



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

SANDRO MAX PINTO MACHADO

**EFEITO DA NARINGINA NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE OXIDATIVO NA
DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2023

SANDRO MAX PINTO MACHADO

**EFEITO DA NARINGINA NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE OXIDATIVO NA
DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Morfologia. Área de concentração: Distúrbios morfofuncionais associados ao sistema nervoso.

Orientadora: Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Coorientadoras: Dra. Dainesy Santos Martins e Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

M1e

Machado, Sandro MaxPinto.

Efeito da naringina na inflamação e no estresse oxidativo na Doença de Crohn experimental induzida por ácido acético em camundongos / Sandro Max Pinto machado Machado. – 2023.

89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Mestrado em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2023.

Área de concentração: Distúrbios morfofuncionais associados ao sistema nervoso.

Orientação: Profa. Ma. Profa. Dra. Antoniella Souza GomesDuarte.

Coorientação: Profa. Dra. Dra.Dainesy Santos Martins e Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.

1. Distúrbios morfofuncionais. 2. Efeito da naringina na inflamação. 3. Doença de Crohn Experimental. 4. Sistema nervoso. I. Título.

CDD 370.7

SANDRO MAX PINTO MACHADO

EFEITO DA NARINGINA NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE OXIDATIVO NA
DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Morfologia. Área de concentração: Distúrbios morfofuncionais associados ao sistema nervoso.

Aprovado em 28/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Kayse Najara Matos (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Conceição da Silva Martins (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, que em sua infinita sabedoria repartiu conosco seu conhecimento e outras tantas bênçãos, e permitiu que uma oportunidade se tornasse realidade, por estar presente sempre que precisei e acima de tudo mostrou que seus planos sempre foram maiores que os meus e que tudo era possível, e que sem ele nada poderia ser feito.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Com a junção de muitos materiais se faz uma construção, mas sem o talento dos construtores nada se faria, assim vejo esta trajetória, e agora vamos falar de talentos em forma de agradecimentos.

Começo agradecendo a professora Ana Kleiber que me recebeu na iniciação científica e que representa os queridos professores da graduação em nutrição na Universidade Federal do Tocantins (UFT) como sendo incentivadores incondicionais da ciência e do conhecimento.

Aos meus familiares e em especial as minhas tias paternas sendo, Antônia Machado Ximenes, professora aposentada da Universidade Federal do Ceará (UFC) no curso de enfermagem que sempre me inspira por sua dedicação e resiliência, Eudócia Machado da Silva, desenhista técnica de arquitetura por sua prestatividade e amabilidade, Maria Arlete Machado da Silva pedagoga por seu apoio, conselhos e orientações. Também ao meu primo Rafael Machado Simão, engenheiro elétrico, e que neste momento, é acadêmico de medicina na Universidade Federal do Ceará, por me direcionar a área da pesquisa científica.

Gratidão pela compreensão fornecida sem questionamentos ou ressalvas, acreditando sempre em mim e em minha capacidade, respeitando todas as escolhas fiz.

Gratidão a Josi Martins que me recebeu no departamento de Morfologia da UFC, no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (Nempi) sendo uma professora e orientadora formidável onde através dela pude estabelecer parceria acadêmica com todos os técnicos e colaboradores que compõem o Nempi a saber: Junior, Ludmila, Laíssa e Ivan, bem como aos amigos estudantes André, Matheus, Luana, Keyse, Andreia, Ismael, Lucianny, Nayane e Cezarnildo, dentre tantos outros.

Gratidão os técnicos e colaboradores do Biotério Central da UFC que sem seus cuidados e orientações não seria possível realizar este trabalho.

Gratidão aos meus irmãos em especial ao José Samir Machado da Silva, que foi um grande incentivador, ao me apoiar e se tornar um parceiro de todas as horas, e entendendo tantos momentos de ausência.

Gratidão aos amigos mais chegados, aqueles que sofreram as angústias da superação entre eles estão: Margarida Calheiros, Jéssica Lima, Killya Santos, Leandra Silva, Dolores Ezequiel, Poliana Pereira, Adriana Orsi, Andiovane Anselmo, Jordana Cavalcante, Zilda Almeida, André Ribeiro e Antônio Ximenes por estarem sempre ao meu lado, com apoio incondicional e iluminando um caminho tão novo pra mim.

Gratidão aos professores da Universidade Federal do Ceará que compõem uma equipe extraordinária nos levando aos caminhos do conhecimento: Dr. Gilberto Cerqueira, Dra. Ana Beatriz, Dra. Virginia Carmona, e em especial minhas coorientadoras Dra. Dainesy Martins e Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro bem como minha estimada orientadora professora Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte que transmite conhecimento de uma forma tão acessível e sempre disponível, em sua conduta exemplar e amabilidade indiscutível.

Gratidão aos meus filhos Giulia e Guilherme Machado por me mostrarem que mesmo em meio a percalços e dificuldades é preciso seguir.

Gratidão, in memoriam, a Lívia Cristina Araújo uma companheira que mostrou que a vida é mais do que os dias que aqui ficamos.

Gratidão aos meus pais pelo dom da vida concedido a mim, simplesmente amo vocês, in memoriam José Sandoval Machado e Maria Vilacy Pinto Machado. Gratidão a tantos outros que de forma indireta esteve presente, a saber parentes amigos e servidores.

O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo (Mahatma Gandhi).

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) representam um grupo de afecções intestinais inflamatórias crônicas idiopáticas. A etiologia dessas doenças não é completamente conhecida, mas há uma relação com fatores genéticos, ambientais e alterações na microbiota intestinal. Entretanto, as duas principais categorias de DII são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (UC), que apresentam características clínico-patológicas sobrepostas e outras bem diferentes. A DC pode acometer todo o trato gastrointestinal e apresenta infiltração transmural e níveis elevados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Ela afeta as camadas que circundam os órgãos ocos do tubo digestório intestinal, afetando a região terminal do íleo, ceco, cólon e região perianal, muitas vezes resultando em granulomas e o desenvolvimento de fístulas. As DII não têm cura, e os tratamentos visam apenas ao controle dos sintomas. As alterações na permeabilidade da mucosa intestinal são complicações biológicas e fisiológicas causadas pela DC. As células epiteliais que formam a barreira entre o corpo e o microambiente intraluminal são altamente seletivas. No entanto, durante a inflamação, macromoléculas como antígenos bacterianos ou fecais podem fluir em quantidade acima do normal. O Ministério da Saúde, por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), incentiva a oferta de Acupuntura, Homeopatia, Fitoterapia, Hidroterapia e Medicina Antroposófica no Sistema Único de Saúde (SUS). Buscar o desenvolvimento de novas estratégias e agentes terapêuticos é essencial para o tratamento de ambas as patologias. A Naringina é um composto fitoterápico químico que pertence às flavonas, conhecida como 4, 5, 7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicósido. Foi descoberta por De Vry em 1857, em flores de *Citrus paradisi* (Toranja). A Naringina apresenta propriedades farmacológicas, como atividades anti-osteoporóticas, anticâncer, anti-apoptóticas e anti-inflamatórias, além de atuar na síndrome metabólica e em distúrbios do sistema nervoso central, incluindo distúrbios neurológicos. É uma substância com grande potencial farmacológico. Neste estudo, induzimos a DC em animais. Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal (i.p) com quetamina (60mg/kg) e xilazina (5mg/kg) e desafiados com ácido acético (10mg/animal) durante três dias consecutivos. Grupos adicionais receberam ácido acético (AA 8%)(10mg/animal) mais Naringina nas concentrações de 200 mg/kg, 100 mg/kg e 50 mg/kg. Após o protocolo de indução de DC por ácido acético (AA 8%), os animais foram eutanasiados 12 horas após a última aplicação. Os segmentos de cólon dos camundongos foram coletados para a análise dos seguintes parâmetros: macroscopia, microscopia, GSH, MDA, TNF- α e IL-1 β . O extrato de Naringina reduziu significativamente a lesão macroscópica e microscópica induzida pelo ácido acético (AA 8%). Verificamos neste estudo que a Naringina na concentração de 100 mg/kg preveniu a depleção nos níveis de GSH, reduziu os níveis de MDA. Além disso, a Naringina reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , revertendo o efeito do ácido acético. Portanto, a Naringina demonstrou um efeito anti-inflamatório e antioxidante no modelo de Doença de Crohn.

Palavras-chave: Doença de Crohn; Atividade antioxidante; Flavonóides; Atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) represent a group of chronic idiopathic inflammatory intestinal disorders. The etiology of these diseases is not fully understood, but there is a relationship with genetic, environmental factors, and alterations in the intestinal microbiota. However, the two main categories of IBD are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), which have overlapping clinical and pathological features and some distinct characteristics. CD can affect the entire gastrointestinal tract and exhibits transmural infiltration and elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). It affects the layers surrounding the hollow organs of the intestinal digestive tube, affecting the terminal ileum, cecum, colon, and perianal region, often resulting in granulomas and the development of fistulas. IBDs are incurable, and treatments aim only to control symptoms. Alterations in intestinal mucosal permeability are biological and physiological complications caused by CD. The epithelial cells that form the barrier between the body and the intraluminal microenvironment are highly selective. However, during inflammation, macromolecules such as bacterial or fecal antigens may flow in quantities above normal. The Ministry of Health, through the National Policy of Integrative and Complementary Practices (NPICP), encourages the provision of Acupuncture, Homeopathy, Phytotherapy, Hydrotherapy, and Anthroposophic Medicine in the Unified Health System (SUS). Seeking the development of new strategies and therapeutic agents is essential for the treatment of both pathologies. Naringin is a chemical phytotherapeutic compound that belongs to flavones, known as 4, 5, 7-trihydroxy-flavanone-7-rhamnoglucoside. It was discovered by De Vry in 1857 in *Citrus paradisi* (Grapefruit) flowers. Naringin presents pharmacological properties such as anti-osteoporotic, anticancer, anti-apoptotic, and anti-inflammatory activities, as well as acting on metabolic syndrome and central nervous system disorders, including neurological disorders. It is a substance with great pharmacological potential. In this study, we induced CD in animals. The animals were previously anesthetized intraperitoneally (i.p) with ketamine (60mg/kg) and xylazine (5mg/kg) and challenged with acetic acid (10mg/animal) for three consecutive days. Additional groups received acetic acid (10mg/animal) plus naringin at concentrations of 200 mg/kg, 100 mg/kg, and 50 mg/kg. After the induction protocol of CD by acetic acid, the animals were euthanized 6 hours after the last application. Colon segments of mice were collected for the analysis of the following parameters: macroscopy, microscopy, GSH, MDA, TNF- α , and IL-6. Naringin extract significantly reduced acetic acid-induced macroscopic and microscopic lesions. Naringin at a concentration of 100 mg/kg prevented GSH depletion, reduced MDA levels, and decreased neutrophil infiltration. Furthermore, naringin reduced levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β , reversing the effect of acetic acid. Therefore, naringin demonstrated an anti-inflammatory and antioxidant effect in the Crohn's disease model.

Keywords: Crohn's Disease; Antioxidant Activity; Flavonoids; Anti-Inflammatory Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Mucosa gástrica e barreiras defensoras	16
Figura 2	- Estrutura molecular da Naringina	32
Figura 3	- Modelo de indução da doença de Crohn por ácido acético	36
Figura 4	- Parâmetros de avaliação	38
Figura 5	- Aspecto macroscópico do cólon de camundongos tratados com Naringina	44
Figura 6	- Avaliação do Efeito da Naringina sobre o comprimento do cólon em camundongos submetidos a um modelo experimental de colite induzida por ácido acético 8% (AA 8%)	45
Figura 7	- Avaliação microscópica da atividade inflamatória	47
Figura 8	- Fotomicrografias do cólon de camundongos	48
Figura 9	- Efeito do tratamento com Naringina aumenta os níveis de glutathiona reduzida (GSH)	49
Figura 10	- Efeito do tratamento com Naringina reduz os níveis de substâncias reativas (TBARS) no cólon de camundongos	50
Figura 11	Determinação dos nos níveis teciduais de TNF- α	51
Figura 12	Determinação dos nos níveis teciduais de IL-1 β	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Efeito da Naringina sobre os escores macroscópicos totais de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%)	19
Tabela 2	- Efeito da Naringina sobre os escores microscópicos de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%), segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995	39
Tabela 3	- Escore de Inflamação por Análise Microscópica	40
Tabela 4	- Escores macroscópicos totais de inflamação no cólon	44
Tabela 5	- Escores dos nos níveis teciduais de TNF- α	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEC	- Escherichia coli invasiva e aderente
Au@CT	- Nanopartículas de ouro Biossintetizado com Extrato de Alga Cystoseira tamariscifolia
CU	- Colite ulcerativa
DC	- Doença de Crown
CT	- Cystoseira tamariscifolia
DII	- Doença inflamatória intestinal
DEXA	- Dexametasona
ERO	- Espécies reativas do oxigênio
GRAS	- Generally Recognizedas Safe
GSH	- Glutathione Reduzida
IEC	- Células epiteliais intestinais
IL-1 β	- Interleucina-1 beta
LRR	- Leucine-rich Repeat
mAbs	- Anticorpos monoclonais
MDA	- Malondialdeido
NOD2	- Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2
TGI	- Trato gastrointestinal
TNF- α	- Necrose tumoral alfa
MDP	- Muramil Dipeptídeo
GWAS	- Disease Genome-wide Association Studies
PAMP	- Padrão molecular associado a patógeno
PGN	- Peptidoglicano
SNPs	- Polimorfismos de nucleotídeo único

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Anatomia do trato gastrointestinal (TGI)	16
2.1.1	Doenças Inflamatórias Intestinais DII	17
2.1.2	Prevalência das DII	17
2.1.3	Medicamentos para DII	19
2.1.4	Frequência das DII	19
2.2	Microbiota do trato gastrointestinal (TGI)	22
2.3	Fatores genéticos nas DII	24
2.4	Fatores ambientais nas DII	26
2.5	Mecanismos do estresse oxidativo na doença inflamatória intestinal e o Potencial terapêutico dos antioxidantes	26
2.6	Tratamento convencional	28
2.7	Plantas medicinais na bioprospecção de novos compostos terapêuticos	29
2.8	Diversidade e potencial terapêutico dos metabolitos secundários de plantas	30
2.9	Potencial terapêutico da Naringina	31
3.0	RELEVANCIA E JUSTIFICATIVA	33
4.0	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral	34
4.2	Objetivo específico	34

5.0	AMATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1	Aspectos éticos	34
5.2	Animais	35
5.3	Drogas	35
5.4	Obtenção de material vegetal	35
5.5	Modelo de Doença de Crohn (DC) experimental induzido pela administração do Ácido Acético (AA 8%) em camundongos	36
5.6	Protocolo experimental	37
5.6.1	Grupos experimentais	37
5.7	Procedimentos de eutanásia	38
5.8	Parâmetros avaliados	38
5.8.1	Avaliação macroscópica	39
5.8.2	Cumprimento do cólon	40
5.8.3	Avaliação histológica da mucosa gástrica dos camundongos	40
5.9	Avaliação da atividade dos antioxidantes	41
5.9.1	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)	41
5.9.2	Determinação dos níveis de malondildeido (MDA)	41
5.9.3	Determinação dos Níveis das Citocinas IL-1beta e TNF-α	42
5.10	Análise Estatística	43
6.0	RESULTADOS	43
6.1	Avaliação macroscópica das lesões no cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	43
6.2	Avaliação do comprimento do cólon de camundongos tratados	

	com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	45
6.3	Avaliação microscópica do cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	46
6.4	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	48
6.5	Determinação dos níveis de malodialdéido (MDA) no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	50
6.6	Determinação dos níveis teciduais de TNF-a no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	51
6.7	Determinação dos nos níveis teciduais de IL-1β no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)	52
7.0	DISCUSSÃO	52
8.0	CONCLUSÃO	56
9.0	REFERÊNCIAS	57
10	ANEXO 01	74

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são consideradas inflamações crônicas e recorrentes de origem idiopática que afetam o trato gastrointestinal. Sua causa pode ser resultado de uma complexa interação entre fatores ambientais, suscetibilidade genética, disfunção do microbioma intestinal e uma resposta imunitária inadequada. Duas doenças estão incluídas no grupo das DII: a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) (YUAN et al., 2022). Estudos epidemiológicos sugerem que a incidência da DC está aumentando no Brasil, passando de 0,24 por 100.000 pessoas em 1986-1990 para 24,1 por 100.000 pessoas em 2014 corroborando com uma tendência de crescimento no número de casos (FORTES et al., 2020).

