

Sílvia Helena Cestari

Avaliação dos efeitos de *Baccharis dracunculifolia*
DC na prevenção e tratamento de colite induzida por
ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de
concentração Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Cestari, Sílvia Helena.

Avaliação dos efeitos de *Baccharis dracunculifolia* DC na prevenção e tratamento de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos / Sílvia Helena Cestari. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: Luiz Cláudio Di Stasi

Assunto CAPES: 21000000

1. Produtos naturais - Aspectos farmacológicos 2. Colite - Tratamento
3. Plantas medicinais

CDD 615.1

Palavras-chave: Atividade antiinflamatória intestinal; *Baccharis dracunculifolia*; Colite; Flavonóides; Plantas medicinais

Sílvia Helena Cestari

Avaliação dos efeitos de *Baccharis dracunculifolia*
DC na prevenção e tratamento de colite induzida por
ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.

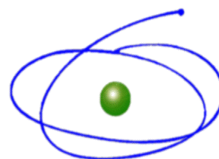
Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão Julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

2º Examinador: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

3º Examinador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos



Auxílio Financeiro: CAPES
(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

"Eu não juro nada por coisa alguma,
pois que todo caminho é de incerteza.
A ordem se desarruma,
a história se desajeita,
o arranjo troca de lado e vira a mesa.
Tampouco prometo.
Nesse jogo de regras e tratos,
rolam os dados, mudam os fatos,
num ciclone célere, inclemente.
Só o que posso é me entregar
completamente
a toda causa que eu me dedicar,
a cada tempo que eu puder viver,
a cada amor que me fizer amar."

FLORA FIGUEIREDO

Dedicatória

Aos meus pais Silvio e Roseli
por tudo o que fizeram para que
esse sonho se realizasse.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por ter me sustentado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, por abrir as portas do laboratório para mim e pelos ensinamentos; minha admiração pela seriedade com que trata a ciência.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pelos extratos, análises cromatográficas e artigos prontamente enviados.

Aos meus pais, que me ensinaram a viver com dignidade e a fazer tudo com amor, que me estimularam a caminhar e sempre me apoiaram em tudo.

À minha avozinha Geralda, pelas orações e todo o apoio.

Aos meus irmãos, Sylvio e Eloá, cunhados, Maria Fernanda e André, e tios, Sirlene (minha *empresária*) e Joébes, pelo apoio e carinho.

Aos meus sobrinhos, Marília, João Pedro e Andréia, e às minhas primas, Edilayne, Gabriela e Maria Eduarda, que coloriram cada momento que passamos juntos.

Ao Daniel, que me acompanha, tenta entender e até discute comigo sobre Farmacologia.

À Isabel, Luiz Roberto, Débora e D. Aparecida, pelo carinho e apoio.

Às amigas Beatriz e Silmere pelos conselhos, carinho e amizade.

Aos meus companheiros de *jornada*, Patrícia, Aline, Carol, Leonardo, Andréia, Tassiane e às caçulas Tarina e Viviane, pela amizade, carinho, mão-de-obra e conhecimentos.

Aos meus amigos, remanescentes da XXXVII Biologia.

À Glória, pelos caminhos apontados, principalmente no final desta etapa.

Aos meus professores de Farmacologia, que me contagiaram.

À Profa. Dra. Clélia, cujas disciplinas acrescentaram muito à minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cristina, Janete, Luis, Paulão, pela amizade e auxílio.

Ao pessoal da Pós Graduação, Luciene, Maria Helena, Sérgio e Erivaldo pela competência e simpatia.

À Selma Maria de Jesus pela conferência das referências bibliográficas.

À CAPES, pela bolsa de apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para esta realização.

Muito obrigada!

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

FERNANDO PESSOA



“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já têm a forma de nossos corpos e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia. E se não ousarmos fazê-la teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

FERNANDO PESSOA

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo que engloba várias doenças crônicas do trato gastrointestinal, principalmente colite ulcerativa (CU) e Doença de Crohn (DC), cuja etiologia ainda não é completamente conhecida, mas que se caracterizam por um curso crônico onde se alternam períodos de remissão e de atividade de duração variáveis. Embora DII tenha sido alvo de muitas pesquisas nos últimos anos, as drogas utilizadas correntemente causam sérios efeitos colaterais quando usados em altas doses ou durante um período prolongado, o que limita seu uso. Considerando-se a etiologia multifatorial das DII, produtos que reúnam atividades antioxidante, antiinflamatória e imunomoduladora representam uma possibilidade potencial para a descoberta de novas drogas eficazes na prevenção e tratamento desta doença. Neste sentido, inúmeras alternativas de pesquisas surgem com base em produtos naturais. Este trabalho testou a atividade antiinflamatória do extrato acetato de etila de folhas de *Baccharis dracunculifolia* em diferentes doses (5 a 200 mg/Kg) em duas condições experimentais distintas: quando a mucosa colônica está intacta (efeito preventivo); quando a mucosa colônica está afetada por um processo inflamatório intestinal (efeito curativo) assim como preventivo da recidiva do processo inflamatório, similar ao que ocorre com a colite ulcerativa em humanos. Diferentes marcadores bioquímicos de inflamação colônica foram avaliados, incluindo glutathione e atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina. Experimentos *in vitro* adicionais foram realizados para testar a atividade antioxidante de diferentes concentrações do EBD. A administração oral do extrato acetato de etila de folhas de *Baccharis dracunculifolia* na dose de 5 mg/Kg protege o cólon de ratos do processo inflamatório através de um mecanismo que envolve a diminuição do estresse oxidativo associado à inflamação, como redução da atividade da enzima mieloperoxidase, e manutenção dos níveis de antioxidantes endógenos, como a glutathione, e que essa atividade antiinflamatória intestinal pode ser devido à presença de compostos fenólicos no extrato. A espécie estudada representa uma nova possibilidade para prevenção e tratamento desta doença.

Palavras-chave: Colite em ratos, atividade antiinflamatória intestinal, plantas medicinais, *Baccharis dracunculifolia*.

Inflammatory bowel disease (IBD) is a term employed to several chronic disease of the digestive tract, usually ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), their etiology has not been clearly elucidated, but which are characterized by variable chronic and spontaneously relapsing inflammation. Although IBD has been the target of many studies in the last years, the drugs commonly used cause serious side effects when employed in high doses or while a long time, limiting their use. Whereas the multifactor etiology of IBD, products with antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activities play potential possibility to discovery of news drugs effective in the prevention and treatment of these disorders. In this way, many alternatives appear based in natural products. This study tested the anti-inflammatory activity of ethyl acetate extract of *Baccharis dracunculifolia* leaves (BDE) at different doses (5 to 200 mg/Kg) in two experimental settings: when the colonic mucosa is intact (preventive effect) or when the mucosa is in process of recovery after an initial insult (curative effect) such as relapse common in human IBD. Different biochemical markers of colonic inflammation were also evaluated, including glutathione, myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities. Additional *in vitro* experiments were performed in order to test the antioxidant activity of different concentrations of BDE. BDE administrated orally at lowest dose, 5 mg/Kg, protects the rat colon of the inflammatory process through a mechanism which involve an improvement on intestinal oxidative stress associated to inflammation, such as reduction of the myeloperoxidase activity and maintenance of endogenous antioxidant levels, such as the glutathione, and that intestinal anti-inflammatory activity can be due to phenolic compounds presence in extract. The specie studied showed the new possibility for the prevention and treatment to this disorder.

Key words: Rat colitis, intestinal anti-inflammatory activity, medicinal plants, *Baccharis dracunculifolia*.

Resumo	
Abstract	
Abreviaturas	viii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Introdução	1
1. Doença Inflamatória Intestinal	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Etiologia	4
1.3.1. Sistema imune	5
1.3.2. Fatores genéticos	6
1.3.3. Fatores ambientais	6
1.4. Fisiopatologia	9
1.4.1. Mediadores inflamatórios	9
1.5. Tratamento farmacológico	13
2. Plantas Medicinais	15
2.1. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	18
2.2. Própolis	20
2.2.1. Aspectos gerais	20
2.2.2. Origem da própolis verde	21
2.2.3. Composição química	22
Objetivos	24
Materiais e Métodos	25
1. Material vegetal	25
1.1. Coleta e identificação	25
1.2. Secagem, moagem e obtenção do extrato bruto das folhas	25
2. Ensaio in vitro	25
2.1. Peroxidação lipídica em membranas de cérebro de rato	25
3. Ensaio in vivo	27
3.1. Animais de experimentação	27
3.2. Indução da colite experimental	27
3.3. Desenho experimental	28

3.4. Avaliação macroscópica	29
3.5. Determinações bioquímicas	31
3.5.1. Determinação do conteúdo de glutatona total	31
3.5.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase	33
3.5.3. Determinação do conteúdo de proteínas método do ácido bicinchônico	34
3.5.4. Determinação da atividade da fosfatase alcalina	34
4. Análise Estatística	35
5. Análises das substâncias fixas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	35
Resultados	37
1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato	37
2. Avaliação da atividade do EBD no processo inflamatório agudo	38
2.1. Avaliação macroscópica	38
2.2. Determinações bioquímicas	41
3. Avaliação do processo inflamatório crônico com recidiva	43
3.1. Avaliação macroscópica	43
3.2. Determinações bioquímicas	49
4. Análises das substâncias fixas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	51
Discussão	53
Conclusão	59
Referências	60
Anexos	81

ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
BCA	Ácido bicinchônico
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
Cl ⁻	Cloreto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa
CSR	Controle sem recidiva
CU	Colite ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
EBD	Extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FCA	Focos de cripta aberrante
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl ⁻	Ácido hipoclorídrico
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LTB-4	Leucotrieno B-4
M \emptyset	Macrófago
MPO	Mieloperoxidase

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato sódico
PG	Prostaglandina
PMNs	Células polimorfonucleares
Sulfa	Sulfassalazina
TCA	Ácido tricloroacético
Th-1	Células auxiliaadoras-1
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características histológicas em biópsia retal que auxiliam na distinção entre colite ulcerativa e Doença de Crohn (Misiewicz *et al.*, 1994).
- Figura 2.** Algumas das complicações extraintestinais e características de subnutrição encontradas em pacientes com Doença de Crohn (Misiewicz *et al.*, 1994).
- Figura 3.** Etiologia das doenças inflamatórias intestinais (Fiocchi, 1998).
- Figura 4.** Respostas imunes mediadas por células no cólon.
- Figura 5.** Arbusto de *Baccharis dracunculifolia* – Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP) / SP.
- Figura 6.** Detalhe do ramo com flores de *Baccharis dracunculifolia* – Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP) / SP.
- Figura 7.** Interação entre *Apis mellifera* e *Baccharis dracunculifolia*.
- Figura 8.** Desenho experimental da fase aguda de colite.
- Figura 9.** Desenho experimental da fase crônica de colite com recidiva.
- Figura 10.** Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutathiona total em amostras de cólon.
- Figura 11A.** Atividade antioxidante do extrato bruto acetato de etila de folhas de *Baccharis dracunculifolia* em ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebro de rato pelo modelo de indução com sulfato ferroso e ácido ascórbico (Stocks *et al.* (1974) e Fee e Teitelbaum (1972), com modificações).
- Figura 11B.** Atividade antioxidante da quercetina em ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebro de rato pelo modelo de indução com sulfato ferroso e ácido ascórbico (Stocks *et al.* (1974) e Fee e Teitelbaum (1972), com modificações).

- Figura 12.** Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento. O 4º dia refere-se ao período de 24 horas de jejum alimentar para posterior indução de colite.
- Figura 13.** Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento durante os 6 dias de experimento.
- Figura 14A.** Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento durante a 1ª semana.
- Figura 14B.** Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento durante a 2ª semana.
- Figura 14C.** Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento durante a 3ª semana (dia 15, jejum).
- Figura 15A.** Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento durante a 1ª semana.
- Figura 15B.** Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento durante a 2ª semana.
- Figura 15C.** Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento durante a 3ª semana (dia 15, jejum).
- Figura 16.** Cromatograma por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) do extrato bruto acetato de etila de folhas de *B. dracunculifolia*.
- Figura 17.** Nomes, tempo de retenção, λ máximo e estruturas químicas dos padrões cromatográficos.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Critério de pontuação do índice de lesão macroscópica (ILM).
- Tabela 2.** Efeitos dos tratamentos com extrato de *Baccharis dracunculifolia* (5, 10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no escore, na relação entre peso e comprimento colônico, nas incidências de diarreia e aderência na fase aguda da colite induzida por TNBS.
- Tabela 3.** Efeitos dos tratamentos com extrato de *B. dracunculifolia* (5, 10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no conteúdo de glutathiona total (GSH), nas atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina (FA) na fase aguda da colite induzida por TNBS.
- Tabela 4.** Efeitos dos tratamentos com extrato de *Baccharis dracunculifolia* (5 e 50 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no escore, na relação entre peso e comprimento colônico, nas incidências de diarreia e aderência na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS.
- Tabela 5.** Efeitos dos tratamentos com extrato de *B. dracunculifolia* (5 e 50 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no conteúdo de glutathiona total (GSH), nas atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS.

Introdução

1. Doença inflamatória intestinal

1.1. Aspectos gerais

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo geral para um grupo de desordens inflamatórias crônicas envolvendo o trato gastrointestinal e frequentemente refere-se a colite ulcerativa (CU) e a Doença de Crohn (DC). Essas doenças são de etiologia ainda não clara e de curso crônico recorrente, com períodos de exacerbação dos sintomas seguidos de intervalos de remissão (Katz *et al.*, 1999).

Os sintomas de ambas são extremamente desagradáveis e impactam todos os aspectos da qualidade de vida. Eles incluem diarreia, dor abdominal, sangramento retal, febre, náusea, perda de peso, letargia e perda de apetite. Se não tratadas, seguem subnutrição, desidratação e anemia, as quais, em casos extremos, podem levar à morte. Embora CU e DC mostrem um grau considerável de similaridade em etiologia e epidemiologia, elas são totalmente diferentes na fisiopatologia (Steidler, 2001). Algumas características histológicas que auxiliam na distinção entre CU e DC podem ser observadas na Figura 1.

DC envolve o intestino delgado (íleo) em 30% dos pacientes, a região ileocecal em 40% dos casos ou uma região maior, a ileo-cólon, mas pode ser observada em todo o trato gastrointestinal, da boca ao reto. A inflamação, de caráter transmural, se propaga através de toda a parede intestinal, favorecendo o aparecimento de perfurações, estenoses e fístulas com órgãos adjacentes (Levine, 1994; Gasche, 2000). As lesões podem ser focais, segmentadas ou difusas (Levine, 1994) e com frequência afetam distintas zonas do trato digestório de forma descontínua e simultânea, separadas entre si por segmentos intactos.

CU é igualmente uma doença inflamatória crônica do intestino, porém, restringe-se ao cólon, fundamentalmente à região distal (reto/ânus) e estende-se progressivamente em direção proximal. Acredita-se que a primeira descrição de CU tenha sido feita por Samuel Wilks em 1859 (Corman, 2005). Quando a doença está ativa (em crise), a inflamação afeta predominantemente camadas superficiais da parede intestinal, normalmente mucosa e submucosa, e caracteriza-se por infiltração de neutrófilos, eosinófilos e células plasmáticas,

com freqüente formação de abscessos das criptas (Obrador e Riera, 1994; Stenson e McDermott, 1991), consistentes em um acúmulo de neutrófilos adjacentes a esta região, necrose do epitélio, presença de edema e hemorragia.

	Características			
Colite Ulcerativa 	Depletada	Células de muco	Normal	Doença de Crohn 
	Comum	Abscessos nas criptas	Escasso	
	Contorcida, atrofiada	Arquitetura glandular	Preservada	
	Uniformemente pesado	Infiltrado linfocítico	Fragmentado, pesado em alguns locais	
	Ausente	Granulomas	Presente	
	Espessada	Muscular da mucosa	Normal	
	Pouca	Inflamação na submucosa	Desproporcionalmente pesada	

Figura 1. Características histológicas em biópsia retal que auxiliam na distinção entre colite ulcerativa e Doença de Crohn (Misiewicz *et al.*, 1994).

As DII estão associadas com elevado risco de câncer colo-retal e este é aumentado fortemente com a duração e extensão da doença (Clevers, 2004), com complicações extraintestinais (Figura 2) e aparecimento da doença em idade jovem. Este risco é maior em CU do que em DC (Pohl *et al.*, 2000).

Em ambas as doenças podem aparecer complicações do tipo autoimune e afetar as articulações, o olho e a pele, e estão presentes em 40% dos casos (Lichtman e Balfour Sartor, 1994). Entre as complicações não autoimunes estão os episódios tromboembólicos, anemia e osteoporose (Szulc e Meunier, 2001; Gasche, 2000).

Características extraintestinais

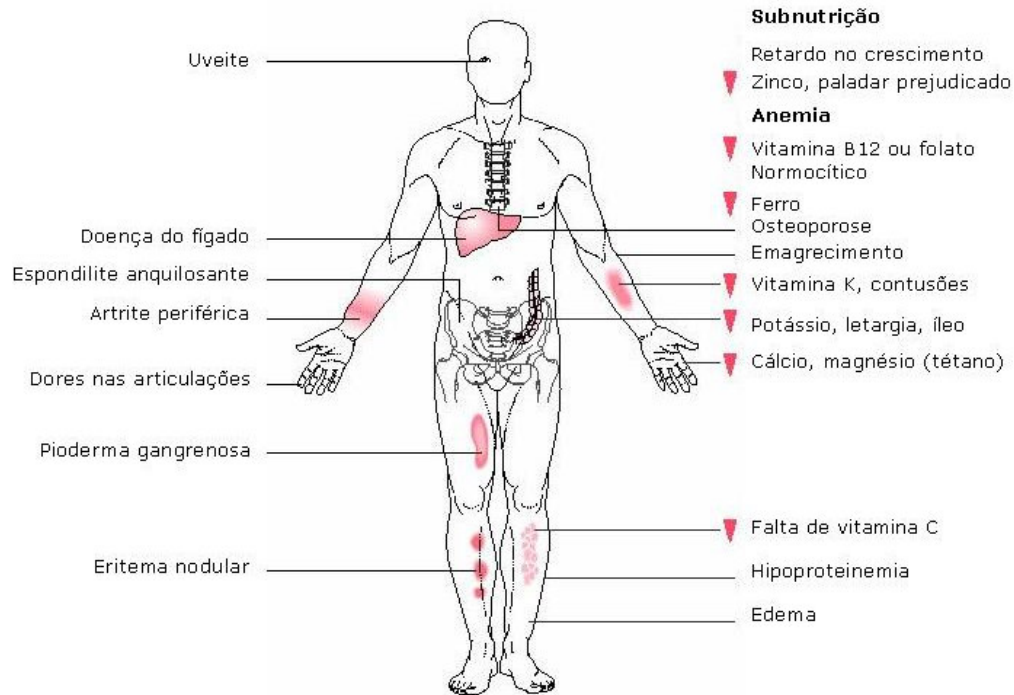


Figura 2. Algumas das complicações extraintestinais e características de subnutrição encontradas em pacientes com Doença de Crohn (Misiewicz *et al.*, 1994).

1.2. Epidemiologia

A CU afeta ambos os sexos e, embora exista um pico de ocorrência entre a segunda e quarta décadas de vida do indivíduo e um segundo pico de ocorrência na sexta década (Corman, 2005; Mazier, 1995), essa doença tem sido relatada em todas as décadas de vida.

Até o presente momento, o entendimento da epidemiologia da CU é limitado. O processo de ocidentalização está intimamente relacionado com o aparecimento das DII no último meio século. Parece ter havido um gradiente Norte-Sul tanto na América do Norte como na Europa durante a década de 80. Estudos recentes, especialmente na Europa, indicam que este gradiente está se reduzindo devido, aparentemente, a um aumento nas regiões do Sul e a uma estabilização nas áreas do Norte (Sonnenberg *et al.*, 1991).

Existe ainda a dificuldade de diferenciar a CU e DC, podendo passar anos de evolução até o diagnóstico definitivo (Keighley e Williams, 1998). De uma maneira geral, pode-se considerar uma incidência aproximada de 10 casos para 100.000 habitantes para a CU (Seril *et al.*, 2003) e 3 casos para cada 100.000 habitantes para a DC (Cotran *et al.*, 2000).

