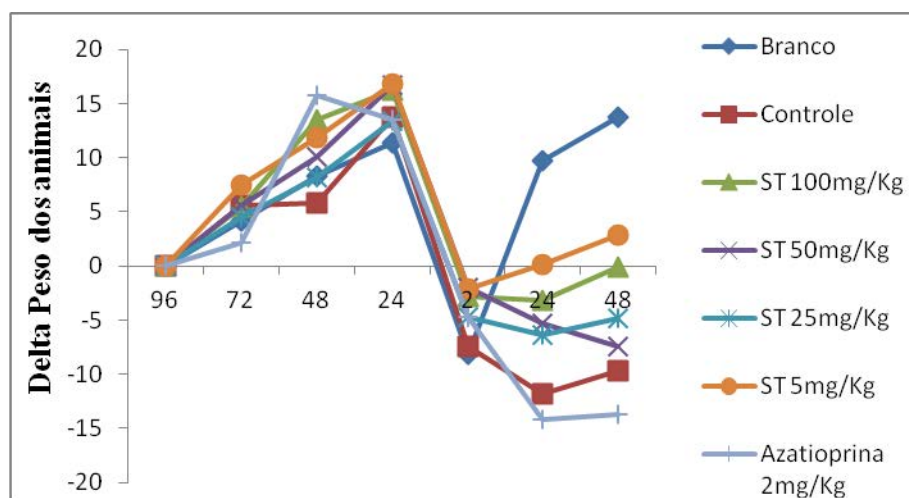
#### 4.6. Avaliação clínica dos animais e macroscópica da lesão

Avaliação do consumo de alimento mostra que após a administração do TNBS, há redução da ingestão de ração em todos os grupos experimentais. Os animais do grupo branco (não colítico) restabelecem normalmente o consumo após o jejum e diferem estatisticamente na quantidade de alimento ingerida quando comparados aos animais do grupo controle. Dentre os grupos tratados com o suco do trigo, verifica-se que os do grupo ST 5 mg/Kg restabeleceram mais acentuadamente o consumo de alimento após a indução do processo inflamatório colônico em relação aos demais grupos, porém sem que houvesse diferença estatística. O gráfico referente à avaliação do consumo encontra-se na figura 2.



**Figura 2.** Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais.

A redução no consumo de alimento também acarreta em redução do peso corpóreo dentre todos os grupos experimentais. Nesse sentido, por meio da avaliação do peso dos animais, verificou-se que os animais do grupo branco restabelecem o ganho de peso de antes do jejum, enquanto que os tratados com o suco do trigo não restabeleceram significativamente o ganho de peso corpóreo após a administração do TNBS, bem como os animais tratados com azatioprina. Houve uma recuperação desse peso maior no grupo ST 5mg/Kg e uma menor recuperação (inclusive que o grupo controle) dos animais tratados com a droga de referência azatioprina 2 mg/Kg. O gráfico referente à avaliação do ganho de peso corporal encontra-se na figura 3.



**Figura 3.** Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do (Peso final - peso inicial) comparados com o grupo controle TNBS.

Com relação à avaliação macroscópica, verificou-se que os animais tratados com o ST 5 mg/Kg apresentaram escore inferior ao grupo controle, sem que houvesse no entanto significância estatística. Os outros grupos apresentaram uma extensão de lesão inferior, sendo a menor no grupo ST 5 mg/Kg, porém nenhuma diferença estatística foi observada.

Analisando a relação peso/comprimento colônico (mg/cm), os animais do grupo controle apresentaram uma relação de  $143,73 \pm 3,63$  no grupo controle vs.  $83,83 \pm 2,68$

grupo branco (não colítico), com diferença estatística de  $p < 0,01$ . Porém nenhum tratamento com o ST promoveu alteração significativa neste parâmetro. Os animais do grupo ST 5 mg/Kg apresentaram 57,14% de diarreia, frente aos 85,75% do grupo ST 100 mg/Kg e aos 100% do restante dos animais. Essa diferença apesar de tendenciosa não apresentou significância estatística. A diarreia é um sintoma importante da doença inflamatória intestinal, indicando perda da capacidade de absorção do epitélio colônico, prejudicada durante a inflamação. Quanto à incidência de aderência, esta se dá pela união do cólon a órgãos adjacentes, o que indica a distribuição transmural da inflamação, característica comum da doença de Crohn. Foi observada aderência em 100% dos animais dos grupos controle e ST 100 mg/Kg, 85,71% do grupo ST 50 mg/Kg, 57,14% do grupo ST 5 mg/Kg, 28,57% do grupo ST 10 mg/Kg e 14,28% do grupo ST 25mg/Kg, onde apenas os grupos de 100 mg/Kg e 25 mg/Kg apresentaram diferença estatística de  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