A doença de Crohn, assim como a colite ulcerativa, pode se manifestar em qualquer parte do trato digestório, mas afeta principalmente o íleo terminal e o cólon, atingindo as camadas do tecido gastrointestinal e levando à quebra da barreira epitelial. Como resultado dessas alterações, as DII estão associadas a um risco de estenoses, fístulas, abscessos, lesões intestinais e aumentam o risco de câncer colorretal (D'HAENS et al., 2021). A CU, por outro lado, afeta principalmente o cólon e o reto, manifestando sintomas como diarreia frequente e constante, presença de muco, sangue e pus nas fezes, sangramento anal, cólicas abdominais, perda de apetite, perda de peso e anemia (D'HAENS et al., 2021).

Um dos fatores que parece estar fortemente associado às DII é o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), (SREEVALSAN; SAFE, 2013). Acredita-se que o estresse oxidativo induzido pelas ERO intensifica a resposta inflamatória, possivelmente através de um mecanismo de retroalimentação positiva, resultando em um aumento na produção de ERO e subsequente lesão tecidual (REZAI; PARKER; ABDOLLAHI, 2007; TOMASELLO et al., 2016). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias também estão em níveis elevados nessa patologia, sendo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) um dos principais alvos da terapia medicamentosa (LOUIS et al., 2023).

A terapêutica convencional visa induzir e manter a remissão, minimizar as complicações e manifestações da doença e otimizar a qualidade de vida dos pacientes. Entre as terapias disponíveis, os agentes anti-TNF α , como o infliximab

e o adalimumab, são comumente usados para suprimir a inflamação e promover a cicatrização da mucosa. No entanto, devido ao entendimento incompleto da patogênese das DII, a cura da patologia ainda não é viável, tornando o acompanhamento dos pacientes ao longo da vida indispensável e resultando em desconforto físico considerável e ônus financeiro significativo (ZHAO et al., 2021). O uso prolongado desses medicamentos também pode causar complicações graves e efeitos colaterais indesejados, incluindo distúrbios gastrointestinais, imunossupressão sistêmica, toxicidade renal, diabetes, ganho de peso, hipertensão e aumento do risco de infecções, além de desencadear outros eventos adversos, aumentando o risco de infecções oportunistas ou graves e distúrbios linfoproliferativos (LOUIS et al., 2023; MENYIY et al., 2022).

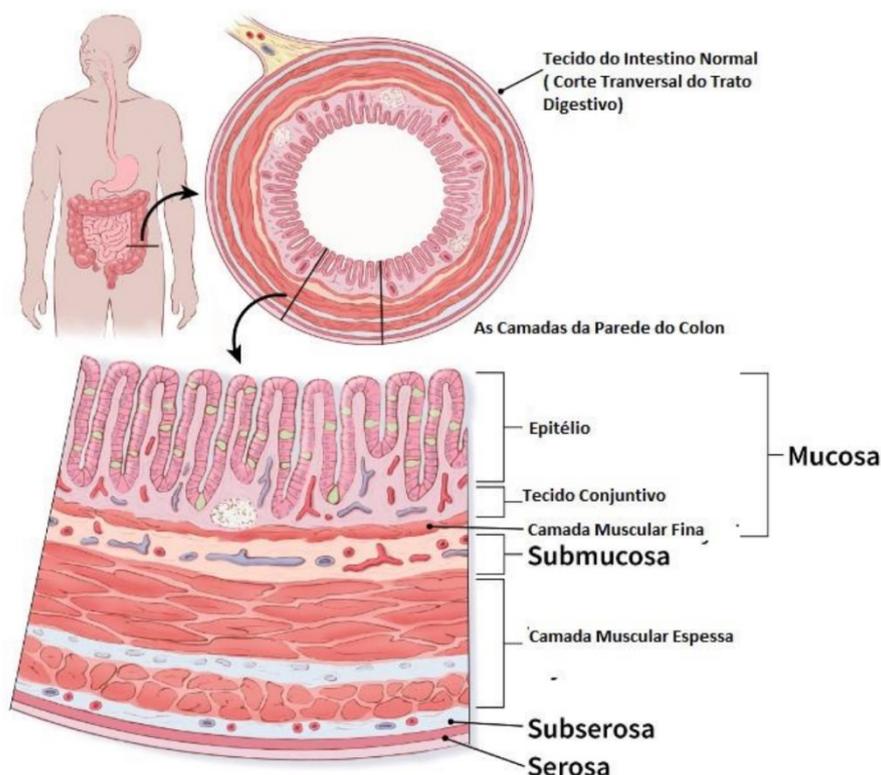
Diante desses fatores, o uso de plantas medicinais constitui uma abordagem promissora, pois possuem uma diversidade de compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, imunorreguladoras e antioxidante. (CONNO B. et al., 2022). Estudos e pesquisas demonstraram que produtos naturais podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibir enzimas e modular a resposta imune, contribuindo assim para a homeostase e inibição das doenças intestinais inflamatórias crônicas (MENYIY EL. N. et al., 2022).

Nesse contexto, a Naringina, um flavonoide encontrado em tomates, toranjas e frutas cítricas relacionadas, tem despertado considerável interesse devido à sua ampla gama de atividades biológicas, que englobam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (CAO et al., 2018; LI et al., 2018; OKUYAMA et al., 2018). Além disso, a Naringina demonstra potencial efeito protetor no desenvolvimento da aterosclerose, colite e carcinomas, bem como no tratamento e prevenção de diversos distúrbios, tais como obesidade, doenças cardíacas, diabetes e síndrome metabólica (CAO et al., 2018; HEIDARY et al., 2020; KUMAR et al., 2018; SUI et al., 2018; ZHANG et al., 2018; ZHAO et al., 2020).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia do trato digestório

Figura 1- Camadas da Parede do Cólon Intestinal Normal.



Fonte: (American Cancer Society, 2020).

O cólon e o reto fazem parte do sistema digestivo, também conhecido como sistema gastrointestinal (GI). A maior parte do intestino grosso consiste no cólon, um tubo muscular que mede aproximadamente 1,5 m de comprimento no ser humano. As partes do cólon são identificadas de acordo com a trajetória do alimento (ACS, 2020).

O cólon ascendente corresponde à primeira seção e começa com uma bolsa chamada ceco, por onde o alimento não digerido proveniente do intestino delgado ingressa. Em seguida, ele segue para cima no lado direito do abdômen. O cólon transverso é a segunda seção e atravessa o corpo da direita para a esquerda. A terceira seção, o cólon descendente, desce pelo lado esquerdo do abdômen. O cólon sigmoide é a quarta seção, possui uma forma em "S" e representa a parte final do cólon. O cólon sigmoide se conecta ao reto, que por

sua vez se liga ao ânus. Quando essas estruturas mantêm sua integridade preservada em termos de tecido e função, elas desempenham suas atividades normalmente (ACS, 2020).

2.1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)

As doenças inflamatórias intestinais, conhecidas em inglês como Inflammatory Bowel Disease, são inflamações crônicas do trato gastrointestinal (TGI). Seus sintomas, incluindo dor epigástrica, diarreia, tenesmo, presença de sangue e/ou muco nas fezes e quadros de vômito, manifestam-se de forma recorrente e podem variar de acordo com a gravidade e local da inflamação (BRITO, 2020; BARROS et al., 2020; STROBER; FUSS; MANNON, 2007).

Diversos distúrbios ocasionados pela DII são percebidos pelos pacientes e incluem alterações no Sistema Nervoso Entérico (SNE), aumento na percepção sensorial e na motilidade intestinal, comprometendo seriamente a função dos órgãos que compõem o sistema digestório. Como exemplo, temos recorrentes incontinências e urgência fecal (GEBOES; COLLINS, 2002).

Problemas no transporte intracelular, apoptose celular e defeitos nos complexos juncionais apicais também afetam a permeabilidade intestinal. O epitélio intestinal possui uma grande quantidade de complexos juncionais celulares, é extremamente justaposto e contém uma variedade de mecanismos. Suas junções celulares são responsáveis por manter o epitélio de revestimento interno do trato gastrointestinal (TGI) ocluído, controlando a passagem de solutos e solventes que ali transitam (MANKERT; SCHULZKE, 2007).

A patogênese destas doenças ainda não está completamente elucidada; no entanto, diversos estudos epidemiológicos e genéticos demonstram a importância da microbiota, fatores genéticos e ambientais na influência do surgimento e gravidade das DII (FERREIRA et al., 2021; ANANTHAKRISHNAN et al., 2017; ABRAHAM; CHO, 2009).

2.1.2 Prevalência das DII

As DII afetam cerca de 1,5 milhões de indivíduos no continente americano, 2,2 milhões no continente europeu e 1,2 milhões no Brasil, de acordo com o Data

SUS (2020). As taxas de incidência e prevalência evoluíram a uma média de 14,87% ao ano, atingindo cerca de 100 casos para cada 100 mil habitantes. Em países desenvolvidos, as DII podem chegar a 1% de prevalência. Portanto, milhares de pessoas ao redor do mundo são acometidas por esse problema de saúde pública (AGÊNCIA BRASIL, 2022; ANANTHAKRISHNAN, 2015). Logo, é de extrema importância determinar o grau de severidade ou atividade de ambas as doenças, uma vez que a gravidade, duração e a localização da doença são importantes na resposta ao tratamento oferecido (CARUSO, 2014).

A colonoscopia consiste em uma técnica capaz de visualizar de forma objetiva o cólon, permitindo o diagnóstico de afecções que acometem o intestino grosso até a parte final do intestino delgado (íleo terminal). Este recurso começou a ser utilizado a partir de 1970 e destaca-se como um dos métodos mais eficientes de investigação das doenças colorretais, incluindo as Doenças Inflamatórias Intestinais, sendo os dois principais tipos a DC e a CU. A colonoscopia possui vantagens sobre outros métodos de investigação, pois possibilita a observação da mucosa colônica e, muitas vezes, do íleo terminal, em tempo real e de forma direta, além de permitir procedimentos durante o exame, como a biópsia (ROCHA et al., 2019).

O estudo histológico nas biópsias comprova o diagnóstico diferencial entre DC e CU, além de possibilitar o diagnóstico de displasia e câncer nos casos de colite de longa evolução. A coleta de material para análise histológica de todos os segmentos é mandatória, incluindo os macroscopicamente normais, pois a endoscopia digestiva na DII desempenha um papel importante em relação ao diagnóstico, prognóstico, vigilância do câncer, terapia e às perspectivas (LEIGHTON et al., 2006).

Com o intuito de auxiliar no diagnóstico da DC, Daperno et al. (2004) criaram e validaram um escore endoscópico simplificado para a avaliação da DC. Para a construção deste escore, foram levadas em consideração quatro variáveis: úlceras, proporção da superfície coberta pelas úlceras, proporção de superfície coberta por outras lesões e estenoses. Cada variável foi classificada em uma pontuação que varia de 0 a 3 nos diferentes segmentos, de acordo com os seguintes critérios: as úlceras foram classificadas conforme o seu tamanho (diâmetro de 0,1-0,5 cm, 0,5-2 cm ou >2 cm); a proporção da superfície ulcerada foi expressa em porcentagem (30%), assim como a proporção da extensão da

superfície afetada (75%), e as estenoses foram avaliadas pelo número e pela possibilidade de serem ultrapassadas ou não pelo colonoscópio.

Tabela 01- Definições do Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn.

Variável	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Tamanho das úlceras	-	Úlceras aftóides 0,1 – 0,5 cm	Úlceras grandes 0,5 – 2cm	Úlceras maiores >2cm
Superfície úlceraada	-	<10%	10-30	>30%
Superfície afetada	-	<50%	50-75%	>75%
Presença de estenoses	-	Única, pode ser ultrapassada	Múltiplas, podem ser ultrapassadas	Não podem ser ultrapassadas

Fonte: (FLORES, C. 2008)

2.1.3 Medicamentos para DII

A conduta medicamentosa para esses pacientes é complexa e envolve o uso de várias classes de fármacos. Os medicamentos mais utilizados incluem os derivados do ácido 5-aminossalicílico, os corticosteroides, os agentes imunomoduladores e, mais recentemente, os agentes biológicos (CARDOZO; SOBRADO, 2015).

Atualmente, o SUS oferece sete medicamentos para o tratamento da doença de Crohn, que são: ciclosporina, azatioprina, metotrexato, sulfassalazina, mesalazina, infliximabe e adalimumabe. Compete aos gestores estaduais e municipais estruturar a rede assistencial, definir os serviços de referência e estabelecer os fluxos para o atendimento dos indivíduos com a doença em todas as etapas do tratamento (BRASIL, 2017).

O Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) utilizado pelo SUS tem o objetivo de estabelecer os critérios de diagnóstico e tratamento de cada doença, bem como as doses e medicamentos adequados para cada caso. Também são avaliados os mecanismos para o monitoramento clínico em relação à efetividade do tratamento e a supervisão de possíveis efeitos adversos, orientando médicos, enfermeiros e demais profissionais de saúde sobre como realizar o diagnóstico, o tratamento e a reabilitação dos pacientes. Isso é realizado utilizando as Redes de Atenção à Saúde, que contam com sistemas

logísticos e de apoio necessários para garantir a oferta de ações de promoção, detecção precoce, diagnóstico, tratamento e cuidados paliativos e integrais por meio da rede pública de saúde (BRASIL, 2017).

2.1.4 Frequência das DII

A idade média para o aparecimento da doença de Crohn está entre os 20-30 anos, enquanto para a colite ulcerativa é entre os 30-40 anos, porém estas doenças também podem aparecer em crianças (GASPARINI, 2018). Os casos de DII pediátrica abrangem 25% da população mundial (LIMA; SPERIDIÃO, 2021; COSNES et al., 2011). Apesar da variação aparentemente irrelevante no Brasil (14,87%/ano), é importante considerar a subnotificação aos indivíduos não diagnosticados, haja visto a queda da qualidade de vida desses pacientes em um período da vida produtiva e o elevado custo aos sistemas de saúde para tratar recidivas e agravos relacionados a essas doenças. É relevante pensar estratégias de informação, prevenção e tratamento que sejam sustentáveis (PASQUALOTTO et A., 2023).

Num processo inflamatório normalmente os antígenos presentes no lúmen desencadeiam uma resposta inflamatória controlada que rapidamente desaparece após a erradicação do patógeno. Nas DII, em contrapartida, ocorre um desbalanço no processo inflamatório, resultando em um estado crônico de inflamação (BRITO, 2020; PODOLSKY, 2002).

A combinação de fatores genéticos e ambientais iniciam alterações na função da barreira epitelial, permitindo que micro-organismos e antígenos migrem do lúmen para a parede do intestino. Caso o organismo não tenha sido capaz de resolver esta inflamação aguda, se desenvolverá uma inflamação crônica, envolvendo uma ativação mais ampla do sistema imunológico (BRITO et Al., 2019).

Alguns grupos celulares, como células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos e células T atuam produzindo citocinas que mantêm este processo inflamatório crônico do TGI (GONÇALVES et Al., 2022; NEURATH, 2014). Ambas as doenças possuem um amplo espectro de sintomas que as caracterizam como condições debilitantes, tendo uma influência direta na qualidade de vida dos indivíduos que as possuem. Sintomas como dores

abdominais, vômitos, diarreias graves, sangramentos anais, anemia e perda de peso são recorrentes nos pacientes de DII (BARROS et al.,2020; RANDHAWA et al., 2014).

Atualmente não há uma cura para estas doenças, e sim tratamentos que amenizam os sintomas. Estes podem atuar na redução da inflamação, a exemplo do uso de anti-inflamatórios e imunossuppressores, além disso, estão incluídas mudanças na dieta, transplante de microbiota fecal, remoção de fatores de risco e em alguns casos mais graves é necessária a remoção cirúrgica de porções degradadas do intestino (BORGES et al, 2021; CASTRO; FERREIRA, 2021; LANGE; BARRETT, 2015).

Apesar de estarem incluídas no mesmo grupo clínico, a doença de Crohn e colite ulcerativa possuem diversas diferenças, que vão desde seu local de ação no intestino, histopatologia, endoscopia, sintomatologia, até o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias envolvidas na imunopatogênese da doença (TONTINI et al., 2015).

Levando em consideração o conjunto destas diferenças, sugere-se que a DC e a CU possuem vias patogênicas diferentes (WIJMENGA, 2005). A colite ulcerativa é tipicamente associada à região do cólon, mas quase sempre acomete o reto (SANDS; KAPLAN, 2007). Sua análise histopatológica restringe a inflamação às camadas mucosa e submucosa do intestino grosso, com erosões e úlceras superficial. Está relacionada a hematoquezia ou hemorragia retal e presença de muco e pus (DANESE; FIOCCHI, 2011; LANGE; BARRETT, 2015).

Os sintomas mais comuns nas DII incluem dor abdominal e diarreia com sangue. Em aproximadamente 10% dos casos não é possível diferenciar a CU e DC no momento do diagnóstico (ABRAHAM; CHO, 2009). A doença de Crohn, por outro lado, pode afetar o TGI inteiro, contudo, as áreas mais comumente afetadas são a região terminal do íleo, ceco, cólon e região perianal (HA; KHALIL, 2015b).