No Brasil, como em outros países em desenvolvimento (Irvine *et al.*, 2001), a determinação da prevalência e da incidência das DII é difícil em função das deficiências dos sistemas de registro de dados, bem como da impossibilidade do acesso às informações de fora do sistema público de saúde (Souza *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos sobre a CU são difíceis, provavelmente porque casos leves podem ser negligenciados (Gordon e Nivatvongs, 1992), bem como pode ocorrer uma superestimativa da doença em locais onde as diarreias infecciosas são muito prevalentes (Damiani, 2006).

1.3. Etiologia

Apesar de não se conhecer claramente a etiologia das DII, alguns pesquisadores afirmam que decorre de problemas no sistema imunológico em que os anticorpos do próprio organismo atacam o cólon, enquanto outros especulam que um microorganismo não identificado seja responsável pela doença, no entanto, é provável que a combinação de fatores genéticos, infecciosos, imunológicos e psicológicos esteja envolvida na etiologia desta doença (Fiocchi, 1998; Sartor, 1997) (Figura 3).

Inúmeros fatores têm sido apontados como desencadeadores da CU, entre eles: anormalidades do sistema imune, fatores genéticos e fatores ambientais.

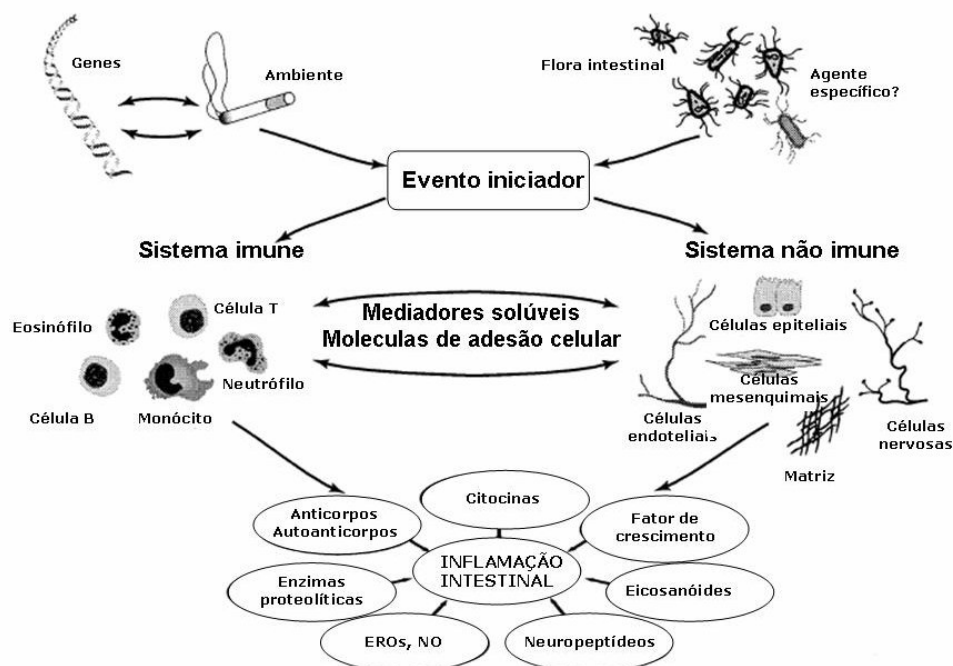


Figura 3. Etiologia das doenças inflamatórias intestinais (Fiocchi, 1998).

1.3.1. Sistema imune

O conceito de que a causa das DII é de natureza imunológica veio da observação de que estas doenças são caracterizadas por infiltrados celulares maciços e anormalidades no sistema imune que incluem produção inapropriada de anticorpos e disfunções de células T (Blumberg e Strober, 2001).

O papel das citocinas no sistema imune da mucosa tem sido extensivamente estudado nas DII. Elas são secretadas por macrófagos, linfócitos e neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e sua síntese é induzida pela ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), um fator de transcrição que está envolvido na regulação de muitos genes associados à inflamação (Fiocchi, 1994; Elson *et al.*, 1995). Existe evidência de um desbalanço entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nas DII: estudos detectaram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Fiocchi, 1994; Elson *et al.*, 1995).

1.3.2. Fatores genéticos

A predisposição familiar é claramente um fator na etiologia das DII. A incidência de CU mostra uma ampla variação de 1% a 16% entre membros imediatos da família, com um aumento possível de 10 vezes na probabilidade de ocorrência quando os pais têm a doença. Estudos mostraram uma alta ocorrência das DII em gêmeos homozigóticos (aproximadamente 60%) maior que entre gêmeos heterozigóticos (Blumberg e Strober, 2001). O escaneamento do genoma de pacientes com DII identificou *loci* nos cromossomos 16 e 12 e potenciais *loci* nos cromossomos 1, 3, 6 e 7 (Hugot *et al.*, 1996), apontando a causa poligênica da doença.

1.3.3. Fatores ambientais

A influência de fatores ambientais no desenvolvimento das DII é evidente dado o dramático aumento na incidência, tanto de CU como de DC, durante a segunda metade do século XX como consequência de profundas mudanças no estilo de vida em países desenvolvidos (Wills-Karp *et al.*, 2001).

Assim como para o câncer de cólon, indivíduos de baixo risco para a CU, quando emigram para regiões de maior prevalência da mesma, passam a apresentar um risco aumentado de desenvolvê-la, sugerindo o envolvimento de fatores ambientais (Corman, 2005). São inúmeros os fatores ambientais de risco para a CU, entre eles: o tabaco, a dieta, a situação social, o estresse, fármacos e microorganismos (Danese *et al.*, 2004).

Ao contrário do que ocorre em pacientes com DC cujo hábito de fumar aumenta a frequência de recidivas e a necessidade de cirurgia e sua interrupção melhora a doença, o risco de desenvolvimento de CU em fumantes que deixam o vício é aumentado, sugerindo que seu papel seja protetor nesta doença (Bridger *et al.*, 2002). Em diferentes modelos se observa que a administração de nicotina melhora a CU coincidindo com uma diminuição local da concentração de várias citocinas próinflamatórias (Agrawal e Rhodes, 2003). Implantes de nicotina trouxeram melhoras ao paciente (Guslandi e Tittobello, 1996; Pullan *et al.* 1994) e enemas à base de nicotina também se mostraram benéficos (Green *et al.*, 1997).

Por se tratar de uma doença do trato digestório, a possibilidade de produtos da dieta estarem implicados em sua patogenia é lógica. Levando em consideração que a maior incidência das DII pode ser associada a mudanças nos hábitos de vida nos países ocidentais e que o intestino é o principal local do processo inflamatório, seria provável que alguns nutrientes presentes na luz intestinal pudessem atuar como antígenos, inclusive influenciando os mecanismos imunes e reparadores da mucosa intestinal (Danese *et al.*, 2004).

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que a mudança na composição da dieta pode afetar a resposta imunológica. Concretamente, os lipídeos são um dos substratos nutricionais que mais afetam a modulação da imunidade. A composição dos lipídeos das membranas celulares pode variar segundo a dieta e isto influencia a síntese de eicosanóides e a resposta celular (Gassull, 2004; Gassull *et al.*, 2005). O consumo de gordura tem sido associado positivamente com a CU, e o consumo de frutas, vegetais e fibras está associado à diminuição de risco das DII (Reif *et al.*, 1997).

Tradicionalmente, CU e DC têm sido mais comuns entre grupos socioeconomicamente mais altos e em trabalhadores sedentários que devido a esta condição podem ter prolongado o tempo de contato de antígenos da alimentação com a parede intestinal, resultando em uma estimulação inapropriada e em reação inflamatória (Cucino e Sonnenberg, 2001).

O estresse tem sido considerado como um desencadeante potencial em cerca de 40% dos pacientes com CU (Theis e Boyko, 1994). Importantes evidências relacionam o estresse com a doença, provavelmente, devido a um aumento na suscetibilidade à infecção como consequência do deterioramento das respostas imunes funcionais (Herbert e Cohen, 1993). Observações clínicas, modelos experimentais de colite e estudos de interações neuroimunes em animais de laboratório têm demonstrado que o estresse pode agravar o curso das DII (Collins, 2001). A duração do estresse também pode ser importante já que o risco de exacerbação da atividade clínica da doença parece estar associado com um estado de estresse prolongado (Levenstein *et al.*, 2000).

Outro fator ambiental envolvido na etiologia destas doenças é o uso de agentes antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) e de anticoncepcionais orais que tem sido associado a um risco aumentado de desenvolvimento das DII

(Evans *et al.*, 1997; Hanauer e Sandborn, 2001; Godet *et al.*, 1995). No entanto, estudos envolvendo a associação de anticoncepcionais orais e risco de desenvolvimento das DII ainda são inconsistentes (Evans *et al.*, 2001; Alstead, 1999).

Durante muitos anos buscou-se estabelecer uma relação entre um agente infeccioso específico e DII sem obtenção de resultados conclusivos. São variados os agentes infecciosos específicos do tipo microbiano que têm sido propostos como responsáveis pelas DII como *Listeria monocytogenes*, *Clamýdia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Danese *et al.*, 2004). Atualmente, a flora intestinal é considerada fundamental no desenvolvimento deste tipo de desordem. A relação entre o desenvolvimento das DII e a flora intestinal comensal começou a se estabelecer através de observações clínicas. Diversos autores têm proposto uma alteração na ecologia microbiana em pacientes com DII ativa, tendo encontrado um decréscimo significativo no número de bactérias anaeróbicas e lactobacilos (Fabia *et al.*, 1993). Além disso, o epitélio destes pacientes apresenta um maior número e concentração de bactérias, tanto intracelulares como nos biofilmes que o cobrem em relação a indivíduos saudáveis (Swidsinski *et al.*, 2002).

Estudos com modelos de inflamação intestinal que mimetizam o que ocorre em humanos mostraram que a flora bacteriana tem papel essencial na inflamação experimental já que não ocorreu inflamação em roedores em ambientes livres de patógenos (*germ-free*) e ocorreu uma redução da inflamação intestinal em animais tratados com antibióticos (Rath *et al.*, 1996).

A demonstração mais recente de que probióticos ingeridos em quantidades adequadas produzem efeitos benéficos para a saúde melhorando tanto DII humana como a colite experimental aumenta a importância do papel da flora intestinal nesta doença (Sartor *et al.*, 2005). Da mesma forma, prebióticos como a lactulosa, um fármaco usado como laxante, promove o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias e de acordo com Camuesco *et al.* (2005), a lactulosa facilita a recuperação do tecido inflamado na colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos cujo efeito foi associado a uma atenuação da resposta imune.

1.4. Fisiopatologia

O intestino, ao constituir uma barreira em contato com o exterior, é particularmente propenso à inflamação e, sob circunstâncias normais, manifesta uma “inflamação fisiológica” representada por uma grande infiltração de leucócitos, que se encontram normalmente na mucosa, em resposta a antígenos microbianos da dieta (Fiocchi, 2003). Este processo inflamatório fisiológico ocorre de forma satisfatória quando é autolimitado e desaparece uma vez que o agente indutor tenha sido eliminado graças a uma resposta imune apropriada. Quando esta resposta imune se prolonga, origina um estado inflamatório crônico.

Acredita-se que a CU, assim como a DC, seja resultado de uma resposta inapropriada e mantida do sistema imune da mucosa à flora entérica normal em um indivíduo geneticamente suscetível, provavelmente facilitada por alterações na barreira epitelial e mediada principalmente por células T da mucosa, com perda de tolerância frente a esta flora endógena (Podolsky, 2002).

A alteração na permeabilidade intestinal pode ser um fator desencadeante do processo inflamatório neste local, já que um epitélio facilmente permeável pode permitir a entrada de antígenos bacterianos ou procedentes da dieta na lâmina própria. A função absorptiva colônica encontra-se profundamente alterada na inflamação intestinal (Sánchez de Medina *et al.*, 2002); sua restauração pode contribuir para a melhora da colite experimental, como observado com uso dos flavonóides quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996), rutina (Gálvez *et al.*, 1997), hesperidina (Crespo *et al.*, 1999) e morina (Ocete *et al.*, 1998).

1.4.1. Mediadores inflamatórios

O entendimento de mecanismos e moléculas da inflamação tem se expandido a partir da década de 80. A descoberta de novas classes de proteínas e mediadores lipídicos envolvidos na inflamação tem mudado claramente a percepção da sua patogênese gerando novas possibilidades de

desenvolver fármacos para o tratamento dessas doenças (Cronstein e Weissmann, 1995).

Do ponto de vista bioquímico, tem-se observado a existência de diversas alterações na síntese e liberação de distintos mediadores implicados na manutenção e amplificação da resposta imune-inflamatória (Nielsen e Rask-Madsen, 1996). Neste sentido, está descrito um grande aumento na síntese colônica de leucotrieno B-4 (LTB-4) em pacientes com DII (Wallace, 1994). O LTB-4 é um agente pró-inflamatório devido a sua capacidade quimiotática e ativadora de neutrófilos, sendo um mediador característico nas lesões inflamatórias agudas e que pode ser o responsável por grande parte da destruição celular e necrose que caracterizam as DII (Nielsen *et al.*, 1987).

A destruição celular e a necrose, por sua vez, ocorrem devido a secreção de distintas proteases e de mieloperoxidase, assim como a geração de radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio. Espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio têm sido implicadas como mediadores da quebra da barreira intestinal nas DII (Grisham, 1994; Middleton *et al.*, 1993).

Embora seja evidente que o óxido nítrico (NO) é um mediador chave nos processos de inflamação intestinal, há atualmente uma enorme controvérsia em relação ao papel deste mediador na fisiopatologia da inflamação intestinal. No entanto, tem-se observado que o sistema enzimático envolvido na síntese do NO parece ser importante, mas depende do estágio, agudo ou crônico, em que se encontra o processo inflamatório (Miller e Grisham, 1995; Kubes e Wallace, 1995). Uma produção aumentada de NO devido a expressão da isoforma induzível da NO sintase (iNOS) também tem importante papel em vários modelos de inflamação, incluindo CU (Cuzzocrea *et al.*, 1998).

Essas substâncias reativas têm um importante papel na supra-regulação da seqüência de eventos inflamatórios via ativação do NF- κ B, um fator de expressão envolvido na regulação de várias citocinas e estimulação da expressão de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e selectina-P (Lefer e Lefer, 1999; Winrow *et al.*, 1993) (Figura 4). Tem-se comprovado que em doenças intestinais ocorrem alterações na expressão de algumas citocinas, entre as quais a IL-1, agente pró-inflamatório capaz de estimular a ativação e quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos (Fiocchi, 1994).

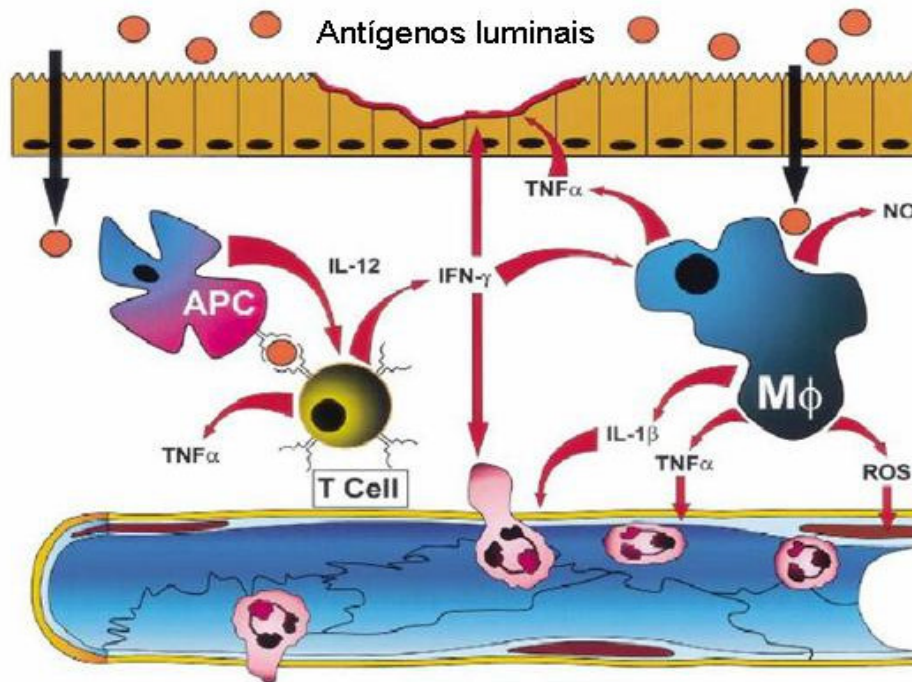


Figura 4. Respostas imunes mediadas por células no cólon. Células apresentadoras de antígenos (APCs) fazem endocitose, processam e apresentam antígenos luminiais que continuamente ganham acesso ao interstício da mucosa. A interação entre APCs e células-T (T cell) ativa estas a produzirem Interleucina (IL)-2 e interferon-gama (IFN- γ), os quais ativam macrófagos teciduais ($M\phi$) a liberarem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e mediadores incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-12, NO e ROS. IL-12 retroalimenta as células T efetoras a induzir diferenciação de células T auxiliaadoras-1 (Th-1). Citocinas e mediadores derivados de Th-1 e $M\phi$ ativam o endotélio microvascular para aumentar a expressão de moléculas de adesão, desse modo promovendo o recrutamento de leucócitos fagocíticos como polimorfonucleares. O resultado é a destruição de patógenos invasores. A resposta imune da mucosa descontrolada pode resultar em injúria tecidual (Pavlick *et al.*, 2002).

Todos estes agentes pró-inflamatórios promovem, em primeiro lugar, a aderência dos fagócitos no endotélio vascular e o extravasamento destas células para a mucosa intestinal e, em segundo lugar, a ativação destes fagócitos originam a liberação de radicais livres, assim como de enzimas proteolíticas no espaço intersticial intestinal. Tanto os radicais livres como as enzimas proteolíticas dão lugar a formação de mais mediadores inflamatórios, incrementando a permeabilidade da mucosa e, em última instância,

favorecendo a entrada de produtos bacterianos prejudiciais, tais como o lipopolissacarídeo. A introdução destes produtos promove o recrutamento e ativação adicional de leucócitos do intestino, estabelecendo-se um círculo vicioso responsável pela instauração do prejuízo intestinal crônico (Shanahan e Targan, 1994).

O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana celular e a conseqüente morte da célula. Os radicais livres podem também reagir com proteínas, dando lugar a alterações da funcionalidade normal da célula. Finalmente, quando os ácidos nucléicos são afetados pelos radicais livres, pode-se originar uma síntese protéica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com conseqüente perigo de desenvolvimento de processos do tipo tumoral. Este último poderia justificar a maior incidência de câncer colo-retal descrito em pacientes com CU (Gitnick, 1996; Obrador, 1994).

De acordo com estas informações, pode-se deduzir que os radicais livres desempenham um papel chave na gênese e manutenção das DII. Em alguns estudos comprovou-se a existência de alterações nos níveis oxidativos de biópsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade (Lih-Brody *et al.*, 1996). Este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição nas defesas antioxidantes fisiológicas (Loguercio, 1996).

A mucosa gástrica é dotada de vários sistemas de defesa antioxidante cuja função é neutralizar os efeitos danosos da formação contínua de EROs. Entre os sistemas de defesa antioxidante as sulfidrilas endógenas, principalmente a glutathiona reduzida, têm papel principal na citoproteção contra estresse oxidativo em vários modelos (Takeuchi *et al.*, 1993; Matersson *et al.*, 1990).

Existe uma importante correlação entre os níveis de glutathiona (GSH) em sua forma reduzida e os mecanismos enzimáticos de defesa. Um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres envolve a enzima GSH peroxidase, encontrada em muitos tecidos de origem animal. Sua atividade enzimática é um dos meios do organismo controlar os níveis de

peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (Meister e Anderson, 1983, Cohen e Hochstein, 1963). Outra enzima que age conjuntamente com a GSH peroxidase é a GSH redutase. Esta enzima não age na remoção de espécies radicalares, porém, é responsável pela regeneração da GSH reduzida na presença de NADPH, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da GSH (Meister e Anderson, 1983).

Desta forma, a inibição ou neutralização destes radicais livres, juntamente com uma ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, poderia ser benéfico no tratamento das DII (Nielsen e Rask-Madsen, 1996). De fato, fármacos eficazes usados correntemente no tratamento das DII, tais como os derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), possuem propriedades antioxidantes que contribuem para seus efeitos benéficos no processo inflamatório colônico (Pavlick *et al.*, 2002). Entretanto, deve-se considerar que derivados do 5-ASA causam sérios efeitos colaterais quando usados em altas doses ou durante um período prolongado, o que limita seu uso (Ransford e Langman, 2002).

