

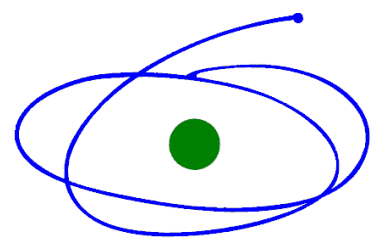
Andréa Costa Fruet

**Avaliação da atividade da fibra alimentar de *Typha angustifolia* L.
e de seus efeitos sinérgicos com a prednisolona no modelo de
colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em
ratos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu – SP
2010



C A P E S

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

Dedicatória:

Dedico esse trabalho á minha família, pai, mãe, Carol, avós, tios e primas que me apoiaram na realização deste trabalho, e que torcem sempre para eu alcançar os meus sonhos.

Às minhas amigas e meus amigos de Campinas, que não importe o quão impossível são meus sonhos, estão sempre lá, me apoiando, ajudando e rindo quando dão os maiores problemas.

Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.

Charles Chaplin

Agradecimentos:

À Deus, por ter me sustentado nas dificuldades.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, Fisiologia e Morfologia, alunos da PG-Farmacologia (Flávia, Patrícia, Carlos, Celso, Filipe, Jean, Ariane e Alex) que ao longo dos dias se tornaram meus amigos e lembraram de mim para todos os momentos.

Ao pessoal do Laboratório de Fitomedicamentos (*LaFit*- BOTU: Leonardo, Aline, Paty, Sílvia, Carol, Tarina, Ana, Viviane, Alexandre, Laura e Adriana) que com ajuda e amizade me auxiliaram na realização do trabalho.

A Prof. Vera Lúcia do departamento de Microbiologia, pela ajuda, auxílio e conselhos prestados.

Aos funcionários Edson (Jardinagem IB) e Ricardo (Morfologia) por me ajudarem nas coletas dos rizomas da planta do estudo.

Aos funcionários Cris, Janete, Paulão e Luiz (depto Framacologia) pela amizade e auxílio.

À minha amiga Giovana, que desde a graduação foi minha amiga, irmã, parte de minha família, que dividiu seus problemas os com meus e rimos deles.

Aos meus amigos da Graduação (XL Biologia).

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.

Charles Chaplin

Ao Orientador:

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi pela oportunidade de realizar o Mestrado em seu laboratório, por me confiar á uma nova linha de estudo do laboratório. Agradeço por me ajudar nas minhas dificuldades relacionadas ao mestrado, pela sua paciência e amizade proporcionada.

Não se mede o valor de um homem
pelas suas roupas ou pelos bens que possui,
o verdadeiro valor do homem é o seu caráter,
suas idéias e a nobreza
dos seus ideais.

Charles Chaplin

"Aprender é a única de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."
Leonardo da Vinci

RESUMO

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo coletivo ao grupo de desordens inflamatórias crônicas com relapsos no trato gastrointestinal, definidas principalmente por dois tipos, a colite ulcerativa e doença de Crohn. O uso de alimentos funcionais contendo componentes como fibras e compostos antioxidante tem sido empregado como estratégia terapêutica em enfermidades crônicas, pois são considerados eficazes na modulação do sistema imune e da microbiota colônica, controlando os processos da inflamação intestinal. O rizoma de *Typha angustifolia* L. possui alto conteúdo de fibras, fração de parede celular como celulose e a 11.25% de glutamina e 4.85% de glicina em suas folhas, os quais juntamente com a cisteína atuam como precursores da síntese de glutathione. O objetivo do estudo foi investigar a atividade antiinflamatória da suplementação de farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. (FRT) na dieta nas doses de 5%, 10% e 20%, isoladas e em associação a prednisolona a 2mg/Kg na colite experimental induzida por ácido trinitrobenzosulfônico (TNBS). O dano colônico foi avaliado macroscopicamente, microscopicamente e bioquimicamente, quantificando o conteúdo colônico de glutathione (GSH) e atividade da mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina (FA), além de seu efeito prebiótico, na concentração de 20%, sobre bactérias Ácido-Láticas em amostras fecais. Adicionalmente foi avaliado á partir de extrato etanólico a 70% da FRT a atividade antioxidante *in vitro* por lipoperoxidação em membrana de cérebros de ratos e detecção fitoquímica qualitativa do grupo de saponinas, taninos, flavonóides e cumarinas. A suplementação de FRT na dose de 10% diminuiu significativamente o dano colônico evidenciado macroscopicamente, microscopicamente e bioquimicamente, com contenção nos níveis de GSH e diminuição nas atividades da MPO e FA. A suplementação de FRT nas doses de 5% e 20% apresentaram apenas contenção apenas dos níveis de GSH. A combinação de FRT com Prednisolona não apresentou sinergismo entre os tratamentos. Nas avaliações microbiológicas, a FRT a 20% não demonstrou efeito prebiótico. O extrato bruto de FRT apresentou atividade antioxidante na concentração de 116.14 ± 4.91 mg/mL e foi detectado a presença de saponinas, cumarinas e flavonóides. A FRT apresentou potencial em reduzir a inflamação colônica, principalmente na dose de 10%, pois reduziu o escore, lesão colônica, a relação peso/comprimento e o escore microscópico, além de inibir a depleção de GSH e diminuiu a atividade da MPO e da FA. Essa atividade antiinflamatória pode ser devido á presença de fibras ou pela presença de compostos antioxidantes como cumarinas e flavonóides

Palavras-chaves: doença inflamatória intestinal, alimentos funcionais, fibras, rizoma de *T. angustifolia* L., TNBS.

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a collective term to the group of chronic inflammatory disorders with relapses in the gastrointestinal tract, defined mainly by two types, ulcerative colitis and Crohn's disease. The use of functional foods containing ingredients such as fiber and antioxidant compounds have been used as a therapeutic strategy for chronic diseases because they are considered effective in the modulation of the immune system and colonic microbiota, controlling the processes of intestinal inflammation. The rhizome of *Typha angustifolia* L. has a high fiber content, cell wall fraction as cellulose and 11.25% of glutamine and 4.85% glycine in the leaves, which together with cysteine act as precursors of glutathione synthesis. This study investigate the anti-inflammatory activity of the diet supplementation of *T. angustifolia* L. (FRT) rhizome at doses of 5%, 10% and 20%, alone and in combination with prednisolone 2 mg/kg in experimental colitis induced by trinitrobenzosulfônico acid (TNBS). The colonic damage was evaluated macroscopically, microscopically and biochemically by quantifying the colonic glutathione (GSH) content, mieloperoxidase (MPO) and alkaline phosphatase (AP) activity, and in addition their prebiotic effect, at concentration of 20% on acid-lactic bacteria in fecal samples. Additionally the antioxidant activity was evaluated from FRT ethanol extract 70% by lipoperoxidation in vitro in membrane brains of mice and phytochemical qualitative detection of saponins, tannins, flavonoids and coumarins group. Dietary supplementation of FRT at dose 10% significantly decreased the colonic damage observed macroscopically, microscopically and biochemically, with counteraction of colonic GSH and decreased MPO and FA activity. Dietary supplementation of FRT in doses of 5% and 20% had only counteracted the colonic GSH. The combination of FRT with prednisolone did not show synergism between treatments. In microbiological evaluations, the FRT 20% did not demonstrate a prebiotic effect. The crude extract of FRT showed antioxidant activity at a concentration of 116.14 ± 4.91 mg/mL and showed presence of saponins, coumarins and flavonoids. The FRT presented potential to reduce colonic inflammation, especially at a dose of 10%, because reduced the score, colonic lesion, weight / length and microscopic scores, and biochemically inhibited the GSH depletion and decreased the MPO and AP activity. This anti-inflammatory activity may be due to the presence of fibers or the presence of antioxidant compounds such as coumarins and flavonoids.

Keywords: inflammatory bowel disease, functional food, fiber, rhizome of *T. angustifolia* L., TNBS.

Lista de Figuras

Figura 1	Foto de <i>Typha angustifolia</i> L. da área de coleta; Distrito de Rubião Junior, Botucatu, SP.....	22
Figura 2	Delineamento experimental de colite.....	27
Figura 3	Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutatona total nas amostras de cólon.....	30
Figura 4	Atividade antioxidante do extrato bruto etanólico 70% do rizoma de <i>Typha angustifolia</i> L.	34
Figura 5	Atividade antioxidante da quercetina.....	35
Figura 6	Média da evolução da massa corpórea dos grupos tratados com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. durante os 21 dias do experimento.....	36
Figura 7	Consumo médio diário de ração dos grupos tratados com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. durante os 21 dias do experimento.....	37
Figura 8	Microfotografias histológica do tecido colônico dos grupos com os tratamentos isolados.....	41
Figura 9	Microfotografias histológica do tecido colônico dos grupos com os tratamentos associados.....	42
Figura 10	Microfotografias histológica do tecido colônico dos grupos Branco e Dieta (FRT 20%).....	43
Figura 11	Efeito dos tratamentos com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. nas doses de 5% (TNBS+FRT5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20% (TNBS+FRT20%), grupo referência (PRED; 2mg/Kg) e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) no conteúdo de glutatona total (GSH) no tecido colônico.....	44
Figura 12	Efeito dos tratamentos com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. nas doses de 5% (TNBS+FRT5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20% (TNBS+FRT20%), grupo referência (PRED; 2mg/Kg) e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) na atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no tecido colônico.....	45
Figura 13	Efeito dos tratamentos com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. nas doses de 5% (TNBS+FRT5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20% (TNBS+FRT20%), grupo referência (PRED; 2mg/Kg) e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED,	

	TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) na atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) no tecido colônico.....	46
Figura 14	Efeito dos tratamentos no grupo branco, grupo controle (TNBS), grupo referência (PRED; 2mg/Kg), com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. nos grupos dieta (FRT20%), tratado com doses de 20% (TNBS+FRT20%), e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT20%+PRED) na leitura microbiológica para bactérias ácido-láticas.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição da dieta padrão “Labina” (Purina do Brasil) na alimentação dos animais.....	23
Tabela 2	Critério de determinação de escore macroscópico de lesão colônica (Bell e cols., 1995).....	28
Tabela 3	Critério de Determinação de Escore Microscópico de Lesão Colônica (Stucchi e cols., 2000).....	29
Tabela 4	Efeitos dos tratamentos com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. (TNBS+FRT5%, TNBS+FRT10% e TNBS+FRT20%) e da prednisolona (PRED; 2mg/Kg) e da associação entre os dois tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) no escore macroscópico, tamanho da lesão, na relação peso/comprimento colônico e na incidência de aderência na colite induzida por TNBS em ratos.....	38
Tabela 5	Efeitos dos tratamentos com farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. (TNBS+FRT5%, TNBS+FRT10% e TNBS+FRT20%) e da prednisolona (PRED; 2mg/Kg) e da associação entre os dois tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) no escore microscópico na colite induzida por TNBS em ratos.....	40
Tabela 6	Análise fitoquímica da farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L. (FRT) e do seu extrato bruto etanólico 70%.....	47

Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Introdução.....	14
1. A doença inflamatória intestinal (DII).....	14
2. A microbiota intestinal e a DII.....	16
3. <i>Typha angustifolia</i> L. como produto-teste.....	20
Objetivos.....	21
Materiais e Métodos.....	22
1. Material vegetal.....	22
1.1. Descrição botânica e coleta.....	22
1.2. Elaboração da farinha do rizoma de Taboa (<i>Typha angustifolia</i>).....	23
1.3. Preparo do extrato vegetal bruto.....	23
1.4. Preparo da ração enriquecida com a farinha do rizoma de <i>T. angustifolia</i> L.	23
2. Ensaio <i>in vitro</i>.....	24
2.1. Peroxidação lipídica em membrana de cérebro de rato.....	24
3. Ensaio <i>in vivo</i>.....	25
3.1. Animais de experimentação.....	25
3.2. Modelo experimental de inflamação intestinal.....	26
3.3. Delineamento experimental.....	26
3.4. Avaliação macroscópica dos cólons.....	27
3.5. Avaliação microscópica das amostras de cólon.....	28
3.6. Determinações bioquímicas.....	29
3.6.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)....	29
3.6.2. Determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH).....	30
3.6.3. Determinação da atividade da fosfatase alcalina (FA) colônica.....	31
3.7. Análise microbiológica.....	31
4. Análise estatística.....	32
5. Determinações fitoquímicas qualitativa.....	32
5.1. Caracterização de taninos.....	32
5.2. Caracterização de saponinas.....	32

5.3. Caracterização de flavonóides.....	33
5.4. Caracterização de cumarinas.....	33
Resultados.....	34
1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato.....	34
2. Avaliação dos efeitos da FRT e da associação da FRT com prednisolona no processo inflamatório intestinal e na dieta.....	35
2.1. Consumo alimentar e massa corporal.....	35
2.2. Avaliação dos parâmetros macroscópicos.....	37
2.3. Avaliação microscópica.....	38
2.4. Avaliação das determinações bioquímicas.....	43
2.5. Avaliação microbiológica.....	46
3. Determinações fitoquímicas qualitativas.....	47
Discussão.....	48
Conclusão.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1. A doença inflamatória intestinal (DII)

Doença inflamatória intestinal (DII) é o termo coletivo a um grupo de condições intestinais idiopáticas caracterizadas principalmente por dois tipos, a colite ulcerativa e doença de Crohn (Geier e cols., 2007), e são conhecidas como uma desordem crônica de relapsos associados com inflamação incontrolada junto ao trato gastrointestinal (Hanauer, 2006). Ambas as doenças apresentam condições bem distintas com diferentes respostas imunes, porém com perfil inflamatório, sintomas e estratégias de tratamento similares. A doença de Crohn, segundo Papadakis & Targan, 2000, é predominantemente de resposta imune mediada por Th1 (linfócitos T helper tipo 1), com aumento inicialmente da expressão de interleucina 12 (IL-12), seguida pela expressão de interferon (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α). A doença de Crohn pode ocorrer em qualquer região do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus, sendo caracterizada por uma inflamação transmural granulomatosa (Geier e cols., 2007). Por sua vez, a Colite ulcerativa é mediada pela resposta imune de Th2, levando ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-5 (Geier e cols., 2007). A Colite ulcerativa se restringe a mucosa do cólon e geralmente começa no reto e se espalha sentido ascendente, dependendo da severidade da doença (Papadakis & Targan, 2000). Em ambas as doenças, os sintomas recorrentes são abscessos, fistulas, obstrução intestinal, sangramento crônico nas fezes e neoplasia intestinal (Oz & Ebersole, 2008).

Recentemente estima-se que a DII afete aproximadamente um 1.4 milhões de pessoas nos Estados Unidos (Loftus e cols., 2007), 2.2 milhões na Europa (Neuman, 2007) e 150 mil no Canadá (Russel, 2000), sendo as maiores incidências em pessoas com idade de 15 a 30 anos (Loftus e col., 2002). Contudo, esses dados podem estar comprometidos devidos à dificuldade nos diagnósticos da DII (Hanauer, 2006). O Brasil é considerado área de baixa incidência, apesar do aumento de registros nos últimos anos (Victoria e cols., 2009; Souza e col., 2008; Souza e cols., 2002). Um recente estudo avaliou a incidência das DII em hospitais de referência da região centro-oeste do estado de São Paulo (Brasil) e apontou uma maior ocorrência das DII em mulheres jovens, de raça branca e que residem em zonas urbanas (Victoria e cols., 2009). Contudo, homens e mulheres parecem ser afetados em igual proporção, em indivíduos de todas as idades predominando em jovens, com quase todos os casos diagnosticados antes da idade dos 30 anos (ABCD, 2010).

A causa da DII ainda não está bem compreendida, mas fatores ambientais, genéticos e imunológicos apresentam-se como parte da etiologia de ambas as doenças

(Danese e cols., 2004; Hanauer, 2006). Evidências recentes sugerem que os fatores genéticos apresentam um maior papel no desenvolvimento de doença de Crohn que na colite ulcerativa, com razão de concordância entre gêmeos monozigóticos de 6-14% em colite ulcerativa quando comparados com 44-50% em doença de Crohn (Farrell & Peppercorn, 2002). A observação de casos dos dois tipos de doença ocorrendo na mesma família sugere que alguns desses genes podem ser comuns para ambas as desordens e, similar a outras desordens genéticas complexas (Abraham e cols., 2009). Mudanças na dieta, usos de antibióticos e manipulação da colonização intestinal provavelmente tem contribuído para a prevalência das DII durante o século passado (Eckburg & Relman, 2007). Outro fator de risco ambiental relacionado a complicações das DII é o tabagismo (Danese e cols., 2004) que afeta essas duas doenças diferentemente, aumentando o risco de desenvolver a doença de Crohn e tendência a tornar-se mais severa nos fumantes, enquanto que em fumantes passivos e não fumantes ocorre o aumento do risco à desenvolver colite ulcerativa (Abraham, e cols., 2009). O tabagismo também desencadeia efeitos opostos nos pacientes com DII, aumentando a probabilidade de relapsos em pacientes com doença de Crohn, enquanto que fumar continuamente diminui a incidência de relapsos em pacientes com colite ulcerativa (Rubin & Hanauer, 2000; Danese e cols., 2004).

Outro fator associado ao desenvolvimento da patogênese da DII seria o aumento da resposta imune contra à microbiota comensal em indivíduos geneticamente susceptíveis (Sartor, 2004; Bamias e col., 2005). O fator imunológico responsável pela perda do reconhecimento aos antígenos luminais incluem uma hiperatividade dos linfócitos efetores e citocinas antiinflamatórias, falha dos linfócitos reguladores e citocinas anti-inflamatórias no controlar a inflamação e a resistência dos linfócitos T para a apoptose (Bamias e cols., 2005).

