

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

**Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos**

Késsien Regina Sander Oliva



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

Orientador: Prof. Dr Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu – SP

2018

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

**Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos**

Késsien Regina Sander Oliva

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

Orientador: Prof. Dr Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliva, Késsien Regina Sander.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus L.* no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos / Késsien Regina Sander Oliva. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi  
Capes: 21001006

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Ácido Trinitrobenzenossulfônico. 3. *Abelmoschus*. 4. Doença de Crohn. 5. Proctocolite.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal; *Hibiscus esculentus*; TNBS.

Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências  
Campus de Botucatu  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

## **DISSESTAÇÃO DE MESTRADO**

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com  
*Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por  
TNBS em ratos

### **BANCA EXAMINADORA**

1º Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

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

2º Prof. Dr. Carlos Augusto R. Martinez

Professor Livre docente do Departamento de Cirurgia/Faculdade de Medicina – USF – Bragança Paulista/SP

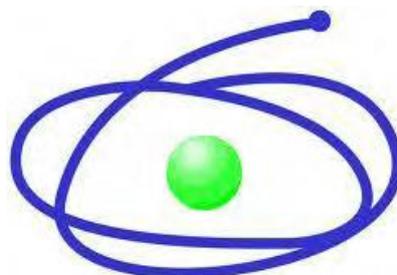
3º Dr. Leonardo Noburu Seito

Pesquisador do Instituto Farmanguinhos/Departamento de Farmacologia Aplicada – FIOCRUZ – Rio de Janeiro/RJ

Botucatu – SP

2018

**Auxílio Financeiro:**



**C A P E S**

(Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior)



(Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo)

*“É nas experiências, nas lembranças, na grande e triunfante alegria de viver na mais ampla plenitude que o verdadeiro sentido é encontrado.”*

*(Chris McCandless)*



*DEDICATÓRIA*

*À Deus por todas as bênçãos concedidas na minha vida, por sua imensa misericórdia que me mantém viva e me acompanha todos os dias, me fazendo trilhar os caminhos certos e colocando sempre fé no meu coração.*

*O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã.*

*(Salmos 30:5)*

*Aos meus avós Alice e Gustavo (in memoriam) por todos os ensinamentos e incentivo em todas as etapas da minha vida, pela educação e por terem me dado o privilégio de ter sido “filha de avós”. Vocês sempre serão o meu maior exemplo de amor, carinho, perseverança, honestidade, humildade e sabedoria. Mesmo não estando mais presentes nesse mundo, eu os levo comigo em tudo que me ensinaram. Obrigada por terem existido na minha vida e por terem contribuído tanto para que eu me tornasse quem sou hoje.*

*O amor incondicional é amar ALÉM.*

*Amar sem esperar retorno.*

*Ser alegres apenas em expressarmos o amor.*

*(DebAoki Chan)*

*À minha mãe Kelli, pela confiança em mim depositada e por todo o sacrifício que fez para que eu chegasse até aqui. Seu exemplo de vida me encoraja a nunca desistir. Sem você eu nada seria.*

*Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo, minha mãe.*

*(Abraham Lincoln)*

*Ao meu irmão Jú, pela amizade, pela torcida, amor incondicional e por sempre ter tido a imensa certeza de que tudo nós podemos dividir um com o outro independente de qual for a situação.*

*Mas o seu sorriso vale mais que um diamante,  
Se você vier comigo,  
Aí nós vamos adiante.  
(Chorão)*

*Ao meu namorado Leonardo pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, incentivo, por alegrar os meus dias e sempre ser capaz de me fazer sorrir!*

*Não sei se o mundo é bom  
Mas ele ficou melhor  
quando você chegou  
E perguntou:  
Tem lugar pra mim?  
(Nando Reis)*

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



***AGRADECIMENTOS***

À Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior) e a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

À todos do Laboratório: Luiz, Aline, Ana, Cristiane, Tainan, Ariane, Celso, Alexandre, Alexandre (Kita), Vinícius e Gabriela por todos os conhecimentos compartilhados, aprendizados durante essa trajetória e auxílio nos experimentos. À Erika e Lesvi por toda colaboração, ajuda, conselhos, boas conversas e amizade.

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

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

Aos funcionários da experimental-UNIPLEX pela disposição e auxílio no preparo da ração.

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

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



***PRÓLOGO***

## Dados curriculares

**Nome:** Késsien Regina Sander Oliva

**Nascimento:** 11/12/1992

**Formação:** Graduação em Biomedicina com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT (2011-2015).

### Atividades realizadas durante o mestrado (2016-2017):

#### I) Disciplinas cursadas:

Disciplinas cursadas	Ano	Frequência (%)	Conceito	Créditos	Carga horária
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	2016	100	A	3	45
Metodologia e Redação Científica	2016	100	A	3	45
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2016	93,3	A	3	45
Plantas Medicinais: Abordagens de Estudos Interdisciplinares	2016	100	B	6	90
Prática de Ensino em Farmacologia	2016	100	A	4	60
Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina	2016	100	A	2	30
Farmacologia e Sociedade	2017	100	B	3	45
Mediadores da resposta inflamatória	2017	100	A	3	45
Farmacologia e Sociedade	2017	100	A	3	45

- Total de créditos cumpridos: 30
- Total de carga horária em disciplinas: 450 horas
- Total de carga horária em atividades complementares: 157,5 horas
- TOTAL GERAL: 607,5 horas

## **II) Participação em Congressos e Eventos**

- Simpósio de Ética e Integridade na Pesquisa – Araraquara/SP (2016).
- XII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu – Plantas Medicinais e suas fronteiras: Tradição e tecnologia – Botucatu/SP (2016).
- XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – Belo Horizonte/MG (2016).
- VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia (SIMFARTEC) – Botucatu/SP (2017).
- Seminário de Ética em Pesquisa – 20 anos de funcionamento – Botucatu/SP (2017).
- 3ª Jornada Caipira da Doença Inflamatória Intestinal – Caipirã – Botucatu/SP (2017).

## **III) Formação complementar**

- Curso de curta duração em Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil e obter melhores resultados. (Carga horária 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2016.
- Oficina Jardins Sensoriais. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2016.
- Curso de curta duração em Técnicas de Centrifugação - Princípios e Aplicações. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2017.
- Curso de curta duração em Western Blot: princípios básicos e vantagens dos produtos Abcam. (Carga horária: 2h.) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2017.
- Curso de curta duração em Nova tecnologia em anticorpos monoclonais primários: vantagens, benefícios e validação dos RabMAbs. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu/SP, 2017.

#### IV) Trabalhos Apresentados em Congresso

- **OLIVA, K. R. S.**; WITAICENIS, A.; MORI, C.; TANIMOTO, A.; COSTA, E. F.; CURIMBABA, T. F. S.; DALMAU, L. M.; STASI, L. C. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE *Hibiscus esculentus* L., XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte/MG (2016).
- **OLIVA, K. R. S.** Avaliação da atividade antioxidante, dos compostos secundários e atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP, Botucatu/SP (2017).

#### V) Co-autoria em Trabalhos

- CURIMBABA, T. F. S.; WITAICENIS, A.; COSTA, E. F.; **OLIVA, K. R. S.**; DALMAU, L. M.; TANIMOTO, A.; STASI, L. C.; MORI, C. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA POLPA DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) COMO POTENCIAL PROTETOR DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL, XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte/MG (2016).
- COSTA, E. F.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; **OLIVA, K. R. S.**; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA FARINHA DOS FRUTOS DE *Musa* sppAAB., XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte/MG (2016).
- MORI, C.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; COSTA, E. F.; **OLIVA, K. R. S.**; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FRUTO VERDE DE *Musa* sppAAA., XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte/MG (2016).

- L. M. DALMAU, E. F. COSTA, **K. R. S. OLIVA**, C. MORI, T. F. S. CURIMBABA, L. C. DI STASI. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Cnidoscolus aconitifolius* NO MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL. XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara/SP (2017).

- E. F. COSTA, L.M. DALMAU, **K. R. S. OLIVA**, T. F. S. CURIMBABA, L. CC. DI STASI. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *MUSA* sp AAB (BANANA PRATA) NO MODELO DE INDUÇÃO POR TNBS. XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara/SP (2017).

#### **VI) Outras atividades**

- Membro da Comissão Organizadora VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC). Botucatu/SP (2017).

#### **VII) Colaboração em outros projetos de pesquisa**

- Avaliação das propriedades anti-inflamatórias da Chaya (*Cnidoscolus aconitifolus*) no tratamento da doença inflamatória intestinal.

- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do óleo da *Bertholletia excelsa bonpl.*

- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com banana prata verde (*Musa* sp AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

- Efeitos da dieta enriquecida com os frutos de *Euterpe oleracea* Mart. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.

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

## RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal engloba duas principais doenças sendo elas a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa onde ambas se caracterizam por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prologados com remissão dos sintomas. Sua etiologia é considerada multifatorial e ainda pouco elucidada. Considerando-se que não existe cura, que os fármacos utilizados são de alto custo, além de apresentarem sérios efeitos colaterais e ainda muitos pacientes não responderem a esses tratamentos disponíveis, a busca por estratégias complementares de prevenção e tratamento dessa doença que combinem eficácia e segurança, como o uso de alimentos funcionais, compostos antioxidantes e compostos bioativos se apresentam como uma perspectiva promissora. Com base nisso, a espécie vegetal *Hibiscus esculentus* L. conhecida popularmente como quiabo, foi selecionada para o presente estudo com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal das dietas enriquecidas com o fruto no modelo experimental da inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos. Para tanto, a farinha dos frutos foi incorporada na dieta de ratos *Wistar* machos nas concentrações de 5% e de 10% por 28 dias antes e 7 dias após a indução do processo inflamatório intestinal. Os animais foram mortos no 35º dia e seus cólons foram extraídos. Para a caracterização da atividade anti-inflamatória intestinal foram analisados parâmetros macroscópicos (escore, extensão da lesão, relação peso/comprimento do cólon, ocorrência de diarreia e aderência do cólon a órgãos adjacentes), análises microscópicas (hematoxilina-eosina e PAS/Alcian Blue para avaliação de muco) e parâmetros bioquímicos (atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina e quantificação da glutatona total). Complementarmente foi realizada a análise fitoquímica do extrato etanólico 70% dos frutos de *Hibiscus esculentus*, a atividade sequestradora de radicais livres utilizando o modelo do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), e a avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebros de ratos. As avaliações bioquímicas mostraram que a dieta nas duas concentrações foi capaz de evitar a depleção dos níveis de glutatona, mas não diminuiu a atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina em nenhuma das concentrações testadas. A dieta nas duas concentrações foi capaz de evitar depleção de muco e foi observada recuperação tecidual pelas análises microscópicas. A dieta na concentração de 10% diminuiu a relação peso/comprimento cólico e extensão da lesão. As análises fitoquímicas mostram a presença de fenóis, taninos, flavonóis, flavononas, xantonas, terpenóides. No ensaio de DPPH a farinha apresentou uma IC<sub>50</sub> de 302.68ug/ml vs. 1.89ug/ml do ácido gálico, enquanto que no modelo de peroxidação lipídica, uma IC<sub>50</sub> de 196,8µg/ml, onde no mesmo teste, a quercetina, flavonoide antioxidante usado como referência, apresentou IC<sub>50</sub> de 1,02µg/ml. Esses resultados sugerem que a suplementação dietética com os frutos de *Hibiscus esculentus* nas concentrações de 5% e de 10% na ração foi responsável pela melhora do processo inflamatório cólico induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos. Esses efeitos estão associados às propriedades antioxidantes da espécie que podem estar relacionadas com a presença de compostos fenólicos, sugerindo que essa espécie é um alimento funcional promissor para o tratamento complementar da doença inflamatória intestinal, propondo a necessidade de que mais estudos sejam realizados para confirmarem e esclarecerem esses efeitos.

**Palavras-chaves:** Doença Inflamatória Intestinal, TNBS, *Hibiscus esculentus*, quiabo, alimentos funcionais.

## ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease comprises two major diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis where both are characterized by chronic inflammation of the intestine, with periods of exacerbation followed by prolonged intervals with remission of symptoms. This disease is multifactorial with complex and not fully elucidated etiology. Considering that there is no cure and the drugs may cause serious side effects, and many patients do not respond to the available treatments, researches focused on the development of new treatment strategies are important. The pursuit of complementary strategy of prevention and treatment of disease that combine effectiveness and safety, such as the use of functional foods, antioxidant compounds and bioactive compounds if known as a promising perspective. Based on this, a vegetable species *Hibiscus esculentus* L., popularly known as okra, was selected for this study with the objective to evaluate the activity of enriched diet in the experimental model of intestinal inflammation induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rats. For this, a fruit flour was incorporated in the diet of male *Wistar* rats in concentrations of 5% and 10% for 28 days before and 7 days after of induction of intestinal inflammation by TNBS. The animals were killed on the 35th day and their colons were removed. For the characterization of the intestinal anti-inflammatory activity, were performed macroscopic studies (score, lesion length, weight ratio length of the colon, occurrence of diarrhea and grip), microscopic analysis (hematoxylin-eosin and PAS/Alcian Blue for evaluation of mucus) and biochemical parameters (myeloperoxidase and alkaline phosphatase enzyme and quantification of total glutathione). Complementarily, it was made a photochemical analysis of the 70% ethanolic extract of *Hibiscus esculentus* fruits, a free radical scavenging activity using the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) model and an evaluation of antioxidant activity by the lipid peroxidation assay in membranes of rat brains. The biochemical evaluations showed that the diet at both concentrations was able to prevent depletion of glutathione but did not decrease the activity of the enzymes myeloperoxidase and alkaline phosphatase in any of the concentrations. The diet at both concentrations was able to avoid mucus depletion and tissue recovery was observed by microscopic analysis. The 10% concentration diet decreased the colic weight/length ratio and extension of the lesion. The phytochemical analyzes showed a presence of phenols, tannins, flavonols, flavonones, xanthones, terpenoids, DPPH showed an IC<sub>50</sub> of 302.68ug/ml vs. 1.89ug /ml of gallic acid and a model of lipid peroxidation, the extract showed an IC<sub>50</sub> of 196.8µg/ml, where in the same test, the quercetin, antioxidant flavonoid used as reference, showed an IC<sub>50</sub> of 1.02µg/ml. These results suggest that dietary supplementation with fruits flour of *Hibiscus esculentus* at concentrations of 5% and 10% in feed was responsible for the improvement of the colonic inflammatory process induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rats. These results are associated as antioxidant properties of the specie that may be related to a presence of phenolic, suggesting that the specie is a functional food for the complementary treatment of inflammatory bowel disease, suggesting the need for further studies to confirm and clarify the effects.

**Keywords:** Inflammatory Bowel Disease, TNBS, *Hibiscus esculentus*, okra, functional foods.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferentes partes do quiabo, (a) plantação, (b) flor, (c) fruto, (d) fruto visto em corte transversal e (e) sementes.....10
- Figura 2.** IC<sub>50</sub>=1,02µg/ml da quercetina (A) e IC<sub>50</sub>=196,8µg/ml do extrato etanólico 70% de frutos secos e pulverizados de *Hibiscus esculentus* (B).....26
- Figura 3.** Consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=7).....27
- Figura 4.** Média do ganho de peso corpóreo dos animais. Dados expressos em média em gramas (peso final – peso inicial) X 100/peso inicial (n=7).....28
- Figura 5.** Fotografia do colón de animal do grupo controle-TNBS.....29
- Figura 6.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos de diferentes grupos experimentais 7 dias após a administração de TNBS. Cortes cortados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografias com micros microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 2.5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 5% e (D) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 10%.....31
- Figura 7.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos de diferentes grupos experimentais 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com PAS/Alcian Blue. Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 2.5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 5% e (D) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 10%.....32
- Figura 8.** Fotomicrografia da mucosa do cólon de rato do grupo saudável. Células caliciformes produtoras de mucina. Corte corado com PAS/Alcian Blue.

Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 40X. ....	33
<b>Figura 9.</b> Escore microscópico expresso em mediana, analisados estatisticamente por teste a posteriori de Kruskal-Wallis com teste de Dunn vs. grupo controle-TNBS, onde ** p<0,01.....	33
<b>Figura 10.</b> Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média ± E.P.M. com **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	34
<b>Figura 11.</b> Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH) cólico. Dados expressos em média ± E.P.M. com *p<0,05 e **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	35
<b>Figura 12.</b> Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA). Dados expressos em média ± E.P.M. com **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	35
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de indução de inflamação intestinal pelo TNBS.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição dos ingredientes principais das dietas dos grupos experimentais (100g).....	17
<b>Tabela 2.</b> Critério de avaliação da severidade da lesão cólica.....	19
<b>Tabela 3.</b> Critérios de avaliação de escore microscópico da lesão cólica.....	20
<b>Tabela 4.</b> Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico 70% de <i>Hibiscus esculentus</i> .....	25
<b>Tabela 5.</b> Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com <i>Hibiscus esculentus</i> (5% e 10%) no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.....	29

## LISTA DE ABREVIÇÕES

**ACCGs** – Ácido graxo de cadeia curta

**ALFAC** – álcool 80%, formaldeído e ácido acético

**ANOVA** – Análise de variância de uma via

**CAT** – Catalase

**CEEA** – Comitê de ética experimental

**DC** – Doença de Crohn

**DII** – Doença inflamatória intestinal

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

**DTNB** – ditiobisnitrobenzóico

**EPM** – Erro padrão médio

**ERN** – Espécies reativas de nitrogênio

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**FA** – Fosfatase alcalina

**GSH** – Glutathiona

**GSSG** – Glutathiona oxidada

**GPx** – Glutathiona peroxidase

**GSR** - Glutathiona redutase

**IL-12** – Interleucina 12

**IC<sub>50</sub>** – Quantidade necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50% ou concentração inibitória de 50% da lipoperoxidação

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**MDA** - Malonildialdeído

**MPO** – Mieloperoxidase

**MUC** – Gene que expressa mucina

**NADPH** – Fosfato de dinucleotídeo

**RCU** – Retocolite ulcerativa

**SOD** – Superóxido dismutase

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TGI** – Trato gastrointestinal

**TNBS** – Ácido 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfônico

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral

**Th** – T-helper

**Th1** – T-helper 1

**Th2** – T-helper 2

**Th17** – T-helper 17



## *SUMÁRIO*

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>



## *INTRODUÇÃO*

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença idiopática, crônica com transtorno inflamatório intestinal, com períodos de exacerbação caracterizados por hábitos intestinais alterados, como dor abdominal e diarreia, constipação e perda de peso, seguido de períodos prolongados de remissão desses sintomas (GITNICK, 1996; MALOY & POWRIE, 2011). As doenças inflamatórias intestinais são consideradas um dos grandes problemas da população moderna, podendo resultar em morbidade e mortalidade significativas, com comprometimento da qualidade de vida de seus portadores, acarretando alterações no âmbito social, psicológico, profissional e na expectativa de vida (YAN 2009; KAPLAN, 2015). A DII é um termo amplo que designa duas principais doenças que são a doença de Crohn (CD) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Embora ambas se sobreponham, há características clínicas e patológicas distintas em relação às regiões do Trato Gastrointestinal (TGI) que podem ser acometidas, diferentes comprometimentos da camada do intestino bem como a distribuição e profundidade da inflamação (UHLIG 2014).

A DC é uma condição inflamatória crônica da mucosa intestinal que se estende por todas as camadas da mucosa da parede intestinal (transmural), com distribuição de lesões esparsas, que pode acometer qualquer parte do TGI, desde a boca até o ânus, de forma descontínua, sendo mais comum na porção terminal do íleo, ceco, área perianal e cólon (BAUMGART E SANDBORN 2007; BOUMA; STROBER, 2003). A doença é caracterizada pela formação de úlceras, estenoses, infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose, podendo promover complicações como abscessos e fístulas e evoluindo para períodos e agravamento de sintomas com cólica abdominal, diarreia, vômitos, perda de peso e febre, seguido por períodos de remissão destes sintomas, com formas distintas de manifestações em cada indivíduo (MALOY & POWRIE, 2011). Também podem ocorrer manifestações extraintestinais associadas ou isoladas e capazes de atingir a pele, a via biliar, o sistema nervoso central, as articulações e os olhos (BELTRÁN, 2005; BRAUN, 2007; BOUMA; STROBER, 2003). As fístulas perianais estão presentes em pelo menos 10% dos pacientes com DC no momento do diagnóstico, podendo acometer até 40% dos pacientes ao longo da evolução da doença (COSNES *et al.*, 2011).

A RCU é uma condição em que a resposta inflamatória e morfológica atinge somente o cólon e/ou o reto, envolvendo basicamente a camada de revestimento ou mucosa, podendo acometer também a submucosa e manifestando-se em áreas contínuas

de inflamação, ulceração, edema e hemorragia ao longo do comprimento do cólon. Há presença de sangue e muco misturado com as fezes, acompanhado de cólicas abdominais intensas, perda de peristaltismo e rigidez na parede intestinal (ORDÁS, *et al.*, 2012; BOUMA; STROBER, 2003).

Apesar da DC e a RCU compartilharem achados clínicos semelhantes e muitas vezes serem abordadas em conjunto como “doença inflamatória intestinal”, há algumas evidências de que o mecanismo de lesão intestinal ocorre de forma diferente nas duas condições. Em indivíduos com DC, as células T isoladas da mucosa se proliferam mais e expressam mais marcadores de ativação (receptor de IL-2) e apresentam maior capacidade citotóxica quando comparadas a células de pacientes com RCU. O perfil de citocinas envolvidas nas duas doenças também é diferente. Na DC remete a um padrão de resposta Th-1/Th-17, já na RCU observa-se o tipo Th-2 ou Th-2/Th-17 (STURM *et al.*, 2004).

O estilo de vida “ocidentalizado”, a depressão e o estresse são fatores que estão correlacionados com o aumento da incidência de DII (DANESE *et al.*, 2004). Alterações psicológicas podem levar a crises agudas em pessoas que já sofrem com a doença, mas não são fatores considerados responsáveis pela formação e desenvolvimento crônico desta patogênese (HOLLANDER, 2003). A DII vem sendo estudada há algumas décadas, e embora sua etiologia ainda não esteja bem elucidada, a mesma tem sido caracterizada como uma doença multifatorial (FIOCCHI, 2012).

Estudos sugerem que existe uma combinação e uma interação complexa de alguns fatores como a predisposição genética, a disfunção da barreira epitelial, principalmente com a redução dos níveis de muco e mucinas, secretados pelas células caliciformes as quais podem ser afetadas pelo estresse oxidativo e liberação excessiva de radicais livres formados (VEZZA *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas normais, as células caliciformes produzem continuamente mucinas para reabastecer e manter o muco na barreira intestinal. No entanto, a função destas células pode ser interrompida por vários fatores que podem afetar a integridade da barreira da mucosa intestinal (CORNICK *et al.*, 2015).

A resposta imune alterada, somado aos fatores ambientais como amamentação, tabagismo, idade, apendicectomia, estresse, dieta, álcool, sedentarismo e exposição a medicamentos como antibióticos, anti-inflamatórios não-esteroidais e anticoncepcionais

via oral (BERNSTEIN *et al.*, 2007; JOWETT *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2009) em conjunto com a microbiota intestinal são capazes de dispararem o desenvolvimento do estado crônico da doença. Desta forma, nenhum dos fatores de risco por si só são suficientes para o desenvolvimento desta condição patogênica, mas sim interações complexas entre cada um desses fatores contribuem juntamente para seu desenvolvimento (WIRTZ *et al.*, 2007; ANANTHAKRISHNAN, 2015).

Dentre estes fatores, tem-se reconhecido que o estresse oxidativo causado pela produção excessiva de radicais livres desempenha importante papel no desenvolvimento destas doenças e que sua correção pode representar melhora da resposta dos pacientes em tratamento. O sistema de defesa enzimático está presente nas células e consiste no mais importante componente de defesa contra radicais livres. As principais enzimas desse sistema são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutaciona peroxidase (GPx) e a glutaciona redutase (GSR), que em condições fisiológicas estão balanceadas e são capazes de manter controlado o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN). Qualquer alteração nos níveis dessas enzimas pode contribuir para o desenvolvimento de um processo inflamatório (KRUIDENIER *et al.*, 2003). Há evidências clínicas e experimentais de que a inflamação crônica está diretamente associada a uma alta produção de EROs e ERN, assim como com a diminuição dos antioxidantes endógenos, envolvendo alterações na atividade de enzimas como SOD, CAT, GSR e GPx (BIASI *et al.*, 2013; ZHU e LI, 2012). Os radicais livres desempenham um papel na gênese e manutenção da DII, uma vez que essas substâncias oxidantes são responsáveis por morte celular, mutações genéticas e alterações no metabolismo celular, especialmente por promoverem peroxidação de lipídeos de membrana, além de reduzirem a produção de mucinas. A camada de muco protege a mucosa e o lúmen cólico das espécies reativas de oxigênio, uma vez que o muco produzido é responsável por proporcionar uma separação física entre a camada de células epiteliais e o conteúdo luminal. O estresse oxidativo ao causar a diminuição da produção de muco é responsável pela junção dessas duas camadas, causando danos à mucosa (BROWNLEE *et al.*, 2003).

O organismo humano possui mecanismos capazes de retardar o estresse oxidativo produzindo antioxidantes que são naturalmente produzidos de forma endógena ou obtidos externamente através da ingestão de alimentos e suplementos (JANG, 2008). O consumo regular de alimentos como frutas e verduras, tem sido cada vez mais estudado e evidenciado como uma potencial fonte de antioxidantes naturais, possuindo propriedades

de diminuir e/ou prevenir o risco de desenvolvimento de câncer, doenças inflamatórias e doenças crônicas degenerativas causadas e/ou agravadas por agentes oxidantes (CHLUDIL *et al.*, 2008; PASTENE, 2009). Diante disso, alimentos que contenham a presença de compostos bioativos, tem-se mostrado uma boa alternativa de proteção para o corpo humano contra os radicais livres, atuando na prevenção e no tratamento de muitas doenças crônicas (VALKO *et al.*, 2007).

Em adição, a DII tem assumido o caráter de doença poligênica visto que mais de 163 genes já foram identificados para RCU e DC. Alguns deles são exclusivos, outros são comuns em ambas as doenças. Parentes de pessoas portadoras de DC e RCU tem respectivamente 10 e 8 vezes mais chances de vir a desenvolver a doença (SCHLIOMA & JAIME, 2016).

A hipótese da higiene postula que a menor exposição a microorganismos na infância resulta em maior vulnerabilidade a doenças imunológicas, incluindo a DII, em virtude do papel das bactérias no desenvolvimento das células T regulatórias (SHAW *et al.*, 2010).

Sabe-se que o TGI é um ambiente complexo e dinâmico, abrangendo um grande número e variedade de microrganismos comensais. Esse microecossistema se encontra equilibrado na homeostase, formando uma defesa natural contra a invasão de organismos patogênicos. Recentemente, a investigação centrou-se no papel importante que a microbiota intestinal exerce na manutenção da saúde (ANDREW *et al.*, 2011). A microbiota intestinal é considerada complexa, não só pela diversidade de espécies de microrganismos que habitam o intestino, como também pela forma como eles interagem entre si e o hospedeiro (LOZUPONE *et al.*, 2012). Ela é composta por inúmeras bactérias, vírus e fungos que em condições normais estão presentes no intestino, sendo estes patogênicos e benéficos, e que tem um importante papel na homeostase intestinal (LEE *et al.*, 1999).

A perda do equilíbrio da microbiota está relacionada com a perda da barreira intestinal que está diretamente ligada a causa de processos inflamatórios, invasão de microrganismos e seus metabólitos que são responsáveis pelo aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e desencadeamento de resposta imune (KAU *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2012). A disbiose pode ocorrer por influência de diversas particularidades, tais como o estilo de vida moderno, aspectos relacionados ao saneamento básico, urbanização, uso excessivo de antibióticos, vacinação, sedentarismo,

entre outros (BERNSTEIN E SHANAHAN, 2008). Um dos fatores mais importantes que afetam a diversidade da microbiota intestinal é a dieta, especialmente com o alto consumo de açúcares, gordura animal e ferro, que estimulam o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, enquanto que a ingestão de fibras pode ser capaz de aumentar a população de bactérias aparentemente benéficas ao hospedeiro (CLAESSON *et al.*, 2012).

Pacientes com DII apresentam redução na diversidade da microbiota que ainda é pouco compreendida, no entanto há evidências de disbiose na composição da microbiota de portadores da doença com diminuição da diversidade de bactérias benéficas e aumento de bactérias patogênicas colocando em risco a integridade da barreira epitelial (BOUMA & STROBER, 2003). Além disso, a pobreza de bactérias na flora intestinal a tornaria mais susceptível a variações decorrentes de alterações no ambiente, como uso de medicamentos ou infecções agudas do TGI (WALKER *et al.*, 2011).

Quanto a epidemiologia da DII, as taxas de incidência são maiores em países desenvolvidos e mais industrializados como no Nordeste europeu, América do Norte e Austrália. Isso sugere que mudanças no estilo de vida como o consumo de dietas mais industrializadas, menor exposição a microorganismos patogênicos pela melhora nas condições higiênico-sanitárias, maior acesso ao uso de antibióticos e outros medicamentos são fatores que podem influenciar o surgimento da doença (SCHLIOMA & JAIME, 2016). Estima-se que 5% da população ocidental é portadora dessas doenças (KAPLAN, 2015). Populações anteriormente consideradas de “baixo risco”, como Japão e Índia, estão testemunhando um aumento da incidência, mostrando que a doença está aumentando em diferentes regiões do mundo, indicando sua emergência como doença global. Esse incremento tem sido associado a mudanças dos hábitos alimentares, estilo de vida, sedentarismo e estresse, bem como alterações maléficas na microbiota intestinal pelo uso de antibióticos principalmente na infância (ANANTHAKRISHNAN, 2015).

Dados epidemiológicos mostram ainda que a RCU é mais comum do que a DC (MARSHALL, 2008) e dados recentes indicam que a incidência de DII está em um range de 100-200 casos para cada 100.000 indivíduos na Europa e na América do Norte. Nos Estados Unidos mais de 1 milhão de pessoas apresentam a doença, enquanto que na Europa o número de portadores é de 2,5 milhões (KAPLAN, 2015; ANANTHAKRISHNAN, 2015).

No Brasil, apesar de existirem poucos estudos que analisam os aspectos epidemiológicos da DII, há evidências de aumento de sua incidência nos últimos anos, se aproximando aos níveis de países desenvolvidos (MOLODECKY *et al.*, 2012). Um estudo de Victoria *et al.* (2009) realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, mostrou que a maioria dos pacientes atendidos eram caucasianos e residiam em centros urbanos, dos quais 65% eram portadores de RCU e 25% de DC, ocorrendo cerca de 14,81 casos para RCU e 5,65 casos para DC para cada 100.000 habitantes. Apesar desses números estarem abaixo da prevalência mundial, representam um aumento considerável no número de casos em países com menor desenvolvimento.

É importante ressaltar que não existe cura definitiva para DII nem mesmo por processos cirúrgicos (FIOCCHI, 2012). A terapêutica atualmente utilizada tem como alvo inibir eventos da cascata inflamatória, com o objetivo de induzir ou manter o paciente em remissão dos sintomas e atenuar os efeitos da doença. A fim de alcançar esses objetivos, dentre os fármacos usados destacam-se os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores (YAMAMOTO-FURUSHO, 2007) e a terapia biológica, tais como os anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  (MORRISON, 2009). Entretanto, o uso dos fármacos disponíveis está associado a problemas como ocorrência de efeitos colaterais, especialmente com o uso crônico de glicocorticoides, baixa resposta dos pacientes aos diferentes tratamentos e alto custo, como é comum com os usuários de terapia biológica (BENCHIMOL *et al.*, 2013; SIEGEL, 2011).

Em vista dessa problemática ao tratamento enfrentado pelos pacientes portadores desta doença, novas pesquisas e novas estratégias efetivas e mais seguras tem sido propostas, tanto na busca por novas estratégias de tratamento e/ou prevenção para DII quanto na busca de novos compostos. Dentre elas, incluem moduladores da microbiota intestinal, agentes antioxidantes, produtos naturais e alimentos com diferentes mecanismos de ação (DI STASI *et al.*, 2004; WITAICENIS, *et al.*, 2010; WITAICENIS *et al.*, 2012; ALMEIDA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Neste contexto, o reconhecimento popular e recentemente científico, de que alguns alimentos, particularmente frutas, vegetais e cereais promovem a saúde e podem atuar evitando ou retardando o aparecimento de doenças crônicas, permitiu o desenvolvimento de uma série de pesquisas sobre a potencialidade de uso de alimentos funcionais para o tratamento destas doenças. Os alimentos funcionais são definidos como alimentos ou nutrientes que além de promoverem sua função nutricional básica, sendo

consumido como parte da dieta normal, são capazes de apresentarem propriedades e funções importantes no organismo, mostrando um impacto positivo na saúde do indivíduo, como a redução do risco de doenças e melhora na qualidade de vida (ROBERFROID *et al.*, 2010).

Dentre os vários produtos alimentares utilizados na prevenção de doenças crônicas destacam-se os probióticos, prebióticos e simbióticos, produtos potencialmente úteis por modularem a microbiota ou afetarem outros mecanismos de proteção. Os probióticos são definidos como espécies microbianas vivas que, quando administradas em quantidades adequadas, são capazes de conferir benefícios para a saúde do hospedeiro, incluindo espécies dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* entre outros, as quais melhoram a saúde humana por meio de uma série de efeitos, principalmente modulando a resposta imune via a fermentação de produtos prebióticos (ROBERFROID *et al.*, 2010). Os produtos prebióticos são definidos como ingredientes não digeríveis, como as fibras alimentares, carboidratos, amido-resistente, fruto-oligossacarídeo e outros que estimulam o crescimento seletivo e a atividade de algumas bactérias fisiologicamente presentes no cólon as quais são reconhecidas por promoverem efeitos benéficos positivos sobre a saúde e o bem-estar (MEYER, 2015; ROBERFROID *et al.*, 2010). Os simbióticos representam a administração conjunta de prebióticos e probióticos.