1.5. Tratamento farmacológico

Até os dias atuais não existe uma terapia farmacológica definitiva para CU, sendo que os fármacos em uso visam produzir e manter estados de remissão da doença, porém sem curá-las. A severidade da doença deve ser considerada ao se instituir o tratamento farmacológico (Corman, 2005). Há muitos anos os fármacos mais utilizados para o tratamento da CU leve e moderada são os aminossalicilatos, em especial a sulfassalazina. Inicialmente acreditava-se que a melhora do quadro era devido ao efeito antibiótico da mesma; hoje, sabe-se que existe uma atividade farmacológica múltipla como: inibição da síntese de prostaglandinas (PG), inibição de enzimas proteolíticas e imunossupressão. Porém, assim como a maioria dos fármacos, a sulfassalazina possui efeitos colaterais como: *rash* cutâneo, depressão da medula óssea, náuseas, cefaléia, hemólise em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, anorexia, deficiência de ácido fólico, hepatite, pancreatite, pneumonite, eosinofilia, alveolite fibrosante, colite e anormalidades

nos espermatozóides, podendo levar à infertilidade masculina. Esses efeitos podem ser dose-dependentes ou devido à reação idiossincrásica. A sulfassalazina é composta pelo 5-ASA – constituinte ativo mais importante e efetivo para tratamento e manutenção da remissão (Corman, 2005; Pearson *et al.*, 1996; Dallegri *et al.*, 1990; Miyachi *et al.*, 1987), e sulfapiridina que serve para transportar o aminossalicilato, mas é tóxica (Azad Khan *et al.*, 1977).

Na CU moderada à severa ou em pacientes que não respondem aos aminossalicilatos, exceto para a terapia de manutenção, empregam-se os corticosteróides. Para a colite distal podem ser utilizados também na forma de enemas. A budenosida é um glicocorticóide que possui menos efeitos colaterais sistêmicos, porém o custo é maior. Os efeitos tóxicos dos corticosteróides dependem da dose e duração do tratamento e incluem o mascaramento de abdômen agudo, doenças metabólicas ósseas e retardo no crescimento em crianças (Corman, 2005).

Os imunomoduladores (azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina) são fármacos aceitos como apropriados para o manejo por longo tempo em pacientes com DII. Seu uso racional é baseado na observação de mecanismos imunes envolvidos na patogênese da doença. O tempo necessário para o medicamento tornar-se efetivo é em torno de três meses, o que os contraindica para o tratamento agudo. A ciclosporina é mais potente e tem início de ação mais imediato, porém com mais efeitos colaterais (disfunção renal, neurotoxicidade e infecções oportunistas), sendo reservada para o tratamento da doença severa, refratária e com contra-indicações para tratamento cirúrgico (Corman, 2005).

Baseado no papel das citocinas nas DII foi definido um uso racional para terapia anticitocina específica. Recentemente, o uso de agentes anti-TNF- α tem demonstrado efetividade em casos de Doença de Crohn em pacientes corticóide-dependentes ou pacientes intratáveis, bem como aqueles com fístulas crônicas. O TNF- α está associado com injúria tecidual associada à endotoxemia, estimula o crescimento de fibroblastos humanos, ativa neutrófilos e osteoclastos, e é responsável pela indução de IL-1 e PGE₂ (Corman, 2005; Wallace *et al.*, 1992).

Outros agentes e medidas utilizadas no tratamento das DII incluem enema de sucralfato, enema de butirato, probióticos, nicotina, agentes antidiarréicos, medidas dietéticas e psicoterapia (Corman, 2005).

Considerando que derivados do 5-ASA causam sérios efeitos colaterais quando usados em altas doses ou durante um período prolongado e que os fármacos mais recentes são de alto custo, a busca de novos fármacos para a prevenção e tratamento destas doenças tem sido considerada importante, sendo que, a avaliação de novos compostos com atividade antioxidante se mostra como uma estratégia interessante para o desenvolvimento de novos tratamentos para a DII. Inúmeros estudos descrevem os efeitos benéficos de diferentes compostos com propriedades antioxidantes em modelos experimentais de CU, incluindo flavonóides como a quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 2001; Sánchez de Medina *et al.*, 1996), rutosídeo (Gálvez *et al.*, 1997), silimarina (Cruz *et al.*, 2001), morina (Gálvez *et al.*, 2001; Ocete *et al.*, 1998), diosmina e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), vitamina E (González *et al.*, 2001) e tempol (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

2. Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais ou seus compostos ativos na prevenção ou tratamento de doenças crônicas é baseado fundamentalmente na medicina tradicional de vários grupos étnicos e em dados etnofarmacológicos. Inúmeras substâncias químicas obtidas de plantas e microorganismos têm proporcionado à indústria farmacêutica uma das mais importantes fontes de componentes para a pesquisa de novos medicamentos, sendo que, nas últimas décadas, os estudos foram direcionados pela medicina popular com o objetivo de identificar produtos naturais com propriedades terapêuticas (Silva *et al.*, 1997).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais como única forma de acesso para suas necessidades básicas de saúde (Farnsworth *et al.*, 1985).

Na metade do século XIX não menos que 80% de todos os medicamentos eram derivados de plantas, mas com a revolução inspirada pelo desenvolvimento da indústria farmacêutica, os fármacos sintéticos dominaram, embora a medicina tradicional nunca tenha saído de cena.

As plantas têm importância como matéria-prima para a obtenção de novos medicamentos, seja como um fitoterápico padronizado ou como fonte de novos fármacos. De fato, hoje, muitas classes de fármacos incluem um protótipo de produto natural (Gilani *et al.*, 1992). Aspirina, atropina, artemisinina, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, fisostigmina, pilocarpina, quinina, quinidina, reserpina, taxol, tubocurarina, vimblastina e vincristina são alguns exemplos. Muitos desses fármacos derivados de plantas foram originalmente descobertos através de estudos com base em dados de medicinas tradicionais e conhecimento folclórico de povos indígenas e alguns destes não puderam ser sintetizados apesar do enorme avanço na química sintética.

As plantas contêm vários compostos bioativos, incluindo fitoesteróis, fitoestrógenos, polifenóis e ácidos graxos poliinsaturados (Foster *et al.*, 2005). Muitos desses compostos têm sido investigados por suas propriedades antiinflamatória, antioxidante e ou anticarcinogênica, e têm mostrado modulação de numerosas funções imunológicas e celulares (Barnes e Prasain, 2005; Mechanick, 2005). A maioria dos metabólitos secundários é conhecida por interferir direta ou indiretamente com as seguintes moléculas e/ou mecanismos: vários mediadores inflamatórios (ex. metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, etc), a produção e/ou ação de segundos mensageiros (como guanosina monofosfato cíclico (cGMP), adenosina monofosfato cíclico (cAMP), várias proteína-kinases e cálcio, entre outros), a expressão de fatores de transcrição como AP-1, NF- κ B e protooncogenes (*c-jun*, *c-fos* e *c-myc*) e a expressão de moléculas-chave próinflamatórias como iNOS, COX-2, citocinas (IL-1 β , TNF- α , etc), neuropeptídeos e proteases (Calixto *et al.*, 2003).

Compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundários vegetais distribuídos, com mais que 8.000 estruturas fenólicas correntemente conhecidas. Os polifenóis podem ser moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos), sendo os flavonóides o subgrupo mais comum e amplamente distribuído (Bravo, 1998).

Os flavonóides compreendem uma classe de produtos naturais que são encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, ervas, especiarias, tronco,

flores, chá e vinho tinto e são consumidos regularmente como parte da dieta humana. Eles exibem atividades biológicas como: antibacteriana, antiinflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, anti-trombótica, anti-viral, anti-carcinogênica e ações vasodilatadoras (Middleton Jr. e Kandaswami, 2000), sendo que muitas dessas funções biológicas têm sido atribuídas a sua atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres.

As atividades de seqüestro de radicais livres e antioxidante dependem do arranjo dos grupos funcionais ao redor da estrutura nuclear, sendo que o número e a configuração dos grupos hidroxila doadores de hidrogênio são as principais características que as influenciam (Cao *et al.*, 1997; Shekher Pannala *et al.*, 2001). Essas atividades são devido a transferência de hidrogênio desse grupo para espécies radicalares ativas, como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e radical lipídico peroxila (LOO^{\cdot}).

Recentemente, muita atenção tem sido dada para as propriedades antioxidantes dos flavonóides que afetam os radicais livres do oxigênio e peroxidação lipídica e estas podem estar envolvidas em várias condições patológicas como aterosclerose, câncer e inflamação crônica (Halliwell, 1994). Existe um interesse emergente no uso de antioxidantes de ocorrência natural para a preservação de alimentos e manejo de condições fisiopatológicas. A implicação de estresse oxidativo e nitrosativo na etiologia e progresso de várias doenças clínicas agudas e crônicas leva a sugerir que antioxidantes podem ser benéficos como agentes profiláticos (Soobrattee *et al.*, 2005), entre elas as doenças inflamatórias intestinais.

Muitos estudos *in vitro* têm mostrado que os flavonóides podem inibir, e algumas vezes induzir, uma grande variedade de sistemas enzimáticos de mamíferos. Algumas enzimas estão envolvidas em importantes vias que regulam divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, detoxificação e respostas inflamatória e imune (Middleton Jr. e Kandaswami, 2000).

Os efeitos dos flavonóides no sistema imune são complexos e não parecem claros. Em altas concentrações eles inibem a função dos linfócitos, mas em baixas concentrações talvez ajam como imunoestimulantes nos indivíduos imunodeficientes (Boik, 1996). A atividade imunomoduladora dos flavonóides depende em parte da sua capacidade de inibir a formação de eicosanóides e histaminas (Di Carlo *et al.*, 1999).

Considerando-se a etiologia multifatorial das DII, produtos que reúnam atividade antioxidante, antiinflamatória e imunomoduladora representam uma possibilidade potencial para a descoberta de novos fármacos eficazes na prevenção e tratamento desta doença. Neste sentido, inúmeras alternativas de novas pesquisas surgem com base em produtos naturais.

2.1. *Baccharis dracunculifolia* De Candole (Asteraceae)

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e, raramente, árvores (Heywood, 1993). Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, sendo encontrados em todos os tipos de *habitat*, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Joly, 1967).

O gênero *Baccharis* está representado por mais de quinhentas espécies distribuídas principalmente em áreas tropicais na América do Sul como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas (Malagarriga Heras, 1976). Como recentemente revisado por Verdi *et al.* (2005), no Brasil estão descritas pelo menos 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizada na região sudeste do país.

As espécies do gênero *Baccharis* são consumidas, principalmente, na forma de chás, com as mais variadas indicações, tratamento e prevenção de anemias, inflamação, diabetes e doenças do estômago, fígado e próstata (Verdi *et al.*, 2005). O estudo dessas espécies tem mostrado grandes avanços devido ao seu reputado uso na medicina caseira na América Latina. Cerca de 120 espécies foram estudadas quimicamente e, dentre estas, cerca de trinta apresentam estudos de atividade biológica, dos quais se destacam os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios (Verdi *et al.*, 2005). Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontram-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (Verdi *et al.*, 2005).

Entre as espécies denominadas coletivamente de carqueja, está a *B. dracunculifolia* (Figuras 5 e 6), que é também popularmente conhecida como alecrim-do-campo, alecrim-de-vassoura, vassourinha, vassoureira, vassoura, erva-de-são-joão-maria, *chilca*, *cilca* e *suncho thola* (Takeda e Farago, 2001; Ariza Espinar, 1973). A partir de suas folhas é extraído, por arraste de vapor, o óleo de vassoura, de alto valor para a indústria de fragrâncias (Queiroga, 1989). Esta espécie é um arbusto que cresce espontaneamente no cerrado brasileiro. É utilizada na medicina tradicional como um antiinflamatório, para o tratamento de doenças gastrintestinais, úlceras estomacais, para combater cansaço físico, inapetência, afecções febris, debilidade orgânica e desordens do fígado (Menezes, 2005; Mors *et al.*, 2000; Silva Júnior, 1997; Queiroga *et al.*, 1990). Estudos recentes mostraram as seguintes atividades biológicas: antiulcerogênica (Lemos *et al.*, 2007), imunomoduladora (Missima *et al.*, 2007), citotóxica (Fukuda *et al.*, 2006), anticariogênica (Leitão *et al.*, 2004) e tripanocida (da Silva Filho *et al.*, 2004). Além disso, *B. dracunculifolia* tem sido a fonte botânica mais importante para produção de própolis verde (Kumazawa *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2002; Midorikawa *et al.*, 2001) para a qual têm sido atribuídas inúmeras atividades biológicas.



Figura 5. Arbusto de *Baccharis dracunculifolia* – Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP) / SP.



Figura 6. Detalhe do ramo com flores de *Baccharis dracunculifolia* – Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP) /SP.

2.2. Própolis

2.2.1. Aspectos gerais

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas melíferas de brotos e exsudatos de plantas cuja aparência física varia muito devido a diversos fatores. Sua cor pode ser creme, amarela, verde, marrom claro ou escuro. Algumas amostras são friáveis com textura dura enquanto outras podem ser elásticas e pastosas. A palavra própolis é de origem grega, *pro*, em defesa de, e *polis*, cidade. As abelhas utilizam a própolis para diversos propósitos, entre eles como uma barreira protetora para selar a abertura da colméia, contribuindo para obtenção de um ambiente interno asséptico. Além de impedir a entrada de intrusos, ajuda a manter a temperatura interna próxima a 35°C. O reconhecimento da eficácia antisséptica da própolis é antigo. Aristóteles recomendou o uso da própolis para tratar abscessos e feridas. Soldados romanos carregavam própolis como um remédio para emergências para feridas de guerra.

2.2.2. Origem da Própolis Verde

Foram apontadas possíveis fontes vegetais para a própolis verde como *Araucaria angustifolia*, *B. dracunculifolia* e *Eucalyptus citriodora* (Lopes *et al.*, 2003). No entanto, estudos de observação comportamental de abelhas melíferas e análises fitoquímicas mostraram que a origem vegetal da própolis verde é de brotos e exsudatos de *B. dracunculifolia* (Teixeira *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2003) (Figura 7). Foi observado que muitos compostos presentes em *B. dracunculifolia* também estão presentes na própolis verde, como derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e flavonóides (Alencar *et al.*, 2005; Kumazawa *et al.*, 2003; Marcucci *et al.*, 1998; Labbe *et al.*, 1986).



Figura 7. Interação entre *Apis mellifera* e *Baccharis dracunculifolia*. *Apis mellifera* coletando ápices foliares de *Baccharis dracunculifolia* (a), em seguida, o material é transportado para a colméia onde é misturado com a secreção salivar para a formação da própolis verde que é depositada em frestas e aberturas para selá-las (b, c) (Kumazawa *et al.*, 2003).

2.2.3. Composição química

A própolis é uma importante fonte de constituintes ativos para a qual têm sido descritos inúmeros compostos químicos e atividades farmacológicas, agindo especialmente como antiulcerogênica (Barros *et al.*, 2007), antioxidante (Simões *et al.*, 2004), antiinflamatória (Montpied *et al.*, 2003), hepatoprotetora (Seo *et al.*, 2003), anticarcinogênica (Bazo *et al.*, 2002), antimicrobiana (Marcucci *et al.*, 2001), anticariogênica (Park *et al.*, 1998), anestésica (Campos *et al.*, 1998), fungicida (Marcucci *et al.*, 1995), imunomoduladora (Dimov *et al.*, 1992) e cicatrizante (Ghisalberti, 1979). Recentemente a própolis tem sido extensivamente usada em alimentos e bebidas para melhorar a saúde e prevenir doenças (Bankova *et al.*, 2000).

A composição da própolis é extremamente complexa. Os principais constituintes são cera de abelha secretada por estes insetos, resina e compostos voláteis obtidos de plantas. A atividade biológica é atribuída às substâncias derivadas de plantas. Apesar das propriedades biológicas, a composição química da própolis pode variar de acordo com a localização geográfica da fonte botânica (Sforcin *et al.*, 2005) e época de coleta, o que dificultaria a padronização de material bruto e produtos comerciais para propósitos medicinais (Leitão *et al.*, 2004).

As principais substâncias químicas encontradas na própolis européia são o ácido benzóico e seus ésteres, os ácidos e ésteres fenólicos substituídos, flavonóides, carboidratos, ácidos graxos, terpenos, entre outros. Entretanto, como era de se esperar por causa da grande biodiversidade de plantas existente no Brasil, a própolis foi classificada em 12 grupos baseada em características físico-químicas: cinco na região sul, uma na região sudeste e seis na região nordeste (Park *et al.*, 2000a; Park *et al.*, 2000b). A própolis produzida no sudeste brasileiro, conhecida como própolis brasileira ou verde, devido a elevada concentração de clorofila, tem uma composição química bastante distinta da européia possuindo ácidos cumárico, ferúlico, cinâmico, kaempferol, kaempferide, isosakuranetina, crisina, acacetina e artepelina C, como determinados através de estudos com cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa (CLAE-FR) (Park *et al.*, 2004). A sua ação

farmacológica deve-se em grande parte à presença dos ácidos fenólicos e derivados (Custodio e Marcucci, 2005).

Considerando que a espécie *Baccharis dracunculifolia* DC é a principal fonte dos constituintes da própolis brasileira (Teixeira *et al.*, 2005; Salatino *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004) e que os constituintes químicos do extrato de broto foliar têm mostrado similaridade àqueles encontrados na própolis verde (Park *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004), ela representaria uma importante alternativa para estudos de sua atividade antiinflamatória intestinal e seu extrato poderia ser incorporado a produtos farmacêuticos.

Objetivos

O presente estudo considerou que, devido a composição química e atividades biológicas descritas, a espécie *Baccharis dracunculifolia* DC é uma fonte de compostos com potencialidade em apresentar atividade biológica na prevenção e tratamento da colite ulcerativa e de outras doenças inflamatórias intestinais. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar a atividade antiinflamatória intestinal do extrato de acetato de etila das folhas desta espécie em duas situações experimentais distintas:

- Fase aguda de colite experimental – quando a mucosa colônica estiver intacta, tendo em vista a avaliação do efeito preventivo;
- Fase crônica de colite experimental – quando a mucosa colônica estiver afetada por um processo inflamatório intestinal, tendo em vista a avaliação do efeito curativo assim como preventivo da recidiva do processo inflamatório, similar ao que ocorre com a colite ulcerativa em humanos.

Materiais e Métodos

1. Material vegetal

1.1. Coleta e identificação

Partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* foram coletadas no Sítio Boa Esperança, localizado em Cajuru/SP, em área constituída de vegetação de Cerrado. Foram confeccionadas exsiccatas do material vegetal coletado e enviada ao Prof. Dr. Jimi N. Nakagima (especialista em taxonomia de Asteraceae do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia/MG) para a confirmação da espécie, além de ser depositada no herbário (SPFR 06143) do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FFCLRP–USP), Ribeirão Preto/SP.

1.2. Secagem, moagem e obtenção do extrato bruto das folhas

O material vegetal fresco foi desidratado e estabilizado em estufa de ar quente e circulante a 40^o C por 48 horas. Após a secagem, 150 g de folhas de *Baccharis dracunculifolia* foram moídos em moinho de facas até obtenção de pó fino. Em seguida, o pó obtido foi submetido a extração por processo de maceração utilizando-se 300 mL de acetato de etila PA por 24 horas a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado sob vácuo a 40^oC, resultando em 7,159 g de extrato bruto, o que corresponde à 4,77% em relação às folhas secas. O extrato bruto resultante foi armazenado em frasco âmbar e mantido ao abrigo da luz até a realização dos experimentos. A escolha deste processo de extração baseou-se em dados preliminares de composição química que inclui compostos potencialmente ativos para o estudo proposto (Resende *et al.*, 2007).

2. Ensaio *in vitro*

2.1. Peroxidação lipídica em membranas de cérebro de rato

A atividade antioxidante do extrato de *B. dracunculifolia* (EBD) foi avaliada através do modelo de inibição da lipoperoxidação induzida por solução de sulfato ferroso e ácido ascórbico (100 µM) em membranas de cérebro de rato, adaptado a partir de Stocks *et al.* (1974) e Fee e Teitelbaum (1972).

Curvas de concentração-resposta do EBD foram determinadas e os resultados comparados com a quercetina (flavonóide usado como referência).

A técnica se baseia na produção de malonildialdeído (MDA) como indicativo de lipoperoxidação. Utilizou-se ácido tricloroacético (TCA) para precipitar proteínas da amostra de membranas e o reativo tiobarbitúrico (TBARS) que reage com o MDA gerando uma coloração cuja intensidade é determinada por espectrofotometria, mediante uma curva-padrão.