Dos fármacos utilizados, apenas o sistema imune é usada como alvo das estratégias terapêuticas e preventivas na DII (Shanahan, 2004). Os aminosalicilatos, fármacos que contem o agente 5-ASA (Ácido 5-aminosalicílico), como a sulfasalazina, mesalazina e olsalazina, são os mais utilizados para o tratamento das DII de grau leve a moderada, no entanto, apresentam efeitos adversos como náuseas, vômitos, dores de cabeça, dores epigástricas e abdominais, reações de sensibilidade (Rachmilewitz e cols., 1989), nefrites, pancreatite e perda de cabelo (Kuehbach, 2007). Os glicocorticosteróides como prednisolona e budesonida são usadas em pacientes de DII de grau moderado à severo e aos que não respondem aos demais tratamentos. No entanto, o uso contínuo de glicocorticosteróides, apesar de garantir a remissão, causa efeitos colaterais correspondentes a Síndrome de Cushing idiopática, como acne, crescimento de pêlos, aumento do apetite e, em uso prolongado podem levar a dependência, perda de densidade óssea e cardiomiopatia. Drogas imunossupressoras como azatioprina e

mercaptopurina são usadas também para o tratamento de DII de grau moderado a severo, porém 30% dos pacientes que recebem o tratamento não respondem a dose padrão usada (Cuffari e cols., 2001), sendo necessário aumento da dose, o que causa efeitos adversos como náuseas, febre, mal-estar, erupção, diarreia, hepatite, dores epigástricas, pancreatite e deficiência de produção de células pela medula óssea (Present e cols., 1989), surgindo quadros clínicos como leucopenias, trombocitopenia e pancitopenia (Connell e cols., 1993; Fraser e cols., 2002; Cuffari e cols., 1996). As terapias biológicas têm levado o tratamento de pacientes com colite ulcerativa a mudanças promissoras (Changtai e cols., 2009). O Infiximab é considerado eficiente para o tratamento das DII do grau moderado a severo, com principal ação terapêutica na redução dos níveis da citocina pró-inflamatória colônica TNF- α . Contudo, esse medicamento apresenta elevado custo e seu uso prolongado tem sido associado ao aumento de infecções como pneumonia, histoplasmose, aspergilose e tuberculose, além de problemas circulatórios e câncer (Kuehbacher, 2007; Changtai e cols., 2009). Apesar do desenvolvimento de fármacos altamente eficazes ter mudado o perfil terapêutico da DII, as drogas utilizadas no tratamento de DII ou são de alto custo, ou frequentemente tóxicas, ou não são efetivas para todos os pacientes (Shanahan, 2004). Enquanto a abordagem terapêutica para o tratamento da colite ulcerativa, de grau leve a moderada têm sido bem estabelecida com uso os aminosalicílicos e os corticosteróides, o tratamento da colite de grau moderado a severo está longe de ser satisfatória (Changtai e cols., 2009).

Considerando que a DII é uma desordem complexa, surge a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens alternativas ou de terapias adjuvantes que influenciem no aumento do tempo de remissão dessas doenças (Coeffier e cols., 2010). Assim, a busca de novas estratégias terapêuticas seriam aquelas com foco na modulação do sistema imune intestinal, através da modificação da microbiota intestinal, seja com a suplementação na dieta por prebióticos, probióticos ou a união desdes, os chamados de simbióticos.

2. A microbiota intestinal e a DII

Muitos estudos têm sugerido uma associação entre a microbiota intestinal e as doenças inflamatórias intestinais (Pagnini & Cominelli, 2006). A interação bactéria-hospedeiro correspondente à patogênese na DII, para a maioria dos casos, apresenta tanto o envolvimento da microbiota comensal normal quanto à infecção por patógenos específicos. Já foi proposto que a exposição a condições anti-higiênicas durante o desenvolvimento do indivíduo pode preparar o ambiente intestinal a um ótimo desenvolvimento e regulação do sistema imune da mucosa intestinal, prevenindo assim

uma futura resposta inflamatória (Shanahan, 2004). As bactérias intestinais desempenham um importante papel na patogênese da DII, pois a inflamação e a lesão geralmente ocorrem em regiões intestinais com altas concentrações de bactérias, como no cólon e no íleo (Thompson-Chagoyan e cols., 2005), sendo evidenciados alto número de bactérias aderentes em portadores de DII (Swidsinski e cols., 2002). Com base nisto, o tratamento com antibióticos é uma opção viável, particularmente nos casos de doença de Crohn (Greenberg, 2004), no entanto, os antibióticos apresentam papel gerenciador das complicações das DII, pois seu longo tempo de uso é desfavorável devido ao risco de toxicidade, resistência bacteriana e conseqüente superpovoamento de bactérias aderentes (Shanahan, 2004).

A manipulação da microbiota intestinal tem-se mostrado como uma estratégia importante na manutenção da homeostase colônica (Guarner, 2003), visto que a modificação adequada do ecossistema intestinal tem sido considerada uma terapia viável e oportuna para o tratamento das DII (Shanahan, 2004). A suplementação com alimentos funcionais tem sido considerada uma estratégia simples para a modulação da composição e/ou atividade da microbiota colônica (Ziemer e col., 1998). Alimentos funcionais são definidos como alimentos ou ingrediente(s) alimentar(es) que apresentam efeitos positivos em um ou mais alvos funcionais do organismo (Diplock e cols., 1999), além do seu valor nutricional, promovendo saúde ou bem-estar do hospedeiro (Huggett & Verschuren, 1996) e/ou redução de risco de doenças quando consumidos (Diplock e cols., 1999; Roberfroid, 2000). O conceito de alimento funcional engloba diretamente aditivos alimentares que podem inserir um efeito positivo na composição microbiana intestinal, como os probióticos, prebióticos e simbióticos (Ziemer e col., 1998).

Probióticos são definidos como organismos vivos adicionados em alimentos os quais, após a ingestão, promovem a saúde no hospedeiro além de sua nutrição básica inerte (Fuller, 1992 e 1997). A ingestão de bactérias vivas não é um requerimento absoluto para a eficácia terapêutica, pois estudos comprovam que a inclusão de microorganismos mortos ou até mesmo fragmentos bacterianos (Ziemer e col., 1998) contribuem com os efeitos antiinflamatórios dos probióticos (Shanahan, 2005). Outros efeitos benéficos dos probióticos no epitélio intestinal, tanto direta como indiretamente, incluem aumento da função da barreira epitelial, alteração na composição da microflora intestinal (Ewaschuk, 2006), modulação do sistema imune da mucosa no hospedeiro frente a diversos tipos de agentes infecciosos e a produção de substâncias de inativação de toxinas alimentares (Isolauri e cols., 2004).

Estudos reportam que a administração da mistura das espécies *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Venturi e cols., 1999) ou de *Escherichia coli* Nissle 1917 não-patogênica (Rembacken e cols., 1999) agem prevenindo a colonização do intestino por microorganismos patogênicos, prolongando a remissão da colite ulcerativa (Boudeau

e cols., 2003; Shiba e cols., 2003; Setoyama e cols., 2003). Inúmeros probióticos já estudados exercem uma atividade antiinflamatória intestinal, tanto em humanos como em modelos de colite experimental, destacando-se os efeitos produzidos por bactérias do gênero *Lactobacillus*, especialmente *L. casei* GG (Borrueel e cols., 2002), *L. bulgaricus* (Borrueel e cols., 2002), *L. salivarius* ssp. *salivarius* (Peran e cols., 2005), *L. fermentum* (Peran e cols., 2007), *L. plantarum* (Pathmakanthan e cols., 2004), *L. rhamnosus* (Braat e cols., 2004), *L. acidophilus* (Schultz e cols., 2004) e do gênero *Bifidobacterium*, como *B. longum* (Fujiwara e cols., 2003) e *B. lactis* (Schultz e cols., 2004).

Os Prébióticos são definidos como “ingredientes alimentares não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou limitado número de bactérias no cólon e assim promove saúde do hospedeiro” (Gibson & Roberfroid, 1995). O consumo de produtos alimentares ricos em carboidrato e polissacarídeos não-digeríveis, como fibras dietárias, aumenta a fermentação anaeróbica de bactérias colônicas. Fibras dietárias são definidas como partes de plantas ou análogos de carboidratos resistentes à digestão e absorção pelo intestino delgado e que sofrem fermentação completa ou parcial por bactérias do intestino grosso. Nesse grupo estão incluídos o amido resistente, vários oligossacarídeos, como inulina e frutooligosacarídeos, dissacarídeos, como a lactulose, e polissacarídeos componentes da parede celular vegetal, como ligninas (Almeida, 2003), celulose, β -glicanos, hemicelulose e pectinas (Escudero-Álvarez, 2006). Os efeitos fisiológicos benéficos das fibras dietárias são descritos como laxativos, redutores dos níveis séricos de colesterol e/ou de glicose, e efeito prebiótico, estimulando o crescimento de bactérias colônicas potencialmente protetoras, como Bifidobactérias e Lactobacilos (Gibson & Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1998), e produção de metabólitos da fermentação colônica, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Cherbut, 2002).

O interesse por certos tipos de fibras presentes em alimentos com efeitos prebióticos tem crescido, pois o produto da sua fermentação estimula o crescimento de certas bactérias intestinais (Garcia Peris e cols., 2002). O uso de fibras dietárias presentes em sementes de *Plantago ovata* Forssk (tanchagem) e em fibra de cevada germinada, têm demonstrado eficácia para o tratamento da DII. Em pacientes com colite ulcerativa, a ingestão de sementes de *Plantago ovata*, quando comparadas ao uso de mesalazina, apresentou maior eficácia na manutenção da remissão da doença (Fernández-Bañares e cols., 1999). Em pacientes com a DII ativa, o uso desta fibra juntamente com o ácido 5-aminosalicílico, promoveu maior tempo de remissão da doença (Kanauchi e cols., 2002).

Os AGCC, o acetato, o propionato e o butirato, podem atuar de forma direta, ou indireta sobre o cólon, modificando o pH e diminuindo atividade da iNOS (óxido nítrico sintetase indutiva) e ao baixo nível de TNF- α no cólon (Rodríguez-Cabezas e cols.,

2002). Dos AGCC produzidos, o butirato apresenta papel central na regulação de várias atividades das células epiteliais do cólon (Inan e cols., 2000). O butirato serve como fonte primária direta de energia aos colonócitos (Mortensen & Clausen, 1996), promovendo a diferenciação e estimulando a produção de muco na mucosa intestinal, formação de bicarbonatos e absorção iônica (Hague e cols., 1997; Barnard e cols., 1993; Hodin e cols., 1996). O butirato pode influenciar na expressão de genes ativadores de citocinas em colonócitos epiteliais, como exemplo a diminuição da expressão de receptores para IL-12 em leucócitos ativados (Saemann e cols., 2000) e assim apresentar papel supressor na inflamação mucosal. Outras evidências como aumento na concentração de GSH colônico (Hamer, 2009), inibição na produção das citocinas pró-inflamatórias NF- κ B, TNF- α (Inan e cols., 2000) e IL-12 e aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Saemann e cols., 2000) indicam que o butirato auxilia na redução da inflamação intestinal. A diminuição na disponibilidade do butirato e de outros ácidos graxos de cadeia curta tem sido associada a diverticulite e a colite ulcerativa (Harig e cols., 1989; Chapman e cols., 1994; Clauser e cols., 1994).

O uso de butirato administrados na forma de enemas e supositórios, são efetivos para o tratamento de danos na mucosa causados pela DII (Vernia e cols., 1995), no entanto, este tratamento só é eficaz nas lesões das porções descendentes do intestino, no cólon e reto (Kanauchi e cols., 1999). A administração por via oral não é eficaz, pois o butirato é absorvido no intestino delgado (Bamba e cols., 2002), não alcançando a parede intestinal do cólon (Kanauchi e cols., 1999).

Simbióticos são produtos contendo probióticos e prebióticos (Bengmark, 2001). Todo probiótico e prebiótico apresentam propriedades distintas, com seu modo de ação através da modulação na microbiota (Damaskos e Kolios, 2008). Várias combinações de probióticos e prebióticos já foram estudadas. Roller e cols. (2004) demonstraram que a combinação de oligofrutose, inulina, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* suprimem a carcinogênese colônica, enquanto que a mesma mistura estimula a secreção de IgA e IL-10 no ceco. Furrie e cols. (2005), em triagem clínica com 18 pacientes de colite ulcerativa, demonstrou que a combinação de *B. longum*, inulina e oligofrutose reduz o escore inflamatório de biópsias retais e sigmóides, com a redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β .

A abordagem de estudos no tratamento da DII usando alimentos funcionais com presença de fibras que podem conferir efeitos prebióticos tem se tornado de grande interesse, pois alimentos com fibras não-digeríveis afetam o hospedeiro de forma benéfica estimulando seletivamente o desenvolvimento e/ou a atividade de determinadas bactérias no cólon (Gibson e Roberfroid, 1995) e, sua fermentação pela microbiota colônica, gerando os AGCC que atuando de forma direta (trófica), ou indireta, modificando o pH e modulando o sistema imune nas células do cólon, podendo assim

controlar os processos da inflamação intestinal, diarreia e até mesmo o câncer de cólon (Marti del Moral e cols., 2003).

3. *Typha angustifolia* L. como produto-teste

A espécie *Typha angustifolia* L. (sin. *T. domingensis* Pers., *T. foveolata* Pobed., *T. pontica* Klok. f & A. Krasnova) é conhecida no Brasil como planta daninha, pois crescem em áreas de culturas de grande importância econômica e em regiões alagadiças. De acordo com Kinupp (2007), todas as partes da planta, partes aéreas, brotos ou palmitos, rizoma e pólen, apresentam interesse alimentício para o consumo humano. A espécie pode produzir até 7 toneladas por hectare de rizomas (Lorenzi, 2000), chegando até 22% do seu peso fresco em farinha (Rapoport, 2003 *apud* Kinupp, 2007). São consumidos como alimento na Austrália (Reitz, 1984b *apud* Kinupp, 2007) e também por Ameríndios Chilenos (Schmeda-Hirschmann, 1999). Análises da biomassa nutricional do rizoma indicam que são fontes ricas de amido (Lorenzi, 2000), alto conteúdo de fibras (17.20%) (Schmeda-Hirschmann, 1999), com 2.6% de proteína, 10.8% de carboidratos solúveis, 0.06% de taninos solúveis, 11.9% de lipídeos, 41.5% fração de parede celular e 16.9% de conteúdo energético em relação ao peso seco (Furtado, 1997). Foi descrito a presença de taninos e saponinas em extratos de rizoma, assim como alto conteúdo de celulose, que pode propiciar efeito laxante mecânico (Bela e col. 2000). Estudos mostram que as folhas de *T. angustifolia* L. possuem 11.25% de glutamina (semelhante a alfafa) e 4.85% de glicina (semelhante a alfafa e pasta de soja), além de fibras como 24.43% de celulose, 28.84% de hemicelulose e 7.46% de lignina (Carranco e cols., 2002). Ambos os aminoácidos, juntamente com a cisteína (Duggan, e cols., 2002), atuam como precursores da síntese de glutathione (Grimble, 1992; Duggan, e cols., 2002). Muitos estudos referem que as espécies de *Typha* apresentam potencial medicinal para diversas enfermidades na medicina popular. Na Tailândia, há citações do uso das raízes de *T. angustifolia* L. para o tratamento de diabetes (Kitirattrakarn, 2005), enquanto que grupos nativos da América usam o pólen e rizomas de *T. latifolia* L. no tratamento de distúrbios dermatológicos e gastrointestinais (Acuña, 2006), em forma de geléias para o tratamento de feridas, inflamações e queimaduras, e os infusos de raízes para tratar disenterias e diarreia (Foster & Duke, 2000).

Objetivos

Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do uso da farinha do rizoma de *T. angustifolia* L., como suplemento na dieta, no processo inflamatório intestinal induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, assim como determinar a influência desta dieta sobre os efeitos antiinflamatórios intestinais da prednisolona.

Materiais e Métodos

1. Material Vegetal

1.1. Descrição Botânica e coleta

A espécie *Typha angustifolia* L. pertence à família Typhaceae, conhecida por outras sinonímias como *T. domingensis* Pers., *T. foveolata* Pobed. ou *T. pontica* Klok. f & A. Krasnova e é classificada no Brasil como uma planta daninha (Lorenzi, 2000). É uma espécie cosmopolita, de ocorrência estendendo-se por todo continente Americano, em locais alagadiços, de brejo e em torno de corpos d'água. A *T. angustifolia* L. possui habito herbáceo, perene, ereta, rizomatosa, aquática, de caule cilíndrico, com 2-3m de altura. Propaga-se por sementes e vegetativamente através de rizomas. É conhecida popularmente como taboa, tábua, espadana, capim-de-esteira, pau-de-lagoa, tabebuia ou erva-de-esteira (Lorenzi, 2000) (Figura 1).

As partes férteis de *T. angustifolia* L. foram coletadas em Setembro de 2009 no Distrito de Rubião Jr, Botucatu, SP e foram levadas para identificação e depositadas no Herbário "Irina Delanova Gmtchujnicon - BOTU" de Botucatu, SP, Brasil.

Os rizomas de *T. angustifolia* L. foram coletados no mesmo período das partes férteis usadas na identificação. Os mesmos foram higienizados e estocados em câmara fria até o processamento.



Figura 1 - Foto de *Typha angustifolia* L. da área de coleta; Distrito de Rubião Junior, Botucatu, SP.

1.2. Elaboração da farinha do rizoma de Taboa (*Typha angustifolia*)

Os rizomas foram cortados e secados em estufa com circulação de ar a 55^oC. Após, o material foi triturado em moinho de facas e armazenado para posterior utilização. O rendimento final da farinha de *T. angustifolia* L. foi de 11% em relação ao peso fresco do material vegetal.

1.3. Preparo do extrato vegetal bruto:

A farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. foi submetido ao método de extração por maceração a frio, na proporção de 5% (p/v) em solução de etanol:água destilada (7:3). A seguir, o extrato foi filtrado e a porção etanólica do extrato foi eliminado em Evaporador Rotativo 120MA Marconi® sob pressão reduzida e temperatura controlada em torno de 45^oC e aquecido sobre placa quente para eliminar a porção aquosa. O rendimento final do extrato foi de 2.8% em relação ao peso fresco do material vegetal.

1.4. Preparo da ração enriquecida com a farinha do rizoma de *T. angustifolia* L.

Três tipos de dieta foram suplementadas com 5%, 10% e 20% de farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. (FRT), usando a ração Labina (Purina® do Brasil) como base, para a realização dos ensaios biológicos (tabela1).

Tabela 1 – Composição da dieta padrão “Labina” (Purina do Brasil) na alimentação dos animais.