A histopatologia da DC mostra uma inflamação transmural da parede intestinal que afeta o tecido de forma salteada, ou seja, com a presença de segmentos normais e regiões afetadas. Além disso, é caracterizada pelo espessamento da parede do cólon, assim como a presença de granulomas, ulcerações, fibrose e fissuras (ABRAHAM; CHO, 2009). A DC também está

relacionada a complicações, como estenose, formação de abscessos, fístulas, estomatite, obstruções e câncer de cólon (ZHANG; LI, 2014).

Na doença de Crohn, há um aumento na população de *Escherichia coli* (*E.coli*) nas regiões do íleo e cólon (MARTINEZ-MEDINA et al., 2006). Foi encontrada também uma linhagem invasiva e aderente de *Escherichia coli* (AIEC). Esta, por sua vez, é uma bactéria capaz de aderir e invadir as células epiteliais intestinais (IEC). Sua sobrevivência e replicação irão ocorrer dentro do fagolisossoma, organela que se forma da fusão de um fagossomo e lisossomo, de macrófagos. São bactérias patogênicas que atuam estimulando as vias imunológicas do hospedeiro (PALMELA et al., 2017).

As interleucinas tem um papel muito importante nas DII, pois descobriu-se que o agravamento do quadro de DC está ligado a produção de interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN-gama), enquanto a CU é agravada pela produção de IL-13(BOUMA; STROBER, 2003). Esses dados elucidam a importância do processo inflamatório no desenvolvimento e agravamento das DII, devido a gravidade da DC, a importância de novas descobertas, no presente estudo corroboramos com novos achados para DC em modelo animal.

2.2 Microbiota do trato gastrointestinal (TGI)

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) humano representa uma das maiores interfaces de comunicação entre o organismo e o ambiente externo (250–400 m²) (BENGMURK, 1998). Nela estão presentes uma variedade de microorganismos, como vírus, fungos e bactérias; estas últimas coexistem de maneira simbiótica envoltas pela estrutura anatômica e funcional.

A TGI pode ser influenciada por diversas condições, como alimentação, ambiente, condições de saúde, exposição a medicamentos e outras substâncias ao longo da vida. É relevante salientar que as fases iniciais da vida são um ponto chave para o desenvolvimento de funções imunológicas primárias que dependem da colonização dessa microbiota (ALVAREZ et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2021; MORAIS et al., 2020; ECKBURG et al., 2005).

A microbiota intestinal humana é formada por aproximadamente 1150 espécies bacterianas principais, e cada indivíduo pode apresentar cerca de 160 destas espécies (UBEROS, 2020; QIN et al., 2010). Inicialmente, o número

estimado de micro-organismos no TGI de um adulto era de 10^{14} . Este valor excederia em 10 vezes o número de células que compõem o corpo humano (COSTA, ROCHA, 2021).

Atualmente, os estudos mencionam a presença de trilhões de microrganismos (GABRIELA et al., 2023; MARIANA et al., 2021), coexistindo de forma equilibrada e diversificada em cada indivíduo. Embora não haja uma padronização precisa do que seria o ideal em proporções de cepas bacterianas, sabe-se que a presença de espécies dos filos Bacteroidetes, Clostridium, Bifidobacterium e Firmicutes é o esperado dentro do microbioma normal (GANDRA et al., 2021; JANDHYALA et al., 2015; GILL et al., 2006).

Diversos pacientes acometidos com a DC mostraram que uma dieta que elimina e/ou restringe a ingestão de alimentos lácteos, proteína animal, gordura animal, emulsificantes e outros aditivos alimentares artificiais pode contribuir para a remissão da DC (SANDEFUR K et al., 2019). Logo, a intervenção dietética traz bons resultados em pacientes com DC ativa, tanto do grupo de pacientes recém-diagnosticados como em pacientes com DC estabelecida que não responderam bem à terapia padrão. Estes apresentaram taxas de remissão que variam de 78,7% a 90,4%, respectivamente. O auxílio do tratamento com intervenção dietética usando alimentos naturais também é bem tolerado por pacientes com DC, com excelente adesão (SANDEFUR K et al., 2019).

Estabelecer uma dieta com alimentos integrais fontes de fitoterápicos, vegetais integrais e de proteína vegetal mostra também um resultado benéfico na manutenção da remissão da DC. O acompanhamento de 22 pacientes, em ambiente controlado, demonstrou uma taxa de remissão de 92% em pacientes com DC que aderiram a uma dieta semi-vegetariana e integral por dois anos, em comparação com apenas 25% em pacientes que continuaram com uma dieta onívora padrão (SANDEFUR et al., 2019). Uma abordagem dietética de alimentos integrais focada em fontes de nutrição à base de plantas pode ser capaz de fornecer o mesmo benefício terapêutico que tratamentos medicamentosos (SANDEFUR K. et al., 2019).

Em condições fisiológicas, a microbiota intestinal saudável se encontra numa relação simbiótica com o hospedeiro. Esta relação é caracterizada pelo benefício mútuo dos envolvidos (ALVAREZ et al., 2022; BÄCKHED et al., 2005). Algumas das funções da microbiota que promovem o bem-estar do hospedeiro

são: a) Regulação do sistema imune (CAMPOS, 2018; GENSOLLEN et al., 2016); b) Modulação da barreira intestinal (ANDRADE, 2023; NATIVIDAD; VERDU, 2012); c) Proteção contra patógenos (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016); d) Digestão dos alimentos e metabolismo energético do hospedeiro (ALEJANDRO, 2022; BESTEN et al., 2013).

A disfunção na interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro caracteriza um processo conhecido como disbiose. Ele pode ser causado por antígenos, micro-organismos patogênicos, agentes químicos ou radiações (ALMEIDA, 2021). Assim, a composição, atividade metabólica e localização da microbiota do hospedeiro encontram-se alteradas (ALMEIDA, 2021). Neste contexto, bactérias patogênicas aumentam em detrimento daquelas consideradas benéficas ao hospedeiro, a espessura da mucosa é reduzida, podendo haver enfraquecimento das zonas de oclusão do intestino e aumento de permeabilidade intestinal (VINHA ET AL., 2023). Com isso, alguns micro-organismos patogênicos podem colonizar o intestino, provocando diversas categorias de distúrbios (CHANG; LIN, 2016).

As disfunções intestinais estão diretamente relacionadas às doenças gastrointestinais; entre elas estão as doenças inflamatórias intestinais (LUPO et al., 2023; ROUND; MAZMANIAN, 2009). Diversos estudos já foram realizados para analisar a composição da microbiota intestinal, em segmentos inflamados e não inflamados do intestino, de pacientes com a doença de Crohn e colite ulcerativa (ROSSENE; COY, 2019). Os pacientes afetados por estas doenças apresentavam uma microbiota significativamente diminuída, instável e menos diversa em relação aos adultos saudáveis (JOOSSENS ET AL., 2011; ANDOH et al., 2011).

2.3 Fatores Genéticos na DII

A base genética das DII é complexa, sendo identificados diversos genes e loci gênicos por meio de estudos de associação do genoma à doença (GWAS, do inglês Genome-wide Association Studies). Foram identificados 71 loci que conferem risco à DC e 47 loci na UC; destes, 28 loci estão relacionados com a predisposição genética do indivíduo em ambas as doenças (ANDERSON et al., 2011; FRANKE et al., 2010). A identificação de genes envolvidos nessas doenças

ajuda a esclarecer seus mecanismos intracelulares, bem como as vias envolvidas na homeostase intestinal (KHOR; GARDET; XAVIER, 2011).

No contexto das DII dentro do genoma, o lócus que contém o gene que codifica a proteína NOD2 (do inglês, Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2) foi considerado a primeira região de susceptibilidade às DII, sendo inicialmente associada à doença de Crohn (SHAW et al., 2011). A NOD2 é uma proteína intracelular relacionada à resposta imune inata contra diversos patógenos. Para atuar de forma efetiva nesta resposta imune, a NOD2 deve reconhecer o patógeno ou bactéria, o qual é identificado por meio da resposta aos fragmentos da parede celular bacteriana (CHEN et al., 2008). A NOD2 foi originalmente descrita como um sensor de reconhecimento do muramildipeptídeo (MDP) (SHAW et al., 2011). O MDP é um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) encontrado no peptidoglicano (PGN) de todas as bactérias, sejam elas gram-positivas ou gram-negativas (MCDONALD; INOHARA; NUÑEZ, 2005).

Estudos *in vitro* demonstraram, por meio de ensaios bioquímicos e moleculares, que as ligações entre a NOD2 e o MDP ocorrem pelo contato direto entre eles. Observou-se que baixas concentrações de MDP não eram suficientes para desencadear uma resposta imune mediada pela NF- κ B, enquanto altas concentrações de MDP, oriundas de baixos níveis de NOD2, desencadeavam essa resposta.

Estudos *in vivo* demonstraram que a interação entre NOD e MDP são diretamente dependentes do pH, com um pH entre 5.0 e 6.5 desencadeando a máxima força de ligação (GRIMES et al., 2012). Essa premissa é importante por ratificar a importância das ações de informação, cuidado e prevenção aos portadores de DII, visto que o pH está diretamente relacionado aos hábitos alimentares, processos medicamentosos e níveis elevados de estresse do indivíduo (Vieira et al., 2021).

As variantes do gene NOD2 encontradas em pacientes com DC possuem mutações no domínio de reconhecimento ao ligante, o que as torna incapazes de induzir o processo autofágico em resposta ao MDP (HOMER et al., 2010). Como resultado dessas alterações, a bactéria não é destruída e permanece atuando nas células da mucosa, posteriormente desencadeando uma resposta imunológica local que leva a um processo inflamatório (KENNEDY et al., 2018).

Alguns outros genes de susceptibilidade às DII incluem IL23R, IL12B, JAK2, STAT3, CARD9, IL1R2, REL, SMAD3 e PRDM1. Um amplo estudo de associação do genoma à doença (GWAS) encontrou que o gene IL23R possui uma alta associação à DC (DUERR et al., 2006). Apesar dos avanços na descoberta de novos genes envolvidos nas DII, é preciso lembrar que a doença é multifatorial e individual, e que os estudos genéticos não são suficientes para desvendar sua patogênese.

2.4 Fatores ambientais nas DII

O ambiente desempenha um papel crucial na patogênese e no agravamento dos sintomas em pacientes com DII. Diversos fatores ambientais, como dieta, localização geográfica, tabagismo, uso de antibióticos, contraceptivos orais, estresse e elementos psicológicos, são considerados de risco para essas doenças (CAVALCANTE ET AL., 2020; LOFTUS, 2004). Entre os fatores ambientais, o tabagismo é o mais amplamente estudado e apresenta ação antagônica. Ele demonstra efeitos protetores no desenvolvimento da colite ulcerativa, ao mesmo tempo em que aumenta o risco da Doença de Crohn (SANTOS et al., 2021; COSNES, 2008; BIRRENBACH; BÖCKER, 2005).

Além disso, evidências sugerem que a poluição do ar também atua como um importante fator de risco para ambas as doenças, CU e DC. Esses dados corroboram com uma maior incidência dessas doenças em países industrializados. A presença de material particulado no ar induz uma resposta inflamatória sistêmica, resultando em um aumento plasmático de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β e IL-6 (REZENDE, TEODORO, 2021; BARBOSA, 2016; EEDEN et al., 2001).

2.5 Mecanismos do estresse oxidativo na doença inflamatória intestinal e o potencial terapêutico dos antioxidantes

Embora seja amplamente reconhecido que a Doença Inflamatória Intestinal (DII) resulta de uma resposta imunológica inadequada a influências ambientais e à microbiota intestinal, especialmente em indivíduos geneticamente suscetíveis, os mecanismos subjacentes ainda carecem de definição precisa (GOYETTE et

al., 2007; TIAN; WANG; ZHANG, 2017; BOURGONJE et al., 2020). A mucosa intestinal na DII, caracterizada pela infiltração de numerosas células inflamatórias, desencadeia uma resposta imunológica crônica descontrolada, marcada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e pela atividade exacerbada dos linfócitos efetores, resultando na perda de homeostase tecidual (NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007; BOURGONJE et al., 2020).

A inflamação crônica está diretamente relacionada à geração e liberação de espécies reativas de oxigênio pelas células do sistema imunológico, que atuam como moléculas sinalizadoras cruciais, mas também podem causar danos às células e moléculas, perpetuando a inflamação e contribuindo para a destruição tecidual (CAMPBELL; COLGAN, 2019; BIASI et al., 2013), frequentemente associada a desnutrição grave devido à absorção intestinal prejudicada (ZHU; LI, 2012).

As superóxidos dismutases (SOD), enzimas dependentes de íons metálicos, desempenham um papel fundamental na conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FRIDOVICH, 1997). Em mamíferos, três isoformas de SOD estão presentes: SOD1 (Cu / ZnSOD, citosólica), SOD2 (MnSOD, mitocondrial) e SOD3 (Cu / ZnSOD, extracelular). A SOD1, predominante, atua na desmutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 no citoplasma e, junto com a catalase, elimina o H_2O_2 produzido na mitocôndria (MARKLUND, 1982; LI et al., 1995). Estudos clínicos mostraram expressões diferenciadas dessas isoformas em pacientes com DII: a SOD2 apresentou aumento significativo, enquanto a SOD1 foi menos afetada e a SOD3 diminuiu, principalmente nas células epiteliais intestinais (IECs) (KRUIDENIER et al., 2003).

Além disso, estudos de OZ et al. (2005) investigaram o impacto de antioxidantes com propriedades diversas em um modelo murino de colite induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS). Os resultados indicaram que esses antioxidantes, como S-adenosilmetionina (um precursor de glutathione), polifenóis do chá verde (um antioxidante conhecido) e ácido 2-n-propiltiazolidina-4-carboxílico (um pró-fármaco de cisteína envolvido na biossíntese de GSH), tiveram um efeito positivo na progressão da colite em camundongos. Eles reduziram sintomas, mantiveram o peso corporal, melhoraram a inflamação no cólon, restauraram os níveis de glutathione reduzida, diminuíram marcadores

inflamatórios e restauraram a integridade do citoesqueleto. Esses resultados sugerem o potencial uso terapêutico de antioxidantes na DII.

2.6 Tratamento convencional

O tratamento clínico da Doença de Crohn (DC) tem como objetivo principal o rápido controle inicial do processo inflamatório (indução da remissão) e a conservação desse controle a longo prazo (manutenção da remissão). Os corticosteroides modulam a resposta imune ao interagir com os receptores de glicocorticoides nos núcleos celulares. Suas principais funções incluem a interferência na expressão da molécula de adesão e a posterior prevenção da migração de células inflamatórias para o trato gastrointestinal. Além disso, reduzem significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, o fator nuclear kappa Beta (NFkB) e o fator de necrose tumoral (TNF). Os corticosteroides podem ser administrados tanto por via oral (prednisona, prednisolona, budesonida) como por via retal (acetato de cortisona e budesonida) ou parenteral (metilprednisolona, hidrocortisona ou dexametasona) (BOUGUEN et al., 2015).

A escolha do medicamento e o manejo clínico são adotados de forma individualizada, de acordo com a evolução da doença e a resposta de cada indivíduo. Sabe-se, porém, que os efeitos colaterais nos pacientes são fatores que trazem desconforto, como, por exemplo, o aumento de peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, síndrome de Cushing, osteoporose, catarata, glaucoma, estrias, miopatia, susceptibilidade a infecções, esteatose hepática, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e pancreatite aguda (FRÓES, 2012).

Os medicamentos imunossupressores também são utilizados no tratamento, uma vez que na DC os linfócitos não conseguem atingir um estado de vigilância plena, perdendo a capacidade de controlar plenamente o estado inflamatório. Os imunossupressores promovem a remissão e a cicatrização da mucosa, sendo utilizados nas terapias com anti-TNF α , esteroides, tiopurinas, metotrexato e infliximabe, que são utilizados pelo SUS e indicados para pacientes que não respondem adequadamente a outros tratamentos (BRASIL, 2017).

Dessa forma, devido ao substancial número de efeitos adversos e ao alto custo dos medicamentos imunossupressores, a busca por agentes mais eficazes e com menos efeitos colaterais tem sido considerada de grande relevância. Sendo assim, há um contínuo esforço para descobrir e elucidar novos agentes potenciais que sejam mais eficazes, menos dispendiosos e com menor incidência de efeitos colaterais do que os fármacos utilizados atualmente (ARAB et al., 2015). Nesse contexto, os compostos bioativos provenientes de plantas medicinais têm despertado considerável interesse.