Nestes experimentos foram utilizados cérebros de ratos normais. Os cérebros foram pesados e triturados com homogeneizador automático, em gelo, com tampão fosfato sódico (PBS) (19 partes da solução A - NaH_2PO_4 10 mM, e 81 partes da solução B - Na_2HPO_4 10 mM, pH 7) na proporção 1:4 (p/v). O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e estocado à -80°C em alíquotas de 1mL. Para a realização do ensaio, o homogenato estocado foi descongelado em temperatura ambiente e diluído em PBS na proporção 1:10 (v/v). A reação de lipoperoxidação foi processada em tubos *ependorf* de 2 mL. Os grupos testes foram: Branco com incubação, branco sem incubação, controle incubado (DMSO 20%, solvente usado para solubilizar o EBD), controle não incubado, controle máximo (tecido, sulfato férrico e ácido ascórbico) e tubos testes (com as concentrações de 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0, 800.0, 1600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do EBD em soluções estoques e quercetina com concentrações de 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 e 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também em soluções estoques). Para cada amostra, exceto nos brancos, foram adicionados 50 μL da solução de sulfato ferroso ($\text{SO}_4\text{Fe}\cdot\text{H}_2\text{O}$) e ácido ascórbico, ambos para induzir a lipoperoxidação, e 1mL de membrana de cérebro de rato em todos os tubos. Os *ependorfs* foram incubados a 37°C por 12 minutos em banho-maria sob agitação constante. Em seguida foram adicionados 0,5 mL do TBARS 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos foram fechados e colocados novamente sob aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos sem agitação. Alíquotas de 1 mL foram colocadas em *ependorfs* de 1,5 mL e centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Foram retirados 200 μL do sobrenadante das amostras e colocados em placa de 96 canais para realização de leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm. O cálculo da porcentagem de inibição da produção de MDA foi realizado em relação aos

valores obtidos com as amostras de lipoperoxidação máxima (cérebro, ferro e ácido ascórbico a 100 μ M) e a IC₅₀ determinada por regressão.

3. Ensaio *in vivo*

Estes estudos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

3.1. Animais de experimentação

Os animais utilizados neste estudo foram ratos albinos machos Wistar recém-desmamados (21 dias), oriundos do Biotério Central da UNESP e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu/SP (UNESP) até atingirem 200 \pm 20 g de peso para o início dos experimentos. Este biotério possui filtros para entrada e saída de ar, temperatura ambiente controlada de 21 \pm 2 °C e ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos foram alojados em caixas separadas por grupo, com 6 animais por caixa, e alimentados com ração de manutenção Nuvital e água filtrada *ad libitum*.

3.2. Indução da colite experimental

A indução da colite foi realizada pelo método descrito por Morris *et al.* (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados com éter. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25 mL de uma solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um cateter de Teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. A solução de TNBS foi preparada a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v). Os animais do grupo branco foram submetidos

ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

3.3. Desenho experimental

A título de resumo, o desenho experimental da fase aguda de colite está esquematizado na figura 8. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dez grupos experimentais (n = 6):

- Branco (B): animais sem colite e sem tratamento;
- Controle (C): animais com colite sem tratamento;
- Tratados (T): animais com colite tratados com extrato de *Baccharis dracunculifolia* (EBD) nas doses 5, 10, 25, 50, 100 ou 200 mg/Kg;
- Referência (S): animais com colite e tratados com 25 mg/Kg de sulfassalazina.

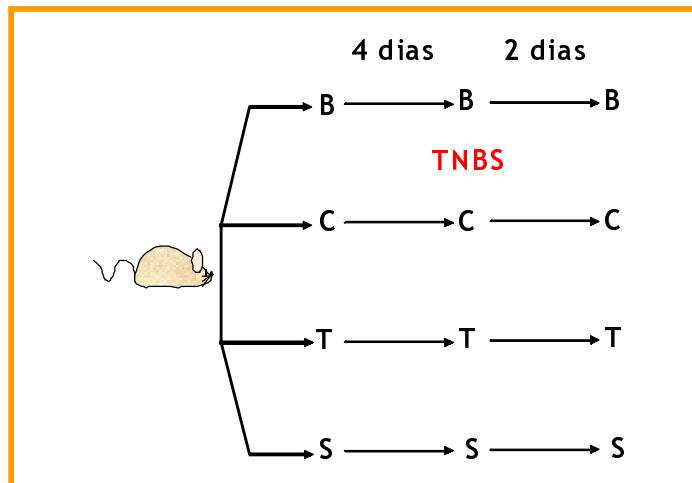


Figura 8. Desenho experimental da fase aguda de colite. B (grupo branco; ratos sem colite); C (grupo controle; ratos colíticos); T (grupo tratado; ratos colíticos tratados com diferentes doses do extrato de *Baccharis dracunculifolia*); S (grupo referência; ratos colíticos tratados com sulfassalazina).

O extrato foi administrado por via oral, utilizando-se uma sonda esofágica em um volume fixo de 1 mL de uma solução dissolvida em Tween 80 a 1%. Os tratamentos foram realizados às 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução, assim como 24 horas após. Os animais do grupo branco receberam 1 mL de salina e aqueles do grupo controle 1 mL de Tween 80 a 1% por via oral enquanto o grupo de referência recebeu 25 mg/Kg de sulfassalazina seguindo a mesma pauta de tratamento usada para a administração do extrato. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite.

Para a recidiva, a colite foi primeiramente induzida com 10 mg de TNBS em etanol 50%, como descrito anteriormente, e depois de 14 dias os animais receberam uma segunda dose de 10 mg de TNBS, na tentativa de mimetizar a recidiva comum em DII de humanos. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos experimentais: um grupo branco, dois grupos controle, mas um sem recidiva, dois grupos tratados (5 ou 50 mg/Kg de extrato) e um grupo de referência (25 mg/Kg de sulfassalazina) (Figura 9). Os tratamentos foram iniciados 2 horas após a indução da colite e continuados até um dia antes dos animais serem mortos. Seis animais de cada grupo, exceto o grupo colítico sem recidiva (CSR), foram mortos depois de 1, 2 ou 3 semanas da indução da colite, enquanto os animais do grupo CSR foram mortos após 3 semanas.

As doses de extrato escolhidas para teste na fase crônica da colite com recidiva foram as que tiveram melhores efeitos na fase aguda.

3.4. Avaliação macroscópica

Ao final dos tratamentos, os animais foram anestesiados com éter e mortos por deslocamento cervical. Em seguida foi observada a existência de adesões entre o cólon e órgãos adjacentes, que pode ser indicativa tanto de perfuração da parede intestinal, como de proliferação de tecido conectivo da parede intestinal. Posteriormente, foi extraído o cólon dos animais em sua totalidade, dispondo-o sobre uma placa de Petri resfriada com gelo e se procedendo com a sua limpeza, retirando-se restos de gorduras e de adesões mesentéricas. Em seguida foram determinados o peso e o comprimento do segmento (sob uma tensão constante de 2 g). O segmento colônico foi aberto

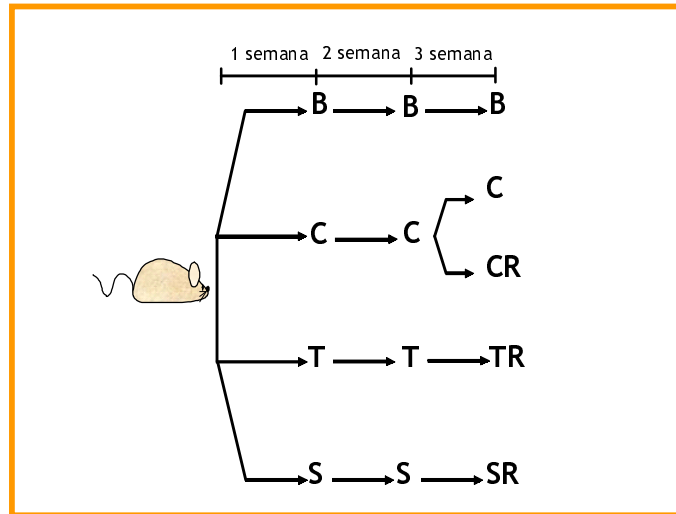


Figura 9. Desenho experimental da fase crônica de colite com recidiva. B (grupo branco; ratos sem colite); C (grupo controle; ratos colíticos sem recidiva); CR (grupo controle com recidiva; ratos colíticos que recebem uma segunda administração de TNBS); T (grupo tratado; ratos colíticos tratados com diferentes doses de extrato de *Baccharis dracunculifolia* – EBD); TR (grupo tratado com recidiva; ratos colíticos tratados com diferentes doses do EBD que recebem uma segunda administração de TNBS); S (grupo referência; ratos colíticos tratados com sulfasalazina); SR (grupo referência; ratos colíticos que recebem uma segunda administração de TNBS).

longitudinalmente, sendo exposta a superfície da mucosa sobre a placa. Em seguida foi determinada a lesão macroscópica, segundo método descrito por Bell *et al.* (1995) que determina tanto a gravidade como a extensão da lesão intestinal (Tabela 1). Esta avaliação foi realizada por um observador não envolvido com o experimento. Finalmente, o cólon foi dividido em 6 fragmentos longitudinais, um fragmento foi pesado e congelado em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) para determinação do conteúdo glutatona (GSH) com o objetivo de inibir a sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase (Anderson *et al.*, 1985), e o restante foi congelado a -20°C para determinação de proteínas, fosfatase alcalina e mieloperoxidase.

Tabela 1. Critério de pontuação do índice de lesão macroscópica.

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 que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada cm adicional).

3.5. Determinações bioquímicas

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogenatos de mucosa intestinal colônica, 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.

3.5.1. Determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH)

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson *et al.* (1985), que está baseado na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo (Figura 10), no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu

conseqüente incremento de absorvância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutatona (GSH).

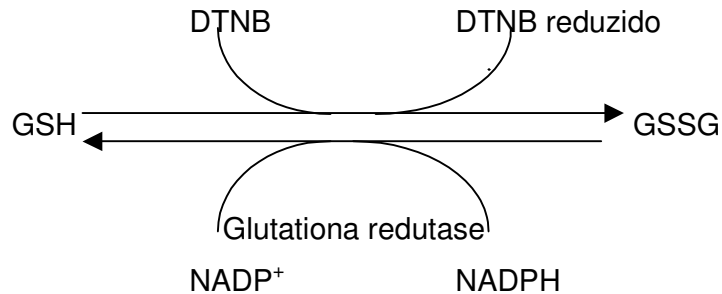


Figura 10. Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutatona total em amostras de cólon.

Para efetuar a determinação, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA) a 5% (p/v). As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente, homogeneizadas em uma solução de TCA a 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Para a determinação da glutatona total, 20 µL do sobrenadante foram colocados em uma placa de 96 canais, onde foram adicionados 5 µL de tampão fosfato sódico (PBS) com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (PBS-EDTA, solução aquosa de fosfato sódico 143 mM e EDTA 6,3 mM, pH 7,5), 20 µL DTNB (6 mM; Sigma D-8130) em PBS-EDTA e 140 µL de solução de β-NADPH (298 µM ; Sigma N-7505) em PBS-EDTA. A placa foi colocada no leitor do espectrofotômetro onde permaneceu durante 5 minutos a 30°C. Após este período, foram adicionados 15 µL de solução de glutaciona redutase (256 UI/mL; Sigma G-3664) em PBS-EDTA, a placa foi agitada e o incremento de absorvância a 412 nm registrado durante 3 a 5 minutos no espectrofotômetro. A concentração de glutatona foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva

padrão realizada com glutathione e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

3.5.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) colônica

A determinação da atividade da MPO em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz *et al.* (1984). A atividade da MPO se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

A determinação foi realizada em fragmentos de cólon, os quais após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesouras. As amostras foram homogeneizadas em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% (p/v) com tampão fosfato sódico (50 mM, pH 6,0) na proporção 1:20 (p/v) até obter um aspecto uniforme. O tampão HTAB funciona como um detergente facilitando a liberação da enzima MPO dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, nos quais está armazenada. O homogenato foi sonicado por 10 segundos e submetido a um triplo processo de congelamento-descongelamento para facilitar a ruptura das estruturas celulares, favorecendo também a liberação da enzima. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 8300 rpm por 10 minutos a 4°C e realizada a determinação da atividade da MPO seguindo a cinética da reação frente à água oxigenada. Em uma placa de 96 canais foram adicionados 50 µL do sobrenadante de cada amostra e 150 µL do reativo de coloração, preparado na hora do uso e composto por cloridrato de orto-dianisidina (0,167 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,0005% (p/v) em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) a 37°C. Em seguida, foi determinado o incremento de absorvância a 450 nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima MPO foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com peroxidase de rábano. Uma unidade de mieloperoxidase (U) se considera como aquela que degrada 1 µmol/min de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados foram expressos como U/g de tecido.

3.5.3. Determinação do conteúdo de proteínas método do ácido bicinchônico (BCA)

A determinação do conteúdo total de proteínas foi realizada pela técnica descrita por Smith *et al.* (1985). Este método é utilizado quando no tampão de homogeneização pode haver detergentes ou outro tipo que apresenta interferências com o reativo azul de Coomassie do método convencional de Bradford. O fundamento da técnica se baseia na capacidade das proteínas reduzirem o Cu^{2+} a Cu^{1+} , de forma que o Cu^{1+} reage com o BCA formando um complexo púrpura cuja absorbância máxima é de 562 nm.

Neste método emprega-se um corante que se obtém misturando dois reativos A e B na proporção 50:1 (v/v). O reativo A consiste em uma dissolução aquosa de BCA (25,8 mM) na forma de sal sódico (ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolínico), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,16 M), tartrato sódico-potássico (5,7 mM), NaOH (0,1 M) e NaHCO_3 (0,11 M) (pH 11,25). O reativo B é uma dissolução aquosa a 40% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Ambos reativos são estáveis à temperatura ambiente de forma indefinida.

As amostras de cólon foram picadas e homogeneizadas em tampão glicina (50 mM com MgCl_2 0,5 mM; pH 10,5) na proporção 1:10 (p/v). Um mL do material foi colocado em tubo *ependorf* e centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Para realizar a determinação, foram colocados 4 μL da amostra centrifugada e acrescentados 200 μL do reativo BCA. A placa foi incubada a 37°C por 20 minutos quando então foi lida a 562 nm em ponto final. O cálculo do conteúdo de proteínas foi feito por interpolação em uma curva padrão de albumina sérica bovina.

3.5.4. Determinação da atividade da fosfatase alcalina (FA) colônica

A determinação da atividade da FA foi realizada pelo método clássico descrito por Bessey *et al.* (1946). A FA presente na amostra cataliza a hidrólise do grupo fosfato de um reativo colorido, o nitrofenilfosfato sódico em tampão glicina, que incorpora MgCl_2 , dando lugar a *p*-nitrofenol, molécula que apresenta absorção máxima de 405 nm. Para a avaliação da atividade da FA,

foram colocados 5 μ L de amostra do homogenato anterior (para determinação do conteúdo de proteínas) em uma placa de 96 canais e adicionados 25 μ L de água e 50 μ L do reativo de coloração (sal *p*-nitrofenilfosfato bis ciclohexilamônio, Sigma N 3129-5, a 5,5 mM em tampão glicina a 50 mM com 0,5 mM MgCl₂, pH 10,5). A placa foi incubada por 25 minutos a 37°C. Para interromper a reação foram adicionados 120 μ L de NaOH 2N (10 gramas de NaOH em 125 mL de água destilada). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm. Os resultados da atividade da fosfatase alcalina foram expressos em mU/mg de proteína.

4. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana (intervalo) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. A evolução do peso corporal dos animais foi expressa em porcentagem, mas transformada em arcosseno para a análise estatística. Diferenças entre proporções foram analisadas com o Teste Exato de Fisher. Os resultados foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi GraphPad InStat® versão 3.01 para Windows 95, 1998, GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA, www.graphpad.com.

5. Análises das substâncias fixas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato foi avaliado do ponto de vista fitoquímico visando a identificação dos constituintes químicos majoritários utilizando-se CLAE. Este estudo foi realizado no Laboratório de Farmacognosia do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FFCLRP-USP), Ribeirão Preto/SP.

A identificação dos compostos majoritários de *B. dracunculifolia* foi realizada a partir da injeção de soluções-mãe de 6 padrões cromatográficos: ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido 3-prenil-*p*-cumárico (Drupanina), ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico (Artepelina C), ácido 3-prenil-4-diidrocinaoiloxicinâmico (Bacarina) e aromadendrina-4'-O-metil éter.

Para as análises do perfil químico do extrato bruto em acetato de etila foi utilizado o equipamento da Shimadzu, equipado com controlador SCL-10Avp e com três bombas LC-10AD, detector SPD- M10Avp, detector Diode Array, injetor Rheodyne com loop de 20 µL e computador, com software Shimadzu Class- VP.

Para as análises qualitativas e quantitativas foi utilizada coluna cromatográfica analítica de fase reversa CLC – ODS (M), Shimadzu, 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula 5 µm, protegida por pré-coluna PELLIGUARDTM, LC – 18.

Condições cromatográficas:

Gradiente multilinear de eluição

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0 - 5.0	75	25
10.0	65	35
15.0	62	38
20.0	60	40
45.0	55	45
50.0	30	70
55.0	20	80
60.0	0	100

Bomba A: 93,9 % água + 0,8 % de ácido acético + 0,3 % de acetato de amônio +5% MeOH; Bomba B: acetonitrila; Fluxo: 1 mL/min; Detecção: UV a 280 nm.

1) Tratamento prévio das amostras: centrifugação a 13000 rpm, durante cinco minutos e filtração em filtro de 45 µm.

2) Preparação das amostras: 5 mg do extrato bruto foram dissolvidos em 5 mL de solução hidrometanólica 9:1 contendo 20 µg do padrão interno veratraldeído (3,4-dimetoxibenzaldeído)/mL. Destes, 20 µL foram injetados no cromatógrafo.

Resultados

1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato

Quanto à avaliação da atividade antioxidante, o EBD apresentou inibição de 50% da peroxidação lipídica (IC_{50}) com $26,27 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ (Figura 11 A) enquanto que a quercetina, substância de referência, apresentou IC_{50} com $1,51 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ (Figura 11B).

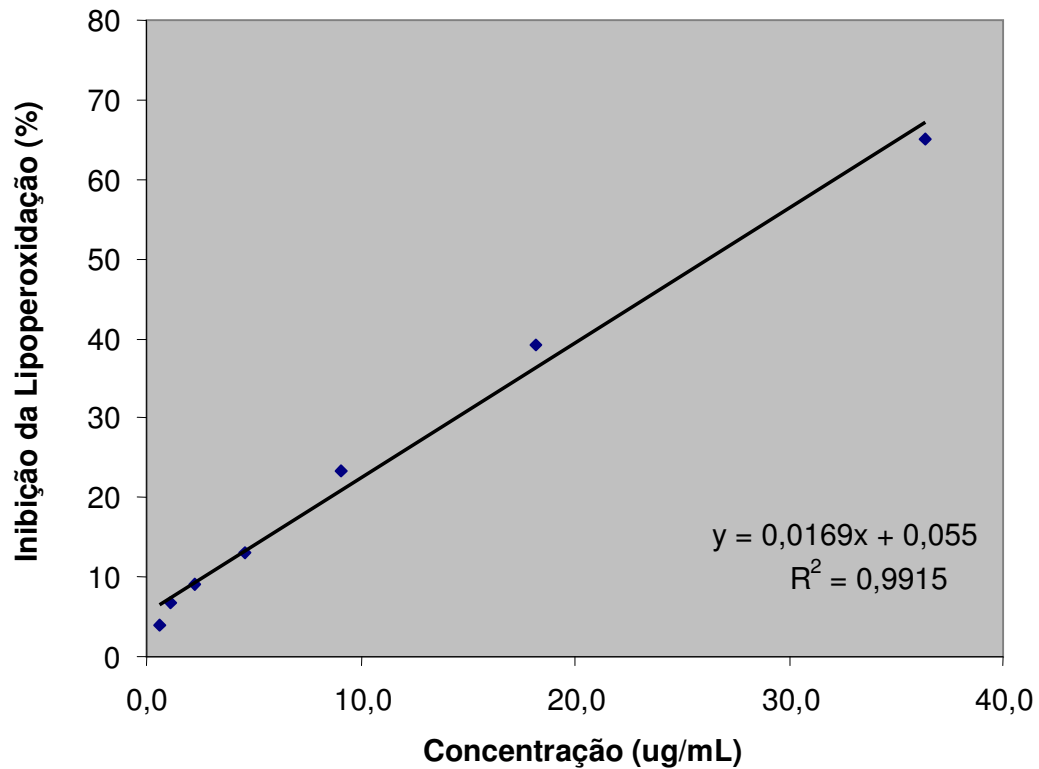


Figura 11A. Atividade antioxidante do extrato bruto acetato de etila de folhas de *Baccharis dracunculifolia* em ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebro de rato pelo modelo de indução com sulfato ferroso e ácido ascórbico (Stocks *et al.* (1974) e Fee e Teitelbaum (1972), com modificações).