Enriquecimento (por 1 quilograma de ração) *				
Composição Nutricional	Ração Normal	Ração com FRT 5%	Ração com FRT 10%	Ração com FRT 20%
Umidade (máx.)	13%	13%	13%	13%
Proteína Bruta (min.)	23%	21.8%	20.7%	18.4%
Extrato etéreo (min.)	4%	3.8%	3.6%	3.2%
Matéria fibrosa (máx.)	5%	4.75%	4.5%	4%
Matéria mineral (máx.)	10%	9.5%	9%	8%
Cálcio (máx.)	1.3%	1.23%	1.17%	1.04%
Fósforo (min.)	0.85%	0.8%	0.76%	0.68%
Vitamina A	25600 UI	25600 UI	25600 UI	25600 UI
Vitamina D3	4000 UI	4000 UI	4000 UI	4000 UI

Vitamina E	82 mg	82 mg	82 mg	82 mg
Vitamina K	6.4 mg	6.4 mg	6.4 mg	6.4 mg
Vitamina B12	40 µg	40 µg	40 µg	40 µg
Vitamina B6	11 mg	11 mg	11 mg	11 mg
Sódio	2.8 g	2.8 g	2.8 g	2.8 g
Niacina	220 mg	220 mg	220 mg	220 mg
Tiamina	11 mg	11 mg	11 mg	11 mg
Ácido Pantotênico	90 mg	90 mg	90 mg	90 mg
Colina	2800 mg	2800 mg	2800 mg	2800 mg
Biotina	0.16 mg	0.16 mg	0.16 mg	0.16 mg
Ácido Fólico	13 mg	13 mg	13 mg	13 mg
Magnésio	1.7 g	1.7 g	1.7 g	1.7 g
Manganês	110 mg	110 mg	110 mg	110 mg
Iodo	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
Selênio	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg
Cobalto	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg
Ferro	180 mg	180 mg	180 mg	180 mg
Zinco	110 mg	110 mg	110 mg	110 mg
Cobre	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg
FRT	---	50 g	100 g	200 g

*Composição Básica: Milho, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de peixe, remoído de trigo, soja integral moída, fosfato bicalcico, feno de alfafa, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), cloreto de colina, premix vitamínico mineral, aditivo antifúngico fungistático.

2. Ensaio *in vitro*

2.1. Peroxidação lipídica em membrana de cérebro de rato

O extrato do rizoma de *T. angustifolia* foi avaliado quanto a sua atividade antioxidante no modelo de inibição da lipoperoxidação induzida por solução de sulfato férrico e ácido ascórbico (100 µM) em membranas de cérebro de rato, adaptado à partir de Stocks e col, 1974 e Fee & Teitelbaum, 1972. Curva de concentração-resposta foi determinada neste modelo e o resultado foi comparado com a quercetina, flavonóide usado como referência.

A técnica se baseia na produção de malonildialdeído (MDA) como indicativo de lipoperoxidação, utilizando o ácido tricloroacético (TCA 20%), para precipitar proteínas da amostra de membranas, e o reativo tiobarbitúrico (TBAR) que reage com o as membranas, produzindo MDA numa coloração cuja intensidade é determinada por espectrofotometria, mediante uma curva-padrão. Cérebros de ratos normais foram

pesados e triturados separadamente com homogeneizador automático, em gelo, com tampão fosfato sódico (PBS) na proporção 1:4 (p/v). O homogenato foi submetido à centrifugação 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). O extrato bruto foi dissolvido em dimetilssulfóxido (DMSO) a 20% na concentração de 3.2 mg/mL e foi realizada a diluição seriada na razão de ½ até 6 concentrações para a realização do ensaio. A reação de lipoperoxidação foi realizada em tubos do tipo *ependorf* de 2 mL. Os tubos testes foram: Tubo de reação branco com incubação, tubo de reação branco sem incubação, tubo de reação controle incubado (DMSO20%, solvente usado para solubilizar os extratos), tubo de reação controle não incubado, tubo de reação controle máximo (tecido, sulfato férrico e ácido ascórbico) e tubos testes (com as concentrações de 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1200 e 1400 µg/mL do extrato em soluções estoques e outros com concentrações de 2.5, 5, 10, 20 e 40µg/mL de quercetina em soluções estoques) e máximo (tecido, ferro e ácido ascórbico). Para cada amostra foi adicionado 50µL de solução de ferro (SO₄Fe·H₂O) e ácido ascórbico, ambos para provocar a lipoperoxidação. Os tubos foram incubados a 37°C por 12 minutos sob agitação constante e, a seguir, adicionou 0.5 mL do TBAR 0,5% em TCA 20%. Os tubos foram fechados e postos novamente sob aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos sem agitação. Após, alíquotas de 1mL foram colocadas em tubos de 1.5 mL (tubos "ependorf") e colocados para centrifugar a 3000rpm, por 15 minutos a 4°C. Foram retirados 200µL do sobrenadante e adicionado nas placas de 96 poços, onde foi realizada leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 532nm. O cálculo da porcentagem de inibição da produção de malonildialdeído foi calculado em relação aos valores obtidos com as amostras de lipoperoxidação máxima (cérebro, ferro e ácido ascórbico a 100µM) e a IC₅₀ determinada por regressão.

3. Ensaio *in vivo*

3.1. Animais de experimentação

Ratos machos albinos da Cepa Wistar de 180 a 220 g de peso, oriundos do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo foram utilizados para os testes de atividade antiinflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos 14 dias antes do início dos experimentos. O biotério possui uma temperatura ambiente controlada de 21 ± 2°C e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos foram alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo 4 animais por caixa e água corrente *ad*

libitum. Os grupos branco, controle e com o fármaco foram alimentados com ração de manutenção Purina Labina e os grupos que receberam a FRT a tiveram incluídas na mesma ração recebida pelos grupos anteriores. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental 042/04-CEEA/IBB/UNESP aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

3.2. Modelo experimental de inflamação intestinal

A indução da colite foi realizada pelo método descrito por Morris e cols., 1989, com pequenas modificações. Após os primeiros 14 dias de tratamento, os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados com halotano. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25 ml de uma solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição supina desde o momento da instilação do halotano 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. Delineamento experimental

O delineamento experimental para a análise dos efeitos da FRT na dieta para o modelo de colite experimental foi realizado de acordo com o delineamento descrito por Camuesco e cols., (2005), esquematizado na figura 1. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dez grupos experimentais:

- A. grupo branco,
- B. grupo controle (com colite),
- C. grupo referência (prednisolona na dose de 2mg/Kg),
- D. grupo dieta na dose de 20% (FRT20%),
- E. grupo tratado com FRT nas doses de 5% (TNBS+FRT 5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20%(TNBS+FRT20%) e;
- F. grupo tratados com FRT, nas doses de 5%, 10% e 20% e prednisolona na dose de 2mg/Kg (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED)

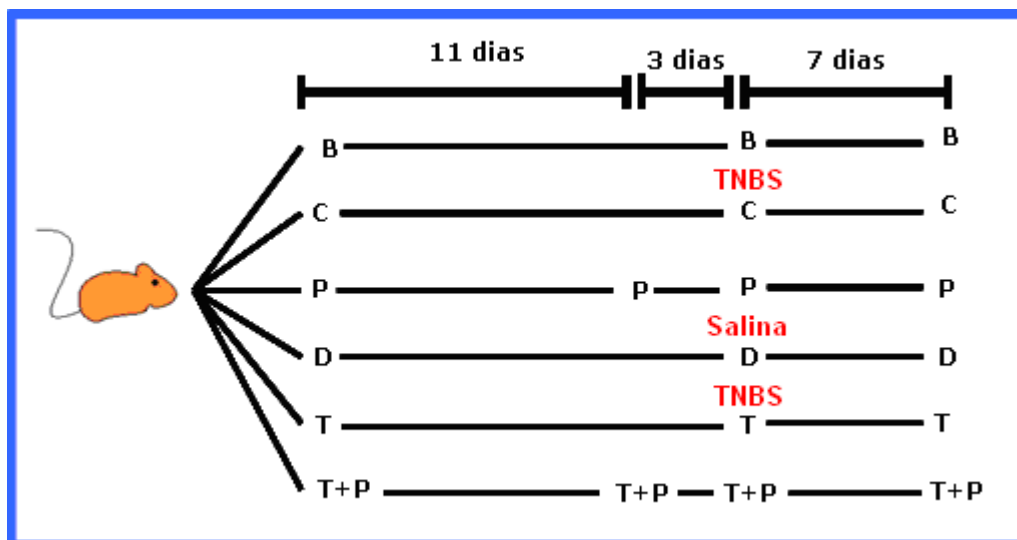


Figura 2 – Delineamento experimental de colite. B (grupo branco, rato sem colite), C (grupo controle TNBS, rato colítico), P (grupo referência, rato colítico tratado com prednisolona), D (grupo dieta, rato sem colite tratado com FRT 20%), T (grupo tratado, ratos colíticos tratados com FRT em diferentes doses), T+P (grupo associado, grupo colítico tratado com FRT em diferentes doses e prednisolona).

Os animais dos grupos tratados com a FRT e do grupo dieta receberam a ração suplementada nos 21 dias do experimento *ad libitum*, enquanto que os grupos branco, controle (TNBS) e referência receberam a ração normal nos 21 dias do experimento *ad libitum*. Os grupos tratados com prednisolona receberam 2mg/Kg, por via oral, a partir de 72 horas antes da indução e nos sete dias restantes do experimento, através de uma sonda esofágica. Todos os animais foram mortos no sétimo dia após a indução.

3.4. Avaliação macroscópica dos cólons

Durante o desenvolvimento do experimento, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarréicas. No final de cada período de tratamento, os animais foram sacrificados, os cólons extraídos, limpidos com solução salina 0.9% (NaCl) e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos. Os conteúdos luminiais foram coletados para posterior análise microbiológica.

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

extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell e cols., 1995 (Tabela 2).

Tabela 2. Critério de determinação de escore macroscópico de lesão colônica.

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 centímetro adicional)

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 1 fragmento transversal e 3 fragmentos longitudinais, o fragmento transversal foi utilizado para análises microscópicas, enquanto que dos fragmentos longitudinais dois foram utilizados para determinação de proteínas e fosfatase alcalina e de mieloperoxidase, e um fragmento foi armazenado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase (Anderson, 1985) para a determinação dos níveis de glutathione total. Todos os fragmentos foram pesados e congelados até sua posterior análise.

3.5. Avaliação microscópica de amostras de cólon

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico, um fragmento transversal de tecido colônico (0,5 mm) adjacente à área de lesão (aproximadamente 1 cm acima da lesão) foram coletadas para processamento histológico. Essas amostras foram fixadas em solução ALFAC (mistura de Etanol 80% com Ác. Acético Glacial e Formaldeído P.A. na proporção de 90:5:10) por 24 horas sendo em seguida desidratadas em série alcoólica etílica crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609), preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6 micrômetros de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando série alcoólica etílica decrescente. As amostras foram submetidas à coloração em Hematoxilina-Eosina para a análise morfológica das lesões e análise da

severidade e extensão do prejuízo tecidual de acordo com uma escala descrita previamente por Stucchi e cols. (2000) (Tabela 3).

Tabela 3 - Critério de Determinação de Escore Microscópico de Lesão Colônica

Localização	Critérios
Mucosa epitelial	Ulceração: nenhuma(0); superficial(1); moderada(2); severa(3)
Criptas	Atividade Mitótica: abaixo de um terço(0); próximo a um terço(1); entre um terço(2); acima de um terço(3). Depleção de muco: nenhuma(0); suave(1); moderado(2); severo(3)
Lamina Própria	Infiltrado Mononuclear: nenhuma(0); suave(1); moderado(2); severo(3) Infiltrado Granulócitos: nenhuma(0); suave(1); moderado(2); severo(3) Vascularização: nenhuma(0); suave(1); moderado(2); severo(3)
Submucosa	Infiltrado Mononuclear: nenhuma(0); suave(1); moderado(2); severo(3) Infiltrado Granulócitos: nenhuma(0); suave(1); moderado(2); severo(3) Edema: nenhuma(0); suave(1); moderada(2); severa(3)
Escore Máximo: 27. Modificado de Stucchi e cols., 2000.	

3.6. Determinações bioquímicas

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas com homogeneizados dos fragmentos intestinais colônicos, processados 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.

3.6.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido colônico de rato foi realizada pelo método de Krawisz e cols., 1984. A atividade da MPO é utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

A determinação foi realizada em fragmentos colônicos (150-300 mg), os quais após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo protegidos com Parafilm e picados com tesouras e foram homigenizados a frio com tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) na proporção 1:20 (p/v), usando o

homogeneizador Heidoph, durante 30 segundos. O tampão HTAB, ao funcionar como um detergente, facilita o rompimento das membranas celulares e assim a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, nos quais está armazenada. O homogeneizado resultante foi dividido em 2 alíquotas de 1,0 ml e armazenadas em *ependorff*. O material foi sonicado por 10 segundos e submetido a um triplo processo de congelamento-descongelamento durante 1-2 dias. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 7000 G por 10 minutos a 4°C. Em uma placa de 96 canais, foi adicionado 50 µl do sobrenadante de cada amostra em pocinhos distintos, 150 µl do tampão de reação (cloridrato de orto-dianisidina). Em seguida, foi realizada leitura com absorvância a 450 nm usando um espectrofotômetro, incubados a 37°C. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de mieloperoxidase (U) se considera como aquela que degrada 1 nmol/min de peróxido de hidrogênio a 37°C. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

3.6.2. Determinação do conteúdo de glutatona total (GSH)

A determinação do conteúdo de glutatona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson, 1985, que está baseado na oxidação total da glutatona 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. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutatona redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo (Figura 2), no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu consequente incremento de absorvância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutatona (GSH+GSSG).

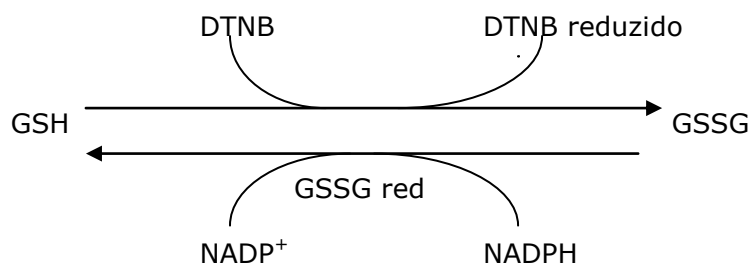


Figura 3 - Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutatona total nas amostras de cólon

Para efetuar a determinação do conteúdo de glutathiona total, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA) a 5%. As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesoura sobre uma placa de Petri com gelo protegidos por Parafilm e posteriormente homogeneizadas com solução de TCA 5% na proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador Heidoph. Após a homogeneização, o material foi centrifugado duas vezes, a primeira a 2000 G por 10 minutos a 4°C e a segunda, com o sobrenadante da primeira centrifugação, a 9000 G por 5 minutos a 4°C. Do segundo sobrenadante, 20 µl de cada amostra foram colocados em uma placa de 96 canais, onde juntamente se adicionou 140 µl de NADPH, 5 µl de tampão PBS-EDTA (fosfato-sódico a 143 mM com 6.3 mM de EDTA-Na) e 20 µl DTNB. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 5 minutos em uma temperatura de 30°C. Após incubação, 15 µl de enzima glutathiona redutase foram adicionado e o incremento de absorbância a 412 nm foi registrado no espectrofotômetro, em leitura cinética (10 leituras a cada 20 segundos). A concentração de glutathiona foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com GSH e os resultados expressos como nmol/g de tecido.

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

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foram realizadas pelos métodos clássicos descritos por Bradford, 1976 e Bessey e cols., 1946. As amostras de cólon foram picadas e homogenizadas em homogeneizador Heidoph com tampão glicina (50mM com 0.5mM de MgCl₂) na proporção 1:10 (p/v). Um ml do material foi colocado em tubo *ependorf* e centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. Para a determinação de proteínas, foram colocados 4 µl da amostra centrifugada em placa de 96 poços e acrescentado 200 µl do reativo do ácido bicinchonínico. A placa foi incubada a 37°C por 25 minutos quando então foi lida a 562 nm. Para a avaliação da atividade da fosfatase alcalina, foram colocados 5 µl de cada amostra nos poçinhos da placa, adicionados 25 µl de água e 50 µl do reativo de coloração (4-nitrofenilfosfato bis 5.5mM em tampão glicina). A placa foi incubada por 25 minutos a 37°C e após foram adicionados 120 µl de NaOH 2N para interromper a reação. A leitura foi feita a 405 nm. O resultado da atividade da fosfatase alcalina foi expresso em mU/mg de proteína.

3.7. Análise Microbiológica

Amostras do conteúdo luminal foram pesadas e diluídas na proporção de 1:9 (p/v) em água salina a 0.85% esterilizada, homogenizadas e seriadamente diluídas em

razão de 10. Das séries de 10 diluições dos homogenizados, as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueados em meio Ágar Rogosa (MRS). As placas com o meio Agar Rogosa foram incubadas por 5 dias em estufa controlada com 5% de CO_2 a 35°C . Após o período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e reportadas em \log_{10} UFC por grama de material fecal.

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 e foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. Dados descontínuos foram analisados pelo teste χ^2 . Significância estatística foi considerada para valores a partir de $p < 0,05$. A análise estatística para avaliar a associação entre a droga e a dieta auxiliar foi realizada de acordo com metodologia descrita por Slinker, 1998.

5. Determinações fitoquímica qualitativas

A detecção de taninos e saponinas foi realizada à partir da farinha do rizoma, enquanto que a detecção de flavonóides e cumarinas foi realizada à partir da diluição de 4mg do extrato bruto em 1 mL de etanol 100%.

5.1. Caracterização de taninos

Em 20 mL de solução metanólica à 50% foi adicionado 1g do material seco e pulverizado, aquecendo-o por 5 minutos sob agitação constante. Após a filtração, 5 mL deste extrato foi colocado em um tubo de ensaio e adicionou-se 5mL de albumina sérica bovina a 1%. Um outro tubo de ensaio (controle) foi realizado adicionando-se 5 mL de solução metanólica a 50% com 5 mL de albumina. Devido ao caráter dos taninos de precipitarem proteínas, a presença de taninos foi verificada pela precipitação.

5.2. Caracterização de saponinas

Em 1g do material seco e pulverizado foi adicionado 20mL de água destilada, fervendo por alguns minutos. Após filtração do extrato, 5 mL foram colocados em tubo

de ensaio, fechados e agitados energeticamente. A formação de espuma persistente indica a presença de saponinas.