**Tabela 2.** Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato (ST) nas doses de 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg, 5 mg/kg e azatioprina (2 mg/Kg) no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

<b>Grupo (mg/Kg)</b>	<b>Escore macroscópico (0-10)<sup>a</sup></b>	<b>Extensão da lesão (cm)<sup>b</sup></b>	<b>Relação peso/comprimento (mg/cm)<sup>b</sup></b>	<b>Diarréia (%)<sup>c</sup></b>	<b>Aderência (%)<sup>c</sup></b>
<b>Branco</b>	0 (0-0)***	0±0**	83,83±2,68**	0**	0**
<b>Controle</b>	9,0 (7-10)	3,45±0,31	143,73±3,63	100,00	100,00
<b>ST (100)</b>	8,0 (4-10)	2,84±0,34	152,26±4,80	85,71	28,57*
<b>ST (50)</b>	10,0 (8-10)	3,77±0,29	137,74±8,12	100,00	85,71
<b>ST (25)</b>	8,0 (6-10)	2,95±0,26	154,90±5,59	100,00	14,28**
<b>ST (5)</b>	9,0 (1-10)	2,57±0,51	143,28±4,22	57,14	57,14
<b>Aza (2)</b>	9,0 (7-10)	3,51±0,22	154,98±5,14	100,00	100,00

<sup>a</sup> Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), <sup>b</sup> extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M., <sup>c</sup> diarreia e aderência foram analisados pelo teste  $X^2$ , onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparados ao grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco com  $p < 0,01$  (significância não demonstrada na tabela).

#### **4.7. Avaliações bioquímicas**

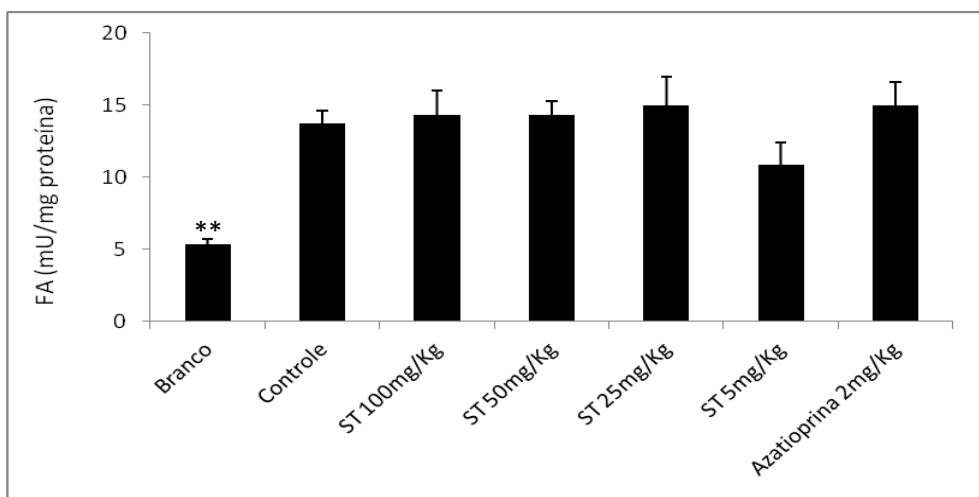
O processo inflamatório intestinal é uma série de eventos imunológicos de âmbito celular e molecular que envolvem a migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios e consequente liberação de radicais livres, que na ausência de mecanismos de defesa antioxidantes, promovem um aumento da lesão, depleção dos níveis de glutathiona, das enzimas de detoxificação, como a fosfatase alcalina (Dryden et al., 2005) e enzimas pró-inflamatórias, como a mieloperoxidase (MPO).

Como já dito, o estresse oxidativo é responsável pela morte celular, alterações no metabolismo das células e mutações genéticas, além de estar fortemente relacionado com a lesão tecidual. Isso reforça a importância da pesquisa de novos compostos com potencial atividade antioxidante para o tratamento de doenças crônicas inflamatórias.