Os prebióticos ao serem fermentados no intestino pelas bactérias são capazes de melhorar a homeostase intestinal, influenciando de forma benéfica a microbiota intestinal. Como produto final da fermentação anaeróbica de fibras ingeridas na dieta, são gerados metabólitos considerados benéficos para o organismo pelos seus efeitos sistêmicos, os chamados ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). De 90 a 95% dos AGCCs formados são constituídos pelo acetato, propionato e principalmente butirato. Após serem formados, eles são rapidamente absorvidos no cólon, exercendo importantes funções sistêmicas (MACFARLANE E MACFARLANE, 2011; SCOTT *et al.*, 2013; ROYALL *et al.*, 1990).

Em adição, os alimentos são fontes de compostos fenólicos, reconhecidos como substâncias não nutricionais, mas ingredientes vitais para a saúde humana visto produzirem efeitos antioxidantes. Estudos dão destaque aos compostos polifenólicos por sua capacidade de exercerem efeitos farmacológicos e dessa forma contribuir para a saúde de quem os consome. Nos últimos anos diversos compostos bioativos foram identificados pelo seu potencial antioxidante, anticancerígeno e anti-inflamatório. Dentre os compostos

polifenólicos, os flavonoides são o principal grupo. Estas substâncias consistem um grupo de compostos de baixo peso molecular amplamente distribuídos na natureza, presentes na maioria das plantas, cujos efeitos benéficos descritos na saúde humana residem principalmente na sua potente atividade antioxidante e modular células do sistema imune (COOK & SAMMAN, 1996; MILLER, 1996).

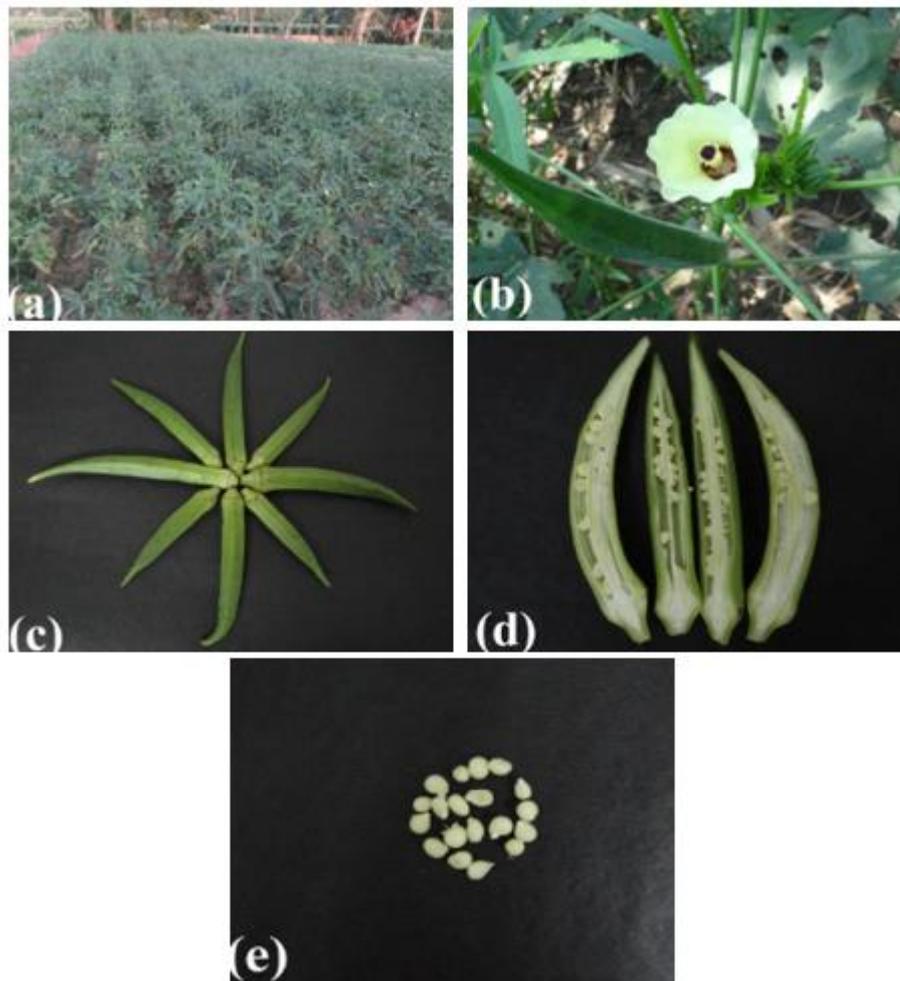
Nos últimos anos, nosso laboratório tem desenvolvido uma série de estudos e pesquisas com alimentos amplamente consumidos pela população brasileira, com foco especial no quiabo. O quiabo, *Hibiscus esculentus* Moench L. (Figura 1), é uma planta alimentar que pertence à família Malvaceae, originária da África, possivelmente da Etiópia, e incluída na dieta em várias partes do mundo (LENGSFELD *et al.*, 2004). O quiabo foi introduzido no Brasil com o comércio de escravos africanos, assim como disseminou-se pelas Américas e pelo mundo (FILGUEIRA, 2003; AGBO *et al.*, 2010). Hoje, é amplamente cultivado em regiões tropicais e subtropicais e encontra em nosso país excelentes condições para seu cultivo, sendo popularmente cultivado nas regiões Sudeste e Nordeste. Seu fruto é uma cápsula fibrosa cônica verde, mucilaginosa com muitas sementes brancas redondas, usado na culinária. É utilizado na forma de fruto imaturo, podendo ser consumido *in natura* em saladas, em conserva na forma de pickles, frito, assado ou cozido (refogado e em sopas). De modo geral, é uma hortaliça subutilizada como alimento em vários países (BURKILL, 1997; KARAKOLTSIDIS; CONSTANTINIDES, 1975; FILGUEIRA, 2003).

A planta apresenta algumas características desejáveis como ciclo rápido, o que faz com quem pode ser cultivado durante o ano todo, custo de produção viável, resistência a pragas e alto valor nutritivo (MOTA *et al.*, 2005). É um legume bem aceito no ponto de vista organoléptico e valorizado na cultura alimentar, empregado como terapêutico na medicina popular da Nigéria (JARRET; WANG; LEVY, 2011). Rico em fibras solúveis como a mucilagem e as pectinas, proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas A, B1, B2, C, cálcio, ferro, fósforo, potássio, sendo também utilizado por suas propriedades medicinais, tais como tratamento de irritações gástricas (SABITHA *et al.*, 2011), constipação, leucorreia, diabetes, icterícia, diarreia, disenteria e úlcera gástrica (CHOPRA *et al.*, 1956; KUMAR *et al.*, 2013). Além de suas vagens, as sementes do quiabo também têm importância na alimentação, como fonte de óleos e proteínas, além de terapêuticos de uso popular. Na Turquia, as sementes maduras são torradas e utilizadas como substitutas do café (CALISIR *et al.*, 2005) e na medicina popular, as sementes são

empregadas no uso terapêutico do diabetes *mellitus* (SMIT *et al.*, 2013). Na Ásia é utilizado como um aditivo mucilaginoso contra doenças inflamatórias gástricas (LENGSFELD *et al.*, 2004).

Estudos farmacológicos mostram que o consumo de seu fruto diminui a absorção de carboidratos, reduzindo níveis de glicose no sangue (COSTA, 2015), provavelmente devido à presença de polissacarídeos (TOMODA *et al.*, 1987; KAHN CHAPMAN E SMITH, 2007). O extrato de *Hibiscus esculentus* tem efeito hipoglicêmico (KHOSROZADEH *et al.*, 2016). Atividade anti-ulcerogênica também foi demonstrada através de dados histopatológicos de amostras de tecido gástrico de ratos com redução de lesão epitelial, edema, infiltração de células, hiperemia, sangramento e alterações degenerativas na mucosa gástrica (GÜRBÜZ *et al.*, 2003). O fruto imaturo também tem sido usado na medicina popular como diurético (NDJOUENKEU *et al.*, 1996), apresentando qualidades medicinais e terapêuticas reconhecidas, como o efeito laxante. Às sementes, são atribuídos benefícios como estimulante estomacal e anti-espasmódico (ANON, 2003).

Com valor energético de cerca de 36 kcal/100g, o vegetal é rico em mucilagem comumente usados como aditivo alimentar contra a irritação gástrica e doenças inflamatórias (KING & ARMSTRONG, 1934). As sementes e extratos das folhas de *Hibiscus esculentus*, apresentaram uma notável atividade antidepressiva em ensaios forçados de estresse em ratos (EBRAHIMZADEH, *et al.*, 2013) e uma potente atividade antioxidante para proteger lesões hepáticas induzidas quimicamente (ALQASOUMI, 2012). Além de ser rico em fibras, o fruto possui compostos fenólicos totais e flavonoides com capacidade antioxidante (LIAO *et al.*, 2012). O extrato do fruto tem a capacidade de resistência à fadiga e tem propriedades antienvhecimento e antioxidante (ARAPITSAS, 2008).



**Figura 1. Diferentes partes do quiabo, (a) plantação, (b) flor, (c) fruto, (d) fruto visto em corte transversal e (e) sementes. (ROY et al., 2014)**

Com base no exposto, a espécie vegetal *Hibiscus esculentus*, foi selecionada para o presente estudo, devido a seus aspectos químicos, como a presença de compostos bioativos como os da classe dos flavonoides e fibras, seus aspectos farmacológicos e etnofarmacológicos abordados na literatura para tratamento de várias condições patológicas, além de potencialmente ser um alimento funcional que pode produzir uma resposta protetora na inflamação intestinal.



***OBJETIVO***

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com a farinha obtida dos frutos de *Hibiscus esculentus* L. usando o modelo de inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.



## ***MATERIAL E MÉTODOS***

## **1. Material Vegetal**

Os frutos da espécie vegetal *Hibiscus esculentus* foram obtidos do cultivo orgânico de produtores rurais do município de Botucatu, SP no período de Fevereiro de 2016. Esses frutos foram cortados transversalmente em partes de 0.2-0.4 mm, excluindo-se os talos, colocados em bandejas para desidratação em estufa com renovação e circulação de ar forçado a temperatura de 45 ° C por 72 horas. Após desidratação, o material foi pulverizado em liquidificador para formação de um pó que posteriormente foi armazenado em câmara fria a 4°C até o preparo do extrato vegetal e da ração.

### **1.1 Obtenção do extrato vegetal**

Os frutos secos e pulverizados de *Hibiscus esculentus* foram submetidos a extração por maceração a frio utilizando etanol 70% como líquido extrator e mantidos em maceração por 48h (1:4, Kg/L). O material resultante foi filtrado em papel filtro com auxílio de bomba de vácuo e o processo de maceração repetido por mais três vezes, em ciclos de 24h. As soluções resultantes foram rotaevaporadas em pressão reduzida a 45°C até a formação de um resíduo aquoso. O líquido resultante foi colocando em um vidro âmbar e armazenado sobre refrigeração em câmara fria para posteriores análises.

## **2. Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato de *Hibiscus esculentus***

O extrato etanólico 70% de frutos secos e pulverizados de *Hibiscus esculentus* foi submetido a prospecção fitoquímica qualitativa, a fim de obter informações preliminares acerca dos principais grupos de metabólitos secundários presentes na planta em estudo. Essa abordagem tem por base a observação de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característicos para algumas classes de substâncias. Dessa maneira, os testes visaram à verificação da presença ou ausência de compostos visando à detecção de fenóis, flavonóis, flavononas, xantonas, chalconas, auronas, flavonas, leucoantocianidinas, antocianinas, antocianidinas, catequinas, taninos, cumarinas, terpenoides, saponinas e alcaloides, descrita por MATOS (1988) e adaptada por GONZALEZ & DI STASI (2002).

### **2.1. Avaliação da atividade antioxidante pelo modelo de peroxidação lipídica em membranas de cérebros de ratos**

A atividade antioxidante do extrato etanólico feito a partir da farinha dos frutos de *Hibiscus esculentus* foi avaliada pelo ensaio de peroxidação lipídica em membranas de

cérebro de ratos segundo o protocolo descrito por GÁLVEZ *et al.*, (1995) com algumas modificações.

Primeiramente, membranas de cérebro foram obtidas de ratos machos *Wistar* saudáveis de aproximadamente 2 meses de idade. Amostras de tecido foram homogeneizadas com homogeneizador automático na proporção de 1:4 (p/v) em solução tampão PBS (pH 7.4) contendo 19 partes de fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 10 mM) e 81 partes de fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 10 mM), e posteriormente centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e diluído na proporção 1:10 (v/v) na solução tampão utilizada para a homogeneização. A peroxidação lipídica foi induzida com solução de Ferro/Ácido Ascórbico (100  $\mu\text{M}$ ) e a atividade antioxidante do extrato etanólico de *Hibiscus esculentus* foi avaliada em diferentes concentrações num range de 0,71 a 363  $\mu\text{g/mL}$ , concentração final na reação. A amostra contendo extrato, membrana de cérebro e solução de Ferro/Ácido Ascórbico foi incubada à 37°C por 12 minutos em banho-maria com agitação. A reação foi interrompida com a adição do reativo tiobarbitúrico 0,5% preparado em ácido tricloroacético (TCA) 20%. O reativo tiobarbitúrico reage com o malondialdeído (MDA), que é um metabólito liberado durante a reação de lipoperoxidação, gerando uma cor cuja intensidade é determinada no espectrofotômetro. Quanto maior a intensidade da cor, maior a concentração de MDA. Assim, um composto será antioxidante quando inibir a lipoperoxidação causada pela solução de Ferro/Ácido Ascórbico, reduzindo os valores de MDA. A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) a 532 nm e utilizada para calcular a  $\text{IC}_{50}$ , ou seja, a concentração do extrato capaz de inibir 50% da peroxidação lipídica induzida nas membranas de cérebro de ratos. A quercetina foi utilizada como referência e testada nas concentrações de 1.81 a 0.11  $\mu\text{g/mL}$ .

## **2.2 Determinação da atividade sequestradora de radicais livres**

A atividade sequestradora de radicais livres foi avaliada segundo as metodologias de BLOIS (1958) e BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET (1995), com adaptações. O procedimento consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura, que absorve a 517nm. Por ação de uma substância antioxidante ou outra espécie radicalar, o DPPH• é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção. O monitoramento do decréscimo da absorbância 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 517nm. 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 (A<sub>C</sub>), 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. Os testes foram realizados em triplicata. O percentual de atividade sequestradora de radicais livres (ASRL) é então determinado com base no decaimento da absorbância das amostras e do controle, segundo a equação:

$$\text{ASRL} = [(A_C - A_{\text{amostra}})/A_C] \times 100$$

A<sub>C</sub> = Média da absorbância do controle (DPPH + água)

A<sub>amostra ou padrão</sub> = Média da absorbância da amostra (ou padrão) analisada

Em seguida, os dados encontrados foram expressos na forma de Concentração Inibitória (IC<sub>50</sub>), ou seja, quantidade necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%.

### 3. Preparo da ração

O preparo da ração foi feito misturando a farinha de frutos de *Hibiscus esculentus* com a ração de ratos em pó (Nuvilab), nas concentrações de 5% e 10% com diluição geométrica por agitação manual, até obtenção de uma mistura homogênea. Após a mistura, o material passou por uma peletizadora, obtendo assim a ração em forma de pellets enriquecida com a farinha dos frutos em estudo nas diferentes proporções (5% e 10%). Depois de peletizada, a ração foi levada à estufa a temperatura de 45°C por 72 horas. A peletização da ração foi realizada junto à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu.

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

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

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta básica</b>	<b>Dieta quiabo 5%</b>	<b>Dieta quiabo 10%</b>
Proteína bruta	22.0	20.9	19.8
Material mineral	9.0	8.55	8.1
Fibra bruta	7.0	6.65	6.3
Gorduras	4.0	3.8	3.6
Farinha de quiabo	-	5.0	10.0

### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos albinos *Wistar* pesando de 180 a 250 g, adquiridos do biotério Anilab, Paulínia-SP. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), localizado nas dependências do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências da UNESP Botucatu-SP, durante 10 dias antes do início dos experimentos, para o processo de aclimação. 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 controlado.

O protocolo e delineamento experimental foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto, segundo o Protocolo n. 2016/845 – CEEA.

### **3.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Hibiscus esculentus***

Após aclimação, os animais (n=7 por grupo), foram alojados em caixas (3-4/caixa), e alimentados com a ração enriquecida com farinha de frutos de *Hibiscus esculentus* por um total de 35 dias. Foram alimentados por 28 dias antes da indução do processo inflamatório que ocorreu no 28º dia e continuaram se alimentando por mais 7 dias. No 35º dia, os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical.