5.3. Caracterização de flavonóides

O extrato etanólico foi colocado em papel filtro com auxílio de um capilar formando uma mancha de aproximadamente 1.5cm de diâmetro. Uma gota de solução alcoólica de $AlCl_3$ foi adicionado sobre a mancha. A coloração esverdeada no ultravioleta a 365 nm caracteriza a presença de flavonóides.

5.4. Caracterização de cumarinas

O extrato etanólico foi colocado em papel filtro com auxílio de um capilar formando duas manchas de aproximadamente 1.5cm de diâmetro. Uma gota de solução alcoólica de KOH 1N foi adicionada sobre uma das manchas. Com auxílio de um cartão opaco, metade de cada mancha foi coberta e o conjunto exposto à luz ultravioleta a 365 nm por 2 a 3 minutos e em seguida as manchas foram descobertas. A modificação na fluorescência da mancha alcalinizada, ainda sob a luz ultravioleta, caracteriza a presença de cumarinas.

RESULTADOS

1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato

Quanto à avaliação da atividade antioxidante, o extrato de FRT apresentou concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da peroxidação lipídica com 116.14 ± 4.91 mg/mL (Figura 4), enquanto que a quercetina, substância de referência, apresentou IC₅₀ com 0.387 ± 0.02 mg/mL (Figura 5).

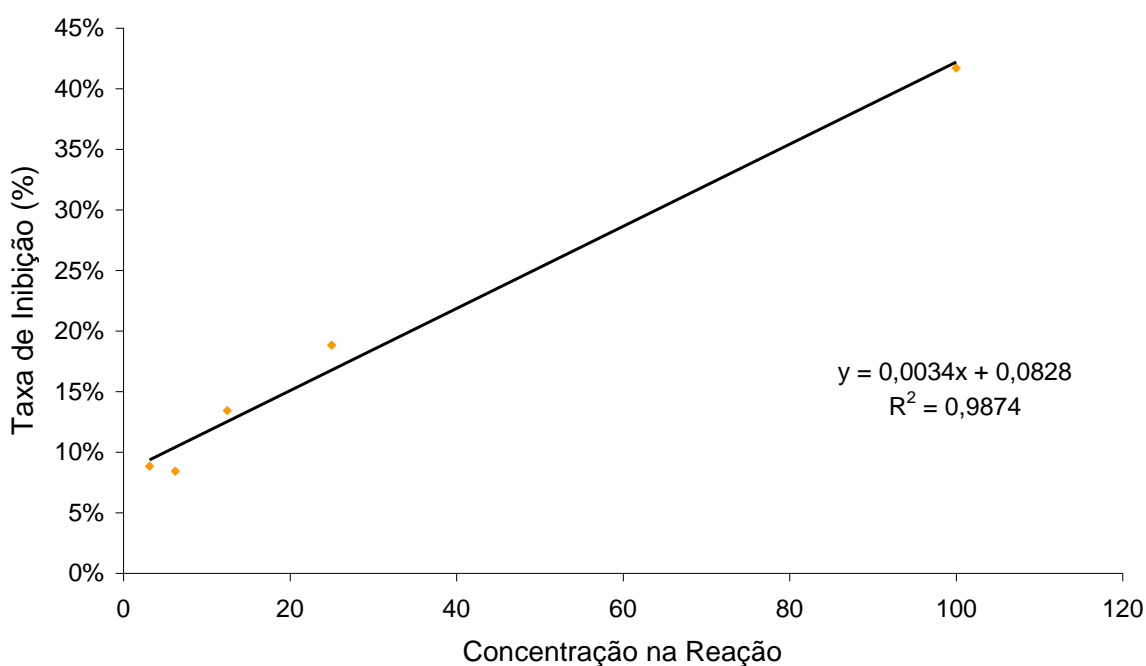


Figura 4 – Atividade antioxidante do extrato bruto etanólico 70% do rizoma de *Typha angustifolia* L. em ensaio de peroxidação lipídica em membrana de cérebro de rato pelo modelo de indução com sulfato ferroso e ácido ascórbico (Stocks e cols. (1974) e Fee & Teitelbaum (1972), com modificações).

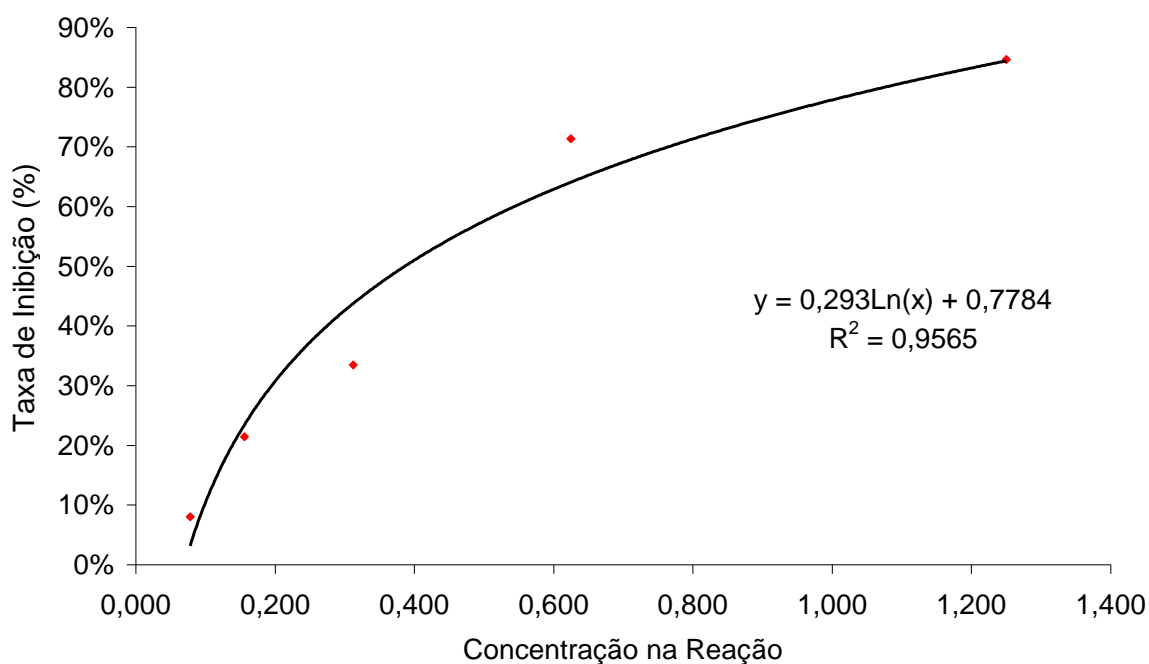


Figura 5 – Atividade antioxidante da quercetina em ensaio de peroxidação lipídica em membrana de cérebro de rato pelo modelo de indução com sulfato ferroso e ácido ascórbico (Stocks e cols. (1974) e Fee & Teitelbaum (1972), com modificações).

2. Avaliação dos efeitos da FRT e da associação da FRT com prednisolona no processo inflamatório intestinal e na dieta

2.1. Consumo alimentar e massa corporal

A administração intracolônica de TNBS resultou na perda de massa corpórea como consequência da redução no consumo de ração pelos animais. Nos animais colícticos, os grupos TNBS+FRT5% e TNBS+FRT10% apresentaram recuperação significativa da massa corpórea (Figura 6) observada no 1º dia e no 4º dia, após a indução, respectivamente, com restabelecimento do consumo de ração (Figura 7) de forma significativa a partir do 2º dia após a indução em ambos os tratamentos. Nos grupos de animais colícticos que receberam a suplementação de FRT na dieta, nas doses de 5% e 10%, associado com prednisolona (2mg/kg) (TNBS+FRT5%+ PRED e TNBS+FRT10%+PRED) apresentaram somente o restabelecimento do consumo de ração de forma significativa, evidenciada no 3º dia após a indução. Nos grupos restantes (TNBS+FRT20%, TNBS+FRT20%+PRED e TNBS+PRED) nenhuma diferença estatística foi observada.

Os animais do grupo dieta (FRT20%) foram similares ao grupo branco, sem alteração da massa corpórea (Figura 6) e do consumo de ração (Figura 7) ao longo dos dias de tratamento.

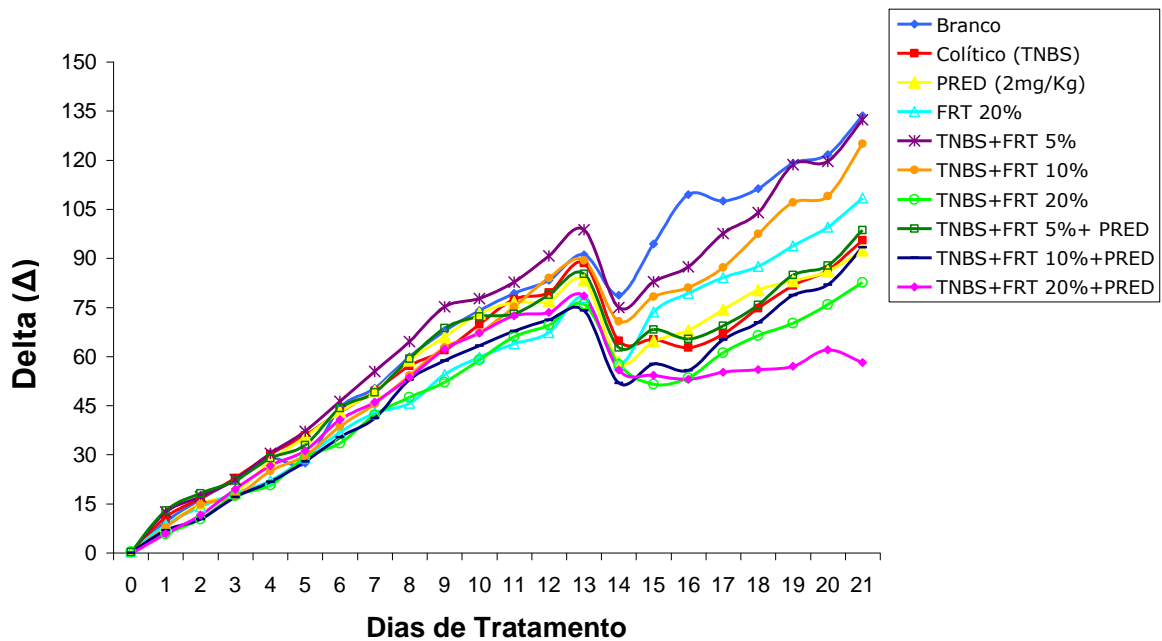


Figura 6 – Média da evolução da massa corpórea dos grupos tratados com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. nas doses de 5%, 10% e 20% e Prednisolona (2mg/Kg) e das associações entre os dois tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) durante os 21 dias do experimento. Os valores estão expressos em média do grupo \pm E.P.M.. O grupo branco difere com os valores de $P < 0.01$ comparado ao grupo controle.

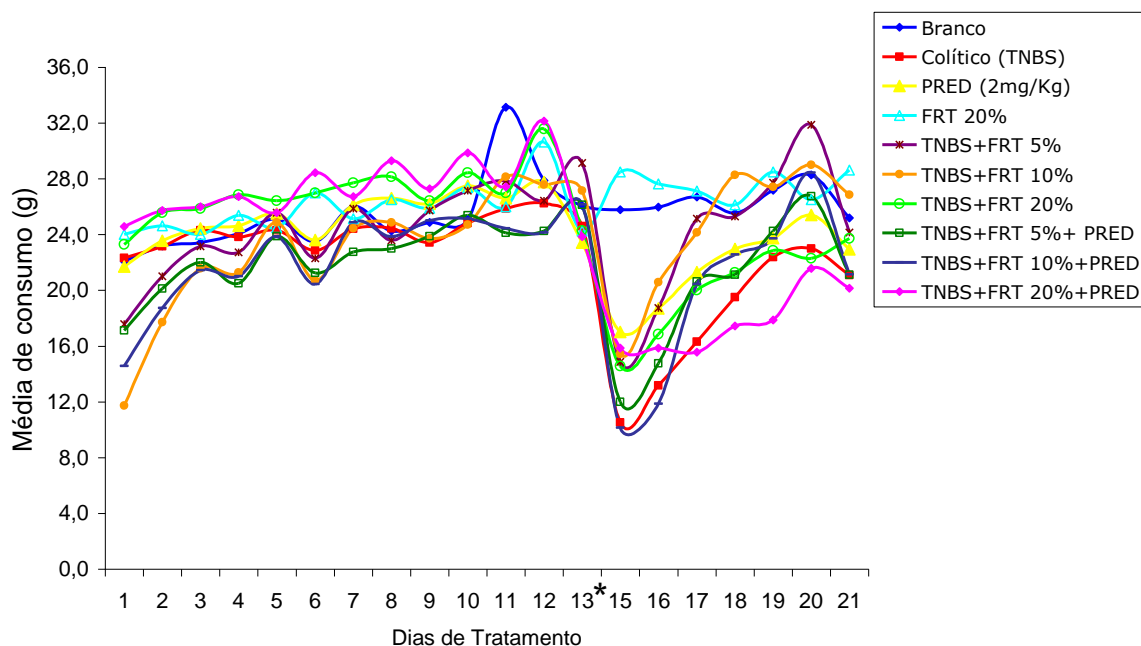


Figura 7 – Consumo médio diário de ração dos grupos tratados com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. nas doses de 5%, 10% e 20% e Prednisolona (2mg/Kg) e das associações entre os dois tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) durante os 21 dias do experimento. *O 14º dia os animais estavam de jejum e receberam a indução da colite. Os valores estão expressos em média do grupo \pm E.P.M. O grupo branco difere com os valores de $P < 0.01$ comparado ao grupo controle.

2.2. Avaliação dos parâmetros macroscópicos

A inflamação colônica induzida por TNBS foi evidenciada sete dias após a indução, caracterizada por lesão na mucosa intestinal afetando 2.57-3.29 cm ao longo do cólon, espessamento da parede intestinal evidenciada pelo aumento da relação peso/comprimento colônico (268.20 ± 41.19 mg/cm), escore inflamatório de 7 (range de 4-9), presença de aderências a órgãos adjacentes (Tabela 4) e ocorrência de diarreia.

O efeito antiinflamatório da suplementação com FRT foi evidenciado estatisticamente pela redução da lesão tecidual evidenciada nos grupos TNBS+FRT5% e TNBS+FRT10% (Tabela 4). A razão peso/comprimento colônico foi significativamente reduzida nos animais tratados com FRT nas doses de 5% e 10%, nos grupos com FRT nas doses de 5%, 10% e 20% associados com prednisolona e no grupo referência (Tabela 4). A redução do escore macroscópico foi evidenciada apenas nos grupos de animais tratados com FRT na dose de 10% (TNBS+FRT10%) e com o fármaco referência (TNBS+PRED). A incidência de aderência do cólon aos órgãos adjacentes, indicativo tanto de perfuração da parede intestinal como proliferação de tecido conectivo da parede intestinal foi ausente apenas no grupo tratado com FRT na dose de 10%

(TNBS+FRT10%). A incidência de diarreia ocorreu em todos os grupos, com 100% de frequência (dados não apresentados).

Os animais do grupo dieta (FRT20%) não apresentaram alterações na razão peso/comprimento do cólon e incidência de aderências à órgãos adjacentes (Tabela 4) ou diarreia, similares ao grupo branco.

Tabela 4 – Efeitos dos tratamentos com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. (TNBS+FRT5%, TNBS+FRT10% e TNBS+FRT20%) e da prednisolona (PRED; 2mg/Kg) e da associação entre os dois tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) no escore macroscópico, tamanho da lesão, na relação peso/comprimento colônico e na incidência de aderência na colite induzida por TNBS em ratos.

Grupos	Escore^a (0-10)	Lesão (cm)^b	Peso/Compr.^b (mg/cm)	Aderência (%)
Branco	0***	0**	110.91±5.01**	0**
Colítico (TNBS)	7(4-9)	2.97±0.36	268.20±4.19	56%
PRED (2mg/Kg)	6(0-8)*	1.79±0.32*	159.78±9.90**	30%
DIETA (FRT20%)	0***	0**	112.13±5.04**	0*
TNBS+FRT5%	6(1-7)	1.67±0.41*	156.66±16.76*	14.3%
TNBS+FRT10%	4(1-6)**	1.44±0.29**	169.24±6.11*	0*
TNBS+FRT20%	6(3-8)	2.17±0.36	204.74±22.80	71.4%
TNBS+FRT5%+PRED (2mg/Kg)	6(5-8)	3.03±0.55	187.41±22.16*	25%
TNBS+FRT10%+PRED (2mg/Kg)	6(3-7)	2.42±0.29	156.01±9.86*	42.8%
TNBS+FRT20%+PRED (2mg/Kg)	6(1-8)	2.41±0.68	258.04±63.76	57%

^a Dados de escore macroscópico expresso em mediana (intervalo) com teste Mann Whitney *U*-test, ^b lesão e razão peso-comprimento colônico expressos em média ± E.P.M com teste Kruskal-Wallis com *post-test*, * $P < 0,05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparados ao grupo controle.

2.3. Avaliação microscópica

Nos cortes histológicos, as amostras de cólons do grupo controle (TNBS) apresentaram alterações na citoarquitetura normal do cólon, como ulceração severa na mucosa do cólon e inflamação envolvendo as camadas da mucosa e submucosa (Figura 8B). As amostras foram caracterizadas com edema e depleção de muco severa, alta atividade mitótica intestinal e infiltração difusa de leucócitos, maioria composta por neutrófilos e em menores proporções de linfócitos, tanto na lâmina própria como na submucosa. A presença de vasos sanguíneos na lâmina própria foi suave, se concentrado mais na submucosa. A mediana (range) do escore microscópico para o grupo foi de 12 (8–20) (Tabela 5).

Os grupos de animais tratados com a FRT nas doses de 5%, 10% e 20% apresentaram preservação da citoarquitetura normal do cólon, com pequenas áreas de ulceração na mucosa, nas doses de 5% (Figura 8D) e 20% (Figura 8F), e processo de

cicatrização, na dose de 10% (Figura 8E). A formação de edema foi ausente para os tratamentos nas doses de 10% e 20%, enquanto que a depleção de muco foi ausente nas 3 doses (TNBS+FRT5%, TNBS+FRT10% e TNBS+FRT20%). O infiltrado de neutrófilos na mucosa foi suave no grupo FRT20%, enquanto que o de linfócitos foram suaves nos grupos TNBS+FRT10% e TNBS+FRT20%. A ausência de vasos foi observada apenas no grupo FRT10% e escore microscópico foi significativamente reduzido nos grupos FRT10% e FRT20% (Tabela 5).