O modelo de indução da doença inflamatória intestinal por TNBS é responsável pelo aumento de diversos mediadores do processo inflamatório e permite o estudo dos eventos iniciais da inflamação e a análise da resposta imune da mucosa intestinal (Strober et al., 2002).

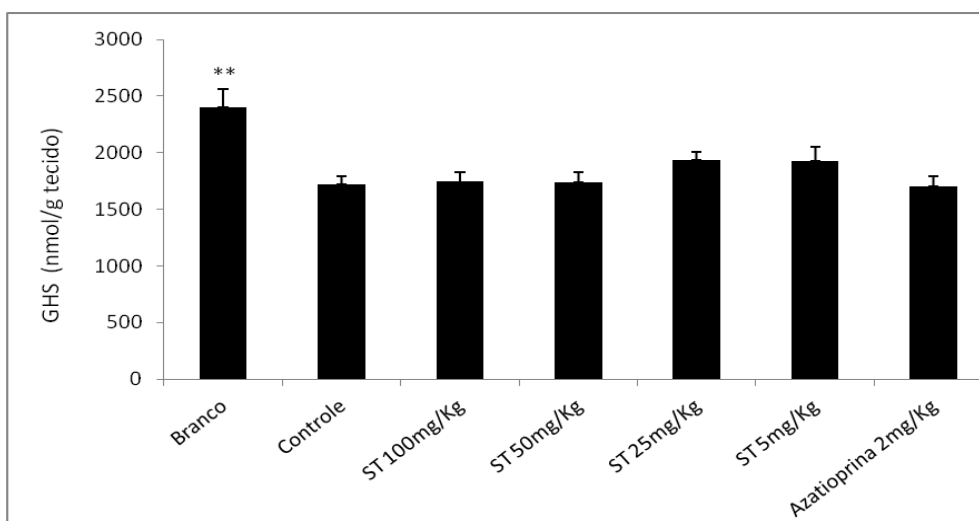
Como será discutido adiante, nos parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo, a atividade da fosfatase alcalina, da glutathiona total e da mieloperoxidase não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

A fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana ligada ao fosfatidilinositol e pertence a uma família de enzimas relativamente inespecíficas que catalisam a hidrólise de fosfomonoésteres em pH alcalino. Fisiologicamente sua função não é totalmente conhecida, mas sabe-se que seu teor fica aumentado durante a inflamação. No experimento agudo de colite realizado com o suco de trigo (ST) foi observada uma diminuição clara da atividade da fosfatase alcalina no grupo tratado com o ST a 5mg/Kg, porém sem diferença estatística.



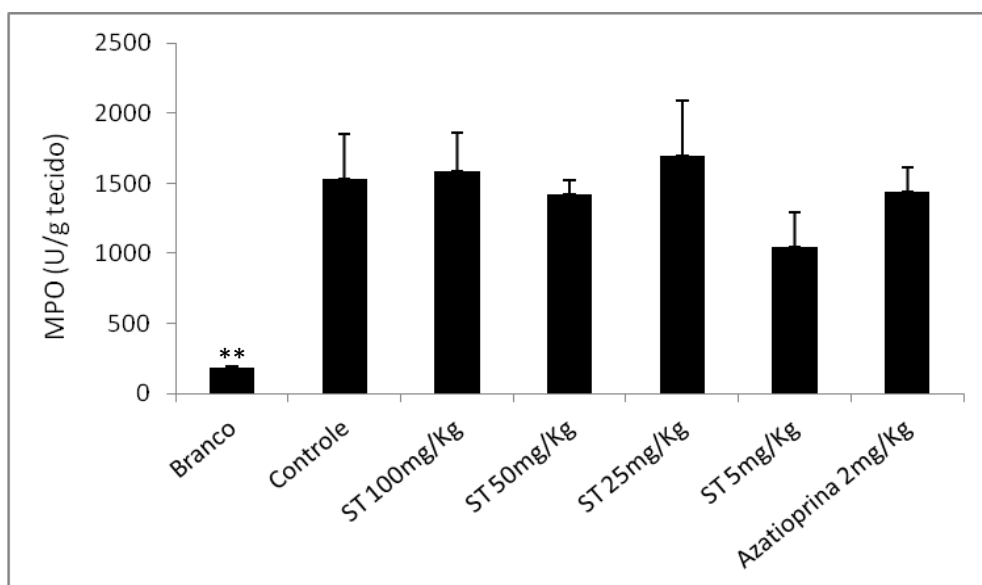
**Figura 4:** Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ , comparados ao grupo controle.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo linear constituído por glutamato, cisteína e glicina. É um dos mais abundantes e importantes agentes antioxidantes dos organismos vivos e em sua forma reduzida possui um grupo (sulfidril) capaz de sequestrar radicais livres, além de estar relacionado com a reparação da lesão oxidativa no DNA e com a proteção contra moléculas reativas de oxigênio. Sua diminuição, portanto está intimamente relacionada com a progressão do processo inflamatório. Na avaliação dos níveis de glutathiona colônica no experimento agudo de colite, nenhum tratamento foi capaz de evitar a depleção dos níveis de glutathiona (Figura 5).