2.7 Plantas medicinais na bioprospecção de novos compostos terapêuticos

Ao longo de milênios, a humanidade dependeu significativamente das plantas, tanto como fonte de alimento quanto para o tratamento de doenças. Nesse sentido, os produtos naturais desempenharam um papel crucial na evolução da medicina moderna e continuam a ser fundamentais na busca por novos medicamentos (SEM; SAMANTA, 2014). Exemplos históricos incluem o uso de glicosídeos digitálicos no século XVIII para tratar doenças cardiovasculares e a utilização popular da casca do salgueiro para aliviar dores e febres. A exploração de recursos naturais tem levado a descobertas notáveis, abrangendo desde antibióticos até agentes anticancerígenos, além de compostos anti-inflamatórios e analgésicos (SEM; SAMANTA, 2014; WHO, 2009).

Uma revisão bibliográfica indicou que as plantas medicinais têm apresentado resultados promissores em estudos experimentais, principalmente quando se trata dos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, podendo ser uma alternativa no tratamento da DC, nesse levantamento foi visto que na maioria das plantas selecionadas a presença de flavonoides e terpenos contribui para os efeitos farmacológicos, reafirmando o potencial das plantas medicinais como fonte de abordagens alternativas de tratamento da DC (SANTANA et al., 2017).

Globalmente, o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 44 bilhões, atendendo às maiores indústrias farmacêuticas (BRASIL, 2012). No entanto, no contexto brasileiro, não há dados oficiais sobre o mercado de fitoterápicos, com estimativas da Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico variando entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões (MIOTO, 2010; BRASIL, 2012). Essa interligação entre plantas medicinais e a indústria

farmacêutica é impulsionada pelo uso da biotecnologia em conjunto com conhecimentos tradicionais (BRASIL, 2012).

Especificamente no Brasil, que abriga aproximadamente 20% da biodiversidade mundial, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e somente 1.100 espécies foram avaliadas quanto a propriedades farmacológicas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2023). Isso, ressalta a importância contínua da pesquisa com plantas medicinais para bioprospecção de novos compostos com atividade biológica.

2.8 Diversidade e Potencial Terapêutico dos Metabólitos Secundários de Plantas

Metabólitos secundários representam um grupo heterogêneo de compostos bioquímicos produzidos pelas plantas em resposta às pressões seletivas de seu ambiente. Essas substâncias desempenham múltiplas funções adaptativas, influenciando aspectos-chave do ciclo de vida vegetal, exercendo atividades antimicrobianas cruciais para a resistência a patógenos e modulando interações ecológicas ao funcionar como atrativos ou repelentes para outros organismos. Além disso, é notável a diversidade desse repertório bioquímico, com a identificação de mais de 50.000 metabólitos secundários. Essa vasta gama de compostos confere a esses compostos uma ampla variedade de atividades biológicas, tornando-os indispensáveis na busca por novos agentes farmacológicos e no desenvolvimento de terapias inovadoras (TEOH, 2016; LAWLER 1986).

Os metabólitos secundários das plantas e suas propriedades terapêuticas são amplamente documentados na literatura científica (TEOH, 2016). As fitoalexinas são substâncias de baixo peso molecular produzidas pelas plantas em resposta a desafios microbianos, desempenhando um papel crucial na conferência de resistência contra patógenos (LETCHER; NHAMO, 1975; STOESSL; ARDITTI, 1984; TEOH, 2016). Os terpenos, por sua vez, são metabólitos de grande relevância encontrados em diversas espécies vegetais, como no óleo de pinho. Além de atuarem como hormônios vegetais, também exibem propriedades inseticidas notáveis (REINECKE; KINDL, 1994; SIMONSEN, 1953; STOESSL, 1977; STOESSL; ARDITTI, 1984; TEOH, 2016; WINK, 2010;

TEOH, 2016). Os alcaloides, compostos orgânicos nitrogenados, são produzidos por várias plantas e possuem importantes propriedades terapêuticas, como a capacidade analgésica e o potencial no tratamento do câncer (LUNING, 1964, 1967, 1974, 1975, 1980; LAWLER, 1984; TEOH, 2016). As saponinas, compostos com propriedades surfactantes, apresentam versatilidade em suas ações, podendo manifestar propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas e toxicidade em relação a animais de sangue frio (COURTOIS, 1983; HARBORNE, 1988; LAU et al., 2016; SCHÜLY; ARN, 1973; STOESSL; ARDITTI, 1984). Já as bibenzilas e estilbenoides, frequentemente sintetizados por *orquídeas*, revelam atividade antimicrobiana e citotóxica, demonstrando sua relevância na defesa das plantas contra ameaças (CHEN et al., 2008; FRIEDERICH et al., 1998; GUO et al., 2006; REINECKE; KINDL, 1994a; REINECKE; KINDL, 1994b; REINECKE; KINDL, 1994c; STOESSL; ARDITTI, 1984). Por último, os flavonoides, tais como a Naringina e as antocianinas, apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, sendo responsáveis por conferir cores vibrantes a flores e frutos, além de desempenharem funções essenciais em diversos processos biológicos (HARBORNE, 1988; KIM et al., 2010; LIN et al., 2005; LIN et al., 2014).

2.9 Potencial terapêutico da Naringina

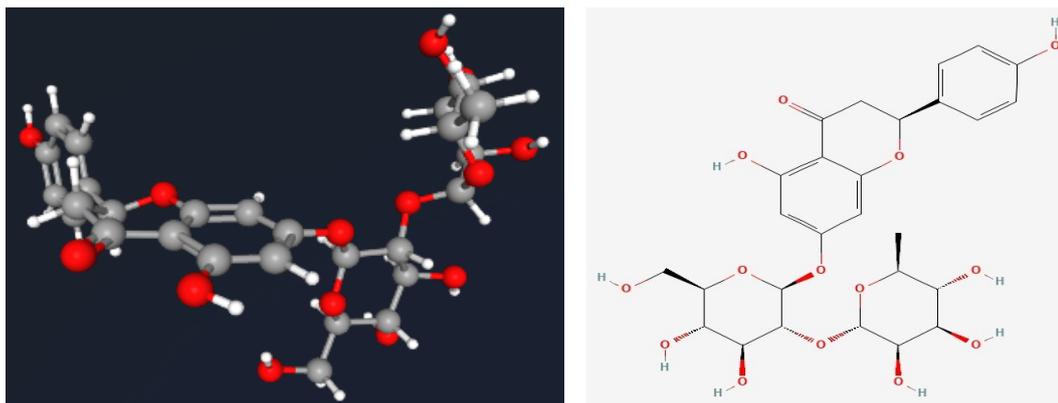
A Naringina é uma biflavona glicosilada encontrada em frutos cítricos, especialmente em flores de *toranja*. Trata-se de um composto químico pertencente às flavonas, conhecida como 4,5,7-trihidroxiflavona-7-ramnoglicósido (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Sua fórmula molecular é $C_{27}H_{32}O_{14}$, sendo seu peso molecular de 580 g/mol. Foi descoberta pelo pesquisador De Vry em 1857 em flores de toranja, também conhecida como grapefruit (*Citrus paradisi*). Sua estrutura química (Fig. 2) foi elucidada pela primeira vez em 1928 (BHARTI et al., 2014). Além da estrutura básica de um flavonoide, a Naringina possui o dissacarídeo neohesperidose ligado ao carbono 7 de sua porção aglicona (MEMARIANI et al., 2020). A substância apresenta um sabor extremamente amargo, a menos que seja tratada com uma base forte, como hidróxido de potássio, alterando seu sabor para uma doçura de 300 a 1800 vezes mais intensa que o açúcar, com características refrescantes, semelhantes ao mentol (ANSARI et al., 2022).

Embora seja comum em frutas cítricas, como a laranja, e amplamente utilizada como adoçante nas indústrias de alimentos, sua baixa solubilidade em água dificulta seu uso mais abrangente como conservante alimentício (LI et al., 2022). Ela é encontrada em grande quantidade nos tecidos de plantas jovens, sofrendo redução de quantidade pelo processo de amadurecimento, onde a Naringina se converte em Naringenina ou em outros compostos (GUPTA et al., 2022).

Ela é um dos principais compostos ativos em algumas ervas chinesas medicinais, como *Drynaria fortunei*, *Citrus aurantium L.* (laranjeira azeda) e *Citrus medica L.* (cidreira). Além de estar presente na toranja, é encontrada também em tomate, feijão, cereja e orégano (EXARCHOU et al., 2003; YIN et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Estima-se que a concentração de Naringina em sucos de toranja varie de 50 a 1.200 mg/L (HO et al., 2000). Quando ingerida, a Naringina é hidrolisada à sua forma aglicona, a Naringenina, que é parcialmente absorvida e metabolizada pelo corpo humano (ZENG et al., 2017).

As atividades antioxidantes e anti-inflamatórias da Naringina são bem descritas na literatura (CHEN et al., 2016). Além disso, diversos estudos têm demonstrado o potencial terapêutico da Naringina contra diabetes, alergias, asma, osteoporose, hipertensão e câncer, além de efeito neuroprotetor e proteção do fígado e do trato gastrointestinal (AHMED et al., 2019; BHARTI et al., 2014; CHEN et al., 2016; MEMARIANI et al., 2020). Dentro desse contexto, abre-se caminho promissor na busca por terapias inovadoras para doenças gastrointestinais e diversas outras condições de saúde.

Figura 2 – Estrutura molecular da Naringina



Fonte: Adaptado de National Library of Medicine, 2023.

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, representam um desafio significativo em termos de saúde pública, tendo um impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes. Apesar de a subnotificação ser uma preocupação no contexto brasileiro, os dados globais revelam uma crescente e alarmante incidência dessas doenças, destacando a necessidade premente de intervenções preventivas e terapêuticas mais eficazes em escala mundial (ROHN, GINZBURG, OPPENHEIMER, 1999; FORTES et al., 2020; JACKSON et al., 2008; KLIMMEL et al., 2017).

O tratamento convencional das DII frequentemente acarreta efeitos colaterais indesejados e, em muitos casos, não proporciona alívio efetivo para todos os pacientes, o que justifica a busca incessante por alternativas terapêuticas. Diversos estudos têm evidenciado que compostos de origem vegetal, como os polifenóis, flavonoides, bibenzilas e estilbenoides, possuem propriedades terapêuticas notáveis, tais como a capacidade anti-inflamatória e antioxidante (ARAB et al., 2015; CHEN et al., 2008; CONNO et al., 2022; FRIEDERICH et al., 1998; MENYIY el al., 2022; SEM; SAMANTA, 2014).

Entre esses compostos, a Naringina, presente em quantidades significativas na casca de Grapefruit, é um flavonoide multifacetado, reconhecido por suas diversas atividades biológicas, incluindo ação anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora(LI et al., 2022; CAO et al., 2016; OKUYAMA et al., 2018; ZHANG et al., 2014). Isso fundamenta a sua seleção como objeto de estudo neste projeto.

Dessa forma, considerando o impacto substancial das DII na saúde pública em âmbito global, bem como a urgente necessidade de terapias mais eficazes e menos onerosas em termos de efeitos adversos, a investigação sobre a Naringina assume uma relevância significativa no âmbito da busca por soluções terapêuticas alternativas e inovadoras (MENYIY el al., 2022; FORTES et al., 2020; CONNO et al., 2022).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e o efeito protetor do tratamento com Naringina na doença de Crohn experimental induzida por ácido acético em camundongos

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito protetor do extrato de Naringina com 95% de pureza na condição de anti - inflamatória ;
- Avaliar a ação protetora do extrato sólido de Naringina, através de uma análise macroscópica e microscópica, na lesão induzida por ácido acético AA 8% em camundongos;
- Avaliar a toxicidade do extrato de Naringina nas concentrações de 50, 100 e 200 mcg em células murino;
- Avaliar a ação do extrato de Naringina sobre o estresse oxidativo no trato digestório, através de medidas da concentração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) na mucosa dos camundongos submetidos a DC por ácido acético AA 8%.
- Investigar o potencial antiinflamatório da Naringina no modelo experimental de DC induzida pelo ácido acético, através da determinação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias: interleucina I beta (IL-1 beta) e TNF alfa.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Todos os protocolos experimentais estão em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pela

Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) nº 8723040422 da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com massa corporal entre 25 g e 30 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Durante o estudo, os animais foram mantidos no Biotério do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem, em gaiolas apropriadas, em grupos de seis a oito, a uma temperatura de 22-24°C, sob um ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a um jejum de sólidos de 16 horas antes da realização dos experimentos.

5.3 Drogas e Reagentes

Os fármacos, os reagentes e as soluções utilizadas neste estudo encontram-se detalhados no apêndice (APÊNDICE A).

5.4 Obtenção do material vegetal

O extrato sólido de Naringina foi fornecido ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará pelo Departamento de Química da mesma universidade. Inicialmente, o extrato foi adquirido com uma pureza de 95% (HPLC) da empresa Xi'na Quanao Biotech Co., localizada em Xi'an, China. A Professora Dra. Maria Elenir Nobre Pinheiro Ribeiro, responsável pela correta dissolução e liberação do extrato de Naringina para o Departamento de Morfologia, nos apresentou a Naringina nas concentrações adequadas para o experimento.

5.5 Modelo de Doença de Crohn (DC) experimental induzido pela administração do Ácido Acético (AA 8%) em camundongos

Inicialmente, para a preparação do cólon, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas, com acesso livre à água. A indução da DC foi realizada pela diluição de 8 mL de AA 8% em água destilada (100 mL), com administração de 0,2 mL dessa solução para cada 10 gramas de peso corporal dos animais. Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal (IP) com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido um cateter de polietileno nº 6, com 4 cm de comprimento, por via retal, para a administração das soluções de AA 8% ou solução salina. Cada animal foi suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o refluxo das soluções (Figura 03). A indução por ácido acético para a doença de Crohn segue um protocolo semelhante à indução por TNBS, conforme o método descrito por Morris et al. (1989). Foram tomados todos os cuidados necessários para garantir que os experimentos não causassem estresse, desconforto ou dor excessiva aos animais, sendo os procedimentos de intensidade intermediária.

Figura 3- Modelo de indução da doença de Crohn por ácido acético



Fonte: Adaptado de (CARNEIRO, 2019).

5.6 Protocolo Experimental

5.6.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, cada um composto por seis animais. Os grupos controles foram organizados da seguinte maneira: Grupo Controle e Grupo Colite (ácido acético 8%; AA 8%). Os grupos tratados consistiram em três grupos nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg de naringina. Além disso, houve um grupo comparativo, Grupo Dexametasona (2 mg/kg DEXA - Decadron Injetável®), conforme a estrutura abaixo:

Grupo Controle: Solução salina a 0,9% em um volume de 0,8 mL por via retal, em substituição à solução de ácido acético (AA 8%).

- Grupo Ácido acético 8% (AA 8%): Solução de AA 8% em um volume de 0,8 mL por via retal, para indução da DC;
- Grupo Naringina 50: Naringina, dose de 50 mg/kg, via oral (v.o), administrada 1 hora antes da indução da DC por solução de ácido acético(AA 8%), e uma vez ao dia pelo período de três dias;
- Grupo Naringina 100: Naringina, dose de 100 mg/kg, via oral (v.o), administrada 1 hora antes da indução da DC por solução de ácido acético(AA 8%), e uma vez ao dia pelo período de três dias;
- Grupo Naringina 200: Naringina, dose de 200 mg/kg, via oral (v.o), administrada 1 hora antes da indução da DC por solução de ácido acético(AA 8%), e uma vez ao dia pelo período de três dias;
- Grupo Dexametasona: Dexametasona 2 mg/kg, via subcutânea (s.c.), administrada 1 hora antes da indução da DC por solução de ácido acético(AA 8%), e uma vez ao dia pelo período de três dias.

Todos os grupos foram submetidos à indução da DC, exceto o grupo de controle. Os animais foram pré-tratados da seguinte forma: o grupo CONTROLE recebeu solução salina a 0,9% por via retal, os grupos experimentais nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg receberam extrato de Naringina nas respectivas doses por gavagem, e o grupo DEXA recebeu dexametasona 2 mg/kg via subcutânea. O grupo ácido acético (AA 8%) não recebeu pré-tratamento. 12 horas após a

administração do último tratamento, a eutanásia foi realizada e os segmentos do cólon foram coletados para avaliações posteriores. Essas avaliações incluíram análises bioquímicas e morfológicas do colón, incluindo macroscopia, histologia e a determinação dos níveis de peroxidação lipídica (malondialdeído) e glutathione reduzida por ELISA.