As análises histológicas do cólon dos animais do grupo referência (TNBS+PRED) indicam regiões de cicatrização da mucosa (Figura 8C), edema na submucosa e depleção de muco suave e ausência de formação de vasos na lâmina própria.

Os grupos de animais tratados com a FRT associada a prednisolona apresentaram a citoarquitetura preservada e regiões de cicatrização nas doses de 10% (TNBS+FRT10%+PRED; Figura 9D) e 20%(TNBS+FRT20%+PRED; Figura 9E). O edema foi suave nos 3 grupos associados, com depleção de muco e atividade mitótica suave nas doses de 10% e 20%. O infiltrado de neutrófilos foi suave nas associações com doses de FRT a 5% (TNBS+FRT5%+PRED) e 10% e o de linfócitos foi suave apenas na associação com dose de FRT a 10%. A formação de vasos foi ausente em todos os grupos.

O grupo dieta mostrou a citoarquitetura do cólon normal, com ausência de edema, depleção de muco nas células caliciformes ou atividade mitótica nas criptas (Figura 10B). Apenas o infiltrado de neutrófilos foi suave, enquanto que o de linfócitos foi ausente, tanto na mucosa como na submucosa, sem a formação de vasos sanguíneos na lâmina própria.

Tabela 5 - Efeitos dos tratamentos com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. (TNBS+FRT5%, TNBS+FRT10% e TNBS+FRT20%) e da prednisolona (PRED; 2mg/Kg) e da associação entre os dois tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) no escore microscópico na colite induzida por TNBS em ratos.

Grupos	Escore Microscópico (0-10) ^a
Branco	0***
Colítico (TNBS)	12 (8-20)
PRED (2mg/Kg)	13 (6-16)
DIETA (FRT20%)	4 (0-6)**
TNBS+FRT5%	9 (3-21)
TNBS+FRT10%	6 (5-16)*
TNBS+FRT20%	7 (3-16)*
TNBS+FRT5%+PRED (2mg/Kg)	9 (3-20)
TNBS+FRT10%+PRED (2mg/Kg)	11 (2-17)
TNBS+FRT20%+PRED (2mg/Kg)	9 (5-13)

^a Dados de escore macroscópico expresso em mediana (intervalo) com teste Mann Whitney *U*-test, * P < 0,05 , **P < 0.01 e ***P < 0.001 comparados ao grupo controle.

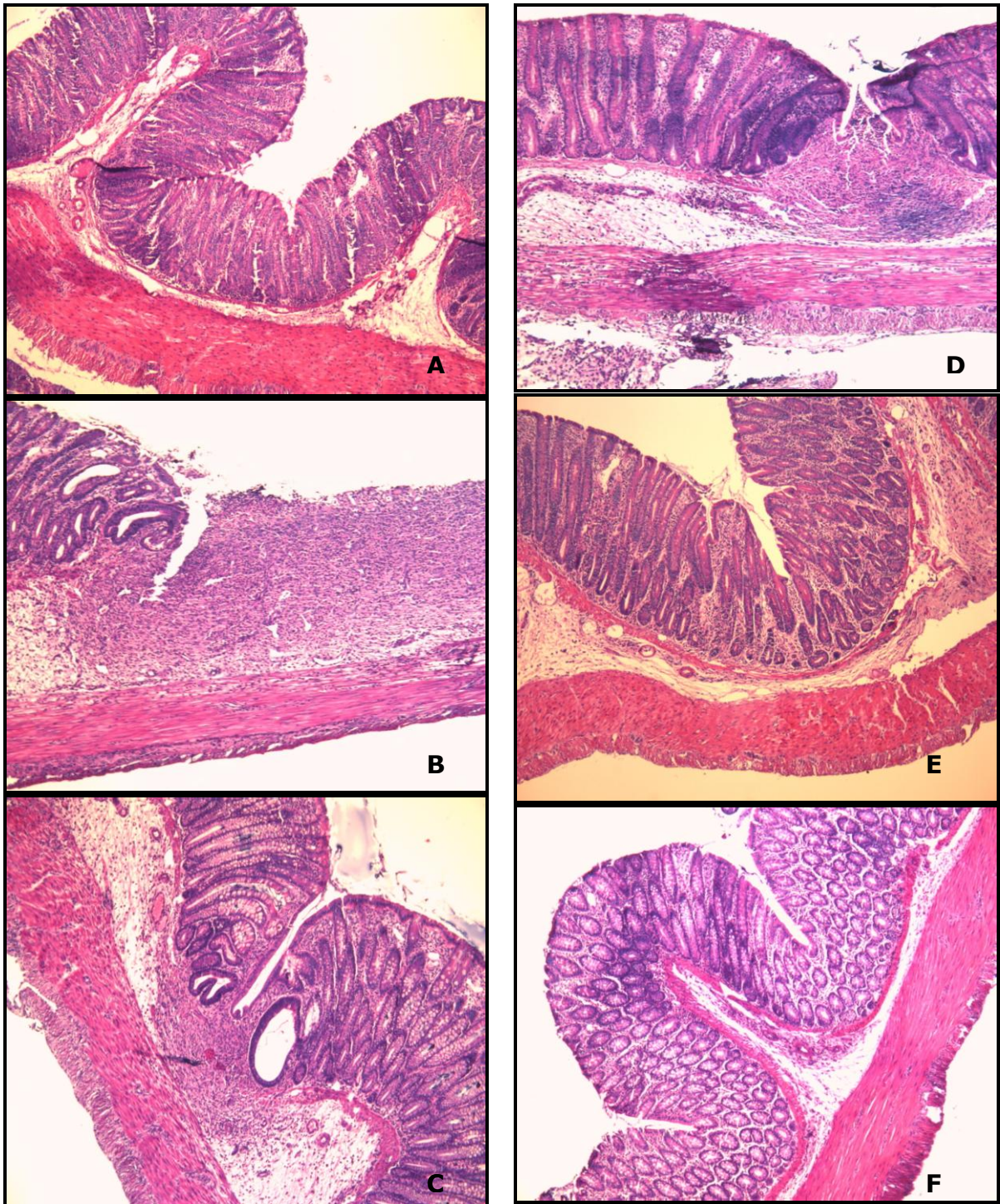


Figura 8 – Microfotografias histológica do tecido colônico dos grupos com os tratamentos isolados (material objetivado no aumento de x20): A - grupo branco; B - grupo controle (TNBS); C - Grupo referência (PRED; 2mg/kg)); D - Grupo colítico tratado com FRT a 5% (TNBS+FRT5%); E - Grupo colítico tratado com FRT a 10%(TNBS+FRT10%); F - Grupo colítico tratado com FRT a 20% (TNBS+FRT20%). Os cortes foram coradas com Heatoxilina-Eosina (HE).

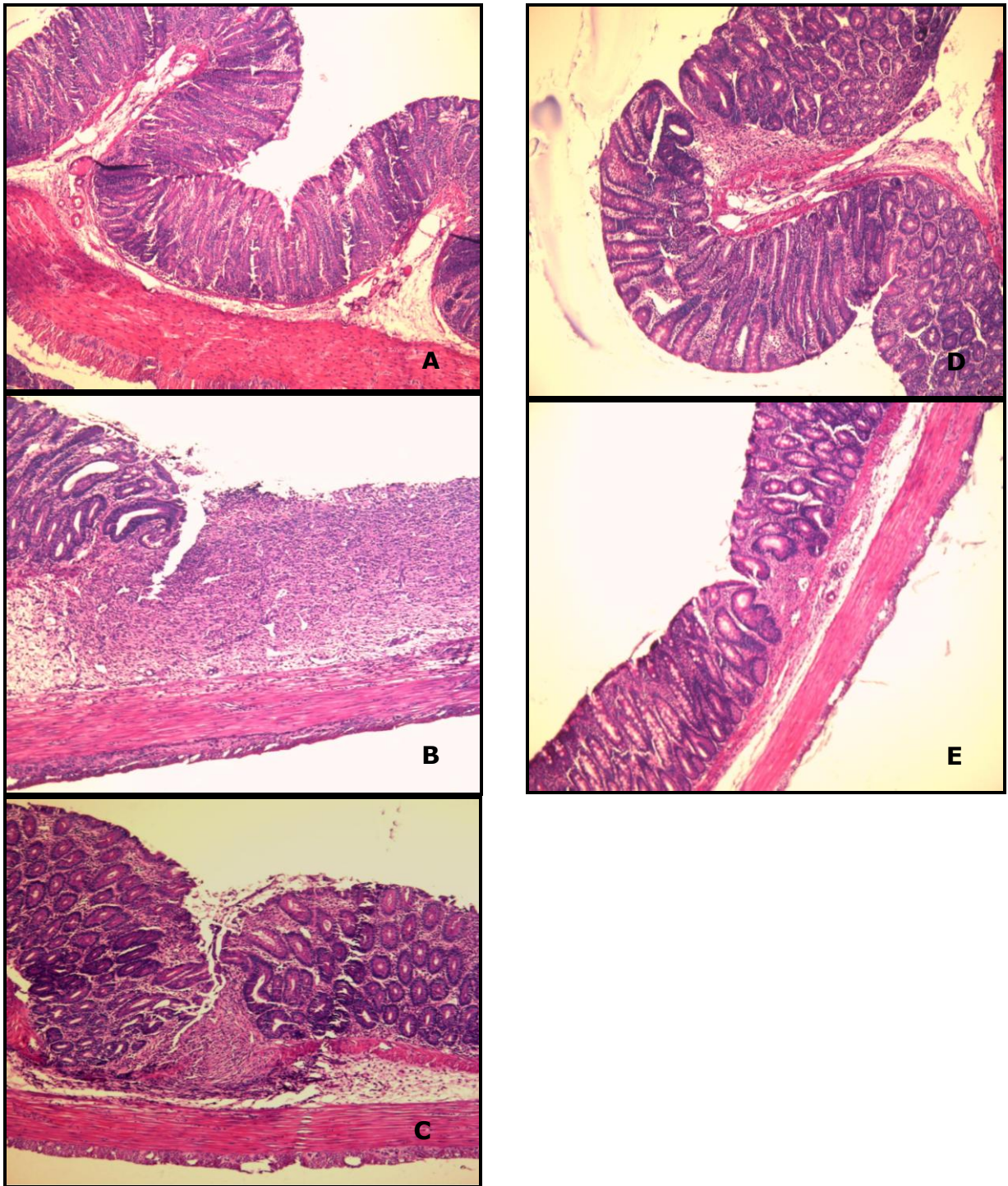


Figura 9 – Microfotografias histológica do tecido colônico dos grupos com os tratamentos associados (material objetivado no aumento de x20): A - grupo branco; B - grupo controle (TNBS); C - Grupo colítico tratado com FRT a 5% associado com prednisolona (TNBS+FRT5%+PRED); D - Grupo colítico tratado com FRT a 10% associado com prednisolona (TNBS+FRT10%+PRED); E - Grupo colítico tratado com FRT a 20% associado com prednisolona (TNBS+FRT20%+PRED). Os cortes foram coradas com Heatoxilina-Eosina (HE).

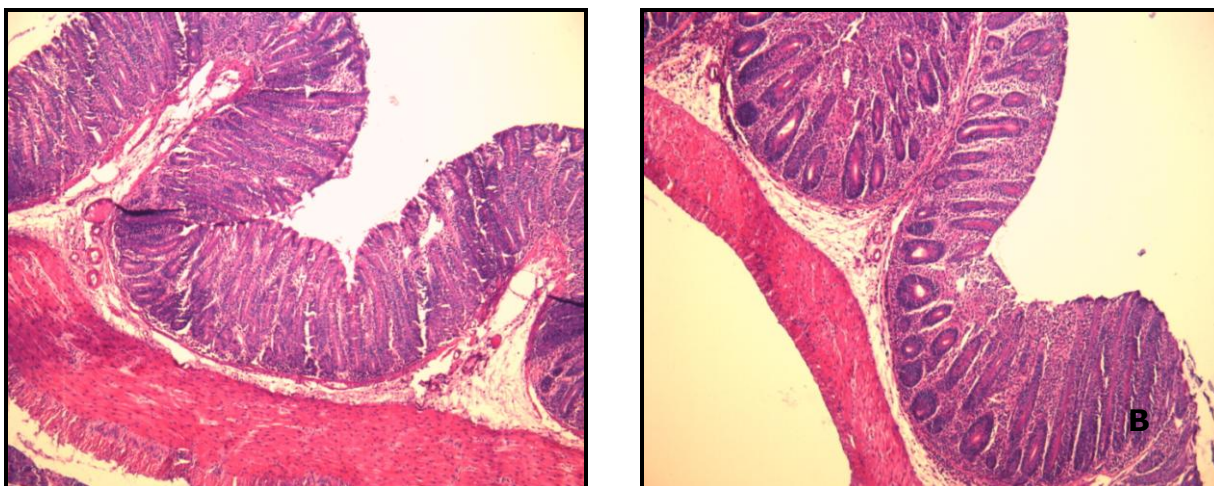


Figura 10 – Microfotografias histológica do tecido colônico dos grupos Branco e Dieta (FRT 20%) (material objetivado no aumento de x20): A - grupo branco (Aumento de x20), (material objetivado no aumento de x10): B - Grupo Dieta FRT 20%. As amostras foram coradas com Heatoxilina-Eosina (HE).

2.4. Avaliação das determinações bioquímicas

A inflamação colônica foi caracterizada bioquimicamente pela depleção de GSH colônica (Figura 11), e aumento da atividade enzimática da MPO (Figura 12) e da FA (Figura 13).

O tratamento com FRT produziu efeito benéfico na colite experimental evidenciado pelo impedimento da depleção de GSH, nas 3 doses estudadas (Figura 11), e redução da atividade da MPO (Figura 12) e da FA (Figura 13) na dose de 10% (TNBS+FRT10%).

O tratamento com prednisolona foi eficaz, pois evitou a depleção de GSH colônica ($P < 0.05$) (Figura 11) e inibiu a atividade da MPO (Figura 12) e FA (Figura 13).

A associação de FRT com prednisolona evitou a depleção de GSH (Figura 11) e inibiu a atividade da MPO (Figura 12) nas doses de 5% (TNBS+FRT5%+PRED) e 10% (TNBS+FRT10%+PRED) e da FA (Figura 13) na dose de 20% (TNBS+FRT20%+PRED).

Os animais do grupo dieta (FRT20%) não colíticos apresentaram os parâmetros bioquímicos semelhantes ao grupo branco, com manutenção dos níveis de GSH colônica (Figura 11) e ausência da atividade enzimática da MPO (Figura 12) e da FA (Figura 13).

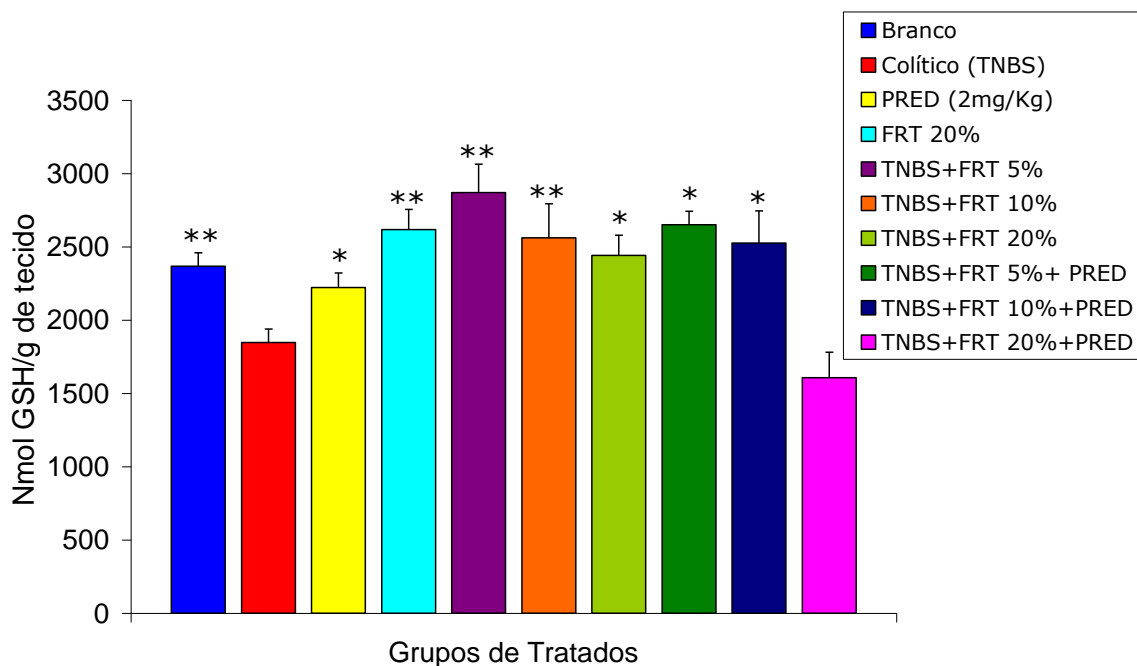


Figura 11 - Efeito dos tratamentos com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. nas doses de 5% (TNBS+FRT5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20% (TNBS+FRT20%), grupo referência (PRED; 2mg/Kg) e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) no conteúdo de glutathione total (GSH) no tecido colônico. Os valores estão expressos em média do grupo \pm E.P.M. com os valores * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ quando comparados ao grupo controle.