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- A) Grupo saudável: animais sem indução do processo inflamatório intestinal que receberam dieta padrão;
- B) Grupo controle-TNBS: animais que receberam dieta padrão e indução do processo inflamatório intestinal no 28º dia;
- C) Grupo dieta 5%: animais que receberam dieta enriquecida com 5% da farinha de frutos de *Hibiscus esculentus* e indução do processo inflamatório intestinal no 28º dia;

D) Grupo dieta 10%: animais que receberam dieta enriquecida com 10% da farinha de frutos de *Hibiscus esculentus* e indução do processo inflamatório intestinal no 28º dia.

### **3.2.1. Indução do Processo Inflamatório Intestinal**

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por MORRIS *et al.* (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos ao período de jejum de 12 horas e posteriormente anestesiados com uma solução de Ketamina-Xilazina na concentração de 116 mg/ml de ketamina e 23 mg/ml de xilazina, de modo a permitir a administração do anestésico na proporção ideal anestésica de 50 mg/kg de ketamina e 7mg/kg de xilazina por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracólica) com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2 mm, pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm) de 0,25 mL de uma solução contendo 10 mg de TNBS em etanol a 50% v/v. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo durante o momento da instilação do hapteno e colocados nas caixas deitados até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo saudável foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Todos os animais foram mortos 7 dias após a indução do processo inflamatório por deslocamento cervical.

### **3.2.2. Avaliação do processo anti-inflamatória intestinal**

Após serem mortos, os cólons foram extraídos e analisados quanto aos danos intestinais, considerando-se parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos.

#### **3.2.2.1. Análises macroscópicas**

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados diariamente em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas. Após a morte dos animais, os cólons foram extraídos e analisados quanto ao peso e o comprimento cólico, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da severidade e extensão do dano intestinal, de acordo com escore macroscópico descrito por BELL *et al.* (1995). (Tabela 2).

**Tabela 2.** Critério de avaliação da severidade da lesão cólica.

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

### 3.2.2.2. Análises microscópicas

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório cólico, amostras de tecido localizadas a 0,5 cm adjacentes à área de lesão foram coletadas e fixadas em ALFAC (álcool 80%, formaldeído e ácido acético) por 48 horas para processamento histológico. Após fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações etanólicas crescentes, diafanizadas em xilol incluídas em parafina, cortadas em micrótomo de maneira seriada (3µm de espessura), desparafinizadas e reidratadas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à coloração em eosina-hematoxilina para a análise morfológica das lesões e determinação do índice de lesão microscópica de acordo com método descrito por STUCCHI *et al.*, (2000). (Tabela 3).

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

com KOH 0,1 M durante 30 min e depois ácido periódico 1 mM, antes do reagente de Schiff.

As lâminas histológicas foram observadas no microscópio óptico e microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.3 e 3.40 no aumento 2.5X, 5X, 10X e 20X.

### 3.2.2.3. Escore microscópico

As análises morfológicas das lesões e a determinação do escore foi realizada com base nos parâmetros propostos por Stucchi *et al.*, (2000). (Tabela 3).

**Tabela 3.** Critérios de avaliação de escore microscópico da lesão cólica.

Parâmetro	Critérios para avaliação
Mucosa	1. Infiltração de neutrófilos: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 2. Infiltração de linfócitos: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo
Criptas	3. Atividade mitótica: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 4. Infiltração de neutrófilos: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 5. Depleção de muco: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo
Submucosa	6. Infiltração de plasmócitos: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 7. Infiltração de neutrófilos: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 8. Vascularização: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo
Ulceração	9. Ulceração: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 10. Deposição de fibrina: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 11. Neutrófilos na submucosa: (0) Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo 12. Edema na submucosa: Nenhum, (1) Leve, (2) Moderado, (3) Severo

Escore máximo: 36

#### **3.2.2.4. Análises bioquímicas**

Após as análises macroscópicas, o cólon foi dividido em 7 fragmentos longitudinais e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para determinação de proteínas e atividade da fosfatase alcalina, avaliação da atividade da mieloperoxidase, e para determinação dos níveis de glutathione total. Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal cólica, sendo que a homogeneização foi realizada a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflón e um recipiente de vidro de 10 ml de capacidade. Nas análises bioquímicas foram avaliados os seguintes parâmetros:

##### **A) Atividade de mieloperoxidase (MPO)**

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase em amostras de cólon, foi realizada pelo método de KRAWISZ; SHARON; STENSON (1984). A atividade da mieloperoxidase é utilizada como marcador de infiltração de neutrófilo, mesmo que essa enzima não seja específica desse tipo celular. A determinação foi realizada em um dos fragmentos de cólon cortados longitudinais e homogeneizados com tampão HTAB, (brometo de hexadeciltrimetilamônio), o qual funciona como um detergente, por sua capacidade de facilitar a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, locais nos quais estão armazenadas. Foi determinado o incremento de absorvância a 450nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de mieloperoxidase (U) foi considerada como aquela que degrada 1nmol/min de peróxido de hidrogênio a  $25^{\circ}\text{C}$ . Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

##### **B) Determinação do conteúdo de glutathione total (GSH)**

A quantificação de glutathione total foi feita, utilizando uma amostra de tira de cólon coletada após a morte dos animais que foi imediatamente armazenada em 1 mL de ácido tricloro acético (TCA), realizada pelo método descrito por ANDERSON (1985) que está baseado na oxidação da glutathione reduzida (GSH) presente em uma amostra para a sua forma oxidada (GSSG), através da incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 412nm. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathione reductase na presença de NADPH.

A GSH formada se oxida novamente, gerando assim, um ciclo, no qual a velocidade de redução do DTNB é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH + GSSG). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. de nmoles de glutathiona total por grama de tecido (nmoles de glutathiona/g de tecido).

### **C) Determinação de proteína total e da atividade da fosfatase alcalina**

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos clássicos descritos por SMITH; HARRIS; PETERS (1984) e BESSEY; LOWRY; BROOK (1946). A determinação de proteínas foi espectrofotometricamente determinada a 562nm e foi realizada pela reação de ácido bicinchonínico e sulfato de cobre que forma coloração roxa após incubação a 37 °C por 25 minutos. A determinação de fosfatase alcalina foi realizada através do uso de p-nitrofenilfosfatodissódico como substrato na presença de tampão glicina 50 mM (pH 10,5) com 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub> que adquire coloração amarelada após incubação a 37 °C por 25 minutos, que é detectada a 405nm. O cálculo da fosfatase alcalina é baseada na quantidade de proteínas totais e expressa em mU/ mg de proteína.

### **3.3.Análise Estatística**

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



***RESULTADOS***

## **1. Rendimento de *Hibiscus esculentus***

A coleta de *Hibiscus esculentus* forneceu 30 kg de frutos inteiros que foram utilizados para a preparação da farinha em pó. Após pulverização, se produziu 3,4 kg de farinha, o que caracteriza um rendimento de 11,25% em relação ao peso fresco.

## **2. Análise fitoquímica quantitativa**

Com a realização da prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico 70% de farinha de *Hibiscus esculentus* os resultados obtidos demonstraram que o extrato contém essencialmente fenóis, taninos, flavonóis, flavononas, xantonas, terpenóides. As demais classes de substâncias investigadas como chalconas, auronas, leucoantocianidinas, antocianidinas, antocianinas, catequinas, cumarinas e saponinas não foram detectadas, como observado na Tabela 4.

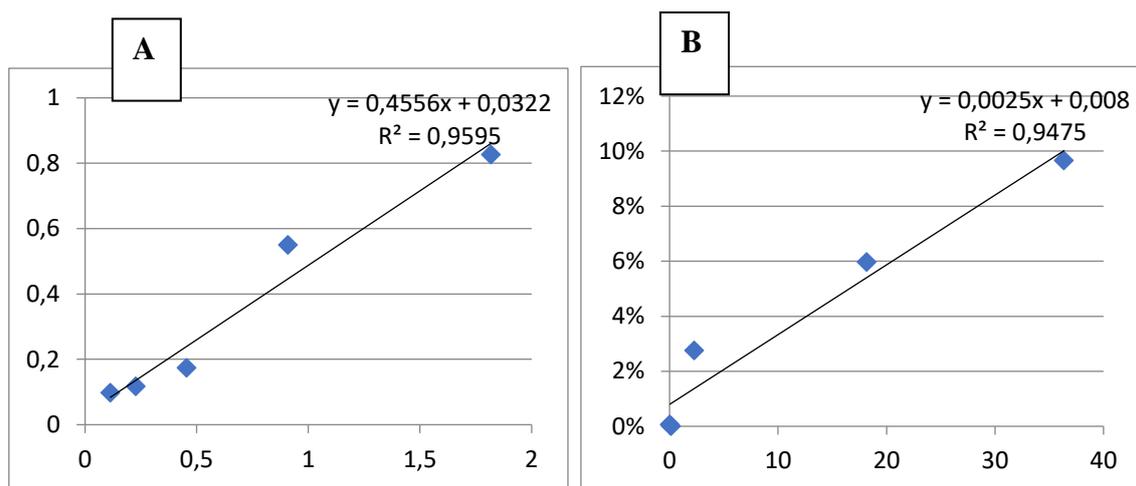
**Tabela 4:** Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico 70% de *Hibiscus esculentus*

Classe de compostos	Ensaio	Tipo de observação	Extrato
<b>Fenóis</b>	FeCl <sub>3</sub>	Coloração variável entre azul e vermelho	+
<b>Flavonóis</b>	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH 1N	Coloração amarela	+
<b>Flavononas</b>	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH	Coloração vermelho-laranja	-
<b>Xantonas</b>	HCl	Coloração vermelha	+
	NaOH 1N	Coloração amarela	+
<b>Chalconas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 1N	Coloração vermelha-púrpura	-
<b>Auronas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 1N	Coloração vermelha-púrpura	-
<b>Flavonas</b>	NaOH 1N	Coloração amarela	+
<b>Leucoantocianidinas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
<b>Antocianinas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 0,2 %	Coloração lilás	-
	NaOH 1N	Coloração azul púrpura	-
<b>Antocianidinas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 0,2 %	Coloração lilás	-
	NaOH 1N	Coloração azul púrpura	-
<b>Catequinas</b>	HCl	Coloração pardo-amarelada	-
<b>Taninos</b>		Precitado escuro de tonalidade azul (taninos pirrogálicos)	-
	FeCl <sub>3</sub>	Precipitado verde (taninos flobatênicos)	+
	Albumina	Formação de precipitado	+
<b>Cumarinas</b>	KOH N	Fluorescência azulada em exposição à luz UV (360 nm)	-
<b>Terpenoides</b>	Liebermann-Buchard	Coloração azul evanescente seguida de verde permanente (esteroides)	+
		Coloração entre pardo e vermelho (triterpenoides)	+
<b>Saponinas</b>	Agitação	Espuma persistente e abundante	-
<b>Alcaloides</b>	Hager	Precipitado característico	-
	Mayer	Precipitado característico	-
	Dragendorff	Precipitado característico	-

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

### 3. Análises antioxidantes

O extrato etanólico 70% de frutos secos e pulverizados de *Hibiscus esculentus* apresentou atividade antioxidante no modelo de inibição da peroxidação lipídica induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico em membranas isoladas de cérebro de ratos, onde a IC<sub>50</sub> foi de 196,8µg/ml para o extrato. No mesmo teste, a quercetina, flavonoide antioxidante usado como referência, apresentou IC<sub>50</sub> de 1,02µg/ml.

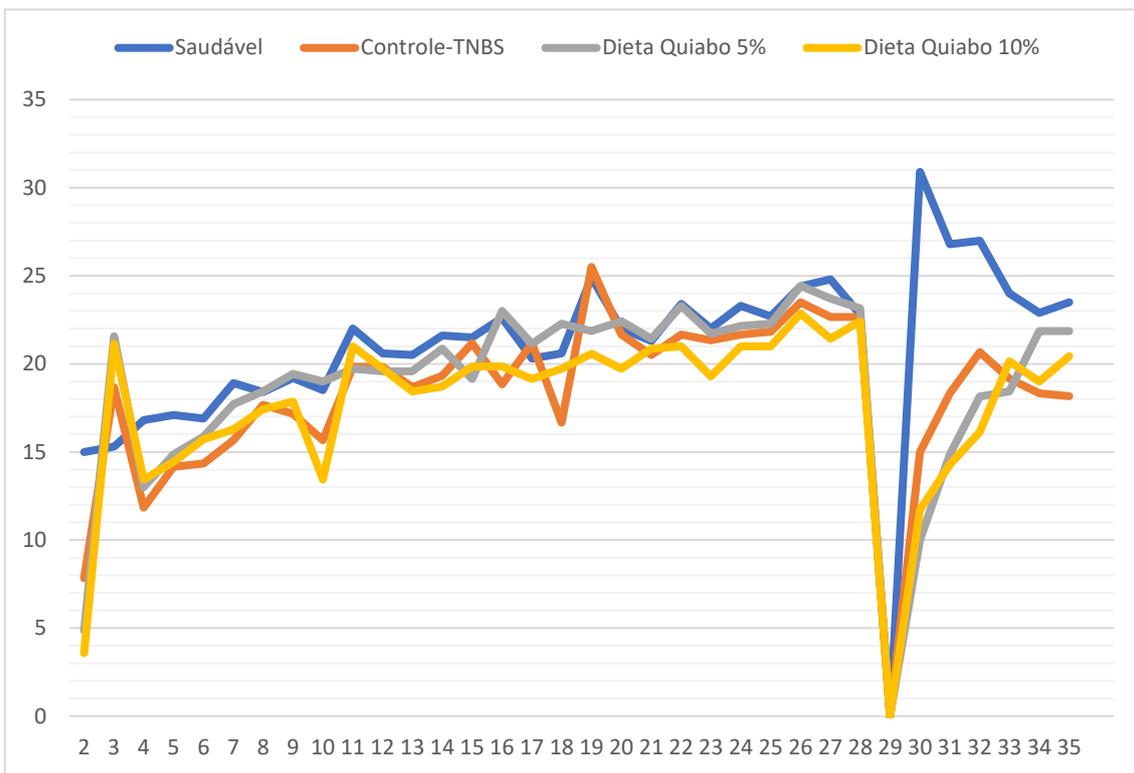


**Figura 2. IC<sub>50</sub>=1,02µg/ml da quercetina (A) e IC<sub>50</sub>=196,8µg/ml do extrato etanólico 70% de frutos secos e pulverizados de *Hibiscus esculentus* (B).**

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada utilizando o modelo do DPPH (2,2-difenil- 1-picrilhidrazil) e demonstrou que o extrato apresenta uma IC<sub>50</sub> de 302.68ug/ml em comparação ao controle ácido gálico que apresentou IC<sub>50</sub> de 1.89ug/ml.