**Figura 5:** Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*\*  $p < 0.01$  comparados ao grupo controle.

Na análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), apesar de nenhuma diferença estatística, foi observada uma diminuição tendenciosa da mesma no grupo experimental ST 5mg/Kg em relação aos outros grupos. A mieloperoxidase é uma enzima que está concentrada predominante nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. A diminuição da atividade dessa enzima indica diminuição de migração de neutrófilos para a região, portanto está diretamente relacionada à redução da inflamação (Krawisz et al., 1984).



**Figura 6:** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M com \*  $p < 0.05$  comparados ao grupo controle.

## **5. CONCLUSÕES**

Com base nos objetivos propostos, nos resultados e discussões apresentadas, foi possível concluir que:

- 1) O extrato aquoso das folhas jovens de trigo é rico em compostos antioxidantes.
- 2) O extrato aquoso na dose de 5 mg/Kg demonstra uma tendência na melhora no processo inflamatório colônico induzido por TNBS em ratos.
- 3) Esse resultado pode ser devido aos compostos antioxidantes presentes no extrato.
- 4) Os resultados preliminares observados sugerem que o extrato seja testado em doses menores.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, C. & CHO, J. H. Inflammatory Bowel Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 361, np. 2066-78, 2009.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- AYDOS, O. S.; AVCI, A.; ÖZKAN, T.; KARADAĞ, A.; GÜRLEYİK, E.; ALTINOK, B.; SUNGUROĞLU, A. Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) extract on CML (K562) cell line. **Turkish Journal of Medical Sciences**, 41 (4), p. 657-663, 2011.
- BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am. J. Physiol.*, 268, G622-G630, 1995.
- BEN-AYRE, E., GOLDIN, E., WENGROWER, D., STAMPER, A., KOHN, R., BERRY, E. Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, p. 444-449, 2002.
- BERNSTEIN, C. N.; FRIED, M.; KRABSHUIS, J. H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R.; FEDAIL, S.; GEARRY, R.; GOH, K. L.; HAMID, S.; KHAN, A. G.; LEMAIR, A. W.; MALFERTHEINER, OUYANG, Q.; REY, J. F.; SOOD, A.; STEINWURZ, F.; THOMSEN, O. O.; THOMSON, A.; WATERMEYER, G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 16, n. 1, 2010.
- BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROOK, M. J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-329, 1946.



- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MANDELLI, K. K.; PEREIRA, M. A. C.; FATURI, J. L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 172-182, 2003.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 118, p. 1199-1200, 1958.
- BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 521-533, 2003.
- BOUSVAROS A. Nutritional therapy of inflammatory bowel disease. Caballero B, Trugo L, Finglas P eds. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2003; 3315-3320.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRANDI, M. T.; RIBEIRO, M. S.; CHEBLI, L. A.; FRANCO, M. B.; PINTO, A. L.; GABURRI, P. D.; ZANINI, A.; CHEBLI, J. M. Psychological distress in Brazilian Crohn's disease patients: Screening, prevalence, and risk factors. **Medical Science Monitor**, v.15, n.8, 2009.
- CARTER, M. J.; LOBO, A. J.; TRAVIS, S. P. L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53, p. v1-v16, 2004. doi: 10.1136/gut.2004.043372.
- DEDECCA, D. M.; PURCHIO, M. J. Variedades agrícolas de trigo (*Triticum aestivum* L.): caracterização botânica de algumas variedades em experimentação em São Paulo. **Bragantia**, vol. 12, n.1-3, p. 19-53, 1952.
- DRYDEN, G. W.; DEACIUC, I.; ARTEEL, G.; MCCLAIN, C. J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. **Current Gastroenterology Reports**,

v.7, p.308–316, 2005.