5.7 Procedimentos de Eutanásia

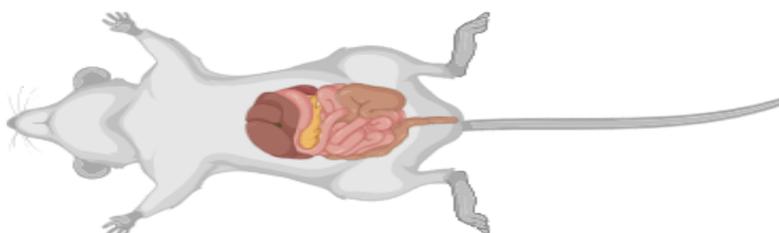
Doze horas após a indução da colite, todos os animais do estudo foram submetidos à eutanásia por meio de uma overdose de cetamina (300 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg), ambos administrados por via intraperitoneal. Utilizando técnicas operatórias padronizadas, realizou-se uma laparotomia através de uma incisão mediana, procedendo-se à dissecação e remoção de um segmento colônico para fins de estudo. O limite proximal foi o cólon descendente, a cerca de 6 cm da sínfise púbica, e o limite distal foi o reto, seccionado ao nível da reflexão peritoneal. As peças foram abertas longitudinalmente, lavadas com soro fisiológico e armazenadas para avaliações posteriores macroscópicas, histológicas e bioquímicas. Após a eutanásia, as carcaças dos animais utilizados foram devidamente embaladas e refrigeradas em um freezer apropriado, sendo posteriormente encaminhadas para incineração pela empresa responsável pela coleta de material biológico da UFC.

5.8 Parâmetros avaliados

Após a indução da DC, o delineamento do estudo envolveu a realização da eutanásia, seguida da avaliação dos parâmetros conforme apresentado na Figura 3.

Figura 4 - Parâmetros avaliados

- Macroscopia
- Microscopia
- MDA



- GSH
- IL-1beta
- TNF- α

Fonte: Autor (Machado S.M.P, 2023).

5.8.1 Avaliação macroscópica

Após 12h da indução da colite, todos os animais do estudo foram submetidos à eutanásia, seguida de exsanguinação. Usando técnicas operatórias padronizadas, foi realizada laparotomia através de incisão mediana, dissecação e remoção de segmento colônico para avaliação macroscópica. As peças foram abertas longitudinalmente, lavadas com soro fisiológico e distendidas sobre uma superfície plana, sendo avaliadas por um pesquisador cego para os grupos do trabalho, que realizou uma análise macroscópica com a utilização de lupa estereoscópica e aplicou o escore de inflamação abaixo (Tabela 02) (MORRIS et al., 1989):

Tabela 2 - Escore de Inflamação através de Análise Macroscópica

CRITÉRIO	ESCORE
APARÊNCIA NORMAL	0
HIPEREMIA FOCAL, SEM ÚLCERA	1
ULCERAÇÃO SEM HIPEREMIA OU ESPESSAMENTO DA PAREDE COLÔNICA	2
ULCERAÇÃO COM INFLAMAÇÃO EM UMA REGIÃO	3
ULCERAÇÃO/INFLAMAÇÃO EM DUAS OU MAIS REGIÕES	4
LESÃO PRINCIPAL SE EXTENDENDO POR 1 CM AO LONGO DO CÓLON	5
QUANDO A LESÃO PRINCIPAL SE EXTENDE POR MAIS QUE 2 CM AO LONGO DO CÓLON, 1 PONTO É DADO PARA CADA CM ADICIONAL	6-10

5.8.2 Comprimento do cólon

Após a eutanásia dos animais, o cólon foi cuidadosamente retirado, lavado e o comprimento foi mensurado considerando sua extensão desde a junção com o ceco até o reto. A medida foi realizada com o auxílio de uma folha milimetrada, em centímetros. O encurtamento do cólon é um dos aspectos característicos da UC (SONG et al 2014). A relação entre a massa do cólon e o seu comprimento é usado como indicador, na compreensão da extensão do edema, onde maior proporção, conota o grau de severidade do edema (CHEM et al., 2017).

5.8.3 Avaliação histológica da mucosa gástrica de camundongos

Na área que macroscopicamente apresentava o maior comprometimento inflamatório em cada cólon dissecado foi isolado um segmento de 1 cm, acondicionado em cassete e encaminhado para fixação em formol a 10%. Após 24 horas todos os cassetes foram mergulhados em álcool absoluto para desidratação. Após diafanização com xilol e inclusão com parafina, as lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por um pesquisador cego para os grupos do trabalho, que realizou uma análise microscópica e aplicou o escore de inflamação abaixo (tabela 03) (APPLEYARD; WALLACE, 1995):

Tabela 03 - Escore de Inflamação por Análise Microscópica

CRITÉRIO	ESCORE
PERDA DE ARQUITETURA DA MUCOSA	0 – 3
INFILTRAÇÃO CELULAR	0 – 3
ESPESSAMENTO DA CAMADA MUSCULAR	0 – 3
FORMAÇÃO DE ABSCESSO EM CRIPTA	0 – 1
AUSÊNCIA DE CÉLULAS CALICIFORMES	0 – 1

5.9 Avaliação da atividade antioxidante

5.9.1 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) será realizada de acordo com o método proposto por Sedlak e Lindsay (1968), que baseia-se na reação do DTNB [5,5 ditídio-bis-(ácido-2-nitrobenzóico)], com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-benzóico; para determinação de grupos sulfídricos não proteicos (NPSH). A determinação da GSH, será feita em amostras de tecidos da mucosa intestinal correspondente ao íleo (100mg/mL) onde, após descongelamento, serão mantidas no eppendorf em um bécker com gelo e, posteriormente homogeneizada em um homogeneizador de tecidos (Polytron®) em 0,02M EDTA refrigerado, para conseqüente preparação de um homogenato a 10%. Alíquotas de 400 µl do homogenato serão adicionadas a 320 µl de água destilada e a 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Em seguida o material será centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos à 4°C. Após a centrifugação, 400 µl do sobrenadante será retirado e misturado a 800µl de tampão TRIS com concentração de 0,4 M (pH 8,9) e 20 µl de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M e agitadas por 3 minutos. A absorbância será então mensurada a 412 nm em leitor de placa (Elisa®) contra um reagente branco (sem homogenato). A concentração será expressa por µg de GSH/g de tecido a partir de uma curva padrão.

5.9.2 Determinação dos Níveis de Malondialdeído (MDA)

Malondialdeído é um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica, utilizado para confirmar o dano oxidativo, determinado pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os níveis de MDA serão verificados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978), para isso, amostras de 50 mg tecido da mucosa intestinal correspondentes ao íleo serão homogeneizadas em 500 µl de solução de KCl a 1,15%, refrigerado, obtendo-se um homogenato a 10%. Desta obtenção, alíquotas de 250 µl do homogenato serão adicionadas a tubos falcon plástico contendo 1,5 mL da solução de H₃PO₄ a 1% e 500 µL da solução de TBARS (0,6%). Em seguida, os tubos serão alinhados em estantes para tubo de ensaio,

envolta em plástico filme e aquecidos em banho-maria a 100°C, por um período de 45 minutos, e então, resfriado em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 mL de n-butanol. Em sequência, as amostras serão agitadas em vortex (Phoenix®) por um minuto, e posteriormente centrifugados (LEICA®) a 1200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante, fase orgânica, será mensurado a uma absorvância de 520 e 535 nm, em leitor de placa (ELISA®), sendo o resultado obtido pela diferença da absorvância das duas leituras. Os resultados serão expressos em nmol/g de tecido intestinal.

5.9.3 Determinação dos Níveis das Citocinas IL-1beta e TNF- α

Os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1beta na mucosa gástrica foi quantificada por ELISA. Para a dosagem de IL-1 beta e TNF-alfa, foi utilizado a melhor dose de EACP (3 mg/kg). Os tecidos coletados foram homogeneizados em PBS. A detecção da citocina IL-1 beta foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-1beta por 18h em temperatura ambiente com 100 μ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200 μ L de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100 μ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1beta em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 μ L da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 μ L solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorvância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

5.10 Análise Estatística

Todos os resultados quantitativos serão expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM), exceto os escores histopatológicos que serão expressos pela mediana. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism®, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos serão utilizados os seguintes testes: teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni e para os escores histológicos será realizado teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância adotado será de 5% ($p < 0,05$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor serão considerados significantes.

6.0 RESULTADOS

6.1 Avaliação macroscópica das lesões no cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Com base nas avaliações macroscópicas (Tabela 02), é possível observar a presença de aspectos inflamatórios, tais como úlcera, hiperemia, edema e prolapso do cólon em animais do grupo Colite (B), em comparação com o grupo Controle (A). O pré-tratamento oral com Dexametasona (C) ou Naringina (E) na dose de 100 mg/kg, demonstrou eficácia na prevenção desses aspectos inflamatórios e no aumento do comprimento do cólon. É importante notar que Naringina nas doses de 50 e 200 mg/kg (D e F, respectivamente) não apresentaram efeitos semelhantes ao observado com Naringina na dose de 100 mg/kg.

Seguindo os critérios estabelecidos por Morris e colaboradores (1989), a Tabela 04 apresenta os escores observados nos grupos estudados. O grupo colite apresentou um aumento significativo na atividade inflamatória ($3,0 \pm 0,298$), em comparação com o grupo controle ($0,4 \pm 0,163$) e o grupo tratado com dexametasona ($0,5 \pm 0,166$). Os animais que receberam pré-tratamento com Naringina nas doses de 100 mg/kg ($0,8 \pm 0,200$) e 200 mg/kg ($1,9 \pm 0,210$)

reverteram significativamente os escores inflamatórios quando comparados ao grupo Colite. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com Naringina na dose de 50 mg/kg ($2,2 \pm 0,249$) e o grupo Colite.

Figura 5 – Aspecto macroscópico do cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%): (A) Grupo Controle, (B) Grupo Colite, (C) Grupo Dexametasona, (D) Grupo Naringina, 50 mg/Kg, (E) Grupo Naringina, 100 mg/Kg e (F) Grupo Naringina, 200 mg/Kg. As numerações (1) a (11) nas figuras indicam a diferença em centímetros (cm) no comprimento do cólon em relação ao Grupo Controle.

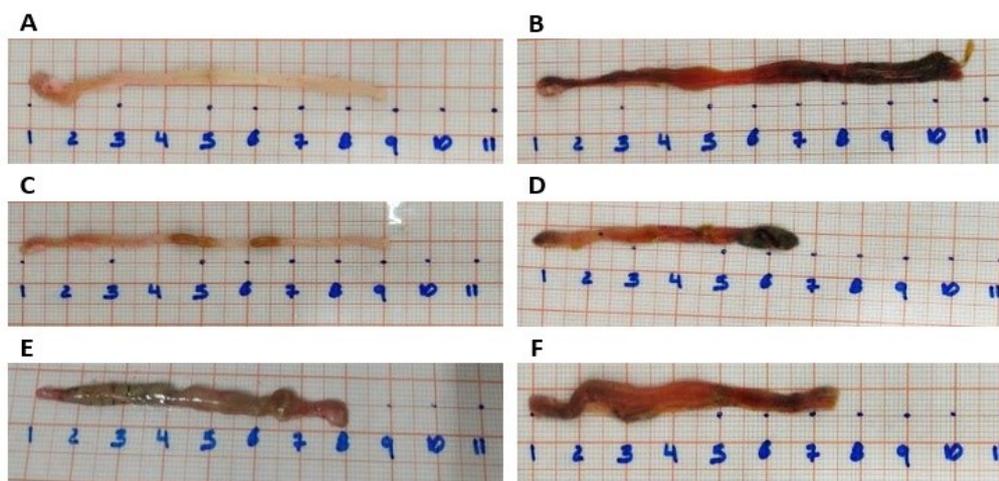


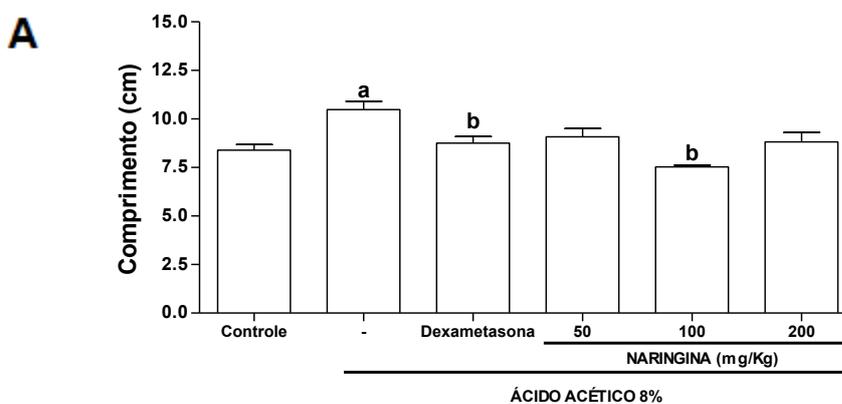
Tabela 4 – Escores macroscópicos totais de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida por ácido acético 8% (AA 8%). Os resultados são apresentados como medianas acompanhadas dos valores mínimos e máximos (intervalo interquartil) entre parênteses. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para identificar diferenças significativas entre os grupos. As letras (a) e (b) indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação aos grupos Controle e Ácido Acético 8%, respectivamente.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES
	MACROSCÓPICOS
Controle	0 (0-1)
Ácido Acético 8%	3 (1-4) ^a
Dexametasona	0,5 (0-1) ^b
Naringina 50mg/Kg	2 (1-3)
Naringina 100mg/Kg	1 (0-2) ^b
Naringina 200mg/Kg	2 (1-3) ^b

6.2 Avaliação do comprimento do cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Com relação à análise do comprimento do cólon, medido em centímetros (cm) foi registrado um aumento significativo no comprimento do cólon dos animais com Colite ($10,48 \pm 0,43\text{cm}$) em comparação com o grupo Controle ($8,4 \pm 6,28\text{ cm}$). Esses resultados refletem um aumento de 24% no comprimento, possivelmente associado os parâmetros macroscópicos inflamatórios mencionados anteriormente. Tanto a Dexametasona ($8,75 \pm 0,33\text{ cm}$) quanto a Naringina na dose de 100 mg/Kg ($7,52 \pm 0,09\text{ cm}$) foi eficaz em prevenir o aumento do comprimento quando comparados ao grupo com colite induzida por AA 8%. Não foram observadas diferenças significativas nas outras doses de Naringina testadas em relação a esse grupo (Figura 5).

Figura 6 – Avaliação do Efeito da Naringina sobre o comprimento do cólon em camundongos submetidos a um modelo experimental de colite induzida por ácido acético 8% (AA 8%). Os resultados são apresentados graficamente (painel A) e tabularmente (painel B), exibindo a média \pm erro-padrão da média (EPM) do comprimento do cólon, medido em centímetros (cm). A análise estatística foi conduzida por do teste de ANOVA One-way (Análise de Variância de Um Fator), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As letras (a) e (b) indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação aos grupos Controle e Ácido Acético 8%(AA 8%), respectivamente.



B

GRUPOS EXPERIMENTAIS	COMPRIMENTO DO CÓLON (CM)
Controle	8,4 ± 6,28
Ácido Acético 8%	10,48 ± 0,43 ^a
Dexametasona	8,75 ± 0,33 ^b
Naringina 50mg/Kg	9,08 ± 0,42
Naringina 100mg/Kg	7,52 ± 0,09 ^b
Naringina 200mg/Kg	8,82 ± 0,47

6.3 Avaliação microscópica do cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Na análise microscópica utilizando escores totais de inflamação, conforme os critérios de Appleyard e Wallace (1995) (Figura 07 e Tabela 03) foram observados que no grupo Colite por AA 8% alterações microscópicas significativas, incluindo lesões hemorrágicas, edema, perda de arquitetura e infiltração de células inflamatórias no cólon dos animais avaliados, em comparação com o grupo Controle. Notavelmente, o pré-tratamento oral com Naringina na dose de 100 mg/kg resultou em uma significativa redução nos escores microscópicos mencionados anteriormente. Resultados similares foram observados no grupo tratado com Dexametasona (Figura 08 Ce Tabela 03).

A **Figura 7** apresenta os resultados da avaliação microscópica, destacando um processo inflamatório acentuado nos animais do grupo Colite (induzida por AA 8%), caracterizado pela presença de infiltrado celular, perda da arquitetura da mucosa, hemorragia e depleção de células caliciformes (B). No grupo Controle (A) e no grupo tratado com Dexametasona (C), observa-se um aspecto colônico normal. Houve uma melhora notável nos aspectos inflamatórios induzidos pelo AA 8% nos animais que receberam pré-tratamento oral com Naringina na dose de 100 mg/kg (E). No entanto, os grupos tratados com Naringina nas doses de 50 e 200 mg/kg não conseguiram prevenir os efeitos do AA 8%, exibindo um padrão inflamatório semelhante ao observado nos animais com colite (D e F, respectivamente).

Figura 7 – Avaliação microscópica da atividade inflamatória (escore total) de acordo com os critérios estabelecidos por Appleyard e Wallace (1995). As colunas representam a média \pm Erro-Padrão da Média (EPM) dos escores microscópicos, os quais foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de ANOVA One-way (Análise de Variância de Um Fator), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. "a" indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação ao Grupo Controle, enquanto "b" indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação ao Grupo Ácido Acético 8%(AA 8%).