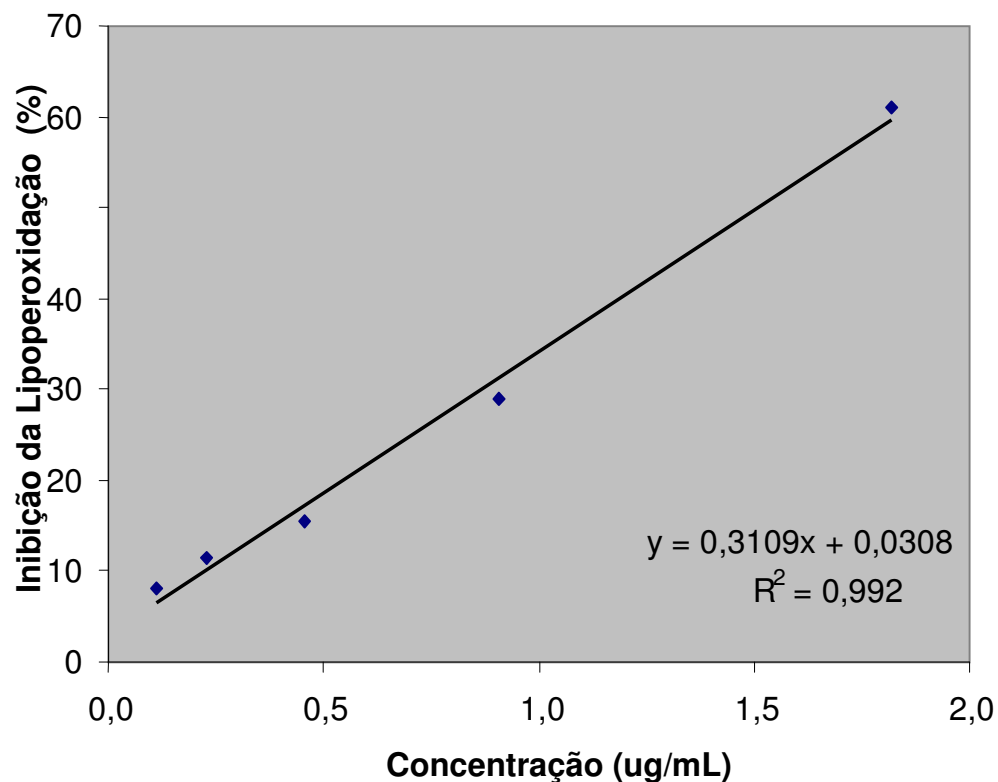


Figura 11B. Atividade antioxidante da quercetina em ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebro de rato pelo modelo de indução com sulfato ferroso e ácido ascórbico (Stocks *et al.* (1974) e Fee e Teitelbaum (1972), com modificações).

2. Avaliação da atividade do EBD no processo inflamatório agudo

2.1. Avaliação macroscópica

A administração intracolônica de TNBS/etanol 50% resultou em inflamação colônica, que foi evidenciada após 48 h com ulceração severa da mucosa estendendo-se de 2,5 a 5 cm, espessamento da parede do intestino, hiperemia e aderência a órgãos adjacentes (Tabela 2).

A atividade antiinflamatória intestinal preventiva do EBD foi evidenciada macroscopicamente pela redução do escore nos animais colíticos tratados com doses de 5, 50 e 200 mg/Kg. Entretanto, não houve diferença na razão entre peso e comprimento colônico. A incidência de diarreia, outro sintoma

característico da colite ulcerativa, ocorreu em todos os grupos de animais colíticos, sendo menos freqüente entre os animais tratados com EBD 50 mg/Kg (33,3 %) e mais freqüente naqueles tratados com EBD 100 mg/Kg (83,3%), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A menor incidência de diarréia foi encontrada no grupo tratado com sulfassalazina (16,7%), acompanhando a tendência de recuperação de peso desses animais (Tabela 2). A incidência de aderência do cólon aos órgãos adjacentes, indicativo tanto de perfuração da parede intestinal como proliferação de tecido conectivo da parede intestinal, não apresentou diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos dos tratamentos com extrato de *Baccharis dracunculifolia* (5, 10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no escore, na relação entre peso e comprimento colônico, nas incidências de diarréia e aderência na fase aguda da colite induzida por TNBS.

Grupo	Escore ^a (0 – 10)	Peso / comprimento colônico ^b (mg/cm)	Diarréia (%)	Aderência (%)
Branco	0 ***	82,30 ± 3,86 **	0	0
Controle	8,5 (7-9) ***	146,99 ± 8,78 **	50,0	50,0
EBD 5 mg/Kg	6,0 (5-8) *	127,44 ± 8,06 **	50,0	50,0
EBD 10 mg/Kg	7,5 (6-8) **	127,82 ± 3,94 **	50,0	66,7
EBD 25 mg/Kg	7,5 (5-10) ***	135,28 ± 6,33 **	66,7	66,7
EBD 50 mg/Kg	6,5 (5-8) * +	139,10 ± 9,05 **	33,3	0
EBD 100 mg/Kg	6,5 (5-8) +	131,53 ± 7,34 **	83,3 +	33,3
EBD 200 mg/Kg	7,0 (4-8) * +	134,62 ± 9,11 **	50,0	33,3
Sulfa 25 mg/Kg	6,0 (2-8) **	133,58 ± 12,38 **	16,7	50,0

^a Dados de escore expressos como mediana (range); ^b razão entre peso e comprimento do cólon expressos como média ± SEM; *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 vs. grupo controle; *** p<0,001; ** p<0,01 e + p<0,05 vs. grupo branco.

Este processo inflamatório foi associado a redução no consumo alimentar (Figura 12) e perda de peso corporal (Figura 13), quando comparados com o grupo branco (sem indução da colite e sem tratamento farmacológico). A perda de apetite e redução de peso são características de DII. Os animais colíticos tiveram redução no peso corporal de aproximadamente 10% em relação aos não colíticos associada à diminuição no consumo alimentar após a indução de colite. Os animais controle, os tratados com EBD na dose de 5 mg/Kg e os tratados com sulfassalazina reduziram seu consumo de ração em aproximadamente 50%, enquanto aqueles tratados com EBD nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg em aproximadamente 60%, e os animais tratados com EBD nas doses de 10 e 25 mg/Kg em 83%.

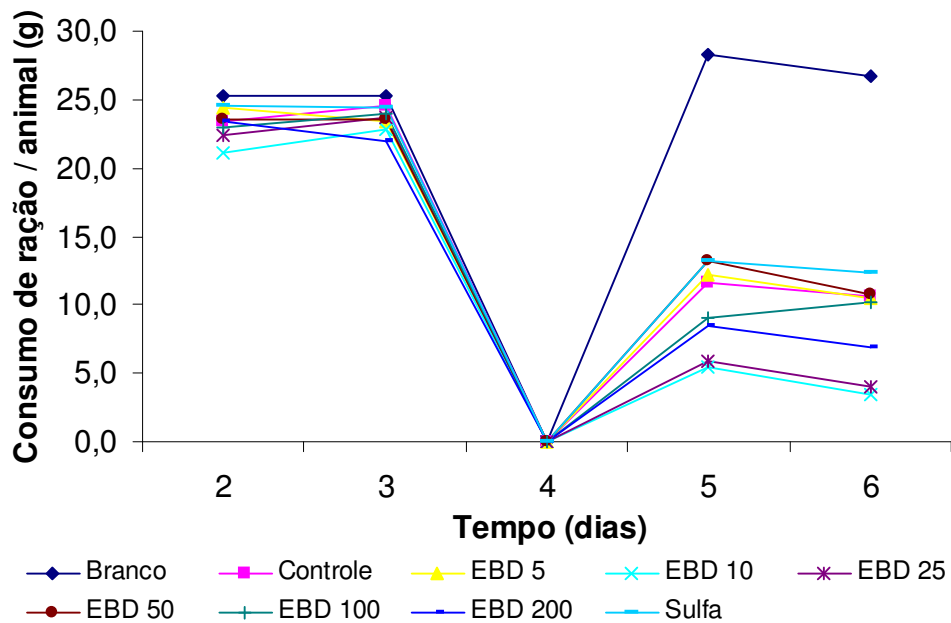


Figura 12. Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento. O 4º dia refere-se ao período de 24 horas de jejum alimentar para posterior indução de colite.

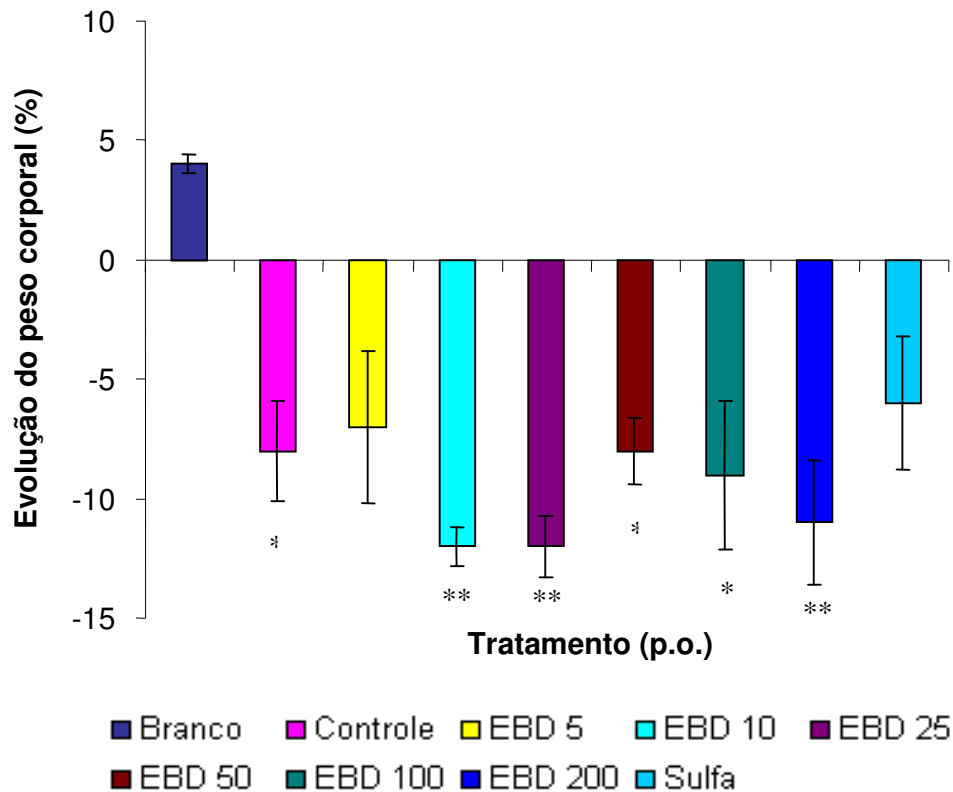


Figura 13. Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento após 6 dias de experimento.

2.2. Determinações bioquímicas

Os fragmentos de cólon foram analisados bioquimicamente para a determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH) e das atividades enzimáticas da mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina (FA), conforme dados apresentados na Tabela 3.

Os marcadores enzimáticos da lesão colônica apresentaram altas atividades em ratos colíticos. O dano colônico foi caracterizado bioquimicamente no grupo controle por um aumento de 8 vezes na atividade da enzima MPO colônica e por um aumento de duas vezes na atividade da enzima FA e significativa depleção de GSH (Tabela 3).

O EBD produziu efeito benéfico na fase aguda da colite como evidenciado pelo impedimento da depleção de GSH e redução na atividade da MPO na menor dose (5 mg/Kg), redução na atividade da MPO nas doses 50,

100 e 200 mg/Kg e redução na atividade da FA na dose de 50 mg/Kg (Tabela 3). Esses resultados foram usados para a seleção das doses a serem testadas no modelo crônico com recidiva de colite (5 e 50 mg/Kg).

O tratamento dos animais com sulfassalazina produziu efeito benéfico na fase aguda da colite evidenciado pela redução nas atividades da MPO e FA colônicas e contenção na depleção do conteúdo de GSH (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito dos tratamentos com extrato de *B. dracunculifolia* (5, 10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no conteúdo de glutathiona total (GSH), nas atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina (FA) na fase aguda da colite induzida por TNBS.

Grupo	GSH	MPO	FA
	(nmol/g de tecido)	(U/g de tecido)	(mU/mg de proteína)
Branco	1357,5 ± 86,5 **	84,2 ± 8,7 **	6,24 ± 0,36 *
Controle	759,6 ± 31,9 ++	684,2 ± 62,8 ++	12,62 ± 1,72 +
EBD 5 mg/Kg	967,3 ± 55,0 * ++	324,9 ± 89,9 **	10,53 ± 1,21
EBD 10 mg/Kg	850,3 ± 27,8 ++	532,8 ± 96,3 ++	14,58 ± 1,36 ++
EBD 25 mg/Kg	878,5 ± 82,7 ++	576,4 ± 79,8 ++	14,27 ± 2,02 ++
EBD 50 mg/Kg	809,4 ± 55,0 ++	216,9 ± 31,6 **	6,16 ± 0,63 *
EBD 100 mg/Kg	873,8 ± 25,8 ++	245,8 ± 39,9 **	7,45 ± 0,93
EBD 200 mg/Kg	930,9 ± 113,8 ++	380,1 ± 84,4 * +	9,54 ± 1,76
Sulfa 25 mg/Kg	1006,2 ± 87,0 * ++	419,8 ± 80,1 * ++	9,02 ± 1,56

Dados expressos como média e ± SEM. ** p<0,01 e * p<0,05 vs. grupo controle, ++ p<0,01 e + p<0,05 vs. grupo branco.

3. Avaliação da atividade do EBD no processo inflamatório crônico com recidiva

3.1. Avaliação macroscópica

O consumo alimentar, que diminuiu após a indução do processo inflamatório, foi restabelecido ao final de cada semana de tratamento à mesma quantidade consumida antes da indução (Figuras 14A, 14B e 14C). O grupo controle teve redução estatisticamente significativa no peso corporal durante as 3 semanas de experimento, enquanto que os animais tratados com EBD apenas tiveram o peso corporal reduzido na 3ª semana de tratamento em relação ao grupo branco. Os animais colícticos sem recidiva (CSR) tiveram evolução de peso corporal semelhante aos animais do grupo branco (Figuras 15A, 15B, 15C).

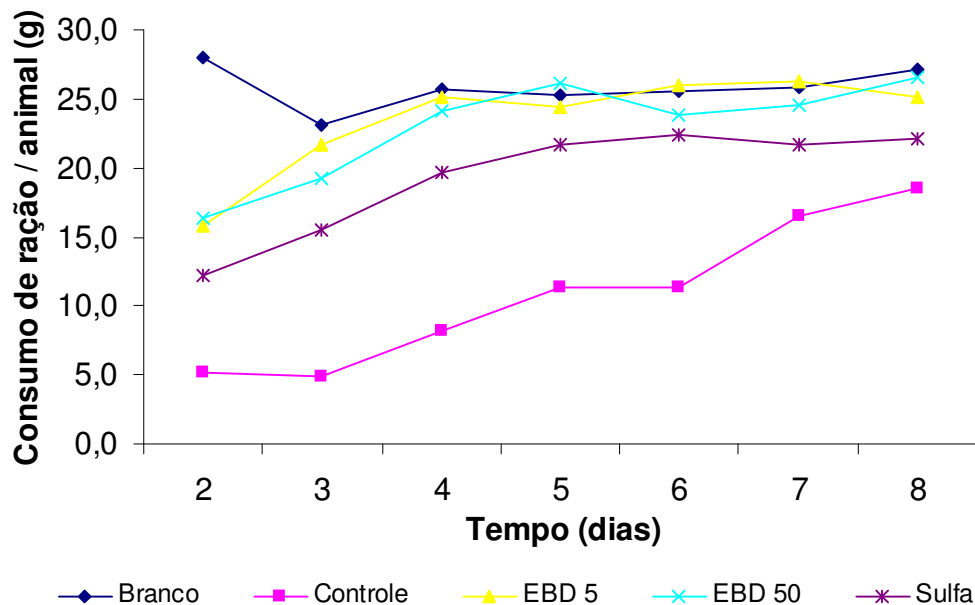


Figura 14A. Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento durante a 1ª semana.

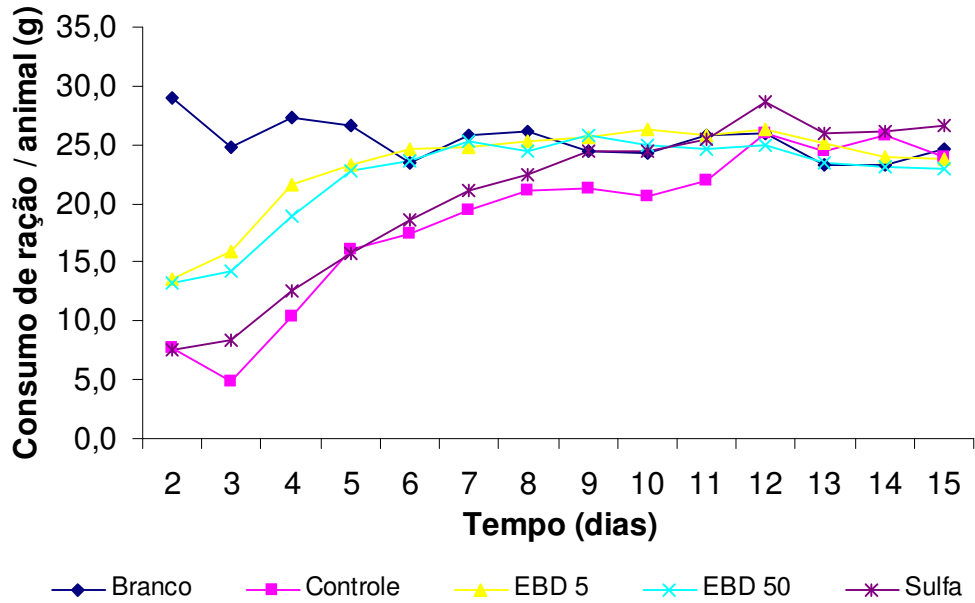
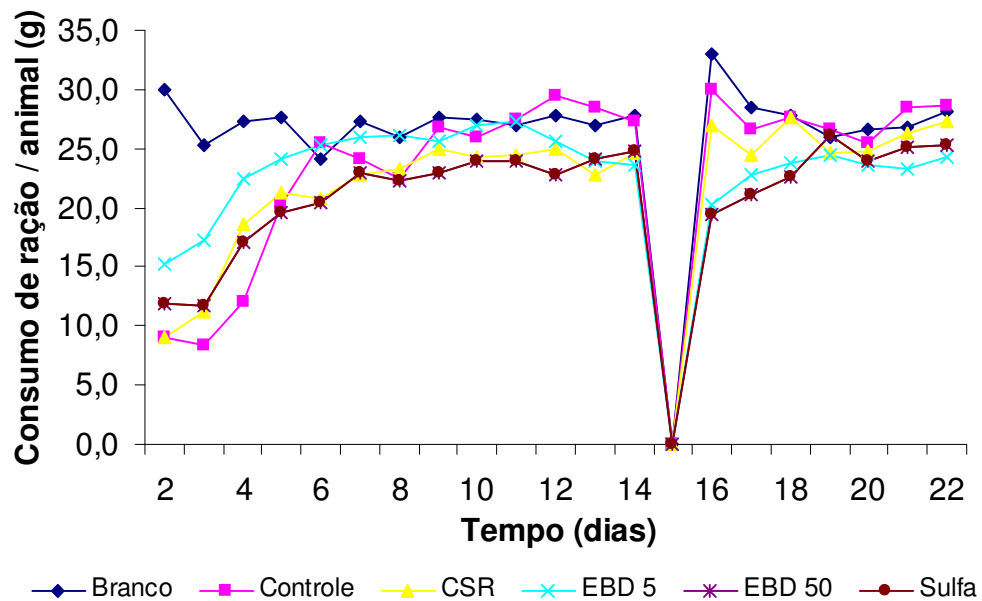


Figura 14B. Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento durante a 2ª semana.