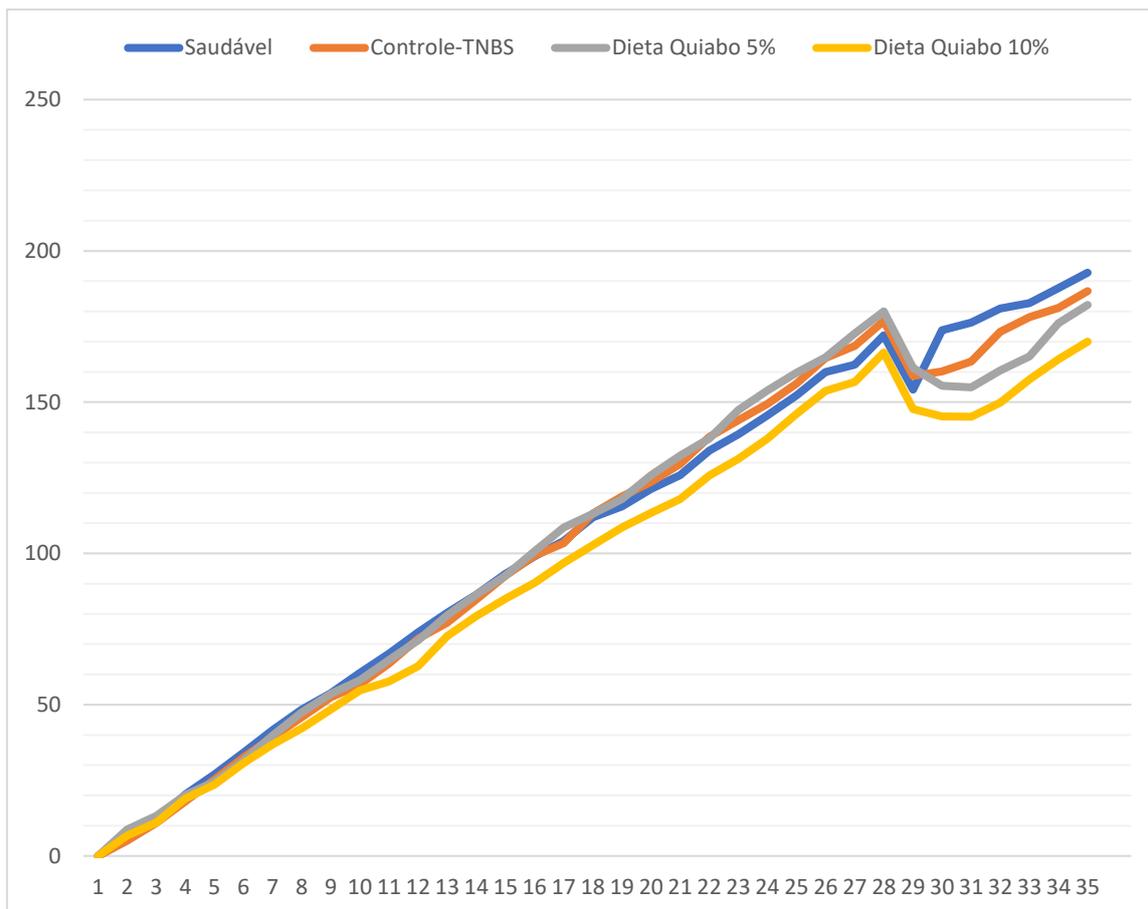
### 4. Análises macroscópicas

Durante o protocolo experimental de 35 dias, os animais foram avaliados diariamente quanto ao consumo de ração e peso corpóreo. Em relação ao consumo de ração do 1º ao 28º dia, os grupos apresentaram um consumo semelhante ao da ração padrão, pressupondo-se que a dieta enriquecida com frutos de *Hibiscus esculentus* foi palatável e aceita pelos animais, tanto na concentração de 5% como na de 10%. Em decorrência do jejum de 12 horas (28º dia) para indução do processo inflamatório, ocorreu uma queda no consumo de ração. Com exceção dos animais do grupo saudável que restabelece o consumo no mesmo dia, o consumo de redução foi normalizado após o 32º dia. (Figura 3).



**Figura 3. Consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=7).**

Quanto ao peso corpóreo dos animais, foi observado que todos os grupos apresentaram um ganho gradativo de peso semelhante aos animais saudáveis, desde o início do experimento (1º dia) até o dia anterior à indução do processo inflamatório intestinal (28º dia). Os animais do grupo saudável, após o jejum voltaram a ganhar peso novamente (30º dia), enquanto que os animais que sofreram a indução do processo inflamatório intestinal, tanto o grupo controle-TNBS, quanto os grupos que receberam dieta enriquecida nas proporções de 5% e 10% apresentam uma perda de peso (não significativa) nos primeiros dias após a indução com consequente recuperação a partir do 31º dia. (Figura 4).



**Figura 4. Média do ganho de peso corpóreo dos animais. Dados expressos em média em gramas (Peso final –Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=7).**

Quanto aos parâmetros macroscópicos, diarreia, escore, extensão da lesão e relação peso/comprimento cólico, inicialmente se observa que ocorre de forma nítida a instalação do processo inflamatório quando se compara os parâmetros entre os grupos saudável e controle-TNBS. Nos grupos tratados com a dieta, foi observada uma diferença significativa na extensão da lesão e na relação do peso/comprimento dos animais que receberam a dieta na concentração de 10% (Tabela 5). Apesar de não haver diferença estatística significativa nos outros parâmetros analisados, os animais que receberam a dieta enriquecida na concentração de 5% apresentaram valores inferiores em comparação com o grupo controle-TNBS.

Quanto aos parâmetros de diarreia e aderência aos órgãos adjacentes, os animais que receberam a dieta na concentração de 5% tiveram uma diminuição da aderência de órgãos adjacentes significativa em comparação ao grupo controle-TNBS. Já no parâmetro diarreia, não foi observada nenhuma diferença nos grupos tratados em relação ao grupo controle-TNBS.

**Tabela 5.** Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* (5% e 10%) no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore macroscópico (0-10) <sup>a</sup>	Extensão da lesão (cm) <sup>b</sup>	Relação peso/comprimento (mg/cm) <sup>b</sup>	Diarreia (%) <sup>c</sup>	Aderência (%) <sup>c</sup>
Saudável	<b>0*</b>	<b>0*</b>	<b>99,14±5,34*</b>	<b>0*</b>	<b>0*</b>
Controle – TNBS	<b>7 (6-9)</b>	<b>3,21±0,31</b>	<b>212,8±14,97</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Dieta Quiabo 5%	<b>6 (6-8)</b>	<b>3,03±0,14</b>	<b>194,1±13,01</b>	<b>100</b>	<b>36,36*</b>
Dieta Quiabo 10%	<b>6 (4-7)</b>	<b>2,14±0,24*</b>	<b>172,9±8,08*</b>	<b>100</b>	<b>72,72</b>

**a** Valores de escore expressos em mediana (intervalo) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, **b** extensão da lesão e relação peso/comprimento cólico expressos em média ± E.P.M. e analisados por (ANOVA) seguida por teste *a posteriori* de Dunnett. **c** Valores de diarreia e aderência expressos em (%) e foram analisados por teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo controle-TNBS onde \*\*<0,01 e \*<0,05.



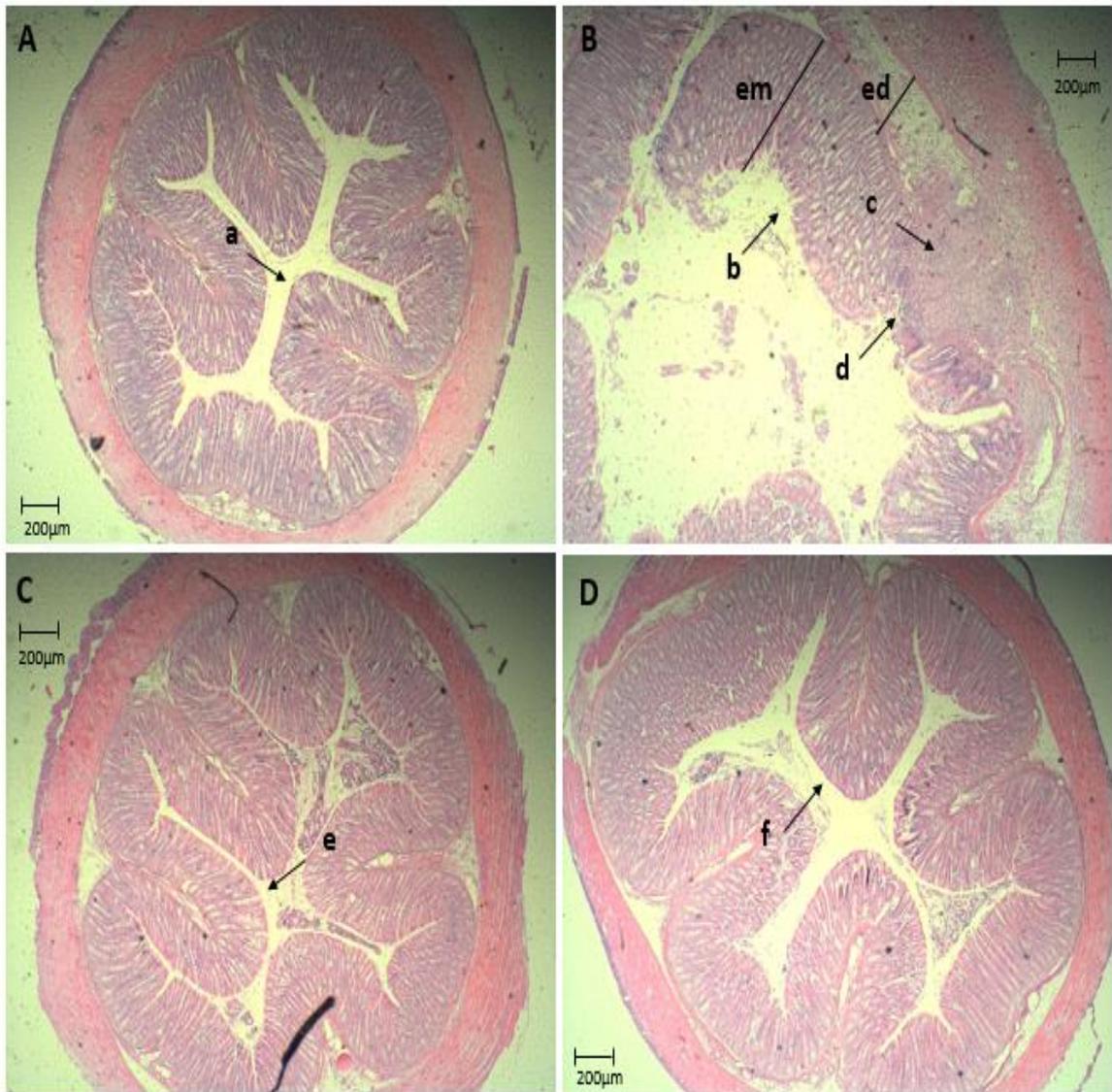
**Figura 5.** Fotografia do cólon de animal do grupo controle-TNBS. Fotografia tirada por **Oliva, 2017.**

A indução do processo inflamatório intestinal através da administração intracólica de TNBS resultou em um processo inflamatório severo com danos na mucosa do epitélio intestinal que pode persistir em uma lesão completa que se estende de 3.8-5.8 cm do cólon promovendo espessamento e hiperemia na parede intestinal, como pode ser observado em uma amostra de cólon ilustrada na Figura 5.

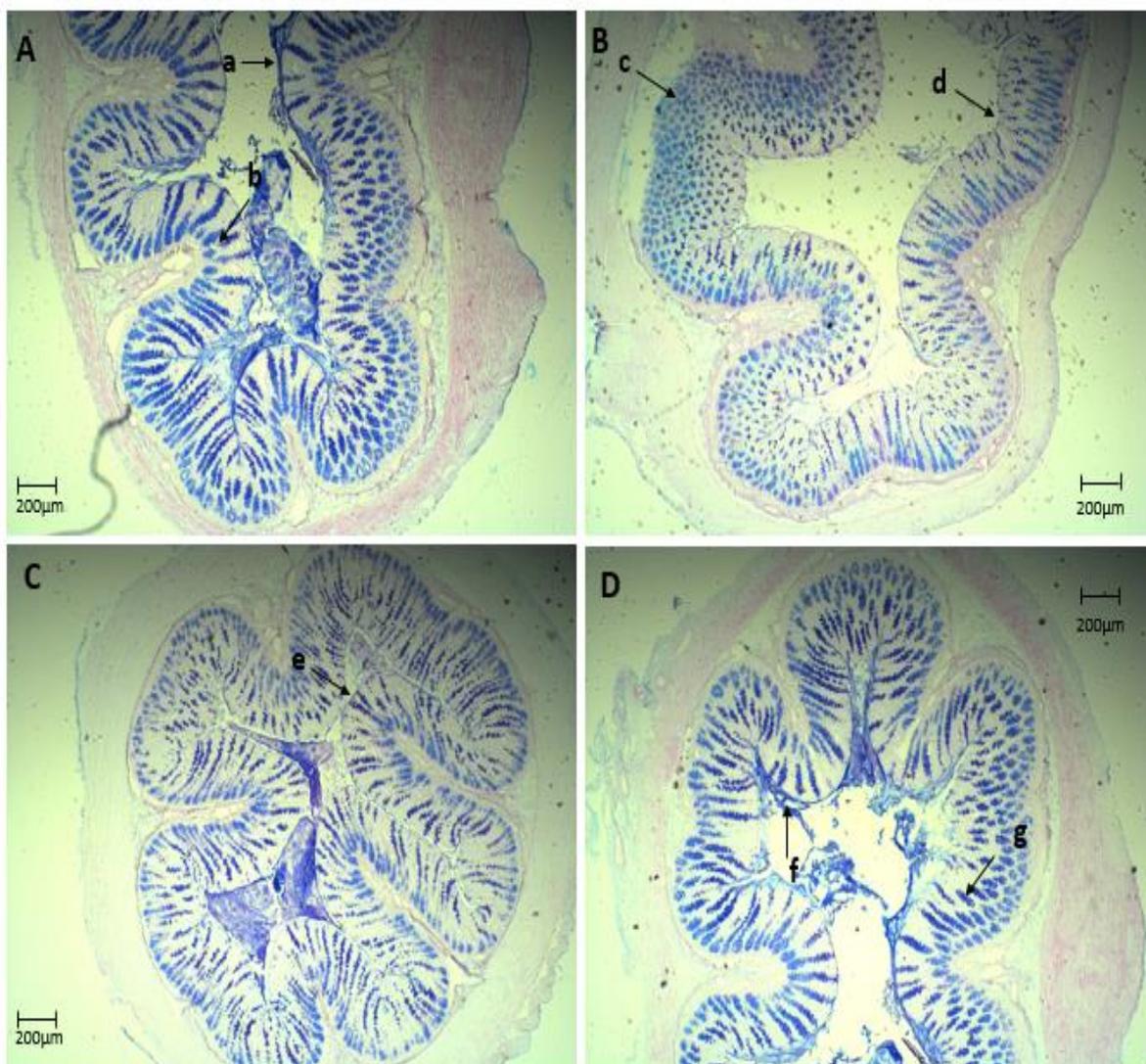
## 5. Análises microscópicas

As fotomicrografias da mucosa cólica coradas com hematoxilina e eosina mostraram no grupo saudável que o epitélio intestinal estava intacto com sua morfologia típica e citoarquitetura inalterada (seta a). No grupo controle-TNBS ocorreu uma redução na integridade da membrana, mostrando que o TNBS afeta a citoarquitetura intestinal (seta b), promovendo áreas de ulceração e rompimento da membrana celular (seta d), espessamento da mucosa (em), edema na submucosa (ed), e infiltrados de células inflamatórias (seta c). Nos animais que receberam a dieta nas concentrações de 5% e 10% foi notável a recuperação da citoarquitetura do cólon com restauração da mucosa muito semelhante aos animais saudáveis (seta e e seta f). (Figura 6).

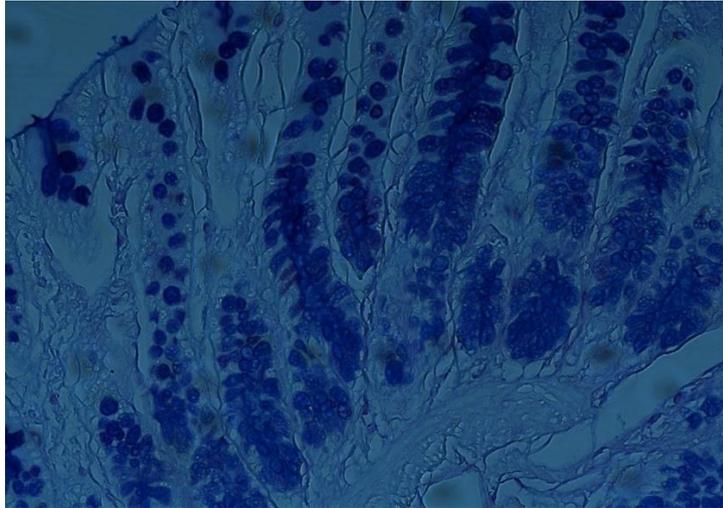
Nas fotomicrografias da mucosa cólica de animais saudáveis coradas com PAS/Alcian Blue é evidente a presença de várias células caliciformes repletas de muco (Figura 8 e seta b/Figura 7), combinadas com uma camada de muco ligada a membrana (seta a/Figura 7). No grupo controle-TNBS observou-se claramente que houve depleção de muco, evidenciado pela coloração de azul mais claro (seta c/Figura 7), e redução da camada de muco ligada a membrana (seta d/Figura 7). No grupo que recebeu a dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* na concentração de 5% foi mantida a produção de muco de forma que podemos considerar intermediária entre os grupos saudável e controle-TNBS, como evidenciado pela presença de células caliciformes (seta e/Figura 7) e uma camada fina na superfície celular indicando o muco de ligação de membrana. Na concentração de 10% é evidente que foi evitada a depleção de muco pelas células caliciformes em relação ao grupo controle-TNBS (seta g/Figura 7) e há uma camada mais espessa na superfície celular indicando o muco de ligação de membrana (seta f/Figura 7).



**Figura 6.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos de diferentes grupos experimentais 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 2.5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 5% e (D) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 10%.