FONTANELI R. S., SANTOS H. P., FONTANELI R. S. “Morfologia de gramíneas”.

In: **FORAGEIRAS PARA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA-FLORESTA NA REGIÃO SUL-BRASILEIRA**, p. 33- 39, 2009.

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

HEMALATHA, R.; KARTHIK, M.; NARENDRA, B.; KUMAR, B. D. Immunomodulatory Activity of Triticum aestivum and its Effects on Th1/Th2 Cytokines and NFκB P 65 Response. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 2, p. 19-29, 2012.

KOTHARI, S.; JAIN, A. K.; MEHTA, S. C.; TONPAY, S. D. Effect of fresh Triticum aestivum grass juice on lipid profile of normal rats. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 40, p. 235-236, 2008.

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

KULKARNI, S. D.; TILAK, J. C.; ACHARYA, R.; RAJURKAR, N. S.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; REDDY, A. V. R. Evaluation of the Antioxidant Activity of Wheatgrass (Triticum aestivum L.) as a Function of Growth under Different Conditions. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 218–227, 2006.

LOFTUS, E. V. Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1504–1517, 2004.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **Journal of**

- Gastroenterology**, v. 45, p. 9-16, 2010.
- MAWDSLEY, J. E. & RAMPTON, D. S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**, v. 54, p. 1481-1491, 2005.
- MORRIS, G. P.; BECK, P. L.; HERRIDGE W.; DEPEW, W.; SZCEWCZUK, M. R.; WALLACE, J. L. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p. 795-803, 1989.
- MUJORIYA, R. A study on wheat grass and its Nutritional value. **Food Science and Quality Management**, ISSN 2225-0557, v. 2, 2011.
- NAVARRO, F. & HANAUER, S. B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 12, 2003.
- REZAIIE, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 2015–2021, 2007.
- SINGH, J.; SETHI, J.; YADAV, M.; SOOD, S.; GUPTA, V. Effect of Triticum aestivum juice on wound healing in rats. **International Journal of Natural Product Science**, v. 1, p. 15-20, 2011.
- SINGH, V. P.; PATIL, C. S.; JAIN, N. K.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins & Others Lipid Mediators**, v. 71, p. 163-175, 2003.
- SINGLETON, V. L.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. 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.
- SHANAHAN, F. & TARGAN, S. R. "Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside" In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**. TARGAN, S.

- R., SHANAHAN, F. (eds.), p. 02-30, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- SHANAHAN, F. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 359, p. 62–69, 2002.
- SMITH, G. P.; HARRIS, H.; PETERS, T. J. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinica Chimica Acta**, v. 142, p. 221–30, 1984.
- SOUZA, M. H. L. P.; TRONCON, L. E. A.; RODRIGUES, C. M.; VIANA, C. F. G.; ONOFRE, P. H. C.; MONTEIRO, R. A.; PASSOS, A. D. C.; MARTINELLI, A. L. C.; MENEGHELLI, E. U. G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 2, 2002.
- STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 495–549, 2002.
- STROBER, W.; LUDVIKSSON, B. R.; FUSS, I. J. The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 10, 1998.
- TANDON, S.; ARORA, A.; SINGH, S.; MONGA, J.; ARORA, S. Antioxidant Profiling of Triticum aestivum (wheatgrass) and its Antiproliferative Activity In CF-7 Breast Cancer Cell Line. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, 2011.
- TERUEL D. A.; SMIDERLE O. J. “Trigo”. In: **Ecofisiologia de Cultivos Anuais**. CASTRO P. R. C.; KLUGE R. A. p. 13-24, Nobel, 1999.
- VIND, I.; LENE RIIS, L.; JESPERGAARD, C.; JESS, T.; KNUDSEN, K.; PEDERSEN, N.; ELKJAERE, M.; HANSEN, T. S.; ANDERSEN, I. B.; PAERREGAARD, A.; BONDESEN, S.; LOCHT, H.; LARSEN, S. O.;

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

WITAICENIS, A. Estudo comparativo dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. Botucatu: **Tese de doutorado**, 2010.

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