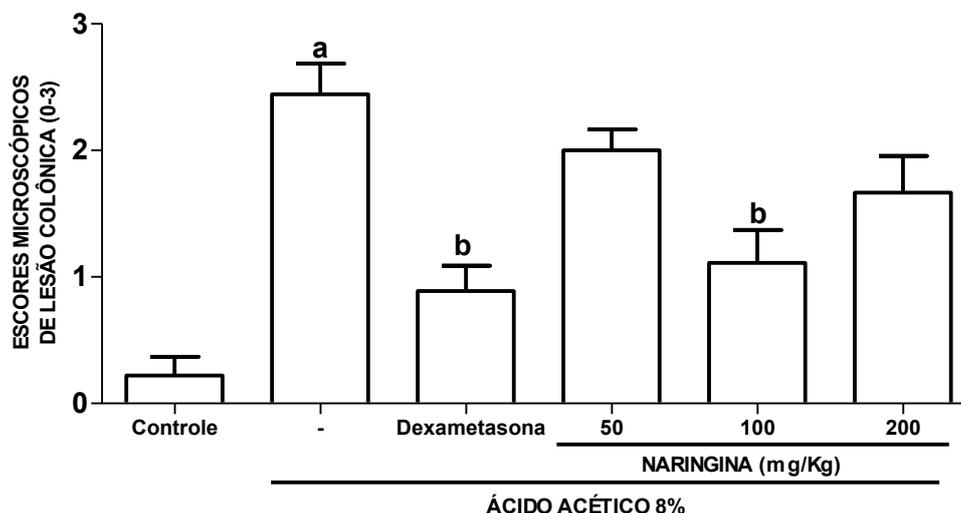
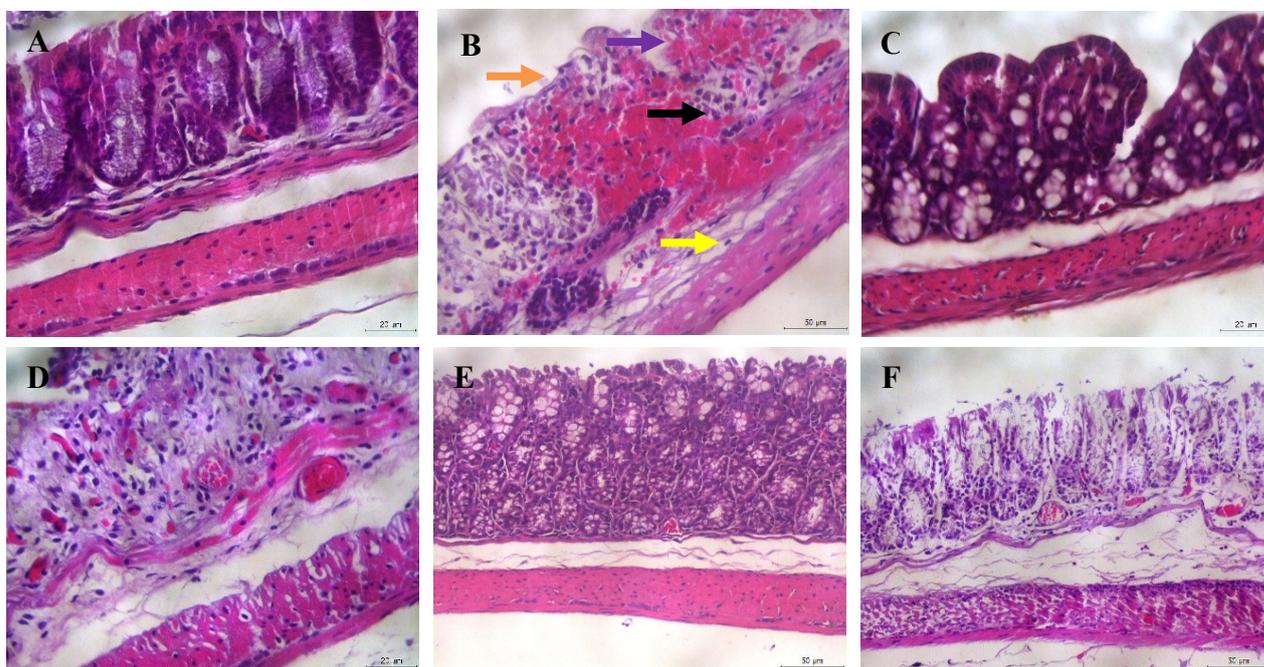


Tabela 5 – Efeito da Naringina nos escores microscópicos de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo ácido acético 8% (AA 8%), conforme os Critérios Estabelecidos por Appleyard e Wallace (1995). Os resultados são apresentados como medianas acompanhadas dos valores mínimas e máximas (intervalo interquartil) entre parênteses. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para identificar diferenças significativas entre os grupos. As letras (a) e (b) indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação aos grupos Controle e Ácido Acético 8%(AA 8%), respectivamente.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MICROSCÓPICOS	ESCORES MICROSCÓPICOS (média \pm EPM)
Controle	0 (0-1)	0,22 \pm 0,140
Ácido Acético 8%	3 (1-3) ^a	2,44 \pm 0,29 ^a
Dexametasona	1 (0-2) ^b	0,88 \pm 0,20 ^b
Naringina 50mg/Kg	2 (1-3)	2,00 \pm 0,16
Naringina 100mg/Kg	1 (0-2) ^b	1,11 \pm 0,26 ^b
Naringina 200mg/Kg	2 (0-3)	1,66 \pm 0,28

Figura 8 – Fotomicrografias do cólon de camundongos tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). Magnificação de 50x, coloração: hematoxilina e eosina. (A) Grupo Controle, (B) Grupo Colite, (C) Grupo Dexametasona, (D) Grupo Naringina 50 mg/Kg, (E) Grupo Naringina 100 mg/Kg e (F) Grupo Naringina 200 mg/Kg. Setas: perda da arquitetura de mucosa; espessamento (edema); ausência de células caliciformes. → infiltrado celular inflamatório



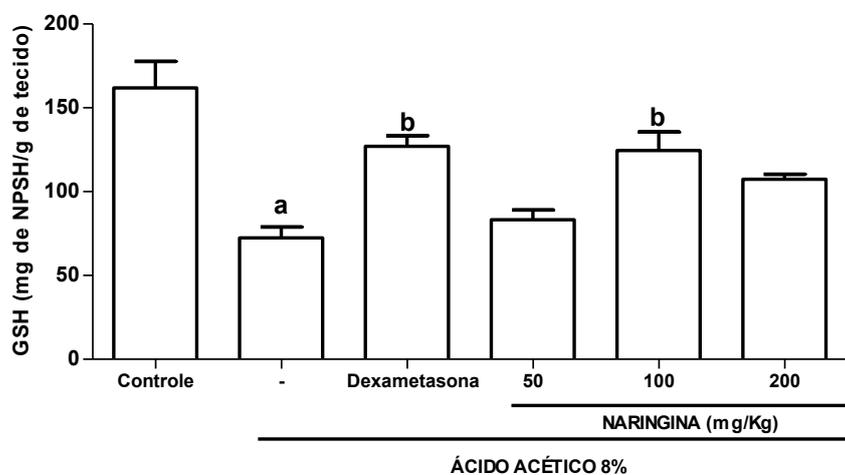
6.4 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

A concentração dos níveis de glutathiona reduzida no cólon de camundongos, expressa em mg de NPSH/g de tecido (Figura 9; painel A e painel B), diminuiu significativamente após a administração de AA 8% ($72,38 \pm 6,54$), em comparação com o grupo Controle ($161,9 \pm 15,83$). Com base nos dados somente a dose de 100 mg/kg ($124,6 \pm 10,97$) de Naringina demonstrou eficácia em restaurar os níveis de glutathiona reduzida, comparando-se ao grupo submetido à colite por AA 8%. Este achado é de grande relevância, uma vez que a Naringina exibiu um efeito protetor significativo, mantendo os níveis de glutathiona reduzida semelhante aos observados no grupo tratado com Dexametasona ($127,1 \pm 6,31$). Por outro lado, as doses de 50 mg/kg ($83,30 \pm 5,84$) e 200 mg/kg ($107,4 \pm 3,05$)

de Naringina não conseguiram evitar a depleção dos níveis de glutatona causada pela colite induzida por AA 8%.

Figura 9 – O tratamento com Naringina aumenta os níveis de glutatona reduzida (GSH) no cólon de camundongos submetidos ao modelo experimental de colite por ácido acético 8% (AA 8). O gráfico (A) e a tabela (B) exibem a média \pm Erro-Padrão da Média (EPM) dos níveis de GSH, expressos em mg de NPSH/g de tecido. A análise estatística foi conduzida por meio do teste de ANOVA One-way, seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As letras (a) e (b) indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação aos grupos controle e ácido acético 8%, respectivamente.

A



B

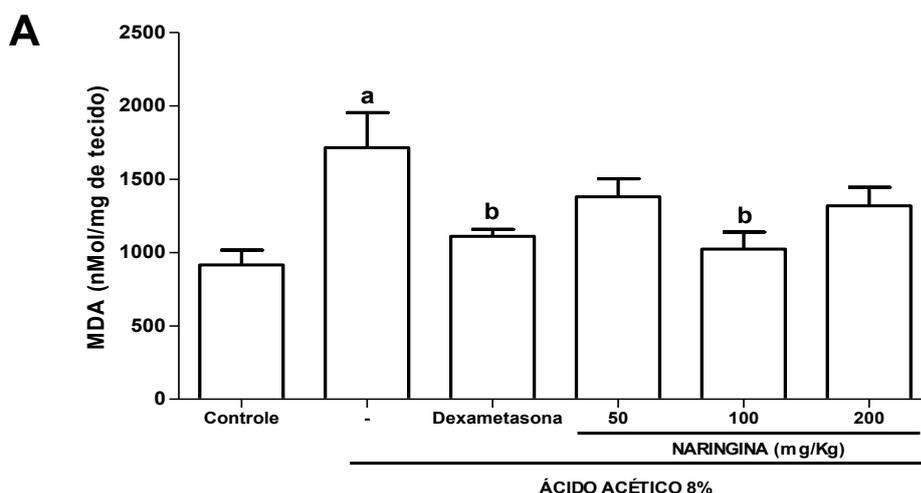
GRUPOS EXPERIMENTAIS	GSH (mg de NPSH/g de tecido) (média \pm erro padrão)
Controle	161,9 \pm 15,83
Ácido Acético 8%	72,38 \pm 6,54 ^a
Dexametasona	127,1 \pm 6,31 ^b
Naringina 50mg/Kg	83,30 \pm 5,84
Naringina 100mg/Kg	124,6 \pm 10,97 ^b
Naringina 200mg/Kg	107,4 \pm 3,05

6.5 Determinação dos níveis de malodialdéido (MDA) no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Conforme evidenciado na Figura 9 (A e B), a colite induzida por AA 8% resultou em um aumento significativo nos níveis de MDA (nMol/mg de tecido) em comparação com o grupo controle, indicando um processo severo de peroxidação lipídica induzido por espécies reativas de oxigênio.

A Naringina demonstrou desempenhar um papel antioxidante fundamental no modelo experimental de colite estudado, especialmente na dose de 100 mg/kg ($1024 \pm 115,1$), onde se observou uma redução significativa nos níveis de MDA em comparação com o grupo Colite AA 8%. Resultados semelhantes foram observados no grupo tratado com Dexametasona ($1110 \pm 49,19$) em comparação ao grupo com colite induzida por AA 8%. No entanto, as doses de 50 mg/kg ($1380 \pm 123,8$) e 200 mg/kg ($1320 \pm 125,4$) de Naringina não conseguiram reverter o aumento da peroxidação lipídica induzido pelo AA 8%.

Figura 10 – A Naringina reduz os níveis de substâncias reativas (TBARS) no cólon de camundongos submetidos ao modelo experimental de colite por ácido acético 8% (AA 8%). O gráfico (painel A) e a tabela (painel B) apresentam a média \pm Erro-Padrão da Média (EPM) dos níveis de TBARS, expressos em nMol/mg de tecido. A análise estatística foi conduzida por meio do teste de ANOVA One-way, seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As letras (a) e (b) indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ em relação aos grupos Controle e Ácido Acético 8%, respectivamente.



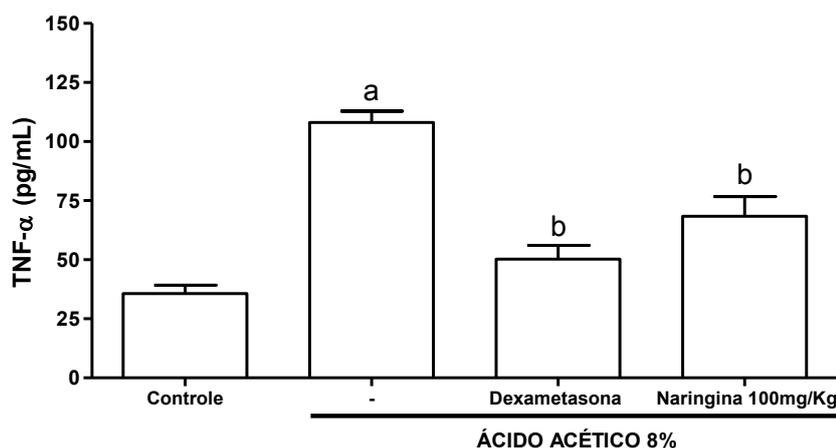
B

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MDA (nMol/mg de tecido) (média \pm erro padrão)
Controle	910 \pm 101,4
Ácido Acético 8%	1715 \pm 239,4 ^a
Dexametasona	1110 \pm 49,19 ^b
Naringina 50mg/Kg	1380 \pm 123,8
Naringina 100mg/Kg	1024 \pm 115,1 ^b
Naringina 200mg/Kg	1320 \pm 125,4

6.6 Determinação dos níveis teciduais de TNF- α no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

As amostras colônicas foram submetidas ao ensaio para determinação dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α (pg/mL). Os animais do grupo AA 8% apresentaram aumento significativo de TNF- α (108,1 \pm 1,7), em relação ao grupo controle (35,69 \pm 3,6). Naringina 100m/Kg (68,34 \pm 8,2), bem como a dexametasona (50,24 \pm 5,8) diminuíram o nível desta citocina, quando comparado ao grupo AA 8% (Figura 11).

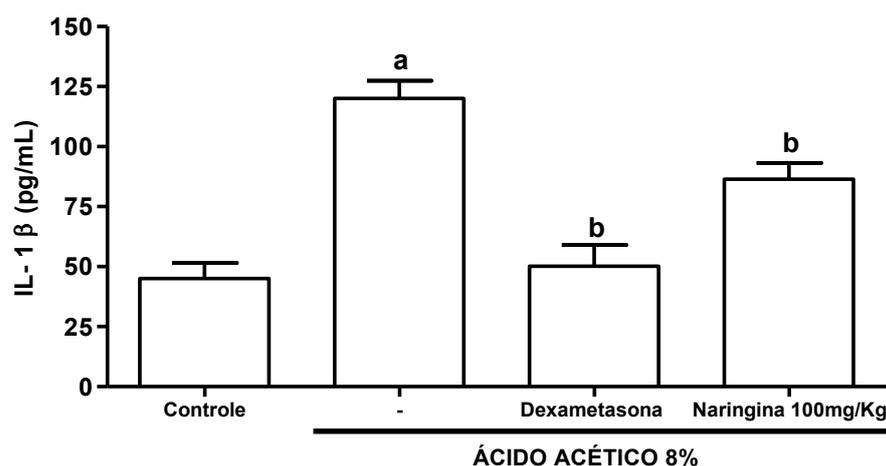
Figura 11 – A Naringina reduz os níveis teciduais de TNF- α no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de TNF- α , expressos em pg/mL. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Ácido acético 8%.



6.7 Determinação dos níveis teciduais de IL-1 β no cólon de camundongos pré-tratados com Naringina no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Para avaliação da citocina pró-inflamatória IL-1 β , amostras colônicas foram submetidas ao ensaio por ELISA para determinação dos níveis desta citocina. Os animais do grupo AA 8% apresentaram aumento significativo de IL-1 beta ($120,1 \pm 6,4$), em relação ao grupo controle ($45,09 \pm 7,3$). Naringina 100m/Kg ($86,39 \pm 6,7$) e dexametasona ($53,24 \pm 8,8$) diminuíram significativamente o nível desta citocina, quando comparado ao grupo AA 8% (Figura 12).

Figura 12 – A Naringina reduz os níveis teciduais de IL-1 β no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de IL-1 β , expressos em pg/mL. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap< 0,05 versus grupo Controle; ^bp< 0,05 versus grupo Ácido acético 8%.



7.0 DISCUSSÃO

A etiologia das DII ainda permanece desconhecida na atualidade (KIM; CHEON, 2017). No entanto, diversos fatores, como a suscetibilidade genética e elementos ambientais, possivelmente estão associados ao seu desenvolvimento (ZHOU et al., 2017). Além disso, há a suposição de que a dieta ocidental, direta

ou indiretamente, possa desencadear essa patologia (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2018).