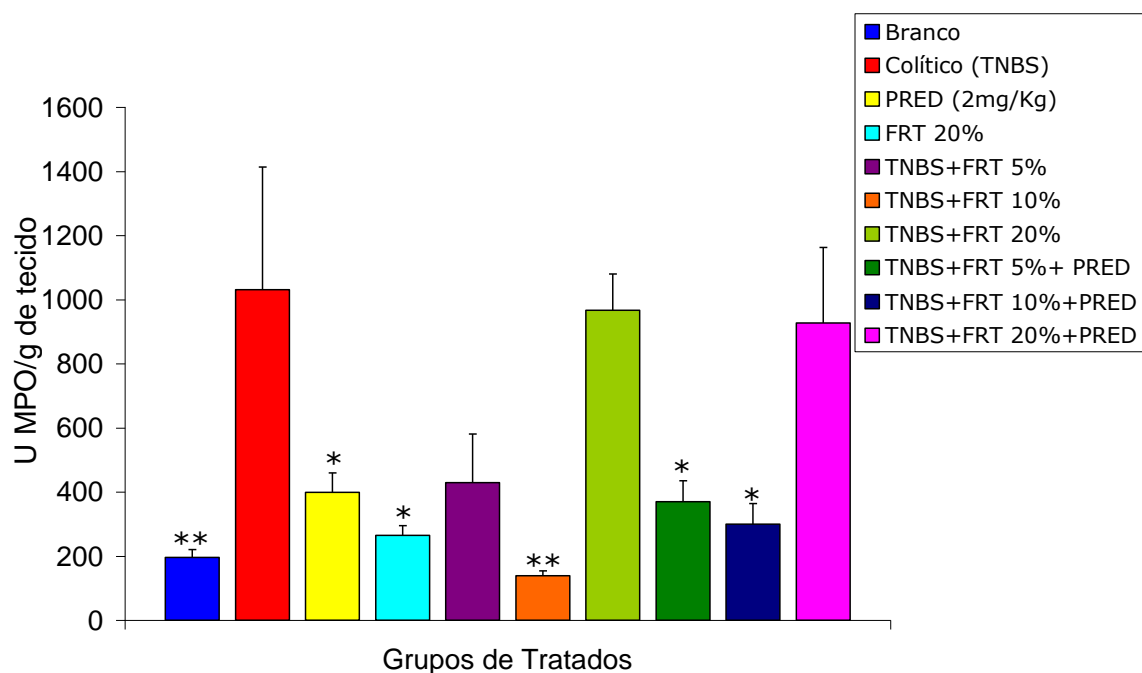


Figura 12 - Efeito dos tratamentos com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. nas doses de 5% (TNBS+FRT5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20% (TNBS+FRT20%), grupo referência (PRED; 2mg/Kg) e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) na atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no tecido colônico. Os valores estão expressos em média do grupo \pm E.P.M. com os valores $*P<0.05$ e $**P<0.01$ quando comparados ao grupo controle.

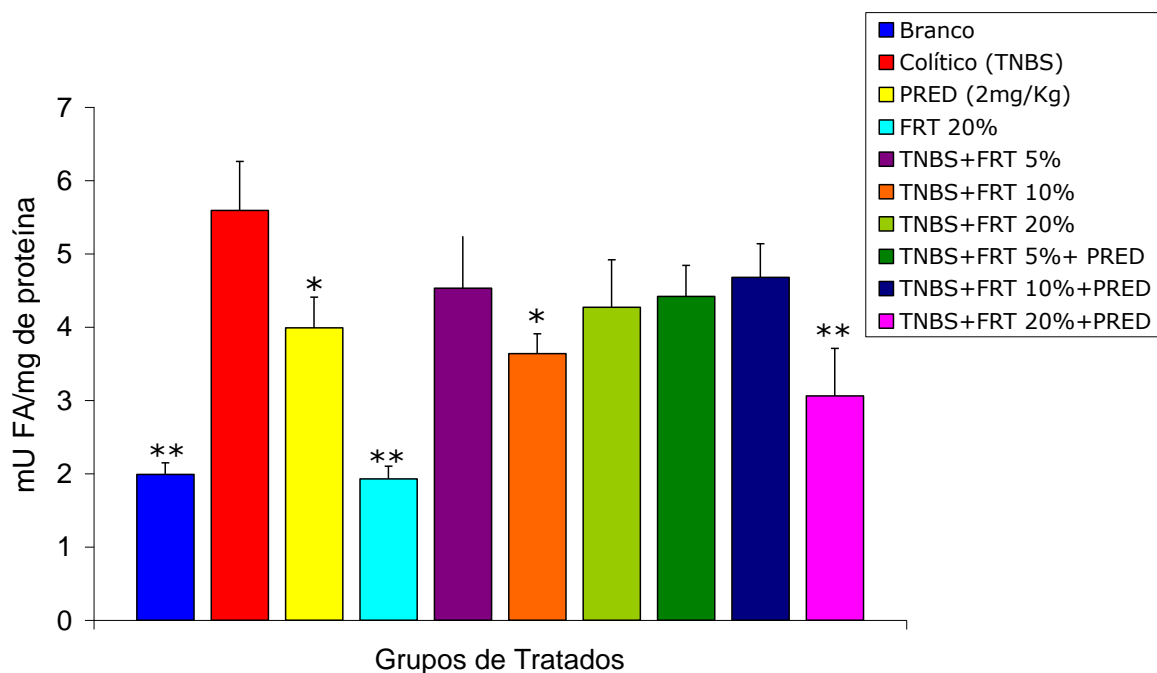


Figura 13 – Efeito dos tratamentos com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. nas doses de 5% (TNBS+FRT5%), 10% (TNBS+FRT10%) e 20% (TNBS+FRT20%), grupo referência (PRED; 2mg/Kg) e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT5%+PRED, TNBS+FRT10%+PRED e TNBS+FRT20%+PRED) na atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) no tecido colônico. Os valores estão expressos em média do grupo \pm E.P.M. com os valores * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ quando comparados ao grupo controle.

2.5. Avaliação microbiológica

A leitura de colônias bacterianas do grupo ácido-láticas não diferiu entre os grupos brancos e controle (Figura 14). Nenhum animal dos grupos tratados (TNBS+FRT20% e TNBS+FRT20%+PRED) e do grupo dieta (FRT20%) apresentaram aumento no número de bactérias ácido láticas (Figura 14).

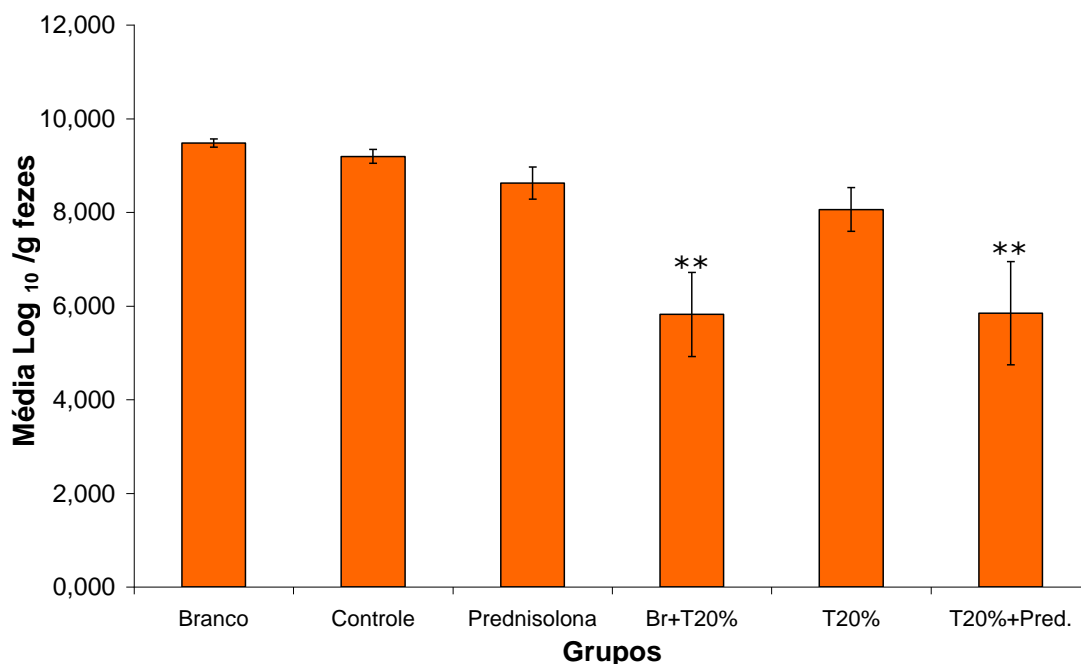


Figura 14 - Efeito dos tratamentos no grupo branco, grupo controle (TNBS), grupo referência (PRED; 2mg/Kg), com farinha do rizoma de *T. angustifolia* L. nos grupos dieta (FRT20%), tratado com doses de 20% (TNBS+FRT20%), e da associação dos tratamentos (TNBS+FRT20%+PRED) na leitura microbiológica para bactérias ácido-láticas. Os valores estão expressos em média do grupo \pm E.P.M. com os valores **P<0.01 quando comparados ao grupo controle.

3. Determinações fitoquímicas qualitativas

Pelas determinações fitoquímicas realizadas na FRT foi detectado a presença de saponinas, flavonóides e cumarinas (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise fitoquímica da farinha do rizoma de *T. angustifolia* L (FRT) e do seu extrato bruto etanólico 70%.

Material de estudo	Composto Secundário	Presença	Ausência
1g FRT (seco e pulverizado) Extrato EtOH _{70%}	Saponina	X	
	Tanino		X
	Flavonóide	X	
	Cumarina	X	

O principal objetivo na busca de novos tratamentos para DII está na prevenção ou tratamento dos danos recorrentes no local de inflamação (Kaya e cols., 1999). Componentes presentes na dieta e seus produtos da digestão estão em íntimo contato com o vasto sistema imune intestinal (Schley e col., 2002) e a presença destes no intestino grosso é considerado necessário para o funcionamento e desenvolvimento adequado do tecido linfóide associado ao intestino (Ruthlein e cols., 1992). Considerando a nutrição enteral, muitas pesquisas têm sugerido e considerado os benefícios desta prática como estratégia para a manutenção da remissão em pacientes com DII ativa (Yamamoto e cols., 2009). Os alimentos funcionais, definidos como alimentos capazes de aumentar a função gastrointestinal ou reduzir riscos à doenças (Diplock e cols., 1999), devem ser consumidos como parte da dieta usual para produção de seus efeitos benéficos que vão além do efeito nutricional tradicional (Roberfroid, 2000). A suplementação na dieta, por apresentar vantagens pela forma de administração oral ser mais fisiológica e conveniente, é considerada a mais adequada para permitir o alcance do produto no tecido colônico (González e cols., 2001). Um dos primeiros estudos realizados com o uso de suplementação dietária e Doença Inflamatória Intestinal demonstrou que pacientes com colite ulcerativa utilizando de suplementação dietária de 20g diários de sementes de *Plantago ovata* tiveram remissão da doença tão eficiente quanto o tratamento com 1.5g por dia de mesalazina por indivíduo (Fernandez-Bañares e cols., 1999). Outros estudos clínicos demonstraram a eficácia da fibra de cevada germinada, a qual reduziu a atividade da doença e prolongou o tempo de remissão (Kanauchi e cols., 2002; Kanauchi e cols., 2003; Hanai e cols., 2004). No presente estudo o efeito protetor e antiinflamatório da suplementação do rizoma de *T. angustifolia* L. junto à dieta no modelo experimental de indução de colite por TNBS em ratos foi evidenciado quanto aos parâmetros macroscópicos, microscópicos, microbiológicos e bioquímicos analisados.

O modelo experimental do estudo baseia-se na indução de colite pelo ácido TNBS em ratos machos, descrito por Morris e cols. (1989). É provavelmente um dos modelos mais amplamente utilizados para inflamação crônica (González e cols., 2001), sendo considerado o mais adequado para o estudo de novos produtos, visto que produz lesão similar a que ocorre em humanos (Israeli, e cols., 2004). O fundamento da técnica baseia-se na hipótese de Ward (1977) e Shorter e cols. (1972) que presume que na doença de Crohn, o aumento na permeabilidade

da mucosa resulta na entrada de antígenos luminais na lâmina própria e que não são reconhecidos pelo sistema imune da mucosa (*apud* Morris e cols., 1989). O ácido TNBS é um hapteno que quando se liga à moléculas de alto peso molecular (como proteínas) estimulam o sistema imunológico, enquanto que o etanol causa dano agudo e temporário na mucosa (Little e col., 1966, Findle, 1985 e Wallace, 1985 *apud* Morris e cols., 1989). Com a presença do componente irritante TNBS, as células caliciformes aumentam a excreção de muco com o objetivo de proteger a mucosa intestinal (Willemsen e cols., 2003), ocasionando a depleção de muco associada à doença. Evidências como infiltração de células inflamatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-12 por macrófagos e de INF- γ e IL-2 por linfócitos, são comumente encontradas no tecido colônico no modelo de indução por TNBS (Jurjus, e cols., 2004), o que sugerem a ativação de resposta imune do tipo Th1, constituindo assim modelo de doença de Crohn (Neurath e cols., 1995). Outros estudos determinaram o papel dos mastócitos na função da barreira epitelial intestinal para este modelo de colite, onde por efeitos diretos ou indiretos, diminuem a absorção de água pela mucosa (Stein e cols., 1998), causando diarreia semelhante a que ocorre em humanos (Jurjus, e cols., 2004). Dos marcadores bioquímicos dosados no presente estudo, o modelo é caracterizado pela depleção de GSH colônica, resultando em degradação severa da mucosa, diarreia e falência no crescimento (Martensson, 1990), efeitos estes também observados na DII em humanos. Há também um aumento nos níveis de MPO, um marcador enzimático que determina proporcionalmente a infiltração de neutrófilos no tecido (Krawisz e cols., 1984), e da FA, um sensível marcador de inflamação intestinal o qual é aumentado devido a indução (Sánchez de Medina e cols., 2004) e apresenta mecanismo de ação baseado na defesa contra endotoxinas (Torres e cols., 2007).

Existem evidências de que nutrientes e compostos fitoquímicos atuam na modulação da resposta imune e assim suprem a inflamação (Ferguson e cols., 2007). Os mecanismos pelos quais os alimentos funcionais atuam têm considerado características como a presença de fibras dietárias (Roberfroid, 2002), presença de estabilizadores de membrana e função mitocondrial, evitando apoptose ou necrose, presença de indutores de apoptose de células cancerígenas (Ferrari, 2004), presença de compostos antioxidantes com capacidade de quelar metais (Salminen e cols., 1998) ou pela presença de aminoácidos considerados não-essenciais moduladores da resposta imune da mucosa intestinal (Ferguson e cols., 2007; Coëffier e cols., 2010). Componentes presentes em alimentos considerados protetores contra desordens intestinais incluem os micronutrientes, como vitaminas C, D, E e beta-carotenos, e minerais, como cálcio, cobre, zinco, ferro e selênio (Ferguson e cols., 2007), glicosinatos, fenóis, lignanas, flavonóides,

isoflavonoides (Salminen e cols., 1998), aminoácidos não-essenciais (Coëffier e cols., 2010) e fibra dietária (Roberfroid, 2002).

A presença de fibra dietária em diferentes alimentos sugere um mecanismo de ação protetor nos organismos vivos. (Roberfroid, 2002). Fibras dietárias são partes comestíveis de plantas, encontradas naturalmente em vegetais, cereais não refinados, frutas, sementes ou carboidratos naturais isolados, como inulina e oligofrutose, ou análogos sintéticos, como lactulose e polidextrose, e que, por serem carboidratos não-digeríveis, são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado, servindo como substratos para fermentação bacteriana completa ou parcial no cólon (Roberfroid, 2002; Valencia e cols., 2004). Devido a estas características, são comumente incluídos dentro do grupo de prebióticos (Roberfroid, 2002), podendo exercer funções importantes no intestino como fornecimento de energia via produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), controle do trânsito intestinal, aumento de massa e frequência fecal e aumento seletivo do número de bactérias. A produção de AGCC a partir da fermentação destes produtos promovem outros efeitos sobre a absorção de nutrientes, especialmente de minerais e sua biodisponibilidade, proliferação de células epiteliais, modulação da atividade imune e funções endócrinas e alterações no metabolismo de proteínas, lipídeos e ácidos biliares (Salminen e cols., 1998, Roberfroid, 2000). Devido a estas características, as fibras dietárias tem sido empregadas no tratamento ou controle de diversas desordens crônicas, como doenças cardiovasculares (Neyrinck e cols., 2008), doença inflamatória intestinal (Rodríguez-Cabezas, e cols., 2003; Camuesco e cols., 2005; Damaskos and Kolios, 2008), osteoporose (Valencia e col., 2004) e câncer (Salminen e cols., 1998).

A quantificação de fibras em diversas partes da espécie *T. angustifolia* L. foi reportada por alguns estudos. Carranco e cols. (2002) refere que as folhas desta espécie apresentam 27.17% de fibra neutra detergente, 32.52% de fibra ácida detergente, 24.43% de celulose, 28.84% de hemicelulose e 7.46% de ligninas, enquanto que Schmeda-Hirschmann e cols. (1999) reporta que seu rizoma apresenta 17.2% de fibras. Apesar das folhas apresentarem maiores conteúdos de fibras, os rizomas foram escolhidos no presente estudo, pois apresentam seus usos como alimento descritos em estudos anteriores por alguns povos da Austrália (Reitz, 1984b *apud* Kinupp, 2007) e por Ameríndios chilenos (Schmeda-Hirschmann e cols., 1999). Outro fator que favoreceu a escolha de rizomas de *T. angustifolia* foi devido a presença de estudos com citações de raízes de *T. angustifolia* para tratar enfermidades crônicas gastrointestinais (Acuña, 2006) como desintérias e diarreia (Foster & Duke, 2000).

A suplementação de FRT na dieta dos ratos auxiliou na recuperação da colite induzida por TNBS, principalmente na concentração de 10%, evidenciado pela redução da área inflamatória tecidual, diminuição da relação peso/comprimento e pelas baixas incidências de aderências e diarreia. Outros trabalhos também demonstram efeitos benéficos da suplementação de fibra de cevada germinada a 5% na dieta, apresentando efeito antiinflamatório no modelo de colite induzida por Sulfato de dextran sódico (Kanauchi e col, 1998) caracterizado pela diminuição da incidência de diarreia sanguinolenta, potencial em aumentar o bolo fecal, diminuição da injúria mucosal (Kanauchi e col, 1997) e aumento da concentração de butirato no conteúdo cecal (Fukuda e cols., 2002).