Figuras 14C. Média do consumo diário de ração por animal em cada grupo de tratamento durante a 3ª semana (dia 15, jejum).

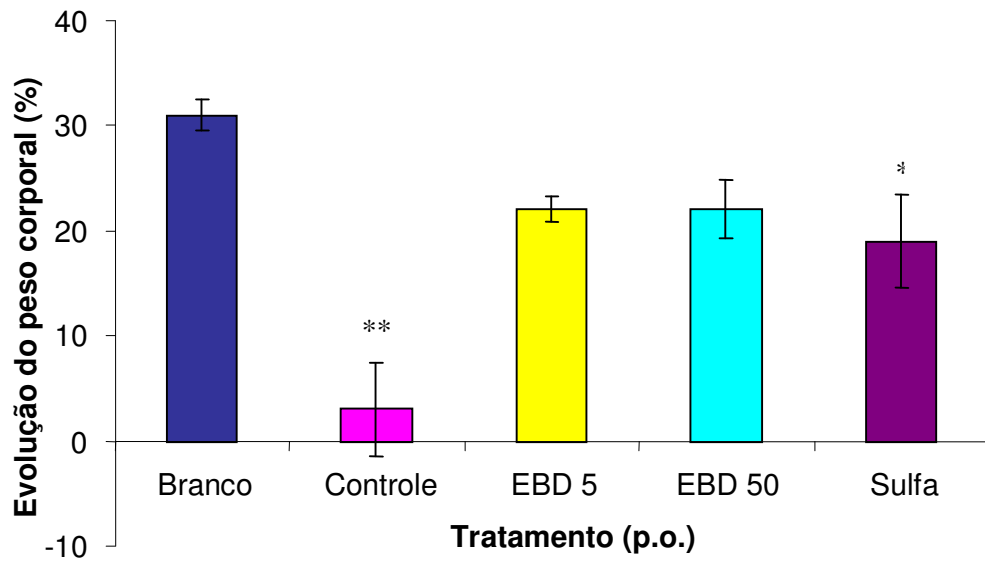


Figura 15A. Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento após a 1^o semana.

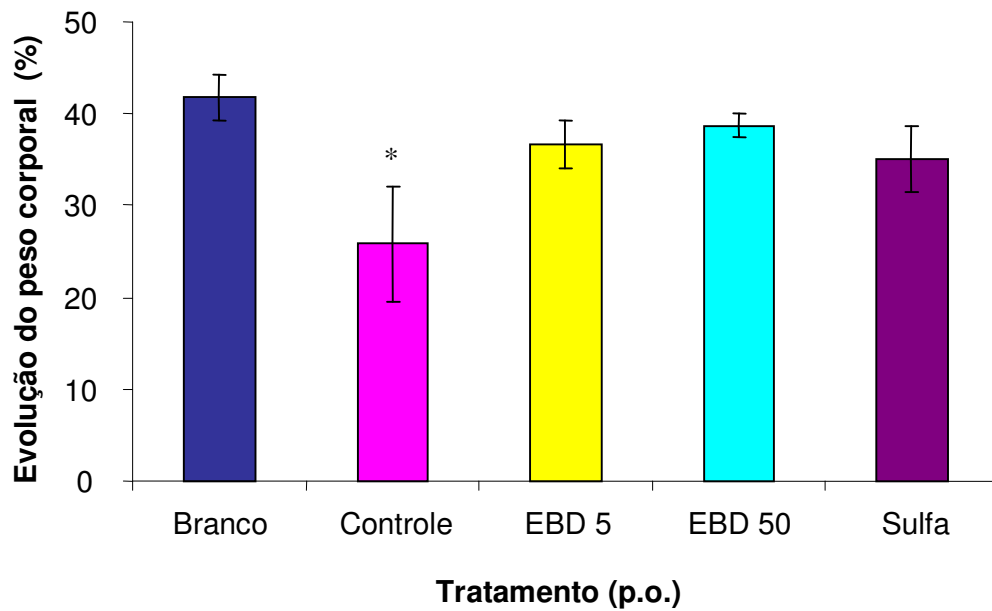


Figura 15B. Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento após a 2^o semana.

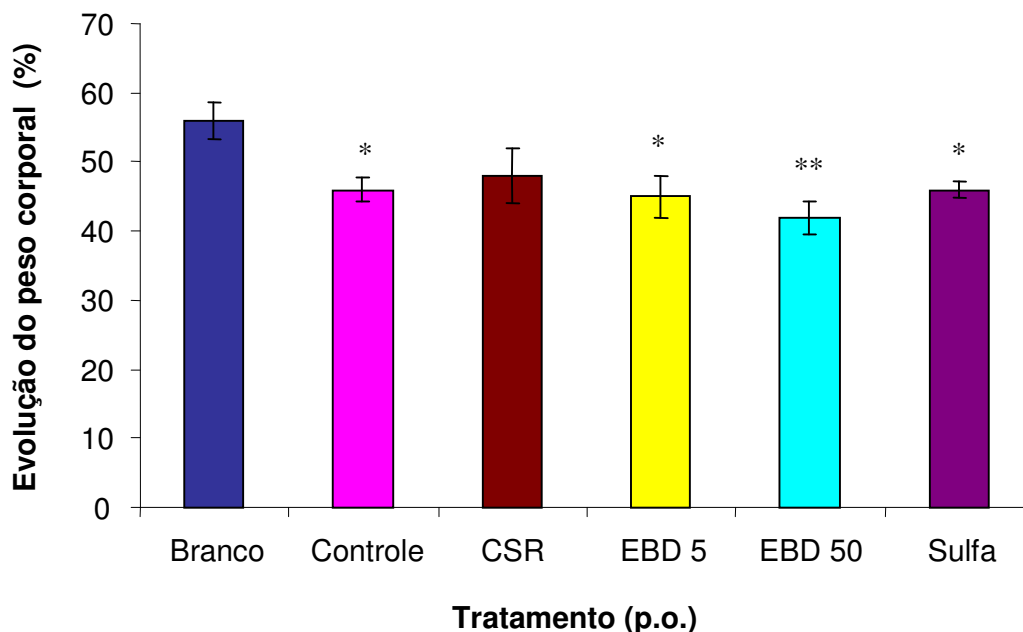


Figura 15C. Média da evolução do peso corporal dos animais por grupo de tratamento após a 3^o semana (dia 15, jejum).

No grupo controle, o dano colônico foi máximo na primeira semana de experimento e diminuiu gradativamente durante as duas semanas seguintes; embora os segmentos colônicos ainda estivessem macroscopicamente ulcerados e inflamados e com um aumento na razão entre peso e comprimento colônico (Tabela 4).

A recidiva do processo inflamatório intestinal foi induzida com uma segunda dose de 10 mg de TNBS em etanol 50% administrada intracolonicamente duas semanas após a primeira administração. Uma semana após a segunda instilação de TNBS, a reativação do processo inflamatório colônico foi observada no grupo controle, como evidenciada por um aumento significativo no escore macroscópico e razão entre peso e comprimento colônico (Tabela 4). Nos animais que não receberam a segunda administração de TNBS (controle sem recidiva, CSR) o dano colônico seguiu a evolução normal de recuperação, sendo que estes animais tiveram um menor escore comparado ao grupo controle que sofreu a recidiva (Tabela 4).

A administração de 5 mg/Kg do EBD foi capaz de prevenir o impacto da lesão causada pelo TNBS como evidenciado macroscopicamente pela redução

do escore na primeira semana de tratamento e redução na razão entre peso e comprimento colônico durante a primeira e segunda semanas (Tabela 4). A administração de 50 mg/Kg do EBD reduziu apenas o escore na primeira semana de tratamento (Tabela 4).

O tratamento dos animais com sulfassalazina produziu um efeito preventivo do processo inflamatório colônico evidenciado por redução na razão entre peso e comprimento colônico e uma tendência em reduzir o escore da lesão na primeira semana (Tabela 4).

A incidência de diarreia foi freqüente nos animais do grupo controle ao final da 1ª semana, mas foi diminuída depois de 14 dias da indução do processo inflamatório e, voltou a ser freqüente na 3ª semana após a 2ª administração de TNBS. Os animais do grupo CSR não apresentaram diarreia ao final do experimento. Os animais do grupo EBD 5 mg/Kg apresentaram menor incidência de diarreia durante todo o experimento crônico, enquanto no grupo EBD 50 mg/Kg a diarreia foi freqüente, embora não diferiram estatisticamente. A ocorrência de diarreia entre os animais tratados com sulfassalazina foi observada com freqüência apenas na última semana de tratamento, após segunda administração de TNBS (Tabela 4).

A aderência do cólon aos órgãos adjacentes foi observada ao final de cada experimento na maioria dos animais do grupo controle, mas também nos animais do grupo CSR e naqueles tratados com EBD 5 e 50 mg/Kg (Tabela 4). Foi observada obstrução em 16,7% dos animais do grupo controle e do grupo tratado com sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) apenas na 1ª semana de experimento.

Tabela 4. Efeitos do tratamento com extrato de *Baccharis dracunculifolia* (5 e 50 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no escore, na relação entre peso e comprimento colônico, nas incidências de diarreia e aderência na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS.

Grupo	Escore ^a (0-10)	Peso / comprimento colônico ^b (mg/cm)	Diarreia (%)	Aderência (%)
1 semana				
Branco	0 ***	100,57 ± 8,03 **	0 *	0 *
Controle	8 (7-9) ***	276,10 ± 31,17 **	83,3 ⁺	83,3 ⁺
EBD 5 mg/Kg	2 (0-4) *	140,53 ± 8,61 **	0 *	0 *
EBD 50 mg/Kg	1 (0-6) *	209,23 ± 42,56 ⁺	33,3	33,3
Sulfa 25 mg/Kg	3,5 (2-7) ⁺	143,25 ± 20,56 **	0 *	50,0
2 semanas				
Branco	0 ***	87,16 ± 4,32 **	0	0 **
Controle	2,5 (2-3)	185,40 ± 22,21 **	16,7	100,0 **
EBD 5 mg/Kg	3,0 (0-4)	117,50 ± 6,45 **	0	16,7 *
EBD 50 mg/Kg	4,0 (2-5) ⁺	141,90 ± 12,02 ⁺	33,3	33,3
Sulfa 25 mg/Kg	4,0 (1-6) **	137,95 ± 10,73 ⁺	0	33,3
3 semanas				
Branco	0 **	88,92 ± 4,57 ** ^{xx}	0	0
Controle	5 (4-5) **	145,27 ± 7,27 **	50,0	66,7
CSR	2,5 (0-4)	149,35 ± 13,09 **	0	33,3
EBD 5 mg/Kg	3,5 (1-6) ⁺	140,43 ± 8,76 **	16,7	16,7
EBD 50 mg/Kg	5 (3-5) **	150,17 ± 8,17 **	50,0	16,7
Sulfa 25 mg/Kg	4,5 (3-7) **	132,70 ± 3,63 **	66,7	0

^a Dados de escore foram expressos como mediana (range). ^b Dados de peso colônico foram expressos como média ± S.E.M. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 vs. grupo controle; *** p<0,001; ** p<0,01; + p<0,05 vs. grupo branco; ^{xx} p<0,01 vs. grupo controle sem recidiva.

3.2. Determinações bioquímicas

O progresso do processo inflamatório no grupo controle também foi observado bioquimicamente desde que as atividades enzimáticas da MPO e FA foram maximamente aumentadas sete dias depois da primeira instilação de TNBS quando comparadas aos níveis enzimáticos dos animais não colícticos (Tabela 5). Esses resultados também foram associados a uma redução significativa no conteúdo de GSH evidenciado nas duas primeiras semanas de avaliação no grupo controle (Tabela 5).

O EBD na dose de 5 mg/Kg produziu melhores efeitos nos parâmetros bioquímicos analisados, durante as duas primeiras semanas de experimento, que o tratamento com sulfassalazina, fármaco de referência no tratamento de DII. A administração de 5 mg/Kg de EBD foi capaz de prevenir o impacto da lesão causada pela administração de TNBS através da manutenção dos níveis de GSH colônicos, redução nas atividades das enzimas MPO e FA, sendo que na segunda semana de tratamento a mesma dose foi capaz de reduzir apenas a atividade da FA. O EBD na dose de 50 mg/Kg manteve os níveis de GSH colônicos apenas na segunda semana de tratamento e reduziu a atividade da FA nas duas primeiras semanas (Tabela 5).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos parâmetros bioquímicos analisados na terceira semana de tratamento após a recidiva do processo inflamatório intestinal com a administração de uma 2ª dose de TNBS (Tabela 5).

Tabela 5. Efeitos dos tratamentos com extrato de *B. dracunculifolia* (5 e 50 mg/Kg) e sulfassalazina (Sulfa; 25 mg/Kg) no conteúdo de glutatona total (GSH), nas atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS.

Grupo	GSH (nmol/g tecido)	MPO (U/g tecido)	FA (mU/mg proteína)
1 semana			
Branco	2357,55 ± 311,27 *	127,60 ± 14,53 *	4,20 ± 0,36 **
Controle	1590,07 ± 53,57 ⁺	1045,14 ± 231,21 ⁺⁺	19,15 ± 4,38 ⁺⁺
EBD 5 mg/Kg	2386,08 ± 177,05 *	221,07 ± 59,16 *	7,93 ± 1,13 **
EBD 50 mg/Kg	2218,55 ± 97,37	167,59 ± 12,74 *	8,31 ± 1,51 **
Sulfa 25 mg/Kg	1992,20 ± 254,15	950,97 ± 327,99 ⁺	7,45 ± 0,92 **
2 semanas			
Branco	2233,85 ± 192,51	115,86 ± 12,91	5,79 ± 0,70 **
Controle	1881,33 ± 146,82	220,60 ± 42,94	13,31 ± 1,65 ⁺⁺
EBD 5 mg/Kg	2228,30 ± 132,73	167,47 ± 31,70	8,39 ± 1,07 *
EBD 50 mg/Kg	2538,22 ± 132,77 **	178,45 ± 34,64	8,78 ± 1,13 *
Sulfa 25 mg/Kg	1776,58 ± 63,50	262,40 ± 59,43 ⁺	11,20 ± 1,29 ⁺
3 semanas			
Branco	1976,17 ± 150,56	90,92 ± 6,73	3,83 ± 0,25 ** ^{xx}
Controle	1767,08 ± 169,47	132,36 ± 18,51	6,86 ± 0,43 ⁺⁺
CSR	1823,10 ± 127,71	96,65 ± 13,83	7,06 ± 0,44 ⁺⁺
EBD 5 mg/Kg	1589,10 ± 114,39	196,55 ± 63,84	8,35 ± 0,41 ⁺⁺
EBD 50 mg/Kg	1702,40 ± 72,36	173,45 ± 42,32	7,10 ± 0,88 ⁺⁺
Sulfa 25 mg/Kg	1765,02 ± 120,79	173,90 ± 24,32	7,35 ± 0,89 ⁺⁺

Dados foram expressos como média ± S.E.M. *** p<0,001; ** p<0,01; *p<0,05 vs. grupo controle; +++ p<0,001; ++ p<0,01; + p<0,05 vs. branco; ^{xx} p<0,01 vs. grupo controle sem recidiva.

4. Análises das substâncias fixas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise do EBD por CLAE permitiu a identificação dos seguintes compostos fenólicos: **1** ácido caféico, **2** ácido *p*-cumárico, **3** aromadendrina-4'-O-metil éter, **4** ácido 3-prenil-*p*-cumárico (drupanina), **5** 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepelina C) e **6** ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico (bacarina) já que os seis maiores picos coincidem no tempo de retenção e espectro com os padrões utilizados disponíveis no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), Ribeirão Preto/SP (Figura 16).

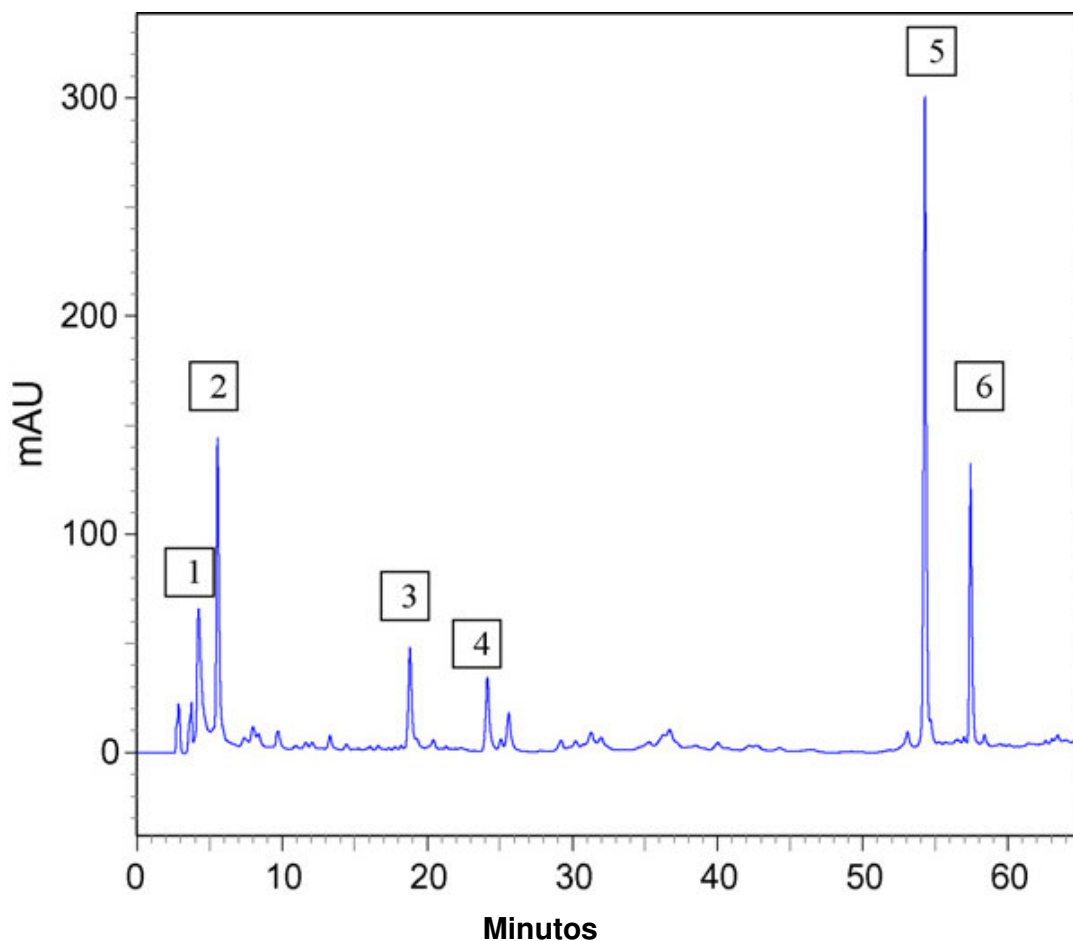


Figura 16. Cromatograma por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) do extrato bruto acetato de etila de folhas de *B. dracunculifolia*: **1** ácido caféico, **2** ácido *p*-cumárico, **3** aromadendrina-4'-O-metil éter, **4** ácido 3-prenil-*p*-cumárico (drupanina), **5** 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepelina C) e **6** ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico (bacarina).

Para a determinação da composição química do extrato bruto acetato de etila de folhas de *Baccharis dracunculifolia* foram utilizados padrões cromatográficos por meio da comparação destes com o extrato, considerando-se o tempo de retenção de cada composto e o comprimento de onda máximo no detector de UV. Os principais compostos detectados podem ser observados na Figura 17.