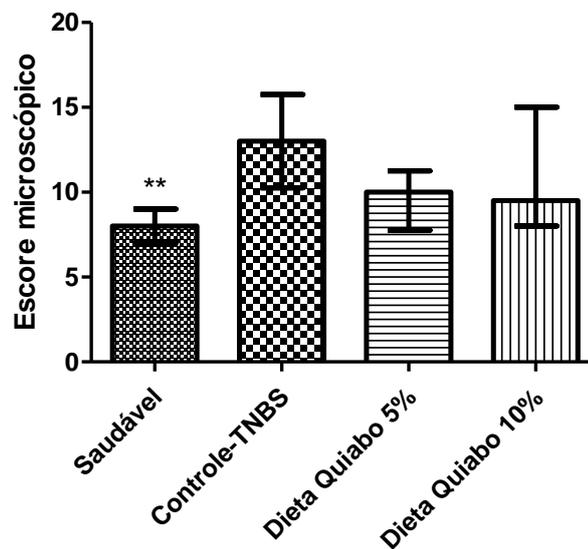


**Figura 7.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos de diferentes grupos experimentais 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com PAS/Alcian Blue. Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 2.5X. (A) Grupo saudável, (B) Grupo controle-TNBS, (C) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 5% e (D) Grupo dieta *Hibiscus esculentus* 10%.



**Figura 8. Fotomicrografia da mucosa do cólon de rato do grupo saudável. Células caliciformes produtoras de mucina. Corte corado com PAS/Alcian Blue. Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 40X.**

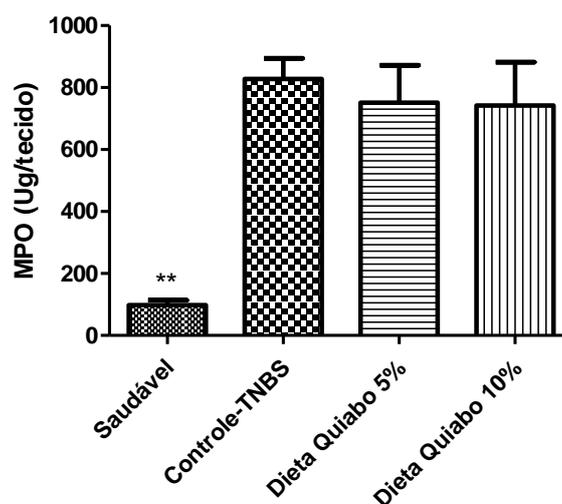
Com base nas fotomicrografias das mucosas cólicas coradas com hematoxilina e eosina, foi estabelecido um escore microscópico geral (Figura 9), onde se observou claramente que houve um aumento significativo entre os animais do grupo controle-TNBS e saudáveis, o qual não foi reduzido após tratamento com a dieta em ambas as concentrações.



**Figura 9. Escore microscópico expresso em mediana, analisados estatisticamente por teste a posteriori de Kruskal-Wallis com teste de Dunn vs. grupo controle-TNBS, onde \*\*  $p < 0,01$ .**

## 6. Análises bioquímicas

Os animais do grupo controle-TNBS apresentaram um aumento de 8,5 vezes na atividade da enzima mieloperoxidase em relação aos animais saudáveis (Figura 10). O tratamento dos animais com a dieta enriquecida com os frutos de *Hibiscus esculentus*, tanto na concentração de 5% quanto na concentração de 10%, não promoveu diminuição significativa na atividade da enzima MPO em comparação ao grupo controle-TNBS (Figura 10).



**Figura 10.** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com  $**p < 0,01$ , analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

Em relação a determinação do conteúdo de glutathiona total cólica, foi observado que após indução do processo inflamatório ocorreu uma depleção significativa dos níveis de glutathiona cólica (Figura 10), o qual foi restabelecido com o consumo da dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* em ambas concentrações quando comparado ao grupo controle-TNBS e, alcançando níveis semelhantes aos animais do grupo saudável (Figura 11).

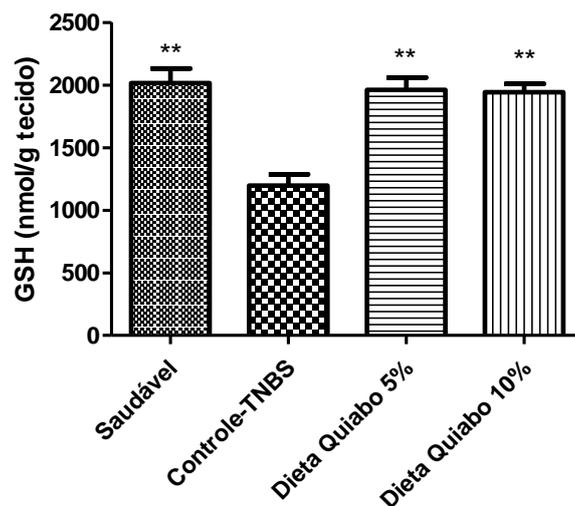


Figura 11. Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH) cólico. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$ , analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

Quanto a fosfatase alcalina, foi demonstrado um incremento de 2,8 vezes após indução do processo inflamatório cólica (Figura 11), o qual não foi reduzido com o consumo da dieta enriquecida com farinha de *Hibiscus esculentus* em relação ao grupo controle-TNBS. (Figura 12).

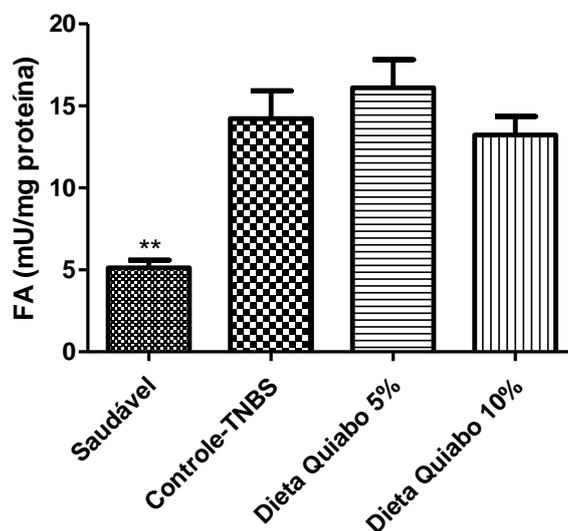
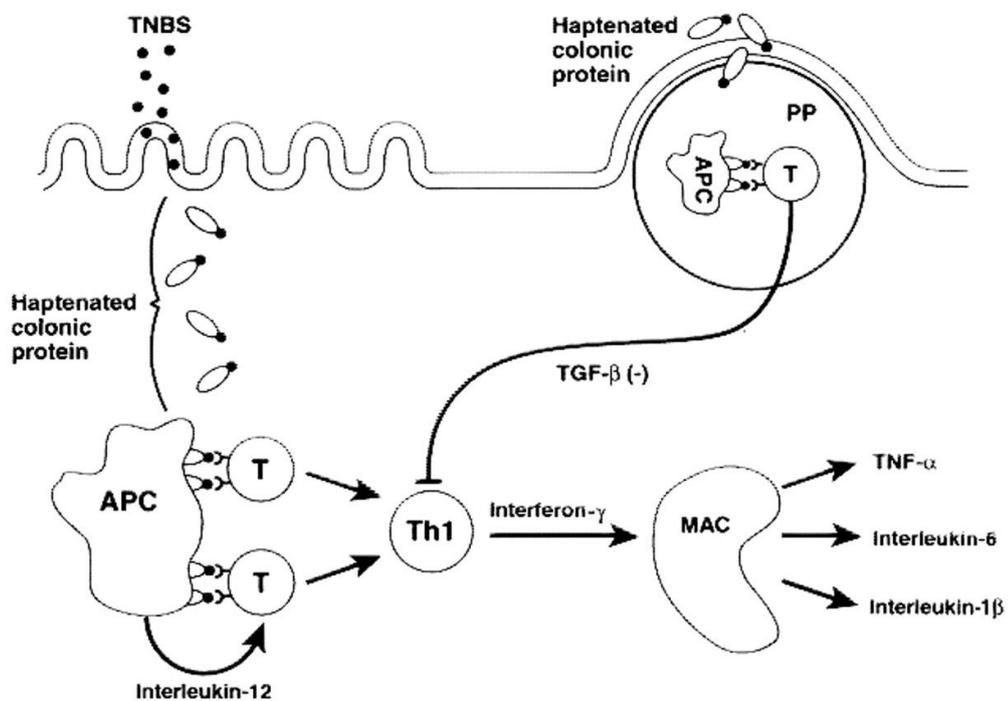


Figura 12. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA). Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com  $**p<0,01$ , analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.



*DISCUSSÃO*

A indução do processo inflamatório intestinal através da administração intracólica do TNBS ocorre pela capacidade do TNBS atuar como um hapteno, ligando-se a moléculas de alto peso molecular como as proteínas teciduais e produzindo uma resposta imunológica que caracterizará o processo inflamatório (Figura 13), que histologicamente se caracteriza pela infiltração de células polifomonucleadas, macrófagos e mastócitos na mucosa e submucosa do cólon, além de uma resposta imune mediada por Th-1 com uma grande produção de citocinas pró- inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 o que se assemelha com a DC (JURJUS *et al.*, 2004; VELDE *et al.*, 2006).



**Figura 13. Mecanismo de indução de inflamação intestinal pelo TNBS.** APC= célula apresentadora de antígeno; PP= Placa de Peyer; T=células T; MAC= macrófagos. (Strober *et al.*, 1998)

Para a produção desta resposta é necessário que o TNBS seja administrado juntamente com etanol, o qual é capaz de promover a ruptura da barreira protetora de muco intestinal, fazendo com que o TNBS consiga penetrar na mucosa intestinal para atuar como um hapteno, de forma que, sem a sua associação ao etanol o efeito inflamatório não conseguiria ser alcançado em modelos animais (MORRIS *et al.*, 1989).

O processo inflamatório cólico está associado a um aumento da relação peso/comprimento (mg/cm) do colón, além da ocorrência de outras variáveis

macroscópicos como o escore, extensão da lesão, ocorrência de diarreia, aderência do cólon a órgãos adjacentes, redução no consumo de alimento e redução do peso corpóreo dos animais. A severidade e a extensão da lesão inflamatória está aumentada nos animais que sofreram a indução por TNBS, uma vez que o aumento do tecido inflamado é um indicativo da severidade da lesão inflamatória, desse modo, a relação peso/comprimento aparece aumentada nos animais que foram induzidos pelo processo inflamatório. No presente estudo, os ratos que receberam a dieta enriquecida com farinha de *Hibiscus esculentus* na concentração de 10% apresentaram diminuição da extensão da lesão e diminuição da relação do peso/comprimento do cólon, indicando uma possível melhora do processo inflamatório nesses animais. Quanto ao escore macroscópico, não houve diferença estatística entre o grupo saudável e o grupo controle-TNBS e nem nos grupos de animais que receberam a dieta nas duas concentrações. De fato, esse é um parâmetro difícil de ser revertido uma vez que a lesão causada por esse modelo experimental de inflamação é extensa e severa (VELJACA *et al.*, 1995).

A dieta enriquecida foi palatável aos animais, uma vez que o consumo foi semelhante a dieta padrão, porém após serem submetidos a administração do TNBS, os animais apresentaram uma diminuição no ganho de peso corpóreo o que pode estar relacionado com o sintoma de dor abdominal causada pela inflamação induzida o que levou a uma redução de peso desses animais, que embora não foi significativa, é uma consequência da diminuição do consumo da ração que também pode estar associada a dores abdominais e a incidência de fezes diarreicas (CAMPOS, 2002). Estes parâmetros, consumo e peso, se reestabeleceram alguns dias após a indução do processo inflamatório.

A diarreia é um sintoma da doença tanto nos animais como em humanos, e indica a diminuição da capacidade de absorção de água na mucosa intestinal inflamada, que é bastante prejudicada durante o processo inflamatório intestinal (JURJUS *et al.*, 2004). Esse pode ser o fator responsável pela ocorrência de diarreia que ocorreu não só nos animais do grupo controle-TNBS, mas também observado em todos os animais que se alimentaram da dieta enriquecida com a farinha de *Hibiscus esculentus* nas duas concentrações. A aderência do cólon a órgãos adjacentes também é um resultado da inflamação cólica observada nos animais do grupo controle-TNBS. Nos animais que receberam a dieta na concentração de 5%, houve diminuição significativa deste parâmetro. A presença de aderências do cólon a órgãos adjacentes é o resultado da inflamação transmural, característica comum da DC em humanos (LEVINE, 1994).

Segundo ROBERFROID, 2007, um organismo pode levar de 7 a 30 dias para se adaptar a um novo alimento e desencadear um processo de modulação da microbiota intestinal, provavelmente aumentando o número de bactérias benéficas, exercendo o seu efeito prebiótico. Neste sentido, optamos pelo fornecimento da dieta de farinha de *Hibiscus esculentus* nas concentrações de 5% e de 10% por um período de 28 dias antes da indução do processo inflamatório com TNBS.

O estresse oxidativo é o causador de lesão tecidual que contribui para a patogênese de diversas doenças, dentre elas a DII. Isto reforça a pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante, estratégias para inibir os radicais livres como novas terapias para o tratamento destas doenças, sendo uma destas estratégias o uso de produtos naturais e/ou alimentos que visem essa ideia. Inúmeros estudos com alimentos funcionais indicam que o efeito protetor destes alimentos envolve a modulação dos sistemas antioxidantes, especialmente reduzindo o estresse oxidativo assim como danos que são causados na mucosa intestinal (FRUET *et al.*, 2012; MAZZOLIN *et al.*, 2013; SCARMINIO *et al.*, 2012; WITAICENIS *et al.*, 2010; ALMEIDA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado que dietas ricas em frutas e vegetais contribuem de forma positiva em doenças crônicas e alguns tipos de câncer. Particularmente, os flavonoides apresentam efeito benéfico em uma ampla variedade de doenças (WILLIAMS *et al.*, 2004). Os mecanismos precisos pelos quais os flavonoides exercem seus efeitos biológicos ainda não estão esclarecidos, no entanto várias de suas ações biológicas têm sido atribuídas as suas propriedades antioxidantes que potencialmente influenciam o estado redox intracelular e a capacidade de eliminação de radicais livres (SCHERER *et al.*, 2009; RICE-EVANS *et al.*, 2001).

Além de seu valor nutritivo, muitos alimentos de origem vegetal contêm compostos químicos não nutritivos que exibem propriedades benéficas à saúde (DOVICH I e LAJOLO, 2011). Neste sentido, *Hibiscus esculentus* tem sido referido na como um produto antioxidante potencialmente útil na prevenção de doenças degenerativas como câncer e distúrbios cardiovasculares (ATAWODI *et al.*, 2009). Seu uso também é relatado na medicina popular por exercer atividades antiulcerogênica e gastroprotetora, esses efeitos são encontrados principalmente pela diversidade de seus compostos fenólicos (ATAWODI *et al.*, 2009).

Um estudo com *Hibiscus esculentus* deu destaque aos compostos bioativos presentes na planta. HAJIAN *et al*, 2016 em seu estudo destacou a presença de compostos fenólicos como fitoesteróis e catequinas e compostos como triterpenos nos frutos desta espécie. Devido a esta composição, onde alguns desses compostos estão presentes na semente e outros na mucilagem, HAJIAN *et al*, 2016 observaram efeitos hipoglicemiantes e redução de lesões pancreáticas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, tratados com a incorporação de semente de *Hibiscus esculentus* em pó ou extrato de mucilagem da planta na dieta desses animais.

Na prospecção fitoquímica quantitativa do extrato etanólico 70% de frutos secos e pulverizados de *Hibiscus esculentus*, nosso trabalho demonstrou que o extrato contém polifenóis como os fenóis, taninos, flavonóis, flavononas, xantonas e terpenóides, similar ao previamente descrito por DOREDDULA *et al.*, 2014. Compostos fenólicos, incluindo flavonóides e terpenóides têm sido referidos como compostos anti-inflamatórios intestinais (GÁLVEZ *et al*, 2001; DI STASI *et al.*, 2004; WANG *et al*, 2011; RODRIGUES-ORSI *et al.*, 2014). No presente estudo, verificamos que as propriedades antioxidantes do quiabo foram evidenciadas tanto em estudos *in vitro* (DDPH e peroxidação lipídica), como em estudos *in vivo* (modulando GSH).

A capacidade de eliminação de radicais livres do extrato foi determinada usando o radical livre estável contendo DPPH, onde este pode aceitar um elétron ou um radical de hidrogênio, fazendo com que o elétron estranho mude de cor e se torne violeta profundo. A absorção desaparece quando o radical DPPH aceita um elétron, resultando em descoloração. A capacidade de eliminação de radicais DPPH de um antioxidante depende da doação de hidrogênio (SOARES *et al.*, 1997). O quiabo apresentou uma IC<sub>50</sub> de 302.68ug/ml, a qual pode ser considerada pequena (160 vezes) quando comparado com o ácido gálico puro, composto antioxidante de referência com uma IC<sub>50</sub> de 1.89ug/ml.

Algumas aplicações terapêuticas têm demonstrado capacidade de melhorar a DII por meio de sua capacidade antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica, tais como vitamina E (GONZÁLEZ *et al.*, 2001), os flavonoides (GÁLVEZ *et al.*, 2001), a paepalatina (DI STASI *et al*, 2004) e cumarinas (WITAICENIS *et al*, 2010, WITAICENIS *et al*, 2012).