As análises histológicas confirmam os efeitos macroscópicos antiinflamatórios atribuídos à FRT. O grupo tratado com a FRT na dose de 10% apresentou uma maior restauração da citoarquitetura normal do cólon dentre as doses testadas, com a cicatrização da mucosa evidenciada pela intensa atividade mitótica e restrição da lesão microscópica ocorrendo apenas na mucosa. As células caliciformes das criptas apresentavam o conteúdo de muco normal, com ausência de dilatação das criptas. Na submucosa foi evidenciado ausência de edema, o que confirma a baixa relação peso/comprimento colônico (Degushi e cols., 2007) evidenciado nos parâmetros macroscópicos descritos acima, e baixo infiltrado inflamatório, apesar da predominância de neutrófilos. Evidências antiinflamatórias similares foram encontradas em análises histológicas em estudo de colite experimental com tratamentos de fibra presentes em sementes de *Plantago ovata* Forssk e em cevada germinada. O tratamento com 5% de fibra de *P. ovata* na dieta auxiliou na recuperação da citoarquitetura intestinal, descritas com a maioria das amostras apresentando a camada epitelial recuperada, com restrição da lesão microscópica apenas na mucosa e ausência na depleção de muco e de criptas dilatadas, com baixo infiltrado inflamatório (Rodríguez-Cabezas e cols., 2002). O tratamento com 5% de fibra de cevada germinada na dieta mostrou menor extensão de dano nas criptas (Kanauchi e cols., 2001) e na camada epitelial, com ausência de edema e ao longo do cólon (Araki e cols., 2007), porém com tênue dilatação cística (Kanauchi e cols., 2003).

A baixa infiltração inflamatória dos animais tratados com FRT na dose de 10% foi reproduzida bioquimicamente com a redução da atividade da MPO e da FA. A suplementação com FRT na dieta evitou a depleção dos níveis de GSH colônico, o que permite concluir que o sistema de defesa antioxidante se manteve íntegro durante o curso da inflamação (González e cols., 2001). Assim, os efeitos da FRT observados podem ser interpretados como ação antiinflamatória no modelo de DII experimental. Efeitos similares aos da FRT em mediadores da resposta inflamatória

também foram reportados no tratamento com suplementação de sementes de *P. ovata* a 5% na dieta de animais com colite induzidos por TNBS, incluindo redução da atividade da MPO e contenção dos níveis de GSH (Rodriguez-Cabezas e cols., 2002). Ambos os componentes alimentares, fibra de semente de *P. ovata* e de cevada germinada, tiveram seus efeitos antiinflamatórios correlacionados à presença de fibra dietária.

Vários estudos demonstram efeitos imunomoduladores e preventivos e/ou restauradores da inclusão de fibras dietárias isoladas na dieta em ensaios clínicos e experimentais. A lactulose, apresentou efeito antiinflamatório na DII experimental reduzindo a atividade da MPO e a produção de citocinas colônicas (TNF- α e leucotrieno-B₄), juntamente com aumento do número de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no conteúdo colônico (Camuesco e cols., 2005). Em estudos clínicos, a lactulose promoveu na qualidade de vida em pacientes com colite ulcerativa ativa, avaliação feita a partir do Questionário Alemão de Doenças Inflamatórias Intestinais (Hafer e cols., 2007). Inulina e a oligofrutose também demonstraram propriedades imunomoduladoras em estudos clínicos com portadores de DII (Lindsay et al., 2006) e na colite experimental (Hoentjen e cols., 2005; Osman, e cols., 2006). Suplementação com oligofrutose induziu a um aumento do número de Lactobacilos e Bifidobactérias (Kleessen e cols., 2001; Bovee-Oudenhoven e cols., 2003), assim como da produção de AGCC no cólon (Campbell e cols., 1997). Estes produtos também foram capazes de promover atividade imunomoduladora, aumentando a atividade de células Natural-Killers e a atividade fagocítica de macrófagos peritoniais, demonstrando assim uma regulação da resposta imune mediada por Th1 (Kelly-Quagliana e cols., 2003). No modelo de colite experimental com ratos a ingesta da mistura de inulina com oligofrutose reduziu a produção de citocina pró-inflamatória IL-1 β na mucosa cecal e de INF- γ por linfócitos mesentéricos (Hoentjen et al., 2005) e reduziu a atividade da MPO (Osman, e cols., 2006). Em estudos clínicos com portadores da doença de Crohn, a ingesta de 15g/dia de inulina e oligofrutose diminuiu a atividade da doença, aumentando o número de bifidobactérias intestinais e a expressão de receptores Toll-like e da citocina antiinflamatória IL-10 pelas células dendríticas (Lindsay et al., 2006).

O mecanismo que explica a diminuição da inflamação colônica dos animais tratados com as fibras dietárias descritas acima se deve a formação de AGCC a partir da fermentação destes por bactérias enterais benéficas. A recuperação das células colônicas ocorre, pois mais de 90% dos AGCC são absorvidos pelos colonócitos (Musch e cols., 2001) com conseqüente aumento da absorção de sódio e água (Roediger, 1994; Musch e cols., 2001), agindo como anti-

diarreico (Scheppach, 1994). Os AGCC também contribuírem com outros efeitos como diminuição do pH luminal (Lupton e col., 1993) e quando absorvidos modulam a resposta imune (Inan e cols., 2000), aumentam o fluxo sanguíneo local (Kvietys e cols., 1981; Mortensen e cols., 1990), e a motilidade nas porções distais e medianas do cólon (Binder e cols., 1989) e da barreira mucosal (Scheppach, 1994), além de diminuírem os níveis séricos de colesterol (LDL) (Lairon, 1996; Delzenne e col., 2001).

A importância de nutrientes específicos para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune já é bem conhecida (Alexander, 1995). A suplementação na dieta de compostos ricos nos aminoácidos glutamina e glicina tem mostrado ação terapêutica para o tratamento da DII em vários estudos. Ambos os aminoácidos, juntamente com a cisteína (Duggan, e cols., 2002), atuam como precursores da síntese de glutathione (Grimble, 1992; Duggan, e cols., 2002), um componente importante das defesas antioxidantes do organismo. O fornecimento de glutathione em modelo experimental de colite evita o dano tecidual histológico colônico (Loguercio, 2003). O aminoácido glutamina é conhecido por apresentar funções fisiológicas únicas no intestino, pois também atua como combustível energético dos colonócitos (Hartmann e col., 1989), estimula a proliferação destas células, impede a invasão bacteriana para o interior da mucosa (Israelí e cols., 2004), diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-8 (Ameho e cols., 1997) e reduz os níveis de endotoxinas portais na colite experimental com cobaias (Fujita e cols., 1995). O requerimento de glicina em situações inflamatórias na qual citocinas estão envolvidas (Grimble, 1992) aumenta, pois inibe a ativação de macrófagos e neutrófilos mediadas por receptor (Ikejima, 1997; Wheeler, 1999; Wheeler, 2000; Li, 2001). Sabe-se que a suplementação de glicina e ácido glutâmico conferem um efeito protetor ao dano colônico induzido por TNBS em ratos (Tsune, 2003; Kaya e cols., 1999; Israelí e cols., 2004). A suplementação com ambos reduz o escore colônico, a relação peso/comprimento e o estresse oxidativo tecidual (Tsune, 2003; Kaya e cols., 1999; Israelí e cols., 2004). Assim, um aumento da ingestão destes componentes nutricionais em alimentos funcionais é considerado de grande valor (Seidel e cols., 2007). Apesar destes aminoácidos não terem sido dosados no presente estudo, salientamos que outras espécies do mesmo gênero são ricas em glicina e glutamina (Boyd, 1970, Carranco e cols., 2002), sugerindo que devido características quimiotaxonômicas que tais aminoácidos também podem ser encontrados em *T. angustifolia*.

Os efeitos antiinflamatórios da Prednisolona na DII estão atribuídos a sua atividade inibitória sobre a cascata do ácido araquidônico (Sharon e col., 1985), inibindo a síntese de produtos da inflamação como prostaglandinas (E₂ e F_{2 α}) e

leucotrienos (Lauritsen e cols., 1987), modulando assim a resposta imune no local da inflamação. O grupo tratado com Prednisolona na dose de 2 mg/Kg apresentou efeito protetor evidenciado pela redução da lesão tecidual, observado microscopicamente pela presença de cicatrização nas células epiteliais e redução da relação peso/comprimento colônico, acompanhado por contenção dos níveis de GSH colônico e a redução da atividade da FA e MPO. Os corticosteróides ainda são o grupo de fármacos de primeira opção para o tratamento das DII com crise moderada a severa (Esteve, 2008). O seu limite clássico de tratamento nas DII é de 7-10 dias para evitar remissões (Meyers, 1987), sendo que, tratamentos que se estendem mais do que 10 dias não alteram a eficácia de remissão do fármaco, porém aumenta os efeitos indesejáveis como sintomas da Síndrome de Cushing iatrogênica (crescimento de pêlos, face de lua cheia, tendência a osteoporose, hiperglicemia, obesidade, entre outros).

Curiosamente, a associação entre a suplementação dietária com a prednisolona não representou uma somatória dos efeitos produzidos por ambos os produtos fornecidos isoladamente aos animais, visto que ambas as combinações testadas produziram efeitos similares aos dados apresentado pela FRT, incluindo redução da relação peso/comprimento colônico, manutenção da GSH colônica e redução da atividade da MPO.

O grupo tratado com a FRT a 20% e prednisolona (2 mg/Kg) produziu, de forma inesperada, um quadro de colite mais severo. Cassidy e cols. (1981) evidenciaram que a suplementação de alfafa a 15% na dieta, alimento que apresenta o mesmo conteúdo de fibras que a FRT (Carranco e cols., 2002), danifica as células epiteliais do intestino, com redução da microvilosidade e aparecimento de bolsas de hemorragias na superfície de animais sadios. Tais considerações poderiam explicar os resultados obtidos com o tratamento usando FRT 20%.

Poucos estudos evidenciam a associação experimental de dietas rica em fibras com fármacos padrões usados para o tratamento da DII. Kanauchi e cols. (2001) reportam efeitos similares para a combinação dos tratamentos com fibra de cevada germinada e sulfassalazina, demonstrando que a combinação não propiciou efeito sinérgico antiinflamatório como esperado. Tanto a sulfasalazina quanto a prednisolona apresentam seus mecanismos de ação sobre a cascata do ácido araquidônico (Hartley e cols., 1996; Sharon e col., 1985). Apesar de não existirem referências de efeito da prednisolona sobre a microbiota intestinal, semelhante ao encontrado nos tratamentos com sulfassalazina (Hartley e cols., 1996), futuros estudos serão necessários para o melhor entendimento da interação de glicocorticóides a microbiota comensal intestinal.

A presença de compostos antioxidantes em alimentos funcionais também pode contribuir com os efeitos protetores destes produtos. Polifenóis presente em alimentos são quelantes naturais de minerais com alta atividade oxidante (Chen & Ann 1998; Lopes e cols. 1999; Barnham e cols. 2004). Os compostos presentes em alimentos e que apresentam atividades antioxidantes compreendem principalmente micronutrientes como vitaminas e minerais e componentes do metabolismo secundário de plantas como glicosinolatos, fenóis, lignanas, flavonóides e isoflavonoides (Salminen e cols., 1998). O uso de compostos antioxidantes têm sido associados à redução de risco de doenças inflamatórias, cardiovasculares e algumas formas de câncer, como coloretal (Salminen e cols., 1998), pois são doenças que resultam na formação de radicais livres que afetam lipídios, proteínas e o DNA celular (Seidel e cols., 2007; Nikoleit, 2007). Desta forma, compostos antioxidantes na dieta podem ser limitantes para o dano causado na DII (González e cols., 2001), pois podem proteger o organismo de eventos oxidativos, quando os níveis dos antioxidantes endógenos forem insuficientes para conter espécies reativas (Rietveld & Wiseman, 2003). Vários produtos naturais com propriedade antioxidantes tem sido estudados quanto a seus efeitos benéficos na colite ulcerativa, especialmente a suplementação na dieta com vitamina E (González e cols., 2001) e diferentes flavonóides como quecetrina, rutosídeo, silimarina, hesperidina, disosmina entre outros (Sánchez de Medina e cols., 1996, 2002; Gálvez e cols., 1997; Crespo e cols., 1999; Cruz e cols., 2001), a isocumarina paepalantina (Di Stasi e cols., 2004) e cumarinas como 4-metil-cumarina, esculetina, 4-metil-esculetina e outras (Witaicenis e cols., 2010; Luchini e cols, 2009)

Nosso estudo indica a presença de flavonóides e cumarinas na farinha preparada com rizomas de *T. angustifolia*, o que poderia contribuir com os efeitos protetores observados.

O rápido restabelecimento do consumo de ração dos animais tratados com a FRT à 20%, quando comparados ao grupo branco, indica que a suplementação de FRT na dieta é aceitável, sendo, portanto, palatável ao consumo. Os animais suplementados com a FRT por 2 semanas não desenvolveram sintomas de diarréia nem constipação devido ao seu consumo, assim como não foram observados nenhum efeitos sobre os diferentes parâmetros estudados. Observações semelhantes foram encontradas em animais suplementados com lactulose (Camuesco e cols., 2005).

Tem sido amplamente aceito que a composição da microbiota intestinal pode levar a alteração significativa na imunidade do hospedeiro e no curso da inflamação na mucosa intestinal (Hoper e cols., 2001a; Hoper e cols., 2001b;

Madsen e cols., 1999). Em pacientes com DII ocorre a redução de bactérias putativas benéficas (como as bifidobactérias) e aumento de Enterobactérias e *Bacteroides* no microambiente intestinal (Linskens e cols., 2001 *apud* Mahida e cols., 2004), os quais em estudos experimentais conferem aumento da injúria da mucosa (García-Lafuente e cols., 1997). A diversidade bacteriana em amostras fecais de pacientes com doença de Crohn e colite apresenta redução de 50% e 30%, respectivamente, quando comparados aos indivíduos saudáveis, sugerindo que a redução na diversificação da microbiota intestinal é um sintoma específico da doença (Ott e cols., 2004). Estudos em pacientes com doença de Crohn evidenciaram um elevado número de bactérias aderentes na camada de muco do íleo, identificadas em biópsias como sendo a espécie *Escherichia coli*, do grupo das Enterobactérias, a espécie dominante (Rhodes, 2007).

De acordo com Gibson e col. (1995), um determinado produto deve ser metabolicamente seletivo para um ou limitado número de bactérias benéficas, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo uma análise essencial para classificar o determinado produto como prebiótico. Poucos estudos foram realizados para esse tipo de análise e tem sido empregada tanto em estudos experimentais quanto em estudos clínicos. No modelo de colite induzida por TNBS, Camuesco e cols. (2005) analisaram o efeito prebiótico da lactulose a 5% enquanto Cherbut e col. (2003) analisaram o efeito prebiótico de frutooligosacarídeos em animais colíticos tratados com 1g/dia, e ambos estudos evidenciaram efeito prebiótico, aumentando o número de *Bifidobactérias* nas fezes.

Em nosso estudo, o uso da FRT como suplemento dietário não aumentou o número de bactérias ácido lácticas como esperado, tanto nos animais do grupo dieta (FRT 20%) quanto no grupo de animais colíticos tratados com a dieta (TNBS+FRT 20% e TNBS+FRT 20%+PRED).

Conclusão

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- A suplementação de FRT na dieta proporcionou atividade antiinflamatória preventiva, principalmente na dose de 10%
- A combinação do tratamento de FRT com Prednisolona não apresentou efeito sinérgico,
- Os efeitos protetores observados não indicam que seja de natureza prebiótica, visto que não se detectou crescimento de bactérias, no entanto, podem estar relacionados à modulação do estresse oxidativo visto que o produto contém a depleção de glutatona e possui diferentes compostos secundários com atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ABCD - Associação Brasileira de Colite Ulcerative e Doença de Crohn [Internet]. São Paulo: ABCD; 2010 [acesso 19 jan 2010]. Disponível em:www.abcd.org.br.

Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med.* 2009; 361:2066-78.

Acuña LIBA. The economic contribution of root foods and other geophytes in prehistoric texas [thesis]. San Marcos: Texas State University; 2006.

Alexander JW . Specific nutrients and the immune response. *J Nutr.* 1995; 11:229-32.

Almeida MMB, Lopes MFG, Sousa PHM, Nogueira CMD, Magalhães CEC. Determinação de umidade, fibras, lipídeos, cinzas e sílica em plantas medicinais. *Bol Ceppa.* 2003; 21:343-50.

Ameho CK, Adjei AA, Harison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y, et al. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut.* 1997; 41:487-93.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985; 113:548-55.

Araki Y, Kanauchi O, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T. Germinated barley foodstuff suppresses dextran sulfate experimental colitis in rats: The role of mast cells. *Int J Mol Med.* 2007; 19: 257-62.

Bamba T, Kanauchi O, Andoh A, Fujiyama Y. A new prebiotic from germinated barley for nutraceutical treatment of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17:818-24.

Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Internal Med.* 2005; 143:895-904.

Barnard JA, Warwick G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ.* 1993; 4:495-501.

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:205-14.

Bela AJ, Chifa C. Posibilidades de uso medicinal y alimenticio de *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae), Totorá. *Comun Cient Tecnol.* 2000;

Bell, CJ, Gall, DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol.* 1995; 268:G622-30.

Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4:571-9.

Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J Biol Chem.* 1946; 164:321-9.

Binder HJ, Metha P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology.* 1989; 96:989-96.

Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolín M, Lara F, Espín E, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut.* 2002; 51:659-64.

Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharm Ther.* 2003; 18:45-56.

Bovee-Oudenhoven IM, Ten Bruggencate SJ, Lettink-Wissink ML, Van Der Meer R. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of *Salmonella* in rats. *Gut.* 2003; 52:1572-8.

Boyd CE. Amino acid, protein, and caloric content of vascular aquatic macrophytes. *Ecology.* 1970; 51:902-6.

Braat H, Van Den Brande J, Van Tol E, Hommes D, Peppelenbosch M, van Deventer S. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1618-25.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Biol Chem.* 1976; 164:321-29.

Campbell JM, Fahey JR, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr.* 1997; 127:130-6.

Camuesco D, Peran, Calamada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodriguez-Cabezas H, et al. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflam Bowel Dis.* 2005;11:265-71.