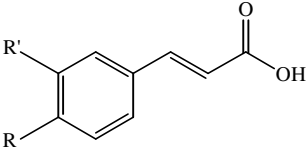
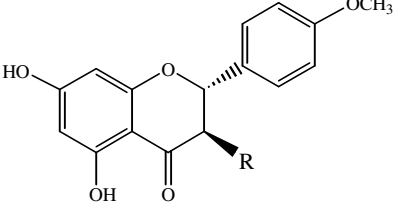
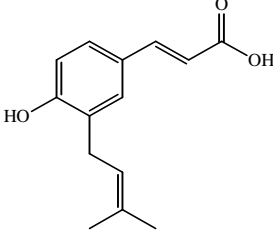
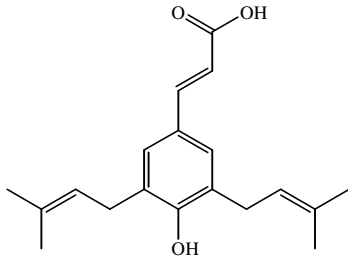
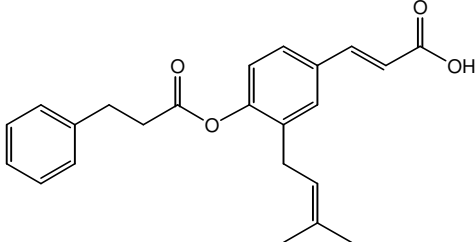
Nome	Tempo de Retenção	UV λ máx	Estruturas Químicas
1 Ácido caféico R; R' = OH	4.21	320	
2 Ácido <i>p</i> -cumárico R = OH; R' = H	5.81	307	
3 Aromadendrina-4'-O-metil éter R=OH	20.04	289	
4 Ácido 3-prenil- <i>p</i> -cumárico (Drupanina)	25.20	312	
5 Ácido 3,5-diprenil- <i>p</i> -cumárico (Artepelina C)	54.41	310	
6 Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi- cinâmico (Bacarina)	55.57	289	

Figura 17. Nomes, tempo de retenção, comprimento de onda máximo e estruturas químicas dos padrões cromatográficos.

Discussão

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo que engloba várias doenças crônicas do trato gastrointestinal, principalmente colite ulcerativa (CU) e Doença de Crohn (DC), cuja etiologia ainda não é completamente conhecida, mas que se caracterizam por um curso crônico onde se alternam períodos de remissão e de atividade de duração variáveis.

Não existe, até o momento, nenhum tratamento farmacológico definitivo para estas doenças, sendo que os fármacos utilizados para o tratamento sintomático das DII apresentam uma série de efeitos adversos quando utilizados em altas doses ou por períodos prolongados (Ransford e Langman, 2002). Tais aspectos associados às complicações extraintestinais que as caracterizam fazem com que a busca de novas terapias mais eficazes seja importante.

Considerando-se o grande número de evidências que apóiam o papel chave dos radicais livres nas doenças inflamatórias intestinais, a utilização de produtos como a *Baccharis dracunculifolia*, com comprovada atividade imunomoduladora, antioxidante e antiinflamatória foram um indicativo potencial de sua ação na prevenção e tratamento da DII. Apesar de serem conhecidas as propriedades da *B. dracunculifolia* e suas indicações tradicionais como um antiinflamatório e para o tratamento de doenças gastrointestinais (Menezes, 2005; Queiroga *et al.*, 1990), sua atividade em DII não havia sido estudada.

Existem diversos modelos para estudar os efeitos de novos fármacos para o tratamento das DII, tais como: colite induzida por ácido acético, dextran sulfato de sódio e ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Neste estudo, o modelo de indução por TNBS foi escolhido porque reproduz mais fielmente o que ocorre na doença em humanos, especialmente considerando-se suas características histopatológicas, bioquímicas e clínicas. Neste modelo, a instilação de uma solução alcoólica (etanol 50%) rompe as membranas celulares e o TNBS, agindo como um hapteno, evoca uma resposta imunológica. A administração separada do hapteno e do etanol (50%) não produz inflamação crônica.

O processo inflamatório intestinal induzido por TNBS é um dos modelos mais utilizados de inflamação colônica. Isso ocorre por ser um modelo experimental simples (não necessita de cirurgia nem sensibilização prévia), com alta reprodutibilidade e relativamente de baixo custo quando comparado a

outros modelos experimentais. Neste modelo experimental o processo inflamatório intestinal apresenta uma fase aguda seguida por um período prolongado de cura com algumas características de inflamação crônica, como inflamação transmural do cólon, formação de granuloma, cicatrização e fibrose do tecido intestinal e estresse oxidativo (Morris *et al.*, 1989). Neste estudo, utilizou-se a menor dose (10 mg) de TNBS proposta por Morris *et al.* (1989) e sugerida por Cruz *et al.* (1998), visto que a mesma evoca uma resposta qualitativamente idêntica à dose máxima utilizada de 30 mg.

Este estudo mostra o efeito exercido pelo extrato acetato de etila de folhas de *B. dracunculifolia* (EBD) na melhora do insulto provocado pela instilação intracolônica de TNBS em ratos em duas condições experimentais: aguda e crônica com recidiva.

O processo inflamatório induzido pela instilação de 10 mg de TNBS em etanol 50% (v/v) progrediu com características similares às aquelas relatadas previamente por Di Stasi *et al.* (2004). Na fase aguda do processo inflamatório intestinal, o EBD produziu redução do escore da lesão nos animais tratados com a dose de 5 mg/Kg. Este efeito foi acompanhado pela inibição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e pela manutenção dos níveis de glutathiona (GSH) que são reduzidos no processo inflamatório intestinal. Estes efeitos, no entanto, não foram dose-dependentes, desde que altas doses do EBD resultaram em perda da atividade. Um efeito dual tem sido descrito para vários flavonóides, como diosmina e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996) e silimarina (Cruz *et al.*, 2001), e para a paepalantina (Di Stasi *et al.*, 2004); em baixas doses esses compostos se comportam como antioxidantes e antiinflamatórios em cólon de ratos e em altas doses, como prooxidantes e proinflamatórios. No ensaio crônico, o EBD também impediu a depleção de GSH na primeira semana de tratamento.

A GSH é considerada um importante seqüestrador celular de radicais livres por sua capacidade antioxidante e por ser substrato para a ação de glutathiona peroxidases e glutathiona transferases. Esse tripeptídeo é essencial na manutenção da integridade da mucosa sendo que a redução de seus níveis está associada às inflamações colônicas em humanos (Lauterburg *et al.*, 1988) e na experimentação animal (Pavlick *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 1997; Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Loguercio *et al.*, 1996; Buffinton e Doe, 1995).

Considerando-se que a administração de um bloqueador de radicais sulfidríla a ratos promove inflamação colônica (Loguercio *et al.*, 2003) e que a suplementação com GSH melhora o dano colônico em colite experimental (Ardite *et al.*, 2000), novos compostos que impedem a redução dos níveis deste tripeptídeo caracterizam-se como potenciais no tratamento da DII. De fato, vários estudos demonstram que compostos com efeitos antiinflamatórios no modelo de TNBS agem também impedindo a depleção de GSH (Gálvez *et al.*, 2006; Di Stasi *et al.*, 2004; González *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 1998; Ocete *et al.*, 1998; Sánchez de Medina *et al.*, 1996) e que a liberação de GSH pelo probiótico *Lactobacillus fermentum* facilita a recuperação do tecido inflamado (Peran *et al.*, 2006).

A dose de 5 mg/Kg do EBD também foi suficiente para reduzir a infiltração neutrofílica no ensaio agudo, demonstrada pela menor atividade da enzima MPO colônica. Essa redução também foi observada na primeira semana de tratamento do ensaio crônico com as duas doses, enquanto nas semanas seguintes não houve diferença significativa. Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) têm sido propostos como sendo o principal tipo celular na injúria tecidual em DII (Dallegrí *et al.*, 1990) e em modelos experimentais de colite (Wallace *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1991). Seu papel na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias tem se mostrado interessante na descoberta de novos compostos para modular este processo (Middleton Jr. *et al.*, 2000). Os PMNs produzem peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que é convertido pela enzima MPO em ácido hipoclorídrico (HOCl), um poderoso oxidante. Assim, a redução observada na atividade da enzima MPO colônica indica um menor estresse oxidativo. Compostos com atividade antiinflamatória intestinal tais como morina (Gálvez *et al.*, 2001), curcumina (Jiang *et al.*, 2006), quercitrina (Camuesco *et al.*, 2004; Sánchez de Medina *et al.*, 1996) e rutosídeo (Cruz *et al.*, 1998) também foram capazes de reduzir a atividade enzimática da MPO.

O EBD reduziu também a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) colônica na fase aguda do processo inflamatório, na dose de 50 mg/Kg, e na primeira e segunda semanas de tratamento crônico, nas duas doses. A razão para o aumento da atividade da enzima FA colônica encontrado em CU é desconhecida, mas essa relação foi demonstrada pela primeira vez por

Sánchez de Medina *et al.* (1996) quando relataram que a FA constitui um marcador sensível e seguro de colite experimental em ratos. Posteriormente, Sánchez de Medina *et al.* (2004) demonstraram que em diferentes modelos de colite, caracterizados por estresse oxidativo e infiltração neutrofílica significantes, a atividade da FA estava aumentada e esse aumento foi atribuído a células epiteliais e células da lâmina própria, principalmente leucócitos.

Os resultados na fase crônica do processo inflamatório mostram que o EBD produz melhora da função absorptiva colônica na primeira semana, quando ocorreu menor incidência de diarreia nos grupos tratados com EBD 5 mg/Kg e sulfassalazina. A restauração da função absorptiva colônica pode contribuir para a melhora da colite experimental, como observado com uso dos flavonóides quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996), rutina (Gálvez *et al.*, 1997), hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), e morina (Ocete *et al.*, 1998). Este efeito foi acompanhado pela redução na extensão e severidade da lesão observadas através da redução no escore e na razão entre peso e comprimento colônico, especialmente após a primeira semana de tratamento.

Macroscópica e bioquimicamente, o tratamento com EBD não foi capaz de prevenir a reativação do processo inflamatório intestinal visto que não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados obtidos demonstraram que o EBD possui atividade antiinflamatória intestinal preventiva – quando a mucosa colônica está intacta, e curativa, quando a mucosa colônica está afetada por um processo inflamatório intestinal, no entanto não atua na prevenção de recidivas.

A análise da composição fitoquímica do EBD revelou a presença de derivados do ácido cinâmico como ácido caféico **1**, ácido *p*-cumárico **2**, drupanina **4** (ácido 3-prenil-*p*-cumárico), artepelina C **5** (ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico), bacarina **6** (ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico) e um flavonóide (di-hidroflavonol) denominado aromadendrina-4'-O-metil éter **3**.

Estudos fitoquímicos em diferentes espécies do gênero *Baccharis* também têm demonstrado a presença de outros flavonóides (principalmente os subgrupos flavona e flavonol), diterpenos (principalmente labdano e clerodano) e triterpenos (Verdi *et al.*, 2005). Os flavonóides e outros compostos fenólicos são conhecidos por serem excelentes antioxidantes *in vitro* e numerosos estudos sugerem que o consumo de polifenóis de origem vegetal pode ter

efeitos positivos em doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Urquiaga e Leighton, 2000).

Park *et al.* (2005) observaram que a atividade seqüestradora de radicais livres nos compostos de broto foliar de *B. dracunculifolia* foi similar àquela da própolis verde, sendo que a presença de flavonóides era abundante em ambos. Segundo Tapia *et al.* (2004), os efeitos benéficos de algumas espécies de *Baccharis* podem ser atribuídos, ao menos em parte, a esse efeito antioxidante/seqüestrador de radicais livres dos compostos fenólicos, considerando que a atividade antioxidante foi observada em extratos contendo derivados do ácido cinâmico.

Em outras plantas do mesmo gênero também foi observada a atividade antioxidante. *B. trinervis* e *B. cordifolia* inibiram a peroxidação lipídica através do seqüestro de radicais hidroxila e superóxido, sendo que esta atividade foi associada à presença de flavonóides (Las Heras *et al.*, 1998, Mongelli *et al.*, 1997). Extratos de *B. grisebachii* mostraram atividade seqüestradora de radicais livres e inibiram a lipoperoxidação de eritrócitos; atividades que podem ser atribuídas principalmente aos compostos fenólicos incluindo flavonóides e derivados do ácido *p*-cumárico, sustentando seu uso como planta medicinal para tratamento de doenças gastrintestinais (Tapia *et al.*, 2004).

Abad *et al.* (2006) estudaram quatro espécies de *Baccharis* usadas tradicionalmente para tratar doenças inflamatórias na América do Sul: *B. obtusifolia*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. subulata* e observaram que a maioria dos extratos testados foi capaz de exercer ação inibitória nas enzimas da cascata do araquidonato, principalmente a via 5-lipoxigenase. A atividade antiinflamatória também foi observada em extratos de partes aéreas de *B. medullosa* no modelo de edema de pata em camundongo (Cifuentes *et al.*, 2001). Perez-Garcia *et al.* (2001) relataram atividade inibitória no *burst* respiratório com extrato diclorometânico de *B. grisebachii*.

O perfil de compostos fenólicos do EBD exhibe artepelina C (3,4-ácido diprenilado *p*-cumárico) como o maior pico. Park *et al.* (2004) também observaram que a artepelina C é o principal composto presente em folhas de *B. dracunculifolia*. Diversos estudos mostraram que este composto é um excelente seqüestrador de radicais livres, similar às catequinas (Nakanishi *et*

al. 2003) e que ele suprime a lipoperoxidação de membranas e a oxidação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (Shimizu *et al.* 2004).

A CU está associada com elevado risco para câncer colo-retal sendo que este é aumentado fortemente com a duração e extensão da doença (Clevers, 2004). A artemelina C também teve efeito inibitório na formação de focos de cripta aberrante (FCA) no cólon, uma lesão pré-neoplásica ligada a carcinogênese colônica (Shimizu *et al.* 2006). O mecanismo proposto para a supressão da formação de FCA por este composto é pela indução de enzimas de biotransformação fase II através da ligação do elemento responsivo ao antioxidante no DNA. Assim, devido a sua atividade antioxidante, a artemelina C é um dos fatores quimiopreventivos que protege contra o câncer de cólon.

Recentemente, muita atenção tem sido dada para as propriedades antioxidantes que afetam os radicais livres do oxigênio e a peroxidação lipídica. No processo inflamatório, a produção inicialmente aumentada de radicais livres induz a peroxidação lipídica que resulta na liberação de mediadores por células inflamatórias, como os neutrófilos, que infiltram a mucosa danificada. O estresse oxidativo resultante pode limitar as defesas antioxidantes endógenas ou depletá-las na mucosa colônica inflamada (Myers *et al.*, 1977). Quando a inflamação se estende por mais tempo, os radicais livres exercem um efeito deletério no órgão afetado e, portanto, sua formação deve ser limitada. Assim, a terapia antioxidante constitui uma abordagem interessante no tratamento de doenças inflamatórias.

Vários estudos com compostos antioxidantes têm sido desenvolvidos no tratamento e prevenção de DII, tais como flavonóides: quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 2001; Sánchez de Medina *et al.*, 1996), rutosídeo (Gálvez *et al.*, 1997), silimarina (Cruz *et al.*, 2001), morina (Gálvez *et al.*, 2001; Ocete *et al.*, 1998), diosmina e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999); cumarinas (Witaicenis *et al.*, 2008); paepalantina (Di Stasi *et al.*, 2004); vitamina E (González *et al.*, 2001) e tempol (Cuzzocrea *et al.*, 2000), e resultaram em melhora do processo inflamatório agudo e/ou crônico.

A atividade antiinflamatória observada neste estudo pode ser devido às propriedades antioxidantes do EBD, como demonstrada pela redução da peroxidação lipídica induzida em membranas de cérebro por sulfato ferroso e ácido ascórbico.

Conclusão

Com base nos objetivos propostos, nos resultados e discussões apresentadas, com a realização do presente estudo foi possível concluir que a administração oral do extrato acetato de etila de folhas de *Baccharis dracunculifolia* na dose de 5 mg/Kg protege o cólon de ratos da colite experimental através de um mecanismo que envolve a diminuição do estresse oxidativo associado à inflamação, como redução da atividade da enzima mieloperoxidase, e manutenção dos níveis de antioxidantes endógenos, como a glutathione, e que essa atividade antiinflamatória intestinal pode ser devido à presença de compostos fenólicos no extrato.

A espécie estudada representa uma nova possibilidade para prevenção e tratamento desta doença e estudos adicionais com os compostos isolados tornam-se importantes para definir se os efeitos antiinflamatórios intestinais de *Baccharis dracunculifolia* decorrem da presença de um destes compostos ou pelo efeito sinérgico do conjunto destes constituintes.

Referências

REFERÊNCIAS *

ABAD, M.J.; BESSA, A.L.; BALLARIN, B.; ARAGON, O.; GONZALES, E.; BERMEJO, P. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.3, p.338-344, 2006.

AGRAWAL, A.; RHODES, J.M. Smoking and IBD. **IBD Monitor**, v.4, p.114-119, 2003.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK. Composição química da *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.

ALSTEAD, E.M. The pill: safe sex and Crohn's disease? **Gut**, v.45, n.2, p.165-166, 1999.

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

ARDITE, E.; SANS, M.; PANES, J.; ROMERO, F.J.; PIQUE, J.M.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Replenishment of glutathione levels improve mucosal function in experimental acute colitis. **Laboratory Investigation**, v.80, n.5, p.735-744, 2000.

ARIZA ESPINAR, L. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba**, v.50, p.176-305, 1973.

AZAD KHAN, A.K.; PIRIS, J.; TRUELOVE, S.C. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. **Lancet**, v.2, n.8044, p.892-895, 1977.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BARNES, S.; PRASAIN, J. Current progress in the use of traditional medicines and nutraceuticals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n.33, p.324-328, 2005.

BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.3, p.567-571, 2007.

BAZO, A.P.; RODRIGUES, M.A.M.; SFORCIN, J.M.; VIANA DE CAMARGO, J.L.; RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.22, n.3, p.183-194, 2002.

BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, v.268, p.G622-G630, 1995.

BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROOK, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **Journal of Biological Chemistry**, v.164, p.321-329, 1946.

BLUMBERG, R.S.; STROBER, W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. **Journal of the American Medical Association**, v.285, n.5, p.643-647, 2001.

BOIK, J. **Cancer and natural medicine**. Princeton: Oregon Medical press, 1996.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BRIDGER, S.; LEE, J.C.; BJARNASON, I.; JONES, J.E.; MACPHERSON, A.J. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease,

smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. **Gut**, v.51, n.1, p.21-25, 2002.

BUNFFINTON, G.D.; DOE, W.F. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.19, n.6, p.911-918, 1995.

CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v.69, n.11, p.973-983, 2003.

CAMPOS, R.O.P.; PAULINO, N.; SILVA, C.H.M.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J.B. Anti-hyperalgesic effect of the ethanolic extract of propolis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.50, p.1187-1193, 1998.

CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; NIETO, A.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **British Journal of Pharmacology**, v.143, p.908-918, 2004.

CAMUESCO, D.; PERAN, L.; COMALADA, M.; NIETO, A.; DI STASI, L.C.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.11, n.3, p.265-271, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, L.R. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v.22, n.5, p.749-760, 1997.

CIFUENTE, D.A.; SIMIRGIOTIS, M.J.; FAVIER, L.S.; ROTELLI, A.E.; PELZER, L.E. Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. **Phytotherapy Research**, v.15, n.6, p.529-531, 2001.

CLEVERS, H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, v.118, n.6, p.671-674, 2004.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, v.2, p.1420-1428, 1963.

COLLINS, S.M. Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.280, n.3, p.G315-G318, 2001.

CORMAN, M.L. **Colon and rectal surgery**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1743 p.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1252 p.

CRESPO, M. E.; GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; OCETE, M. A.; ZARZUELO, A. Anti inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rats colitis induced by TNBS. **Planta Medica**, v.65, n.7, p.651-653, 1999.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMANN, G. Targets for antiinflammatory drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.35, p. 449–462, 1995.

CRUZ, T.; GÁLVEZ, J.; OCETE, M.A.; CRESPO, M.E.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; ZARZUELO, A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. **Life Sciences**, v.62, n.7, p.687-695, 1998.

CRUZ, T.; GÁLVEZ, J.; CRESPO, E.; OCETE, M.A .; ZARZUELO, A . Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v.67, n.1, p.94-96, 2001.

CUCINO, C.; SONNENBERG, A. Occupational mortality from inflammatory bowel disease in the United States 1991-1996. **American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.4, p.1101-1105, 2001.

CUSTODIO, A.R.; MARCUCCI, M.C. Própolis: correlação química e biológica. **ChemKeys**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acesso em: nov. 2005.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; GILARD,E.; HAKE, P.; SALZMAN, A.L.; SZABÓ, C. Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carragenan-induced models of inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, n.3, p.450-459, 1998.

CUZZOCREA, S.; MCDONALD, M.C.; MAZZON, E.; DUGO, L.; LEPORE, V.; FONTI, M.T.; CICCOLO, A.; TERRANOVA, M.L; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **European Journal of Pharmacology**, v.406, n.1, p.127-137, 2000.

DALLEGRI, C.; OTTONELLO, L.; BALLESTRELO, A.; BOGLIOLO, F.; FERRANDO, F.; PATRONE, F. Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. **Gut**, v.31, p.184-186, 1990.