Nesse sentido, os modelos de indução de colite com agentes químicos, como o ácido acético, possuem a vantagem de provocar inflamação em camundongos com sistema imunológico normal (NEURATH, 2012). Além disso, são de fácil administração e baixo custo (LOW et al., 2013). O ácido acético, quando administrado por via retal, é capaz de reproduzir a colite de forma difusa e dose-dependente, resultando em inflamação semelhante à colite ulcerativa (UC) e doença de Crohn (DC) em humanos, tanto em termos de mudanças moleculares quanto de características histológicas e clínicas (GOYAL et al., 2014).

A resposta inflamatória ocorre devido à ruptura da barreira epitelial (KAWADA; ARIHIRO; MIZOGUCHI, 2007), levando à liberação de prótons no espaço extracelular, promovendo acidificação intracelular e dano ao epitélio (RANDHAWA et al., 2014). Além disso, o modelo de administração retal de ácido acético em ratos induz uma inflamação aguda, possibilitando a observação de alterações em apenas 12 horas após a administração (FILMANN, 2007).

Neste estudo, observou-se um aumento nos escores macroscópicos de atividade inflamatória no grupo com colite, 12 horas após indução da doença com ácido acético a 8%, em comparação com os grupos controle. Somente a dose de 100 mg/Kg de Naringina foi capaz de reduzir os aspectos inflamatórios totais. Os mecanismos intracelulares que levam à ruptura da barreira epitelial nesses distúrbios foram alvo de crescente interesse, assim como o reforço dessa barreira por meio de intervenções farmacológicas. Em condições experimentais adequadas, a permeabilidade da parede celular pode ser reduzida principalmente afetando a estrutura das junções (COLLARES-BUZATO, 2001).

Os glicocorticoides, como a dexametasona, podem diminuir a permeabilidade da barreira e, conseqüentemente, reduzir o edema *in vivo* (GUYTON; HALL, 1996). A dexametasona, um glicocorticoide sintético, exerce um efeito direto na formação e manutenção das junções na linha celular endotelial cultivada (ROMERO et al., 2003), modulando a localização, estabilidade e montagem de proteínas de junção na membrana celular (PEIXOTO et al., 2006). É relevante destacar que a Naringina apresentou resultados semelhantes à dexametasona, indicando um efeito biológico promissor.

Além dos efeitos promissores da Naringina nos parâmetros macroscópicos, os resultados da análise microscópica também foram semelhantes. Após o tratamento com Naringina, os parâmetros microscópicos que indicam inflamação induzida pelo ácido acético, como perda da arquitetura da mucosa, espessamento da camada muscular, formação de abscessos, infiltrado celular inflamatório e ausência de células caliciformes, diminuíram e se assemelharam aos resultados obtidos com o uso da dexametasona. A Naringina demonstrou um direcionamento eficaz para o local alvo, baixa toxicidade e longo tempo de circulação.

Em relação aos marcadores antioxidantes, a Naringina mostrou efeito benéfico na preservação dos níveis totais de GSH e na redução dos níveis de MDA, indicando um papel antioxidante importante na proteção contra a peroxidação lipídica. O aumento da oxidação e peroxidação lipídica é uma característica chave desse modelo (VENKATASHIVAN S.K. et al.). Corroborando com os dados desse trabalho, Xiaolei Yu et al. (2023), relataram que a Naringina na concentração de 100 mg/Kg aumentou a atividade de GSH enquanto diminuiu os níveis de MDA, que é um importante subproduto da peroxidação lipídica, refletindo os graus de peroxidação lipídica e dano celular. Correia-Sá et al. (2020) também avaliou a atividade inflamatória em um modelo de colite ulcerativa em ratos tratados com Naringina e obteve resultados semelhantes, incluindo a redução da expressão da enzima iNOS e a inibição da transcrição de NF- κ B, indicando uma ação antioxidante e redução de espécies reativas de oxigênio.

Tanto a administração de dexametasona quanto a de Naringina a 100 mg/Kg sugerem um efeito biológico provavelmente relacionado à regulação positiva da citocina IL-1 β , inibindo a resposta inflamatória e favorecendo a proteção do cólon. Esse efeito é esperado, visto que alguns glicocorticoides, como a dexametasona, são eficazes na inibição da cascata inflamatória e na inibição da transcrição de mediadores, como o TNF- α (MORA et al., 2012). No caso da Naringina, seus flavonoides demonstram atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e gastroprotetoras (AMMAR. HH. et al., 2015).

Ratificamos as análises em H&E no trabalho da (Ribeiro M.E.N.P. et al 2022) que indicam que o tecido que recebeu o tratamento com o extrato de Naringina, um importante polifenol, apresentou uma importante recuperação da estrutura do colón e diminuiu a presença de células inflamatórias na região, diferente do grupo sem tratamento com o extrato polifenólico que apresentou

distúrbios na estrutura mucosa, epitélio danificado e uma grande presença de células inflamatórias, indicando que o extrato se mostrou eficaz no tratamento de colites.

Ressaltamos que no trabalho (FONTES N. F. A. 2023) o extrato da alga CT e as nanopartículas de ouro biossintetizadas com *C. tamariscifolia* (Au@CT), apresentaram resultados semelhantes ao fármaco padrão dexametasona, indicando assim que a alga CT possui efeito biológico promissor, semelhante ao fármaco padrão dexametasona e a Naringina. Diante dos efeitos biológicos promissores da alga CT nos parâmetros macroscópicos e microscópicos avaliados, foi de extrema importância que os resultados destes compostos naturais fossem semelhantes.

Portanto, os resultados deste estudo destacam o potencial terapêutico promissor da Naringina, comparável ao da dexametasona, no contexto das DII. Estas descobertas sugerem a possibilidade de abordagens mais eficazes e com menos efeitos colaterais para o tratamento dessas condições complexas, com a Naringina demonstrando benefícios notáveis na redução da inflamação e na proteção antioxidante.

8.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo forneceram uma compreensão mais aprofundada dos potenciais benefícios da Naringina no contexto da prevenção e tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Com base nas conclusões deste estudo, é possível inferir que a Naringina demonstra propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias significativas, particularmente no modelo experimental de colite induzida por ácido acético. Estes achados sugerem que a Naringina, especialmente quando administrada na dose de 100 mg/kg, poderia se configurar como uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da Doença de Crohn e da Colite Ulcerativa. Contudo, é crucial salientar que são necessárias pesquisas adicionais e ensaios clínicos para validar esses resultados e estabelecer as diretrizes para a utilização clínica da Naringina como terapia complementar ou alternativa nesse contexto.

9.0 REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, S. I. et al. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 2, p. 963-70, Sep 2011. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771650> >.

ABDOLLAHI, H. et al. IL-10, TNF- α and IFN- γ levels in serum and stomach mucosa of *Helicobacter pylori*-infected patients. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 10, n. 4, p. 267-71, Dec 2011. ISSN 1735-1502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184269> >.

ADIL, M.; KUMAR, V. S.; RAJMANE, A. R.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Naringin ameliorates acetic acid induced colitis through modulation of endogenous oxido-nitrosative balance and DNA damage in rats. **Journal of bio medical research**, v. 28, n. 2, p. 132-145, 2014.

ALAI, M.; LIN, W. J. Application of nanoparticles for oral delivery of acid-labile lansoprazole in the treatment of gastric ulcer: in vitro and in vivo evaluations. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 4029-41, 2015. ISSN 1178-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124659> >.

ALI, Y. et al. Attenuation of inflammatory mediators, oxidative stress and toxic risk evaluation of *Aporosa lindleyana* Baill bark extract. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 3, p. 1513-21, Sep 2014. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124276> >.

AMA-KURA, Y.; AMAKURA, Y.; FURUKAWA, Y.; MORI, H.; NAKAJIMA, M.; OHKUBO, Y.; OKUYAMA, S.; SAWAMOTO, A.; SUDO, M.; TAMANAHA, A.; YAMAMOTO, K.; YOSHIMURA, M. Neuro protective effect of *Citrus kawachiensis* (Kawachi Bankan) peels, a rich source of naringin, against global cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 82, n. 7, p. 1216-1224, 2018.

AMARAL, G. P. et al. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 55, p. 48-55, May 2013. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23279841> >.

Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytother Res**, v. 27, n. 6, p. 926-30, Jun 2013.

ISSN 1099-1573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933394> >.

ARAB, H. H. et al. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0122417, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25821971> >.

ARAGÃO, D. M. et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 128, n. 3, p. 629-33, Apr 2010. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064597> >.

ARDITTI, J.; STOESSL, A. Natural products of orchids. In BIELESKI, P.R.; FERGUSON, A. R.; CRESSWELL, M. M. (Eds.), **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**, p. 982-1002. Springer Netherlands, 1984.

ARUN, L. B. et al. In vivo anti-ulcer, anti-stress, anti-allergic, and functional properties of gymnemic acid isolated from *Gymnema sylvestris* R Br. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 70, 2014. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559073> >.

ATEUFACK, G. et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of *Piptadeniastrum Africanum* on experimentally induced gastric ulcers in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 214, Jul 2015. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26152207> >.

BALMUS, I. M. et al. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. **Saudi J Gastroenterol**, v. 22, n. 1, p. 3-17, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1998-4049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26831601> >.

BELAICHE, J. et al. Observational survey of NSAID-related upper gastrointestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterol Belg**, v. 65, n. 2, p. 65-73, 2002 Apr-Jun 2002. ISSN 1784-3227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148440> >.

BHATTACHARYA, A.; GHOSAL, S.; BHATTACHARYA, S. K. Effect of fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 74, n. 2, p. 109-16, Feb 2006. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352428> >.

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

BOCCHESI, R. A., DE OLIVEIRA, A.K.M. AND LAURA, V.A. **Cecropia pachystachya (Cecropiaceae) Seeds Germination Patterns before and after Their Passage by the Digestive Tract of Seed Dispersal Birds**: Revista de Biologia e Ciência da Terra. 8 2008.

BOLIGON, A. A. et al. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharm Sin B**, v. 4, n. 5, p. 358-67, Oct 2014. ISSN 2211-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579405> >.

BONAMIN, F. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chem Biol Interact**, v. 212, p. 11-9, Apr 2014. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480520> >.

BOUMA, G.; STROBER, G. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**. v.3, n.7, p.521-33, 2003.

BOURGONJE, A. R.; FEELISCH, M.; FABER, K. N.; PASCH, A.; DIJKSTRA, G.; VAN GOOR, H. Oxidative Stress and Redox-Modulating Therapeutics in Inflammatory Bowel Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 11, p. 1034–1046, 2020.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-22, Sep 1982. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6286012> >.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. 1. ed. Brasília: **Editora MS**, v. 2000, p. 60, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES: PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA NA ATENÇÃO BÁSICA/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. 1. ed. Brasília **Editora MS**, p. 151, 2012.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biol Chem**, v. 387, n. 10-11, p. 1329-35, 2006 Oct-Nov 2006. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081103> >.

CAMPBELL, E. L.; COLGAN, S. P. Control and Dysregulation of Redox Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Nature Reviews*. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 2, p. 106–120, 2019.

CAO, H.; CAO, Y.; FU, Y.; HAN, Y.; LIU, J.; SHEN, P.; ZHANG, N.; ZHANG, Z.; ZHU, K. Protective Effect of Naringin on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 50, p. 13133–13140, 2018.

CATARZI, S. et al. Oxidative state and IL-6 production in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 8, p. 1674-84, Aug 2011. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744422> >.

CEMEK, M.; YILMAZ, E.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E. Protective effect of *Matricaria chamomilla* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Pharm Biol**, v. 48, n. 7, p. 757-63, Jul 2010. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20645773> >.

CHEN, C. C.; CHEN, C. S.; LIN, C. W.; LIN, R. J.; OJCIUS, D. M.; WENG, C. F. Isolation, Chemical characterization, and antioxidant activities of a novel water-soluble oligopeptide from the fungus *Ganoderma lucidum* mycelium. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 3, p. 313-321, 2008.

CHEN, H. et al. Protective effects of pogostone from *Pogostemonis Herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Fitoterapia**, v. 100, p. 110-7, Jan 2015. ISSN 1873-6971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481373> >.

CHOUDHARY, M. K.; BODAKHE, S. H.; GUPTA, S. K. Assessment of the antiulcer potential of *Moringa oleifera* root-bark extract in rats. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 6, n. 4, p. 214-20, Aug 2013. ISSN 2093-8152. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23972244> >.

CONSOLINI, A. E. et al. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **J Ethnopharmacol**, v. 106, n. 1, p. 90-6, Jun 2006. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413716> >.

DAVIES, N. M. et al. NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 11, n. 1, p. 69-79, Feb 1997. ISSN 0269-2813. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9042976> >.

DAY, R. et al. A randomized trial of the efficacy and tolerability of the COX-2 inhibitor rofecoxib vs ibuprofen in patients with osteoarthritis. Rofecoxib/Ibuprofen Comparator Study Group. **Arch Intern Med**, v. 160, n. 12, p. 1781-7, Jun 2000. ISSN 0003-9926. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871971> >.

DE CARVALHO, K. I. et al. Geraniol-a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 4, p. 355-65, Apr 2014. ISSN 1432-1912. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24337826> >.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 15, n. 4, p. 316-28, Aug 2005. ISSN 0939-4753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054557> >.

DEĞER, C. et al. The effect of glutamine on pancreatic damage in TNBS-induced colitis. **Dig Dis Sci**, v. 51, n. 10, p. 1841-6, Oct 2006. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16957998> >.

DO C MAQUIAVELI, C. et al. Brazilian embauba (*Cecropia pachystachya*) extract reduces renal lesions in 5/6 nephrectomized rats. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 15, n. 4, p. 430-9, Dec 2014. ISSN 1752-8976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002134> >.

DUQUE, A. P. et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **J Pharm Pharmacol**, v. 68, n. 1, p. 128-38, Jan 2016. ISSN 2042-7158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727296> >.

EL-ALFY, A. T.; ABOURASHED, E. A.; MATSUMOTO, R. R. Nature against depression. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 14, p. 2229-41, 2012. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414105> >.

EL-ASHMAWY, N. E. et al. Gastroprotective effect of garlic in indomethacin induced gastric ulcer in rats. **Nutrition**, v. 32, n. 7-8, p. 849-54, 2016 Jul-Aug 2016. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158056> >.

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass**

Spectrom Rev, v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1098-2787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832618> >.

FIGUEREDO, S. M. et al. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. **J Ethnopharmacol**, v. 135, n. 3, p. 603-9, Jun 2011. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21392568> >.

FILARETOVA, L. P. et al. Gastroprotective action of glucocorticoid hormones during NSAID treatment. **Inflammopharmacology**, v. 13, n. 1-3, p. 27-43, 2005. ISSN 0925-4692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16259726> >.

FRIEDERICH, U.; FRITZEMEIER, K.H.; KINDL, H. Synthesis of bibenzylsandtheirin Corporation in tothephenan threnoid biosynthesis of Orchidaceae: a Stereo Chemical study. **Phyto chemistry**, v. 49, n. 5, p. 1263-1273, 1998.

FUNATSU, T. et al. Mucosal acid causes gastric mucosal microcirculatory disturbance in nonsteroidal anti-inflammatory drug-treated rats. **Eur J Pharmacol**, v. 554, n. 1, p. 53-9, Jan 2007. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17112499> >.

GAWLIK-DZIKI, U. et al. Nutraceutical potential of tinctures from fruits, green husks, and leaves of *Juglans regia* L. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 501392, 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616634> >.

GAZAL, M. et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Res Bull**, v. 108, p. 10-7, Sep 2014. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108233> >.

GHOSH, M. et al. Lysosomal membrane permeabilization causes oxidative stress and ferritin induction in macrophages. **FEBS Lett**, v. 585, n. 4, p. 623-9, Feb 2011. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219901> >.

GOLDSTEIN, J. L. et al. Reduced incidence of gastroduodenal ulcers with celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor, compared to naproxen in patients with arthritis. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 4, p. 1019-27, Apr 2001. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316141> >.

Clinical trial: the incidence of NSAID-associated endoscopic gastric ulcers in patients treated with PN 400 (naproxen plus esomeprazole magnesium) vs. enteric-coated naproxen alone. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 32, n. 3, p. 401-13, Aug 2010. ISSN 1365-2036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497139> >.

GOYETTE, P.; LABBÉ, C.; TRINH, T. T.; XAVIER, R. J.; RIOUX, J. D. Molecular Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Genotypes, Phenotypes and Personalized Medicine. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 177–199, 2007.

GUO, B. Q.; WANG, X. H.; XU, W. Y.; LI, Y. R. A new bibenzyl derivative from the orchid *Pholidotayunnanensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 10, p. 862-865, 2006.