Carranco ME, Castillo RM, Escamilla A, Martínez M, Pérez-Gil F, Stephan E. Composicion química, extracción de proteína foliar y perfil de aminoácidos de siete plantas acuáticas. *Rev Cubana Cienc Agr.* 2002; 36:247-58.

Cassidy MM, Lightfoot FG, Grau LE, Story JA, Kritchevsky D, Vahouny GV. Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon: a scanning electron microscopy study. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34:218-28.

Changtai XU, Shangu LI, Borong PAN. Current drug therapy in ulcerative colitis. *J Chin Clin Med.* 2009; 7:410-20.

Chapman MAS, Grahn MF, Boyle MA, Hutton M, Rogers J, Williams NS. Butyrate oxidation is impaired in colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut.* 1994; 35:73-6.

Chen X, Ahn DU. Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *J Am Oil Chem Soc.* 1998; 75:1717-21.

Cherbut C, Michel C, Lecannu G. The Prebiotic Characteristics of Fructooligosaccharides Are Necessary for Reduction of TNBS-Induced Colitis in Rats. *J Nutr.* 2003; 133:21-7.

Cherbut C. Inulin and oligofructose in the dietary fiber concept. *Br J Nutr.* 2002; 87:S159-62.

Clausen MR, Mortensen PB. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short-chain fatty acids and glucose in patients with ulcerative colitis (abstr.) *Gut.* 1995; 37:684-9.

Coëffier M, Marion-Letellier R, Déchelotte P. Potential for Amino Acids Supplementation During Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16:518-24.

Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut.* 1993; 34:1081-5

Crespo ME, Gálvez J, Cruz T, Ocete M A, Zarzuelo A. Anti inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rats colitis induced by TNBS. *Planta Med.* 1999; 65:651-653.

Cruz T, Gálvez J, Crespo E, Ocete MA, Zarzuelo A. Effects of silymarin on the acute stage of the Trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med.* 2001; 67:94-96.

Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2001; 48:642-6.

Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut.* 1996; 39:401-6.

Damaskos D, Kolios G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65:453-67.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 2004; 3:394-400.

Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Araki Y, et al. Curcumin Prevents the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:2993-8.

Delzenne NY, Kolk N. Effects of fructans on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: S456S-8S.

Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br J Nutr.* 1999; 81: S1-S27.

- Duggan C, Gannon J, Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75:789–808.
- Eckburg PB, Relman DA. The Role of Microbes in Crohn's Disease. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:256–62.
- Escudero-Álvarez E, González Sánchez P. Dietary fiber. *Nutr Hosp.* 2006; 21:60-71.
- Esteve M, Gisbert JP. Severe ulcerative colitis: at what point should we define resistance to steroids? *World J Gastroenterol.* 2008; 14:5504-7.
- Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:5941-50.
- Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet.* 2002; 359:331–40.
- Fee JA, Teitelbaum HD. Evidences that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 49:150-8.
- Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res.* 2007; 622:70-83.
- Fernández-Bañares F, Hinojosa J, Sánchez-Lombraña L, Navarro E, Martínez-Salmerón JF, García-Pugés A, et al. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:427-33.
- Ferrari CKB. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontol.* 2004; 5:275–89.
- Foster S, Duke JA. *Field guide to medicinal plants and herbs of Eastern and Central North America.* New York, Boston: Houghton Mifflin Company ; 2000.
- Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut.* 2002; 50:485–9.
- Fujita T, Sakurai K: Efficacy of glutamine-enriched enteral nutrition in an experimental model of mucosal ulcerative colitis. *Br J Surg.* 1995; 82:749–51.
- Fukuda M, Kanauchi O, Araki Y, Andoh A, Mitsuyama K, Takagi K, et al. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *Int J Mol Med.* 2002; 9:65-70.
- Fuller R, *Probiotics: The scientific basis.* London: Chapman & Hall; 1992.
- Fuller R. *Probiotics 2: Applications and practical aspects.* London: Chapman & Hall; 1997.
- Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, et al. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54:242–9.

Furtado ALS, Esteves FA. Nutritional value of biomass and detritus of *Typha domingensis* PERS. (Typhaceae). *Rev Brasil Biol.* 1997; 57:317-21.

Gálvez, J., Cruz, T., Crespo, M.E., Ocete, M.A., Lorente, M.D., Sanchez de Medina, F., Zarzuelo, A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Medica.* 1997; 63:409-414.

García Peris P, Bréton Lesme C, de la Cuerda Compes C, Camblor Álvarez M. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr Hosp.* 2002; 28:11-6.

García-Lafuente A, Antolín IM, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol.* 1997; 272:G10-5.

Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and symbiotics. *Int J Food Microbiol.* 2007; 115:1-11.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125:1401-12.

González R, Sanches de Medina F, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Duarte J, Zarzuelo A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *Int J Vitam Res.* 2001; 71:243-50.

Greenberg GR. Antibiotics should be used as first-line therapy for Crohn's disease. *Inflam Bowel Dis.* 2004; 10:318-20.

Grimble RF, Jackson AA, Persaud C, Wride MJ, Delers F, Engler R. Cysteine and Glycine Supplementation Modulate the Metabolic Response to Tumor Necrosis Factor α in Rats Fed a Low Protein Diet. *J Nutr.* 1992; 122:2066-73.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003; 8:512-9.

Hafer A, Kramer S, Duncker S, Krüger M, Manns MP, Bischoff SC. Effect of oral lactulose on clinical and immunohistochemical parameters in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study *BMC Gastroenterol.* 2007, doi:10.1186/1471-230X-7-36.

Hague A, Singh B, Paraskeva C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterol.* 1997; 112:1036-40.

Hamer HM, Jonkers DMAE, Bast A, Vanhoutvin SALW, Fischer MAJG, Kodge A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr.* 2009; 28:88-93.

Hanai H, Kanauchi O, Mitsuyama K Andoh A, Takeuchi K, Araki Y, et al. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med.* 2004; 13:643-7.

Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflam Bowel Dis.* 2006; 12:S3-9.

- Harig JM, Soergel KH, Komowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short chain fatty acid irrigation. *N Engl J Med.* 1989; 320:23–8.
- Hartley MG, Hudson MJ, Swarbrick ET, Grace RH, Gent AE, Hiller MD. Sulphasalazine treatment and the colorectal mucosa-associated flora in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996; 10:157-63.
- Hartmann F, Plauth M. Intestinal glutamine metabolism. *Metabolism.* 1989; 38:18-24.
- Hodin RA, Meng S, Archer S, Tang R. Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate treated HT-29 cells. *Cell Growth Differ.* 1996; 7:647–53.
- Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, Lien K, Churchill TA, Lupicki M, Dieleman LA. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:977–85.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001b; 292:1115–8.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host microbial relationships in the intestine. *Science.* 2001a; 291:881–4.
- Huggett AC, Verschuren PM. The safety assurance of functional foods. *Nutr Rev.* 1996; 54:S132-40.
- Ikejima K, Qu W, Stachlewitz RF, Thurman RG. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am J Physiol.* 1997; 272:G1581–6.
- Inan HS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard A, Rosenberg DM, Giordina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-KB activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterol.* 2000; 118:724-34.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehard AC. Probiotics Best Practice & Research Clinical Gastroenterol. 2004; 18:299–313.
- Israeli E, Berenshtein E, Wengrower D, Aptekar L, Kohen R, Zajicek G, et al. Prophylactic Administration of Topical Glutamine Enhances the Capability of the Rat Colon to Resist Inflammatory Damage. *Dig Dis Sci.* 2004; 49:1705–12.
- Jurjus AR, Houry NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Met.* 2004; 50:81-92.
- Kanauchi O, Agata K, Fushiki T. Mechanism for the increased defecation and jejunum mucosal protein content in rats by feeding germinated barley foodstuff. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997; 61:443-8.
- Kanauchi O, Iwanaga T, Mitsuyama K, Saiki T, Tsuruta O, Noguchi K, et al. Butyrate from bacterial fermentation of germinated barley foodstuff preserves intestinal barrier function in experimental colitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001; 14:880–8.

Kanauchi O, Mitsuyama K, Homma T, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, et al. Treatment of ulcerative colitis patients by long-term administration of germinated barley foodstuff: multicenter open trial. *Int J Mol Med*. 2003; 12:701-4.

Kanauchi O, Nakamura T, Agata K, Mitsuyama K, Iwanaga T. Effects of germinated barley foodstuff on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J Gastroenterol*. 1998; 33:179-188.

Kanauchi O, Suga T, Tochilara M. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. *J Gastroenterol*. 2002; 37:67-72.

Kaya E, Gür ES, Özguç H, Bayer A, Tokyay R. L-glutamine emenas attenuate mucosal injury in experimental colitis. *Dis Colon Rectum*. 1999; 42:1209-15.

Kelly-Quagliana KA, Nelson PD, Buddington RK. Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutr Res*. 2003; 23:257-67.

Kinupp VF. Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS. [tese]. Porto Alegre; Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Kitirattrakarn T, Anantachoke C. Herbs from Peat Swamp Forests in Narathivas, Thailand. *Trad Med Nutr*. 2005; 6:73-81.

Kleessen B, Hrtmann L, Blaut M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr*. 2001; 86:291-300.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. *Gastroenterol*. 1984; 87:1344-50.

Kuehbacher T, Fölsch UR. Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:1149-55.

Kvietys PR, Granger DN. Effect of volatile fatty acids on blood flow and oxygen uptake by the dog colon. *Gastroenterol*. 1981; 80:962-9.

Lairon D. Dietary Fibres: effects on lipid metabolism and mechanisms of action. *Eur J Clin Nutr*. 1996, 50:125-33.

Lauritsen K, Laursen LS, Bukhave K, Rask-Madsen J. In vivo effects of orally administered prednisolone on prostaglandin and leucotriene production in ulcerative colitis. *Gut*. 1987; 28:1095-99

Li X, Bradford BU, Wheeler MD, Stimpson SA, Pink HM, Brodie TA, et al. Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infect Immun*. 2001; 69:5883-91.

Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2006; 55:348-55.

Loftus CG, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, Sandbom WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted Country, Minnesota, 1940-2000. *Inflam Bowel Dis.* 2007; 13:254-61.

Loguercio C, D'argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Dig Liver Dis.* 2003; 35:635-41.

Lopes GKB, Shulman HM, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta/GS.* 1999; 1472:142-52.

Lorenzi H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.* SP: Instituto Plantarum: Nova Odessa; 2000.

Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari SH, Seito LN, Witacenis A, Pellizzon CH, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hidroxicoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biol Pharmacol Bull.* 2008; 31:1343-50.

Lupton JR, Kurtz PP: Relationship of colonic luminal short chain fatty acids and pH to in vivo cell proliferation in rats. *J Nutr.* 1993, 123:1522-30.

Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterol.* 1999; 116:1107-14.

Mahida YR, Rolfe VE. Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. *Clin Sci.* 2004; 107:331-41.

Martensson J, Jain A, Meister A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1715-9.

Meyers S, Lerer PK, Feuer EJ, Johnson JW, Janowitz HD. Predicting the outcome of corticoid therapy for acute ulcerative colitis. Results of a prospective, randomized, double-blind clinical trial. *J Clin Gastroenterol.* 1987; 9:50-4.

Morris GP, Beck PI, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterol.* 1989; 96:795-803.

Mortensen FV, Nielsen H, Mulvany MJ, Hessev I. Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. *Gut.* 1990; 31:1391-4.

Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31:132S-48S.

Musch MW, Bookstein C, Xie Y. SCFA increase interfinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. *Am J Physiol.* 2001; 280:G687-93.

Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res.* 2007; 149:173-86.

Neurath M, Fuss I, Kelsall B, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995; 182:1281-90.

Neyrinck AM, De Backer F, Cani PD, Bindels LB, Stroobants A, Portetelle D, et al. Immunomodulatory properties of two wheat bran fractions – aleurone-enriched and crude fractions – in obese mice fed a high fat diet. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8:1423-32.

Nikoleit D. Carotinoide natürlichen Ursprungs – wichtige physiologische Modulatoren, mehr als nur Provitamin A (Naturally occurring carotenoid – important physiological modulators more than only provitamin A). *Vitaminspur*. 1997; 12:5-19.

Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. Bifidobacterium infantis strains with and without a combination of oligofructose and inulin attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterol*. 2006; doi:10.1186/1471-230X-6-31.

Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004; 53:685-93.

Oz HS, Ebersole JL. Application of Prodrugs to Inflammatory Diseases of the Gut. *Molec*. 2008; 13:452-74.

Pagnini C, Cominelli F. Probiotics in experimental and human inflammatory bowel disease: Discussion points. *Dig Liver Dis*. 2006; 38:S270-3.

Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Ann Rev Med*. 2000; 51:289-98.

Pathmakanthan S, Li CKF, Cowie J, Hawkey CJ. *Lactobacillus plantarum* 299: Beneficial *in vitro* immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon *J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 19:166-73.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, et al. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis *World J Gastroenterol*. 2005; 11:5185-92.

Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, et al. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr*. 2007; 97:96-103.

Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Ann Intern Med*. 1989; 111:641-9.

Rachmilewitz D. on behalf of an international study group. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized trial. *Br Med J*. 1989; 298:82-6.

Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999; 354:635-9.

Rhodes J. Treatment of inflammatory bowel disease. US Patent N°7235268B2, 2007.

Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr.* 2003; 133:3285–92.

Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:1682S–7S.

Roberfroid MB. Prebiotics and symbiotics: concepts and nutritional properties, *Br J Nutr.* 1998; 80:S197-202.

Roberfroid, MB. Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr.* 2002; 88:S133–8.

Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J, Lorente MD, Concha A, Camuesco D, Azzouz S, et al. Dietary Fiber Down-Regulates Colonic Tumor Necrosis Factor α and Nitric Oxide Production in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitic Rats. *J Nutr.* 2002; 132:3263–71.

Roediger WEW: Famine, fiber, fatty acids and failed colonic absorption: does fiber fermentation ameliorate diarrhea? *JPEN.* 1994, 18:4-8.

Roller M, Rechkemmer G, Watzl B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J Nutr* 2004; 134:153–6.

Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 12:855–62.

Russel MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med.* 2000; 11:191-6.

Ruthlein J, Heinze G, Auer IO. Anti-CD2 and anti-CD3 induced T cell cytotoxicity of human intraepithelial and lamina propria lymphocytes. *Gut.* 1992; 33:1626–32.

Saëmann MD, Böhmig GA, Österreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000; 14:2380-2.

Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez J, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:2317-26.

Sánchez de Medina, F., Gálvez, J., Romero, J.A. and Zarzuelo, A. Effect of quercetrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1996; 278:771-779.

Sánchez de Medina, F., Gálvez, J., Romero, J.A. and Zarzuelo, A. Effect of quercetrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences.* 2002; 70:3097-3108.

Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterol.* 2004; 126:1620-33.

Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1994; 1:S35-8.

Schley PD, Field CJ. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr.* 2002; 87:S221-30.

Schmeda-Hirschmann G, Razmilic I, Gutierrez MI, Loyola JI. Proximate composition and biological activity of food plants gathered by Chilean Amerindians. *Econ Bot.* 1999; 53:177-87.

Schultz M, Murno K, Tannock GW, Melchner I, Göttl C, Schwietz H, et al. Effects of Feeding a Probiotic Preparation (SIM) Containing Inulin on the Severity of Colitis and on the Composition of the Intestinal Microflora in HLA-B27 Transgenic Rats. *Clin Diag Lab Immun.* 2004; 11:581-7.

Seidel C, Böehm V, Vogelsang H, Wagner A, Persin C, Gleit M, et al. Influence of prebiotics and antioxidants in bread on the immune system, antioxidative status and antioxidative capacity in male smokers and non-smokers. *Br j Nutr.* 2007; 97:349-56.

Setoyama H, Imaoka A, Ishikawa H, Umesaki Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes Infec.* 2003; 5:115-22.

Shanahan F. Physiological Basis for Novel Drug Therapies Used to Treat the Inflammatory Bowel Diseases: I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288:G417-21.

Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease – therapeutic rationale and role. *Adv Drug Del Rev.* 2004; 56:809-18.

Sharon P, Stenson WF. Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. *Gastroenterol.* 1985; 88:55-63.

Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, et al. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol.* 2003; 47:371-8.

Slinker BK. The Statistics of Synergism. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30:723-31.

Souza MH, Troncon LF, Rodrigues CM, Vianna CF, Onofre PH, Monteiro A, et al. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in an university hospital in the southeastern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2002; 39:98-105.

Souza MM, Belasco AGS, Aguilar-Nascimento JE. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais do estado de mato grosso. *Rev Bras Coloproct.* 2008; 28:324-8.

Stein J, Ries J, Barret K. Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: Possible role of mast cells. *Am J Phys Gastroenterol Liver Phys.* 1998; 274:G203-9.

Stocks JG, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med.* 1974; 47:215-22.

Stucchi A, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol.* 2000; 279:G1298-306.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal Flora in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol.* 2002; 122:44-54.

Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr.* 2005; 24:339-52.

Torres MI, Lorote P, López-Casado MA, Ríos A. A new approach using tissue alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease. *Path Res Pract.* 2007; 203:485-7.

Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Takei Y, et al. Dietary Glycine Prevents Chemical-Induced Experimental Colitis in the Rat. *Gastroenterol.* 2003; 125:775-85.

Valencia FE, Román MOM. The dietary fiber as functional foods. *Vitae.* 2004; 2:12-7.

Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999; 13:1103-8.

Vernia P, Marcheggiano A, Caprilli R, Frieri G, Corrao G, Valpiani D, et al. Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995; 9:309-13.

Victoria CR, Sasaki LY, Nunes HRC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel disease, in Midwestern of São Paulo state, Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2009; 46:20-5.

Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, Ikejima K, Morrow AL, Thurman RG. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J.* 2000; 14:476-84.

Wheeler MD, Thurman RG. Production of superoxide and TNF α from alveolar macrophages is blunted by glycine. *Am J Physiol.* 1999; 277:L952-9.

Willemsen LEM, Koetsier MA, van Deventer SJH, van Tol EAF. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E₁ and E₂ production by intestinal myofibroblasts. *Gut.* 2003; 10:1442-7.

Witaicenis A, Seito LN, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylsculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem Biol Int.* 2010 (*in press*).

Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi AR. Review article: diet and inflammatory bowel disease, epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009; 30:99-112.

Ziemer CJ, Gibson GR. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and futures strategies. *Int Daily J.* 1998; 8:473-9.