DAMIANI, C.R. **Estresse oxidativo e metabolismo em modelo animal de colite induzida por dextran sulfato de sódio**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma/SP.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity Reviews**, v.3, n.5, p.394-400, 2004.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; LZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, n.4., p.337-353, 1999.

DI STASI, L.C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, 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 Medica**, v.70, n.4, p.315-320, 2004.

DIMOV, V.; IVAVOWSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and

adjuvant effect of the water-soluble derivative. **Vaccine**, v.10, n.12, p.817-823, 1992.

ELSON, C.O.; SARTOR, R.B.; TENNYSON, G.; RIDEL, R. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.109, p.1344-1367, 1995.

EVANS, J.M.M.; MCMAHON, A.D.; MURRAY, F.E.; MCDEVITT, D.G.; MACDONALD, T.M. Non-steroidal antiinflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. **Gut**, v.40, n.5, p.619-622, 1997.

EVANS, M.J.; KEHDIH LAI, A.E.; ADELMAN, S.J.; HARNISH, D.C. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF- κ B activity *in vivo*. **Circulation Research**, v.89, n.9, p.823-830, 2001.

FABIA, R.; AR'RAJAB, A.; JOHANSSON, M.L.; ANDERSSON, R.; WILLEN, R.; JEPPSON, B.; MOLIN, G.; BENGMARK, S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. **Digestion**, v.54, n.4, p.248-255, 1993.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organ**, v.63, n.6, p.965-981, 1985.

FEE, J.A.; TEITELBAUM, H.D. Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.49, n.1, p.150-158, 1972.

FIOCCHI, C. Cytokines In: Targan, S.R.; Shanahan, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.106-122.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, n.1, p.182-205, 1998.

FIOCCHI, C. The normal intestinal mucosa: a state of "controlled inflammation". In: Targan, S.R.; Shanahan, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.101-120.

FOSTER, B.C.; ARNASON, J.T.; BRIGGS, C.J. Natural health products and drug disposition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.203-226, 2005.

GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; CRESPO, M.E.; OCETE, M.A.; LORENTE, M.D.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; ZARZUELO, A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. **Planta Medica**, v.63, n.5, p.409-414, 1997.

GÁLVEZ, J.; COELHO, G.; CRESPO, M.E.; CRUZ, T.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; CONCHA, A.; GONZALEZ, M.; ZARZUELO, A. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.15, p.2027-2039, 2001.

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. Bioactive natural products (Part f)**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p.607-649.

GÁLVEZ, J.; GRACIOSO, J.S.; CAMUESCO, D.; GÁLVEZ, J.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S.; ZARZUELO, A. Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. **Fitoterapia**, v.77, p.515-520, 2006.

GASCHE, C. Complications of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v.47, n.31, p.49-56, 2000.

GASSULL, M.A. Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.20, n.4(supl.), p.79-83, 2004.

GASSULL, M.A.; MANE, J.; PEDROSA, E.; CABRE, E. Macronutrients and bioactive molecules: is there a specific role in the management of inflammatory

bowel disease? **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.29, n.4, p.S179-182, discussion S182-3, 184-188, 2005.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.

GILANI, A.H.; MOLLA, N.; ATTA-ur-RAHMAN; SHAH, B.H. Role of natural products in modern medicine. **Journal of Pharmaceutical Medicine**, v.2, p.111-118, 1992.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.31, n.220(supl.), p.83-86, 1996.

GODET, P.G.; MAY, G.R.; SUTHERLAND, L.R. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.37, n.5, p.668-673, 1995.

GONZÁLEZ, R.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; DUARTE, J.; ZARZUELO, A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.71, n.4, p.243-250, 2001.

GORDON, P.H.; NIVATVONGS, S. **Principles and practice of surgery for the colon, rectum, and anus**. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, 1992. 1097 p.

GREEN, J.T.; THOMAS, G.A.O.; RHODES, J.; WILLIAMS, G.T.; EVANS, B.K.; RUSSELL, M.A.H.; FEYERABEND, C.; RHODES, P.; SANDBORN, W.J. Nicotine enemas for active ulcerative colitis: a pilot study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.11, n.5, p.859-863, 1997.

GRISHAM, M.B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **Lancet**, v.344, n.8926, p. 859-861, 1994.

GUSLANDI, M.; TITTOBELLO, A. Pilot trial of nicotine patches as an alternative to corticosteroids in ulcerative colitis. **Journal of Gastroenterology**, v.31, n.4, p.627-629, 1996.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v.344, n.8924, p.721-724, 1994.

HANAUER, S.B.; SANDBORN, W. Management of Crohn's disease in adults. **American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.3, p.635-643, 2001.

HERBERT, T.B.; COHEN, S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. **Psychosomatic Medicine**, v.55, n.4, p.364-379, 1993.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993.

HUGOT, J-P.; LAURENT-PLUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; OLSON, J.M.; LEE, J.C.; BEAUGERIE, L.; NAOM, I.; DUPAS, J.L.; GOSSUM, A.V.; ORHOLM, M.; BONAITI-PELLIE, C.; WEISSENBACH, J.; MATHEW, C.G.; LENNARD-JONES, J. E.; CORTOT, A.; COLOMBEL, J.F.; THOMAS, G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. **Nature**, v.379, n.6568, p.821-823, 1996.

IRVINE, E.; FARROKHVAR, F.; SWARBRICK, E.T. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.36, n.1, p.2-15, 2001.

JIANG, H.; DENG, C-S.; ZHANG, M.; XIA, J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.24, p.3848-3853, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 1967.

KATZ, J.A.; ITOH, J.; FIOCCHI, C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.15, n.4, p.291-297, 1999.

KEIGHLEY, M.; WILLIAMS, N.S. **Cirurgia do ânus, reto e colo**. São Paulo: Manole, 1998. 2335 p.

KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology**, v.87, n.6, p.1344-1350, 1984.

KUBES, P.; WALLACE, J.L. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? Say it ain't so. **Mediators of Inflammation**, v.4, n.6, p.397-405, 1995.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.6, p.740-742, 2003.

LABBE, C.; ROVIROSA, J.; FAINI, F.; MAHU, M.; SAN-MARTIN, A.; CASTILLO, M. Secondary metabolites from Chilean *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v.49, n.3, p.517-518, 1986.

LAS HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M.J.; GOMEZ-SERRANILHOS, P.; LISO, P.A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, n.2, p.161–166, 1998.

LAUTERBURG, B.H.; BILZER, M.; ROWEDDER, E.; INAUEN, W. Decreased glutathione in inflamed colonic mucosa in man. A possible role of hypochlorous acid and prevention by 5-aminosalicylic acid. In MacDERMOTT (Ed.). **Inflammatory bowel disease: current status and future approach**. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p.273-277.

LEFER, A.M.; LEFER, D.J. Nitric oxide. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. **American Journal of Physiology**, v.276, n.3, p.G572-G575, 1999.

LEITÃO, D.P.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; POLIZELLO, A.C.M.; BASTOS, J.K.; SPADARO, A.C.C. Comparative evaluation of *in-vitro* Brazilian green propolis

and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.11, p.1834-1839, 2004.

LEMOS, M.; DE BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.B.; DA SILVA FILHO, A.A., BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, n.4, p.603-608, 2007.

LEVENSTEIN, S.; PRANTERA, C.; VARVO, V.; SCRIBANO, M.L.; ANDREOLI, A.; LUZI, C.; ARCA, M.; BERTO, E.; MILITE, G.; MARCHEGGIANO, A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. **American Journal of Gastroenterology**, v.95, n.5, p.1213-1220, 2000.

LEVINE, D.S. Clinical features and complications of Crohn's disease. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.296-319.

LICHTMAN, S.N.; BALFOUR SARTOR, R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.317-335.

LIH-BRODY, L.; POWELL, S.R.; COLLIER, K.P.; REDDY, G.M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN, G.; KATZ, S.; FLOYD, R.A.; MCKINLEY, M.J.; FISHER, S.E.; MULLIN, G.E. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases Sciences**, v.41, n.10, p.2078-2086, 1996.

LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. **Digestive Diseases Sciences**, v.41, n.6, p.1204-1211, 1996.

LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Glutathione

supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Digestive and Liver Disease**, v.35, n.9, p.635-641, 2003.

LOPES, F.C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. **Phytomedicine**, v.10, n.4, p.343-343, 2003.

MALAGARRIGA HERAS, R. D. P. Nomenclator Baccharidinarum Omnium. **Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v.37, p.129-224, 1976.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, n.2, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung Section C: Biosciences**, v.53, n.1-2, p.117-119, 1998.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; BANKOVA, V.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS A.P.; VALENTE, P.H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-112, 2001.

MATERSSON, J.; JAIN, A.; MEISTER, A. Glutathione is required for intestinal functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.87, n.5, p.1715-1719, 1990.

MAZIER, W. P.; LEVIEN, D.H.; LUCHTEFELD, M.A.; SENAGORE, A.J. **Surgery of the colon, rectum, and anus**. Pennsylvania: Saunders Company, 1995. 1196 p.

MECHANICK, J.I. The rational use of dietary supplements and nutraceuticals in clinical medicine. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v.72, n.3, p.161-165, 2005.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p.711-760, 1983.

MENEZES, H. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.72, p.1-64, 2005.

MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.4, p. 673-751, 2000.

MIDDLETON, S.J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J.D. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**, v.341, p.465-466, 1993.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, v.12, n.6, p.366-373, 2001.

MILLER, M.J.S.; GRISHAM, B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Mediators of Inflammation**, v.4, p.387-396, 1995.

MISIEWICZ, J.J.; POUNDER, R.E.; VENABLES, C.W. (Eds.). **Diseases of the gut and pancreas**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A.A.; NUNES, G.A.; BUENO, P.C.P.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J.M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n.3, p.463-468, 2007.

MIYACHI, Y.; YOSHIOKA, A.; IMAMURA, S.; NIWA, Y. Effect of sulphasalazine and its metabolites on the generation of reactive oxygen. **Gut**, v.28, n.2, p.190-195, 1987.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; RODRIGUEZ TALOU, J.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, n.3, p.157-163, 1997.

MONTPIED, P.; BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A-S.; LERNER-NATOLI, M.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, v.115, n.2, p.111-120, 2003.

MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE W.; DEPEW, W.; SZCEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v.96, n.3, p.795-803, 1989.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, Inc. Algonac, 2000.

MYERS, C.E.; MCGUIRE, W.P.; LISS, R.H.; IFRIM, I.; GROTZINGER, K.; YOUNG, R.C. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. **Science**, v.197, n.4299, p.165–167, 1977.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J.I.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artemisinin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v.1, n.9, p.1452-1454, 2003.

NIELSEN, O.H.; AHNFELT-RØNNE, I.; ELMGREEN, J. Abnormal metabolism of arachidonic acid in chronic inflammatory bowel disease: enhanced release of leucotriene B4 from activated neutrophils. **Gut**, v.28, n.2, p.181–185, 1987.

NIELSEN, O.H.; RASK-MADSEN, J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.216(supl.), p.149-159, 1996.

OBRADOR, A. Prevention of colon cancer. In: GASSULL, M.A.; OBRADOR, A.; CHANTAR, C. (Eds.). **Management of inflammatory bowel disease**. Barcelona: Prous Science, 1994. p.279-284.

OBRADOR, A.; RIERA, J. Definitions. In: GASSULL, M.A.; OBRADOR, A.; CHANTAR, C. (Eds.). **Management of inflammatory bowel disease**. Barcelona: Prous Science, 1994. p.1-6.

OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; CRESPO, M.E.; CRUZ, T.; GONZALEZ, M.; TORRES, M.I.; ZARZUELO, A. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. **Pharmacology**, v.57, n.5, p.261-170, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAGAKI, M.; CURY, J. A. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v.36, n.1, p.24-38, 1998.

PARK, Y.K.; IKEGANI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p.85-90, 2000a.

PARK, Y.K.; IKEGANI, M.; ALENCAR, S.M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical methods and biological activity. **Mensagem Doce**, v.58, p.2-7, 2000b.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M. E AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.9, p.2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.5, p.1100-1103, 2004.

PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, n.26, p.10306–10309, 2005.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and

nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.3, p.311-22, 2002.

PEARSON, D.C.; JOURD'HEUIL, D.; MEDDINGS, J.B. The antioxidant properties of 5-aminosalicylic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, n.3, p. 367-373, 1996.

PERAN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; NIETO, A.; CONCHA, A.; ADRIO, J.L.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. **International Journal of Colorectal Disease**, v.21, n.8, p.737-746, 2006.

PEREZ-GARCIA, F.; MARIN, E.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Activity of plant extracts on the respiratory burst and stress protein synthesis. **Phytomedicine**, v.8, n.1, p.31-38, 2001.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**, v.347, n.6, p.417, 2002.

POHL, C.; HOMBACH, A.; KRUIS, W. Inflammatory bowel disease and cancer. **Hepatogastroenterology**, v.47, n.31, p.57-70, 2000.

PULLAN, R.D.; RHODES, J.; GANESH, S.; MANI, V.; MORRIS, J.S.; WILLIAMS, G.T.; NEWCOMBE, R.G.; RUSSELL, M.A.; FEYERABEND, C.; THOMAS, G.A.; SAWE, U. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. **The New England Journal of Medicine**, v.330, n.12, p. 811-815, 1994.

QUEIROGA, C.L. **Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia***. 1989. 193f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química, UNICAMP, Campinas.

QUEIROGA, C.L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A.J. Composition of the essential oil of Vassoura. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.1, p.105-109, 1990.

RANSFORD, R.A.; LANGMAN, M.J.S. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. **Gut**, v.51, p.36-39, 2002.

RATH, H.C.; HERFARTH, H.H.; IKEDA, J.S.; GRENTHER, W.B.; HAMM, T.E.; BALISH, E.; TAUROG, J.D.; HAMMER, R.E.; WILSON, K.H.; SARTOR, R.B. Normal luminal bacteria, especially *Bacteriodes* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human β_2 microglobulin transgenic rats. **Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.945-953, 1996.

REIF, S.; KLEIN, I.; LUBIN, F.; FARBSTEIN, M.; HALLAK, A.; GILAT, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.40, n.6, p.754-760, 1997.

RESENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v.634, n.1-2, p.112-118, 2007.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Advance Access Publication**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GALVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.278, n.2, p.771-779, 1996.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GALVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sciences**, v.70, n.26, p.3097-3108, 2001.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; PEREZ, R.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; GONZÁLEZ, R.; LORENTE, M.D.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.444, n.3, p.378-388, 2002.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; NIETO, A.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Induction of alkaline phosphatase in inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, v.68, n.12, p.2317-2326, 2004.

SARTOR, R.B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. **American Journal of Gastroenterology**, v.92, p.5S-11S, 1997.

SARTOR, R.B. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.21, n.1, p.44-50, 2005.

SEO, K.W.; PARK, M.; SONG, Y.J.; KIM, S.J.; YOON, K.R. The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. **Phytotherapy Research**, v.17, n.3, p.250-253, 2003.

SERIL, D.N.; LIAO, J.; YANG, G.Y.; YANG, C.S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. **Carcinogenesis**, v.24, n.3, p.353-362, 2003.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, n.3, p.301-305, 2005.

SHANAHAN, F.; TARGAN, S.R. Mechanisms of tissue injury in inflammatory bowel disease. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.78-88

SHEKHER PANNALA, A.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoids B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v.282, p.1161-1168, 2001.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Biochemistry and Biophysics**, v.424, n.2, p.181-188, 2004.

SHIMIZU, K.; DAS, S.K.; BABAB, M.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Dietary artemisin C suppresses the formation of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in mouse colon. **Cancer Letters**, v.240, n.1, p.135–142, 2006.

SILVA, I.D.; RODRIGUES, A.S.; GASPAR, J.; MAIA, R.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. **Mutagenesis**, v.12, n.5, p.383-390, 1997.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Plantas medicinais e aromáticas** (CD-ROM). Itajaí: Epagri, 1997.

SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.59-65, 2004.

SMITH, P.D., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H. Measurement of protein using BCA. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p.76–85, 1985.

SONNENBERG, A.; MCCARTY, D.J.; JACOBSEN, S.J. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. **Gastroenterology**, v.100, n.1, p.143-149, 1991.

SOOBRAATTEE, M.A., NEERGHEEN, V.S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O.I., BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v.579, n.1-2, p.200-213, 2005.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.39, n.2, p.98-105, 2002.

STEIDLER, L. Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. **Microbes and Infection**, v.3, n.13, p.1157-1166, 2001.

STENSON, W.F.; MCDERMOTT, R.P. Inflammatory bowel disease. In: YAMADA, T. (Ed.). **Textbook of gastroenterology**. Philadelphia: Lippincott Company, 1991. p.1588-1645.

STOCKS, J.G.; GUTTERIDGE, J.M.C.; SHARP, R.J.; DORMANDY, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical Science of Molecular Medicine**, v.47, n.3, p.215–222, 1974.

SWIDSINSKI, A.; LADHOFF, A.; PERNTHALER, A.; SWIDSINSKI, S.; LOENING-BAUCKE, V.; ORTNER, M.; WEBER, J.; HOFFMANN, U.; SCHREIBER, S.; DIETEL, M.; LOCHS, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.122, n.1, p. 44-54, 2002.

SZULC, P.; MEUNIER, P.J. Is vitamin K deficiency a risk factor for osteoporosis in Crohn's disease? **Lancet**, v.357, n.9273, p.1995-1996, 2001.

TAKEDA, I.J.M.; FARAGO, P.V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha**: Guia de campo. Curitiba: Serzegrat, 2001, p.38, 40, 43.

TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; LOPEZ, S.; FERESIN, G.E.;SCHMEDA-, HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, n.2-3, 155–161, 2004.

TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; UESHIMA, K.; OHUCHI, T.; OKABE, S. Endogenous sulphhydryls in healing gastric mucosal injury induced by HCl in the rat. **Digestion**, v.54, n.2, p.91-97, 1993.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.S.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Advance Access Publication.**, v.2, n.1, p.85-92, 2005.

THEIS, M.K.; BOYKO, E.J. Patient perceptions of causes of inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v.89, n.10, p.1920, 1994.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. **Biological Research**, v.33, n.2, p.55–64, 2000.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

WALLACE, J.L. Eicosanoids. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.123-132.

WALLACE, J.L.; HIGA, A.; McKNIGHT, G.W.; McINTIRE, D.E. Prevention and reversal of experimental colitis by a monoclonal antibody which inhibits leukocyte adherence. **Inflammation**, v.16, p.343-354, 1992.

WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C.L. The germless theory of allergic diseases: revisiting the hygiene hypothesis. **Nature Reviews**, v.1, p.69–75, 2001.

WINROW, V.R.; WINYARD, P.G.; MORRIS, C.J.; BLAKE, D.R. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. **British Medical Bulletin**, v.49, n.3, p.506-522, 1993.

WITAICENIS, A.; CESTARI, S.H.; RODRIGUES-ORSI, P.; LUCHINI, A.C.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. Evaluation of intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **European Journal Pharmacology**, no prelo.

YAMADA, T.; ZIMMERMAN, B.J.; SPECIAN, R.D.; GRISHAM, M.B. Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats. **Inflammation**, v.15, n.5, p.399-411, 1991.

Anexos

Artigos Submetidos

- 1) Cestari, S.H., Witaicenis, A., Rodrigues-Orsi, P., Luchini, A.C., Seito, L.N. and Di Stasi, L.C. Protective effects of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) in the trinitrobenzenosulphonic acid model of rat colitis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, submetido, 2007.
- 2) Witaicenis, A., Cestari, S.H., Rodrigues-Orsi, P., Luchini, A.C., Seito, L.N. and Di Stasi, L.C. Evaluation of intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenosulphonic acid model of rat colitis. **European Journal Pharmacology**, no prelo.
- 3) Luchini, A.C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S.H., Seito, L.N., Witaicenis, A. and Di Stasi, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenosulphonic acid model of rat colitis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, no prelo.
- 4) Rodrigues-Orsi, P., Luchini, A.C., Seito, L.N., Cestari, S.H., Witaicenis, A., and Di Stasi, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of daphnetin (7-8,dihydroxycoumarin) in the trinitrobenzenosulphonic acid (TNBS) model of rat colitis. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, submetido, 2007.
- 5) Seito, L.N., Witaicenis, A., Luchini, A.C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S.H., Pellizzon, C.H. and Di Stasi, L.C. Preventive effects of different natural coumarins (fraxetin, scopoletin, esculin and 4-methylumbeliferone) in the TNBS model of rat colitis, **Planta Medica**, submetido, 2007.