No modelo de peroxidação lipídica utilizado, o ácido tricloroacético precipita as proteínas das amostras do cérebro de ratos, enquanto que o reativo tiobarbitúrico reage com o MDA, liberado pela lipoperoxidação causada pelo ferro e ácido ascórbico, gerando uma cor cuja intensidade pode ser determinada no espectrofotômetro. Quanto maior a intensidade de cor maior a concentração de MDA. Um composto é considerado antioxidante se inibir a lipoperoxidação causada pelo ferro e pelo ácido ascórbico, reduzindo os valores de MDA. O extrato etanólico 70% dos frutos de *Hibiscus esculentus* apresentou atividade antioxidante discreta, onde a IC<sub>50</sub> do extrato foi 160 vezes maior do que a IC<sub>50</sub> da quercetina, que é um flavonóide puro e referência como agente antioxidante.

O estresse oxidativo foi ainda avaliado por meio da determinação dos níveis cólicos de glutathiona (GSH), que é o principal sistema antioxidante não enzimático endógeno e desempenha um papel fundamental na eliminação de espécies reativas de oxigênio, além de manter o equilíbrio redox celular, levando a uma redução de estresse oxidativo (LOGUERCIO *et al.*, 2003). A GSH é importante na defesa antioxidante do organismo e estudos mostram que baixos níveis de glutathiona estão associados a degenerações severas de células epiteliais do intestino de camundongos (MASELLA *et al.*, 2005). Na DII, há uma grande produção de radicais livres e a inflamação se caracterizou por uma diminuição dos níveis de glutathiona cólicos, os quais foram modulados pela dieta com farinha de quiabo.

No modelo de indução de inflamação intestinal por TNBS é possível verificar a depleção dos níveis da glutathiona total no cólon dos animais, devido ao estabelecimento do processo inflamatório e a produção de metabólitos reativos de oxigênio causados por esse modelo de indução (KARP; KOCH, 2006). Nos animais pertencentes ao grupo controle-TNBS foi notável a depleção dos níveis de glutathiona em comparação com o grupo saudável. Os animais que receberam a dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* nas duas concentrações evitaram a depleção da glutathiona, indicando que a suplementação na dieta com a espécie em estudo, promoveu um efeito capaz de diminuir danos no cólon desses animais, provavelmente por reduzir o estresse oxidativo e seus efeitos sobre a peroxidação de lipídeos da membrana celular.

A enzima mieloperoxidase (MPO) é considerada um importante marcador bioquímico que caracteriza a infiltração de neutrófilos e a intensidade da inflamação tecidual. Essa enzima é encontrada com predominância nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (KATO *et al.*, 2003). Os neutrófilos possuem um papel efetivo na defesa

contra bactérias, mas também estão associados a processos de injúria tecidual de processos inflamatórios, por terem a capacidade de lesionar células e tecidos. O influxo de neutrófilos ativos nos sítios de inflamação lidera o processo inflamatório de diversas doenças (CARLSON *et al.*, 2002). O aumento de sua atividade está associado a inflamação devido a migração de neutrófilos que ocorre em direção à área tecidual inflamada. Sendo assim, sua atividade se encontra elevada em modelos experimentais da inflamação intestinal (SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 2004), de modo que a redução de sua atividade está associada a uma menor infiltração celular de neutrófilos com consequente resposta anti-inflamatória.

Em nosso experimento pode-se observar um aumento na atividade da enzima MPO no grupo controle-TNBS quando comparados com o grupo saudável, indicando que houve migração de neutrófilos para a área de inflamação. Entretanto, os grupos que consumiram a dieta nas concentrações de 5% e de 10% não reduziram a atividade desta enzima, indicando que os efeitos protetores deste tratamento não estão associados à modulação da atividade desta enzima ou que nas concentrações utilizadas, a farinha de quiabo não foi eficaz em modular esta resposta.

Outro mediador inflamatório na DII é a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA), uma glicoproteína de membrana que está distribuída nos tecidos do organismo (BOL-SCHOENMAKERS *et al.*, 2010). Há evidências de que a atividade dessa enzima aumenta no processo inflamatório intestinal e embora sua função fisiológica ainda não esteja bem elucidada sua atividade tem sido usada como um marcador sensível da inflamação intestinal no modelo de colite induzida por TNBS (SANCHEZ DE MEDINA *et al.* 2004). A FA está relacionada ao processo de calcificação óssea, transporte de imunoglobulinas através da placenta e transporte de fosfato nas células epiteliais do intestino (KARLSSON *et al.*, 1995), mais especificamente nos enterócitos com uma importante participação do processo de absorção de nutrientes (SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 2002). Em nosso estudo, nos animais que receberam a dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* não houve diminuição dessa enzima em nenhuma das concentrações incorporadas na dieta.

A DII se caracteriza pela infiltração de células imunes como neutrófilos, monócitos, eosinófilos e macrófagos na lamina própria e na mucosa intestinal, sendo que esse infiltrado celular está relacionado com os danos causados no epitélio cólico que resulta em ulcerações, edema, deformações, aumento da permeabilidade da mucosa e rompimento da matriz extracelular (MAGRO *et al.*, 2013). Em nosso trabalho foi possível

observar, nos animais que receberam a dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* nas duas concentrações (5% e 10%), uma recuperação da citoarquitetura cólica, evidenciada pela restauração da mucosa e redução do dano epitelial, as quais podem ter incrementado um aumento da função de barreira e facilitando a cicatrização da mucosa. No entanto, estas observações não se caracterizaram por uma melhora significativa do escore microscópico, provavelmente devido ao período de 7 dias de avaliação que ocorre após a indução do processo inflamatório intestinal que já se caracteriza por um período de recuperação natural da lesão.

Outro fator importante relacionado a homeostase intestinal é a produção de muco, responsável pela formação de camadas de gel que cobrem o TGI e proporcionam uma barreira semipermeável entre o lúmen e o epitélio intestinal, além de contribuir para a manutenção da integridade da mucosa (CORNICK *et al.*, 2015). A barreira de muco age como primeira linha de defesa do cólon e é formada pelas mucinas, que consistem em glicoproteínas de alto peso molecular sintetizadas e segregadas por células caliciformes. O muco exerce funções fisiológicas principalmente para lubrificar o epitélio e protegê-lo de danos causados por substâncias nocivas, devido sua capacidade de formar géis lubrificantes e formar barreiras físicas no epitélio intestinal, ajudando a conter bactérias comensais no lúmen do intestino e impedido a adesão desses patógenos nas células epiteliais que estão unidas entre si pelas “tight junctions”. A mucina mais abundante no cólon é a mucina do tipo 2 que é expressa pelo gene MUC-2 e é essencialmente importante na superfície epitelial (CORNICK *et al.*, 2015). O cólon humano secreta cerca de 200 ml de muco diariamente, esse valor é amplamente controlado através da transcrição e regulação da expressão de MUC2 (WEISS; HENNET, 2017). Um estudo relatou que ratos deficientes do gene MUC-2, desenvolveram espontaneamente colite após 5 semanas, demonstrando a importância da barreira do muco cólico na prevenção da DII (VAN DER SLUIS *et al.*, 2006). Indivíduos com DII tem síntese de muco diminuída, bem como alteração na expressão de seus genes, além de danos nas “tight junctions”. Isto torna a barreira intestinal mais susceptível a bactérias que atingem o epitélio do intestino, alterando a cascata imune, levando ao dano celular e ao aumento da produção de radicais livres (NEURATH, 2014).

Na análise histológica verificou-se que foi evitada a depleção de muco pelas células caliciformes nos animais que receberam a dieta enriquecida com *Hibiscus esculentus* nas concentrações de 5% e 10%, assim como uma maior camada na superfície celular indicando a presença de muco de ligação de membrana, quando comparado aos animais

do grupo controle-TNBS. Isso está associado a uma consequente melhora da integridade da mucosa e da barreira intestinal que também se associam ao aumento na produção de muco, visto que as mucinas podem estar envolvidas em mecanismos de crescimento e proteção do epitélio, bem como no reparo de alterações no mesmo (BURGER-VAN PAASSEN *et al.*, 2009; CORFIELD *et al.*, 2000). Observamos que a suplementação da dieta nas duas concentrações foi capaz de reverter o parâmetro de depleção de muco pelas células caliciformes, o que se caracteriza por uma melhora do processo inflamatório intestinal. Como forma de corroborar estes efeitos, estudos da expressão gênica de diferentes mucinas estão em andamento.

A dieta pode afetar a anatomia e histologia do intestino e, portanto, o número de células caliciformes, influenciando a síntese, o armazenamento, e a secreção de muco por essas células (BROWNLEE, 2011). A fibra dietética presente em muitos alimentos é capaz de estimular a produção de muco, devido à capacidade de retenção de água que é uma propriedade que as fibras possuem (MONTAGNE *et al.*, 2003). Tem sido descrito que fibras solúveis e insolúveis são importantes na estimulação da produção de muco (LARSEN, MOUGHAN, & WILSON, 1993; BROWNLEE *et al.*, 2003).

A produção de muco cólico pode ser afetada por uma elevada produção de EROs dentro do lúmen intestinal, seja como um resultado de componentes dietéticos como, por exemplo, alto teor de ferro (TROOST *et al.*, 2003), baixo consumo de fibras ou alto teor de gordura (ERHARDT, 1997), liberação de enzimas endógenas produtoras de EROs, ou através da infiltração de neutrófilos e macrófagos em direção ao epitélio cólico, como ocorre em processos inflamatórios (KRUIDENIER & VERSPAGET, 2002). O aumento dos níveis de metabolitos de bactérias anaeróbias presentes no cólon também pode elevar os níveis de EROs (LINSKENS *et al.*, 2001). Esses fatores caracterizam uma associação entre estresse oxidativo e produção de muco pelas células caliciformes no processo inflamatório cólico. Desta forma, essa condição pode ser revertida com a suplementação de alimentos que evitem a depleção de muco induzida por um processo inflamatório, como observado após o tratamento dos animais com a dieta enriquecida com farinha de *Hibiscus esculentus*, que simultaneamente reduziu o estresse oxidativo e evitou a depleção de muco.

Embora os estudos de quantificação de ácidos graxos de cadeia curta estejam em andamento, é importante constar que NUNES, 2006 determinou a efetividade de frutos de *Hibiscus esculentus* sobre o crescimento das *Bifidobacterium* e principalmente dos

*Lactobacillus*, espécies de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta. As fibras solúveis presentes na planta, principalmente a pectina e a mucilagem, atuaram como meio seletivo para o crescimento de bactérias benéficas, como as *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* (NUNES, 2006), o qual foi associado a um aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato colônico, uma vez que as fibras presentes em *Hibiscus esculentus* foram metabolizadas seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas presentes no intestino, sendo capazes de alterar a população de bactérias presentes no cólon para uma microbiota saudável.



*CONCLUSÃO*

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A dieta enriquecida com a farinha dos frutos da espécie *Hibiscus esculentus* avaliada na concentração de 10% possui efeito anti-inflamatório intestinal reduzindo a extensão da lesão cólica, a relação peso/comprimento cólico e melhora de parâmetros histológicos observados nas duas concentrações testadas;

- Este efeito anti-inflamatório foi associado às propriedades antioxidantes da farinha dos frutos da espécie *Hibiscus esculentus* como evidenciado *in vivo* pela redução da depleção de glutathiona cólica e *in vitro* pelos efeitos, embora discretos, nos ensaios de DPPH e peroxidação lipídica;

- O efeito protetor da dieta enriquecida com a farinha dos frutos da espécie *Hibiscus esculentus* também foi associado por evitar a depleção de muco pelas células caliciformes em ambas as concentrações testadas;

- Os efeitos estão relacionados à presença de compostos antioxidantes como os polifenóis, fenóis taninos, flavonóis, flavononas, xantonas, terpenóides presentes nos frutos de *Hibiscus esculentus*;

- Considerando-se os efeitos observados associados aos dados disponíveis da espécie, é possível indicar que a farinha de frutos de *Hibiscus esculentus* atue como um alimento funcional.



***REFERÊNCIAS***

AGBO, E. A., NEMLIN, J. G., ANVOH, B. K., GNAKRI, D. Characterisation of lipids in okra mature seeds. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 184-192, 2010.

AHMAD, N.; MUKHTAR H. Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications, **Nutr. Rev.**, v. 57, p. 78-83, 1999.

ALMEIDA-JUNIOR, L. D.; CURIMBABA, T. F. S.; CHAGAS, A. S.; QUAGLIO, A. E. V.; DI STASI, L. C. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp.* AAA) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 497–504, 2017.

ALQASOUMI, S. I. ‘Okra’ *Hibiscus esculentus* L.: A study of its hepatoprotective activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, p. 135-144, 2012.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Diabetes and the risk of infections with immunomodulator therapy in inflammatory bowel diseases. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, n. 11, p. 1141–1148, 2015.

ANDERSON, M. Glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.

ANDREW, L. G.; GEORGE, K.; JEREMIAH, J. F.; ALEJANDRO, R.; AIMEE, M. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. **Current Issue**, v. 108, n. 15, p. 6252-6257, 2011.

ANON, *Hibiscus esculentus*.  
<http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/chap6/okra.html>.

Acesso em: 22 de jan., 2016.

ATAWODI, S. E.; ATAWODI, J. C.; IDAKWO, G. A.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Polyphenol composition and antioxidant potential of *Hibiscus esculentus* L. fruit cultivated in Nigeria. **J Med Food.**, v. 12, n. 6, p:1316-1620, 2009.

ARAPITSAS, P. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. **J. Food Chem.**, v. 110, p. 1041-1045, 2008.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease:clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, p. 1641-57, 2007.

BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 4, p. 622-630, 1995.

BELTRÁN, C. P. et al. Papel del sistema inmune en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales. **Gastr. Latinoam.** v. 16, n. 3, p. 229- 242, 2005.

BENCHIMOL, E. I.; COOK, S. F.; ERICHSEN, R.; LONG, M. D.; BERNSTEIN, C. N.; WONG, J.; CARROLL, C. F.; FRØSLEV, T.; SAMPSON, T.; KAPPELMAN, M. D. International variation in medication prescription rates among elderly patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's & Colitis.** v. 11, p. 878-889, 2013.

BERNSTEIN, C. N.; SHANAHAN F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 57, p. 1185-1191, 2008.

BERNSTEIN, C. N.; WANG, M. H.; SARGENT, M.; BRANT, S. R.; COLLINS, M. T. Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 968-971. 2007.

BESSEY, O.; LOWRY, O.; BROOK, M. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-329, 1946.

BIASI, F.; LEONARDUZZI, G.; OTEIZA, P. I.; POLI, G. Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations and Therapeutic Targets. **Antioxid. Redox Signal**, v. 19, n. 14, p. 1711-1747, 2013.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 26 abr. 1958.

BOL-SCHOENMAKERS, M. et al. Intestinal alkaline phosphatase contributes to the reduction of severe intestinal epithelial damage. **European journal of pharmacology**, v. 633, p. 71-77, 2010.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-33, 2003.

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

BRAUN, J.; WEI, B. Bodytraffic: ecology, genetics, and Immunity in Inflammatory Bowel disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** v. 2, p. 401-429, 2007.

BROWNLEE I.A. The physiological roles of dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 238–250, 2011.

BROWNLEE; I, A.; MIKE, E.; HAVLER.; DETTMAR, P. W.; ALLEN, A.; PEARSON, J. P. Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fiber intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 245-249, 2003.

BURGER-VAN PAASSEN, N.; VINCENT, A, PUIMAN, P. J.; VAN DER SLUIS, M.; BOUMA, J.; BOEHM, G.; VAN GOUDOEVEER, J. B.; VAN SEUNINGEN, I.; RENES, I. B. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. **Biochem J.**, v. 420, n. 2, p. 211-219, 2009.

BURKILL, H.M. The useful plant of West Tropical Africa. **Royal Botanic Gardens.** v.4, n.2, p. 969, 1997.

CALISIR, S.; OZCAN, M.; HACISEFEROGULLARI, H.; YILDIZ, M. U. A study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculents*) seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 73–78, 2005.

CAMPOS, F. G. et al. Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 57, n. 4, p. 187–198, 2002.

CARLSON, M.; RAAB, Y.; SEVEUS, L.; XU, S.; HALLGREN, R.; VENGE, P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. **Gut**, v. 50, p. 501-506, 2002.

CHLUDIL, H. D; CORBINO, G. B; LEICACH, S. R. Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. **J. Agric. Food Chem.**, V. 56 p. 5050– 5056, 2008.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. Glossary of Indian Medicinal Plants. **Council of Scientific & Industrial Research**, p. 133, 1956.

CLAESSON, M. J.; JEFFERY, I. B.; CONDE, S.; POWER, S. E.; O'Connor, E. M.; CUSACK, S et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 178-184, 2012.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Review: Flavonoids: chemistry, metabolism, cardio protective effects and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

CORFIELD, A. P.; MYERSCOUGH, N.; LONGMAN, R.; SYLVESTER, P.; ARUL, S.; PIGNATELLI, M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 589-594, 2000.

CORNICK, S.; TAWIAH, A.; CHADEE, K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. **Tissue Barriers**, v. 3, 2015.

COSNES, J.; GOWER-ROUSSEAU, C.; SEKSIK, P.; CORTOT, A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785-1794, 2011.

COSTA, A.M.; ASSIS, M.O.; DAVID, A.M.S.S.; ALVES, I.S.; ROCHA, J.S. Ureia revestida com polímero de liberação controlada na qualidade fisiológica de sementes de quiabo. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 57-64, 2015.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun. Rev.** v. 3, p. 394-400, 2004.

DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A. & GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Med.**, v. 70, n.4, p. 315-320, 2004.

DOREDDULA, S. K, et al. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antistress, and Nootropic Activities of Aqueous and Methanolic Seed Extracts of Ladies Finger (*Abelmoschus esculentus* L.) in Mice. **Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal**, p. 1-14, 2014.

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e Sistema Nervoso Central. **Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 36, n. 2, p. 123-135, 2011.

ERHARDT, J. G.; LIM, S. S.; BODE, C.; BODE, C. A diet rich in fat and poor in dietary fiber increases the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces. **J. Nutr.**, v. 127, p. 706–709, 1997.

FILGUEIRA, F.A.R. Malvaceas: Quiabo uma contribuição africana. **Novo manual de Olericultura: agroecologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. p. 386-391, 2003.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease. Current concepts of pathogenesis and implications for therapy. **Minerva Gastroenterol. Dietol.**, v. 48, p. 215-226, 2002.  
FIOCCHI, C. Towards a “cure” for IBD. **Digestive diseases (Basel, Switzerland)**, v. 30, n. 4, p.428–433, 2012.

FRUET, A. C. et al. Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia* L.) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 62–73, 2012.

GALVEZ, J.; DE LA CRUZ, J.P.; ZARZUELO, A.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differ from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v.51, p.127-33, 1995.

GÁLVEZ, J.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. **In:Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry Elsevier**, v. 25, p. 607–649, 2001.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, Suppl 220, p. 83-6, 1996.

GONZALEZ, F.G.; DI STASI, L. C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p.125-134, 2002.

GONZÁLEZ, R.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; RODRIGUES-CABEZAS ME.; DUARTE J.; ZARZUELO, A. Dietary Vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **Int J. Vit. Nut. Res.**, v.71, p. 243-250, 2001.

GÜRBÜZ, I; ÜSTÜN, O; YESILADA, E; SEZİK, E; KUTSAL, O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 93–97, 2003.

HAJIAN, S.; ASGARY, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SAHEBKAR, A.; GOLI-MALEKABADY. N.; RASHIDI, B. *Hibiscus esculentus* seed and mucilage beneficial effects in reducing complications of diabetes in streptozotocininduced diabetic rats. **Ann. Res. Antioxid.** v. 1, n. 2, 2016.

HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J.; FOEY, A.D. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 1869-1912, 2013.

HOLLANDER, D. Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, n. 4, p. 183-190, 2003.

EBRAHIMZADEH, M.A.; NABAVI, SM.; NABAVI, S.F. Antidepressant activity of *Hibiscus esculentus* L. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 2609-2612, 2013.

JANG, I. C.; PARK, J. H.; PARK, E.; PARK, H. R; LEE S. C. Antioxidative and antigenotoxicactivity of extracts from Cosmos (*Comosbipinnatus*) flowers, **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 63, p. 205-210, 2008.

JARRET, R, L., WANG, M, L., LEVY, I, J. Seed oil and fatty acid content in Okra (*Abelmoschus esculentus*) and related species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p, 4019-4024, 2011.

JOWETT, S. L.; SEAL, C. J.; PEARCE, M. S.; PHILLIPS, E.; GREGORY, W.; BARTON, J. R.; WELFARE, M. R. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. **Gut**, v. 53, p. 1479-1484, 2004.

JURJUS, A. R. *et al.* Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v .50, p. 81– 92, 2004.

KAHLON, T. S.; CHAPMAN, M. H.; SMITH, G. E. In vitro binding of bile acids by okra, beets, asparagus, eggplant, turnips, green beans, carrot and cauliflower. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 676–80, 2007.

KAPLAN, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 12, p. 720-727, 2015.

KAPLAN, G.; PANACCIONE, R. Use of combination therapy in IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, p. 219–221, 2008.

KARAKOLTSIDIS, P, A.; CONSTANTINIDES, S, M. Okra seeds: A new protein source. **Jornal of agricultural and food chemistry**, v. 23, p. 6, 1975.

KARLSSON, A. et al. Neutrophil Alkaline Phosphatase Activity Increase in Bacterial Infections Is Not Associated with a General Increase in Secretory Vesicle Membrane Components. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 911–916, 1995.

KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Disease-a-month.**, v. 52, n. 5, p. 199–207, 2006.

KATO, Y. et al. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1136–1139, 2003.

KAU, A.L.; AHERN, P.P.; GRIFFIN, N.W.; GOODMAN, A.L.; GORDON, J.I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 15, n. 474, p. 327-336, 2011.

KHOSROZADEH, M., HEYDARI, N., ABOOTALEBI, M. The Effect of *Abelmoschus esculentus* on Blood Levels of Glucose in Diabetes *mellitus*. **J. Med. Sci. Supplement.**, v. 41, n. 3, 2016.

KING, E. J.; ARMSTRONG A. R. Determination of serum and bile phosphatase activity. **Can Med Assoc J.**, v. 31, p. 56-63, 1934.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-50, dez. 1984.

KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H. M. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—Radicals or ridiculous? **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 16, p. 1997–2015, 2002.

KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; LAMERS, C. B.; VERSPAGET, H. W. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. **J. Pathol.**, v. 201, n. 1, p. 28-36, 2003.

KUMAR, D. S.; TONY, D. E.; KUMAR, A. P.; KUMAR, K. A.; SRINIVASA RAO, D. B.; NADENDLA, R. A review on: *abelmoschus esculentus* (okra). **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v. 3, p. 129-132, 2013.

LARSEN, F. M.; MOUGHAN, P. J.; WILSON, M. N. Dietary fiber viscosity and endogenous protein excretion at the terminal ileum of growing rats. **J Nutr.**, v. 123, n. 11, p. 1898-1904, 1993.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**, p. 211, 1999.

LENGSFELD, C.; TITGEMEYER, F.; FALLER, G.; HENSEL, A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1495-1503, 2004.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583-593, 1994.

LI, W.; LI, Z.; YE, Q. Enzymatic synthesis of glutathione using yeast cells in two-stage reaction. **Bioprocess and Biosyst. Eng.**, v. 33, p. 675-682, 2009.

LIAO, H.; DONG, W.; SHI, X.; LIU, H.; YUAN, K. Analysis and comparison of the active components and antioxidante activities of extracts from *Abelmoschus esculentus* L. **Pharmagnosy Magazine**, v. 8, n. 30, p.156–161, 2012.

LIH-BRODY, L. et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 41, n. 10, p. 2078-2086, out. 1996.

LINDEN, S. K.; FLORIN, T. H.; & MC GUCKIN, M. A. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. **PLoS One**, n. 3, v.12, 2008.

LINSKENS, R. K.; HUIJSDENS, X, W.; SAVELKOUL, P, H.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C, M.; MEUWISSEN, S, G. The bacterial flora in inflammatory bowel disease:current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.36, p. 29–40, 2001.

LOGUERCIO, C. et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Digestive and liver disease:official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 35, p. 635– 641, 2003.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, B. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 13, n. 489, p. 220-230, 2012.

MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **J Clin Gastroenterol**, v. 45, p. 120-127, 2011.

MAGRO, F.; LANGNER C.; DRIESSENC, A.; ENSARI, A.; GEBOES, K.; MANTZARIS, G. J.; VILLANACCI, V.; BECHEANUH, G.; BORRALHO NUNES, P.; CATHOMAS, G.; FRIES, W.; JOURET-MOURIN, A.; MESCOLI, C.; DE PETRIS, G.; RUBIOO, C. A.; SHEPHERDP, N. A.; VIETH M.; ELIAKIMR, R. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, p. 827–851, 2013.

MALOY, K. J. & POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v.474, p. 298-306, 2011.

MARSHALL, J. K. Are there epidemiological differences between Crohn's disease and ulcerative colitis? **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, p. S1, out. 2008.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARÌ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 10, p. 577-586, 2005.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. Ceará: Ed. Universidade do Ceará, 1988. p. 37-65.

MAZZOLIN, L. P. et al. Antidiarrheal and intestinal antiinflammatory activities of a methanolic extract of *Qualea parviflora* Mart. in experimental models. **Journal of ethnopharmacology.**, v. 150, n. 3, p. 1016–1023, 2013.

MEYER, D. Health benefits of prebiotic fibers. **Adv Food Nutr Res**, v. 74, p. 47-91, 2015.

MILLER, A. L.; Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. **Alt. Med. Rev.**, v. 1, p. 103-111, 1996.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46–54, 2012.

MORRIS, G. P.; BECK, P. L.; HERRIDGE, M. S.; DEPEW, W. T.; SZEWCZUK, M. R.; WALLACE, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p. 795-803, 1989.

MORRISON, G. Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**, v. 38, n. 12, p. 956-961, 2009.

MOTA, W. F. da. Caracterização físico-química de frutos de quatro cultivares de quiabo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 722-725, 2005.

NDJOUENKEU, R.; GOYCOOLEA, F. M.; MORRIS, E. R.; AKINGBALA, J. O. Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) and dika nut (*Irvingia gabonensis*) polysaccharides. **Carbohydrates Polymers**, v. 29, p. 263–269, 1996.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, p. 329-342, 2014.

NUNES-DA-SILVA, Vera Sônia. Estudo dos efeitos nutricionais da farinha de polpa e mucilagem extraída do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.). 2006. 135 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Campinas.

ORDÁS, I.; ECKMANN, L.; TALAMINI, M.; BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 380, p. 1606–1619, 2012.

PASTENE, E. R. Estado actual de la busqueda de plantas com actividad antioxidante. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, n. 6, p. 449-455, 2009.

QIN, J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 4, n. 490, p. 55-60, 2012.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Curr Med Chem.**, v. 8, p. 797-807, 2001.

ROBERFROID, M. Probiotics: the concept revisited. **J. Nutr.**, v. 137, p. 830-837, 2007.

ROBERFROID, M et al. Probiotic effects: metabolic and health benefits. **Br. J. Nutr.**, v. 104, n. 2, p. 61-63, 2010.

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

ROY, A.; SHRIVASTAVA, S. L.; MANDAL, S. M. Functional properties of Okra *Abelmoschus esculentus* L. (Moench): traditional claims and scientific evidences. **Plant Science Today**, v. 1, n. 3, p. 121-130, 2014.

ROYALL, D.; WOLEVER, T.M.S, JEEJEEBHOY. Clinical significance of colonic fermentation, **The Am. Gastroenterol**, v. 85, p. 1307-1312, 1990.

SABITHA, V.S.; RAMACHANDRAN, K.; PANNEERSELVAM. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. In streptozotocin-induced diabetic rats. **J Pharm Bioallied Sci**, v.3, n.3, p.397-402, 2011.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 2317–2326, 2004.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J. A.; ZARZUELO, A. Effect of quercetin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 70, p. 3097-3108, 2002.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2073- 2085, 2000.

SCARMINIO, V. et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp* AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Nutrition research**, v. 32, n. 3, p. 202–209, 2012.

SCHLIOMA & JAIME, **Tratado de Gastreenterologia da graduação e da pós-graduação**. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 2016.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. **Rev. bras. plantas med.**, v.11, n. 4, 2009.

SCOTT, K. P. *et al.* The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, v. 69, p. 52-60, 2013.

SHAW, S. Y.; BLANCHARD, J. F.; BERNSTEIN, C. N. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 105, n. 12, p. 2687-2692, 2010.

SIEGEL, C. A. Review article: Explaining risks of inflammatory bowel disease therapy to patients. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 33, p. 23-32, 2011.

SMITH, G. P.; HARRIS, H.; PETERS, T. J. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinica chimica acta international journal of clinical chemistry**, v. 142, n. 2, p. 221-230, 1984.

SMIT, R., NEERAJ, K., PREETI, K. Tradicional medicinal plants used for the treatment of Diabetes, **International Journal of Pharmaceutical and Phytoparmacological Research**, v. 3, n. 3, p. 171-175, 2013.

SOARES, J. R.; DINS, T. C. P.; CUNHA, A. P.; AMEIDA L. M. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*, **Free Radical Res.**, v. 26, p. 469-478, 1997.

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.

STUCCHI, A F. et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 6, p. 1298–1306, 2000.

STURM, A.; LEITE, A. Z. A.; DANESE, S.; KRIVACIC, K. A, WEST, G. A, MOHR, S.; JACOBBERGER, J. W.; FIOCCHI, C. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1624-1631, 2004.

SU, L.; SHEN, L.; CLAYBURGH, D, R.; NALLE, S. C.; *et al.* Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v.136, p.551–563, 2009.

TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; OSHIMA, Y.; TAKAHASHI, M.; MURAKAMI, M.; HIKINO, H. Hypoglycaemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. **Planta Med**, v. 53, n. 1, p. 8-12, 1987.

TROOST, F. J., SARIS, W. H.; HAENEN, G. R.; BAST, A.; BRUMMER, R. J. New method to study oxidative damage and antioxidants in the human small bowel: effects of iron application. **Am. J. Physiol.**, v. 285, p. 354–359, 2003.

UHLIG, H. H.; SCHWERD, T.; KOLETZKO, S.; SHAH, N.; KAMMERMEIER, J.; ELKADRI, A.; OUAHED, J.; WILSON, D. C, TRAVIS, S. P.; TURNER, D.; KLEIN, C.; SNAPPER, S. B.; MUISE, A. M. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 5, p. 990-1007, 2014.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DER SLUIS, M., DE KONING, B. A.; DE BRUIJN, A, C.; VELCICH, A.; VAN GOUDOEVER, G. B.; *et al.* Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that Muc2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, p. 117–129, 2006.

VELDE, A.; VERSTEGE, M. I.; HOMMES, D. W. Critical Appraisal of the Current Practice in Murine TNBS-induced Colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 12, n. 10, 2006.

VELJACA, M.; LESCH, C. A.; PLLANA, R.; SANCHEZ, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 272, p. 417–422, 1995.

VEZZA, T.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; UTRILLA, M. P.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; GALVEZ, J. Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 211,2016.

VICTORIA, C. R.; SASSAKI L. Y.; NUNES, H. R. C. Incidence and Prevalence Rates of Inflammatory Bowel Diseases, In Midwestern of São Paulo State, Brazil. **Gastroenterology**, v. 46, n.1, 2009.

WALKER, A. W.; SANDERSON, J. D.; CHURCHER, C.; PARKES, G. C.; HUDSPITH, B. N.; RAYMENT, N.; et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. **BMC Microbiol.**, v. 11, n. 7, 2011.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radic Biol Med.**, v. 36, p. 829-837, 2004.

WANG, Y. H.; BE, B.; YANG, X. L.; ZHAI, L. N.; WANG, X. X.; LIU, X.; SHI, J. C.; WU, Y. J. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathways in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 11, p. 620–1627, 2011.

WEISS, A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 74, p. 2959–2977, 2017.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, p. 838-849, 2004.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat. Protoc.** v. 2, p. 541-546, 2007.

WITAICENIS, A.; FRUET, A. C.; SALEM, L. & DI STASI, L. C. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **J Med Food**, v. 13, n. 6, p. 1391-1396, 2010.

WITAICENIS, A.; LUCHINI, A. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; FELISBINO, S. L.; GARRIDO-MESA, N.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; DI STASI, L.C. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylscutletin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biol.Interact.**, v. 195, p. 76–85, 2012.

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

WITAICENIS, A.; FRUET, A. C.; SALEM, L. & DI STASI, L. C. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **J Med Food**, v. 13, n. 6, p. 1391-1396, 2010.

YAMAMOTO-FURUSHO, J. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 13, p. 1893-1896, 2007.

YAN, Y.; KOLACHALA, V.; DALMASSO, G.; NGUYEN, H.; LAROU, H.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS One**, v. 4, n.6, 2009.

ZHU, H.; LI, Y. R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 237, p. 474–480, 2012.



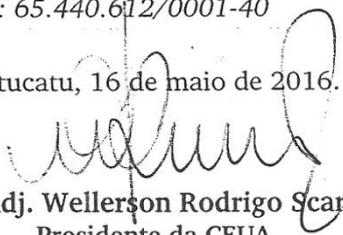
*ANEXOS*

## Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos", Protocolo nº 845-CEUA, sob a responsabilidade de **Luiz Claudio Di Stasi**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), em 8 de abril de 2016.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 02/05/2016	Término: 14/06/2016
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	42	
Peso:	180-220g	Idade: 40 dias
Sexo:	Macho	
Origem	Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. CNPJ: 65.440.612/0001-40	

Botucatu, 16 de maio de 2016.

  
Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano  
Presidente da CEUA