GUL, M. et al. Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian J Exp Biol**, v. 38, n. 7, p. 625-34, Jul 2000. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11215303> >.

HADDAD, J. J. The involvement of L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione/GSH) in the mechanism of redox signaling mediating MAPK(p38)-dependent regulation of pro-inflammatory cytokine production. **Biochem Pharmacol**, v. 63, n. 2, p. 305-20, Jan 2002. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841806> >.

HALABI, M. F. et al. Gastroprotective activity of ethyl-4-[(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxybenzylidene) amino]benzoate against ethanol-induced gastric mucosal ulcer in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e95908, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800807> >.

HAMDAN, D. I. et al. Effect of hesperidin and neohesperidin from bitter-sweet orange (*Citrus aurantium* var. *bigaradia*) peel on indomethacin-induced peptic ulcers in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 3, p. 907-15, May 2014. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691249> >.

HEEBA, G. H.; HASSAN, M. K.; AMIN, R. S. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: role of nitric oxide and prostaglandins. **Eur J Pharmacol**, v. 607, n. 1-3, p. 188-93, Apr 2009. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217901> >.

HEIDARY MOGHADDAM, R.; SAMIMI, Z.; MORADI, S. Z.; LITTLE, P. J.; XU, S.; FARZAEI, M. H. Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. **European journal of pharmacology**, v. 887, 173535, 2020.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. **Phytother Res**, v. 20, n. 4, p. 239-49, Apr 2006. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557604> >.

HÖER, A. et al. Comparison of the effects of diclofenac or other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and diclofenac or other NSAIDs in combination with proton pump inhibitors (PPI) on hospitalisation due to peptic ulcer disease. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 16, n. 8, p. 854-8, Aug 2007. ISSN 1053-8569. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17323403> >.

HOOPER, L. et al. The effectiveness of five strategies for the prevention of gastrointestinal toxicity induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review. **BMJ**, v. 329, n. 7472, p. 948, Oct 2004. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475342> >.

HUNG, C. R. Importance of histamine, glutathione and oxyradicals in modulating gastric haemorrhagic ulcer in septic rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 4, p. 306-12, Apr 2000. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779130> >.

_____. Protective effects of lysozyme chloride and reduced glutathione on betel quid chewing-produced gastric oxidative stress and haemorrhagic ulcer in rats. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 115-29, 2004. ISSN 0925-4692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265315> >.

HUNT, R. H. et al. The gastrointestinal safety of the COX-2 selective inhibitor etoricoxib assessed by both endoscopy and analysis of upper gastrointestinal events. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 8, p. 1725-33, Aug 2003. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907325> >.

HUSSAIN, L. et al. Anti-Ulcerogenic Effects of Salmalia Malabarica in Gastric Ulceration--Pilot Study. **Adv Clin Exp Med**, v. 24, n. 4, p. 595-605, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 1899-5276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26469103> >.

JIANG, Q. et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- κ B pathway. **Int Immunopharmacol**, v. 29, n. 2, p. 370-6, Dec 2015. ISSN 1878-1705. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26507165> >.

KAMIYAMA, M. et al. Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 7, p. 1996-2005, Feb 2015. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658375> >.

KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Dis Mon**, v. 52, n. 5, p. 199-207, May 2006. ISSN 0011-5029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828361> >.

KOSOWER, N. S.; VANDERHOFF, G. A.; KOSOWER, E. M. Glutathione. 8. The effects of glutathione disulfide on initiation of protein synthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 272, n. 4, p. 623-37, Jul 1972. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5050922> >.

KULINSKIĀ, V. I. et al. [The erythrocyte and plasma glutathione system under peptic ulcer]. **Biomed Khim**, v. 54, n. 5, p. 607-13, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 2310-6972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105403> >.

KUMAR, V. S.; RAJMANE, A. R.; ADIL, M.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Naringinamelioratesaceticacidinducedcolitisthroughmodulationofendogenous oxido-nitrosative balance and DNA damage in rats. **Journal of biomedical research**, v. 28, n. 2, p. 132-145, 2014.

KUMAR, S. M. et al. GSH protects against oxidative stress and toxicity in VL-17A cells exposed to high glucose. **Eur J Nutr**, v. 54, n. 2, p. 223-34, Mar 2015. ISSN 1436-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24756473> >.

KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H. W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? **Aliment Pharmacol Ther**, v. 16, n. 12, p. 1997-2015, Dec 2002. ISSN 0269-2813. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452933> >.

LAI, K. C. et al. Celecoxib compared with lansoprazole and naproxen to prevent gastrointestinal ulcer complications. **Am J Med**, v. 118, n. 11, p. 1271-8, Nov 2005. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271912> >.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1254-62, Jun 1988. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3258836> >.

LANGENBACH, R. et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 483-92, Nov 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521478> >.

LANGSTON, W.; CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Insulin stimulation of gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression increases endothelial GSH during oxidative stress: influence of low glucose. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 11, p. 1591-9, Dec 2008. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18926903> >.

LAU, Y. L.; HOWELL, S.; CHAN, K. G.; HAJI IBRAHIM, M. Phyto Chemical analysis and antimicrobial activities of hexane, ethylacetate and methanol extracts of *Dendrobium crumenatum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 2, p. 180-185, 2016.

LI, C. L.; GE, X. T.; LI, G.; LV, F.; ZHANG, J. Naringin protect against bone loss in steroid-treated inflammatory bowel disease in a rat model. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 650, p. 22-29, 2018.

LEE, S. Y. et al. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg1 and its metabolites ginsenoside Rh1 and 20(S)-protopanaxatriol in mice with TNBS-induced colitis. **Eur J Pharmacol**, v. 762, p. 333-43, Sep 2015. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26054809> >.

LIANG, N. et al. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. **Food Chem**, v. 213, p. 251-9, Dec 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27451179> >.

LI, Y.; HUANG, T. T.; CARLSON, E. J.; MELOV, S.; URSELL, P. C.; OLSON, J. L.; NOBLE, L. J.; YOSHIMURA, M. P.; BERGER, C.; CHAN, P. H.; WALLACE, D. C.; EPSTEIN, C. J. Dilated Cardiomyopathy and Neonatal Lethality in Mutant Mice Lacking Manganese Superoxide Dismutase. **Nature Genetics**, v. 11, n. 4, p. 376-381, 1995.

LUNING, B. Alkaloids of the Orchidaceae. In SUKSHOM KASHEMSANTA, M.R. (Ed.), *Proceedings of 9th World Orchid Conference*, p. 349-382. **Bangkok**, 1980.

LUNING, B. Alkaloids of the Orchidaceae. In WITHNER, C.L. (Ed.), *The Orchids: Scientific Studies*, p. 349-382. **Wiley**, 1974.

LUNING, B. Hunting orchids for chemistry. In SENGHAS, S.K. (Ed.), **Proceedings**, 8th World Orchid Conference, p. 538-539, 1975.

LUNING, B. Orchid ethnobotany in the Asean Area. In RAO A. N (Ed.), *Proceedings of the Fifth ASEAN Orchid Congress*, p. 42-45. Singapore: **Parks & Recreation Department, Ministry of National Development**, 1986.

LUNING, B. Studies on the Orchidaceae alkaloids. 1. Screening of species for alkaloids. I. **Acta chemica Scandinavica**, v. 18, p. 1507-1516, 1964.

LUNING, B. Studies on the Orchidaceae alkaloids. IV. Screening of the species for alkaloids 2. **Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 857-861, 1967.

MARKLUND, S. L. Human Copper-Containing Superoxide Dismutase of High Molecular Weight. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 24, p. 7634-7638, 1982.

MELLO, V. J. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 4, p. 237-44, Apr 2008. ISSN 1618-095X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689943> >.

MENDONÇA, E. D. et al. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **J Ethnopharmacol**, Jul 2016. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27435375> >.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**, v. 86, n. 1, p. 271-8, May 1978. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/655387> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biol**, v. 6, p. 617-39, Dec 2015. ISSN 2213-2317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26520808> >.

MUELLER, D. et al. Influence of triterpenoids present in apple peel on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel disease (IBD). **Food Chem**, v. 139, n. 1-4, p. 339-46, Aug 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561115> >.

NAITO, Y., TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Molecular Fingerprints of Neutrophil-Dependent Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 10, p. 787-798, 2007.

OHBA, R. et al. Effect of cilostazol, a selective type-III phosphodiesterase inhibitor, on water-immersion stress-induced gastric mucosal injury in rats. **J Gastroenterol**, v. 41, n. 1, p. 34-40, Jan 2006. ISSN 0944-1174. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501855> >.

OHYAMA, K. et al. Toxicoproteomic analysis of a mouse model of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 420, n. 1, p. 210-5, Mar 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426477> >.

ORTMANN, C. F. et al. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotox Res**, v. 29, n. 4, p. 469-83, May 2016. ISSN 1476-3524. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26762362> >.

OZ, H. S.; CHEN, T. S.; MCCLAIN, C. J.; DE VILLIERS, W. J. Antioxidants as Novel Therapy in a Murine Model of Colitis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 297–304, 2005.

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 301294, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24877079> >.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 605-20, Jul 2014. ISSN 1432-1912. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798211> >.

PIMPLE, B. P.; KADAM, P. V.; PATIL, M. J. Protective effect of *Luffa acutangula* extracts on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins and antioxidants. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, n. 8, p. 610-5, Aug 2012. ISSN 2352-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840448> >.

REHMAN, M. U. et al. Diosmin protects against trichloroethylene-induced renal injury in Wistar rats: plausible role of p53, Bax and caspases. **Br J Nutr**, v. 110, n. 4, p. 699-710, Aug 2013. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23402272> >.

REINECKE, D.M.; KINDL, H. Stilbenoid bio synthesis. **Planta**, v. 195, n. 1, p. 41-45, 1994.

REINECKE, D.M.; KINDL, H. Stilbenoid production in cell suspension cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris*). **Plant**, v. 194, n. 2, p. 223-231, 1994.

REINECKE, D.M.; KINDL, H. The bio synthesis of stil benoids and phenanthrenes in vitro using a partícula tepreparation from cell suspensions of *Vanilla planifolia*. **Plant Physiol.**, v. 6, p. 985–991, 1994.

REZAI, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: na epiphenomenon or the cause?. **Dig DisSci**, v. 52, n. 9, p. 2015-21, 2007.

ROBERT, A. et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433-43, Sep 1979. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/456839> >.

ROSENSTIEL, P.; SCHREIBER, S. Expression signatures, barriers and beyond: the role of oxidative stress in murine colitis and human inflammatory bowel disease revisited. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n. 6, p. 496-9, Jun 2008. ISSN 0954-691X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467906> >.

RUBERT, J.; ZACHARIASOVA, M.; HAJLSLOVA, J. Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food--a review. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 32, n. 10, p. 1685-708, 2015. ISSN 1944-0057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26365870> >.

SANTANA, A. P. et al. The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO](PF₆) increases gastric mucosa protection in mice--involvement of the soluble guanylate cyclase/K(ATP) pathway. **Nitric Oxide**, v. 45, p. 35-42, Feb 2015. ISSN 1089-8611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25681154> >.

SANTANA, M. T; CERCATO, L.M; OLIVEIRA. J. P; CAMARGO. E. A. Medicinal Plants in the Treatment of Colitis: Evidence from Preclinical Studies. **Planta Med**, v.83, n.07, p. 588-614, 2017.

SANTOS CERQUEIRA, G. et al. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 683, n. 1-3, p. 260-9, May 2012. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426163> >.

SAXENA, B.; KRISHNAMURTHY, S.; SINGH, S. Gastroprotective potential of risperidone, an atypical antipsychotic, against stress and pyloric ligation induced gastric lesions. **Chem Biol Interact**, v. 190, n. 2-3, p. 155-64, Apr 2011. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315700> >.

SCHMIDT, B. M. et al. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 7, p. 360-6, Jul 2007. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576417> >.

SCHMITT, B. et al. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. **Redox Biol**, v. 6, p. 198-205, Dec 2015. ISSN 2213-2317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26262996> >.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842-60, Jun 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474247> >.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct 1968. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4973948> >.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, v. 147 p. 59–110, 2014.

SREEVALSAN, S.; SAFE, S. Reactive oxygen species and colorectal cancer. **Current colorectal cancer reports**, v. 9, n. 4, p. 350-7, 2013.

SHOSTAK, N. A. et al. [Clinical and instrumental characteristics of gastrointestinal bleeding caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs]. **Eksp Klin Gastroenterol**, n. 6, p. 91-4, 155, 2003. ISSN 1682-8658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15065536> >.

SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **J Nat Prod**, v. 76, n. 6, p. 1071-7, Jun 2013. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23734744> >.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 13-25, Sep 2013. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665395> >.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; LANAS, A. Interaction between *Helicobacter pylori* infection, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and/or low-dose aspirin use: old question new insights. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 28, p. 9439-50, Jul 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071338> >.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y.; FURUTA, T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 10, p. 1188-200, Mar 2010. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222161> >.

SUI, G. G.; LU, X. Y.; XIAO, H. B.; SUN, Z. L. Naringin Activates AMPK Resulting in Altered Expression of SREBPs, PCSK9, and LDLR To Reduce Body Weight in Obese C57BL/6J Mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 66, n. 34, p. 8983-8990, 2018.

TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 4535194, 2017.

TOMASELLO, G.; MAZZOLA, M.; LEONE, A.; SINAGRA, E.; ZUMMO, G.; FARINA, F.; DAMIANI, P.; CAPPELLO, F.; GERGES GEAGEA, A.; JURJUS, A.; BOU ASSI, T.; MESSINA, M.; CARINI, F. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, **Czechoslovakia**, v. 160, n. 4, p. 461-466, 2016.

WANG, H. et al. Simultaneous determination of three flavonoid C-glycosides in mice biosamples by HPLC-ESI-MS method after oral administration of *Abrus mollis* extract and its application to biodistribution studies. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 903, p. 68-74, Aug 2012. ISSN 1873-376X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819609> >.

WIBBERLEY, A. et al. Dual, but not selective, COX-1 and COX-2 inhibitors, attenuate acetic acid-evoked bladder irritation in the anaesthetised female cat. **Br J Pharmacol**, v. 148, n. 2, p. 154-61, May 2006. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547526> >.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: **WHO Press**, p. 12. 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO monograph on selected medicinal plants. Geneva: **WHO Press**, v. 4, p. 444, 2009.

WHO; IUCN; WWF. WORLD HEALTH ORGANIZATION; WORLD CONSERVATION UNION; WORLD WIDE FUND FOR NATURE. Guide line on the Conservation of Medicinal Plants. Somerton-UK: **Castel Cary Press**, p. 38, 1993.

WINK, M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. **Annual Plant Reviews**, v. 40, p. 198-290, 2010.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 17, n. 6, p. 24, Jun 2015. ISSN 1534-312X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109006> >.

YANG, Y. et al. Anti-inflammatory effect of taurocholate on TNBS-induced ulcerative colitis in mice. **Biomed Pharmacother**, v. 81, p. 424-30, Jul 2016. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27261622> >.

YAO, W. R. et al. Assessment of the antibacterial activity and the antidiarrheal function of flavonoids from bayberry fruit. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 10, p. 5312-7, May 2011. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469731> >.

ZAGHLOOL, S. S. et al. Protective effects of ginger and marshmallow extracts on indomethacin-induced peptic ulcer in rats. **J Nat Sci Biol Med**, v. 6, n. 2, p. 421-8, 2015 Jul-Dec 2015. ISSN 0976-9668. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26283843> >.

ZAKARIA, Z. A. et al. Mechanism(s) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 78, 2016. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912079> >.

ZHANG, Q. et al. The H⁺/K⁺-ATPase inhibitory activities of Trametenolic acid B from *Trametes lactinea* (Berk.) Pat, and its effects on gastric cancer cells. **Fitoterapia**, v. 89, p. 210-7, Sep 2013. ISSN 1873-6971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23742858> >.

ZHANG, S. L. et al. Alkaloids from *Mahonia bealei* possess anti-H⁺/K⁺-ATPase and anti-gastrin effects on pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1356-63, Sep 2014. ISSN 1618-095X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25172799> >.

ZHANG, Y. S.; WANG, F.; CUI, S. X.; QU, X. J. Natural dietary compound naringin prevent sazoxy methane/dextran sodium sulfate-induced chronic colorectal inflammation and carcinogenesis in mice. **Cancer Biol. Ther.**, v. 19, n. 8, p. 735-744, 2018.

ZHAO, H.; LIU, M.; LIU, H.; SUO, R.; LU, C. Naringin protects endothelial cells from apoptosis and inflammation by regulating the Hippo-YAP Pathway. **Bio Science reports**, v. 40, n. 3, BSR20193431, 2020.

ZHOU, R. P. et al. Chlorogenic Acid Prevents Osteoporosis by Shp2/PI3K/Akt Pathway in Ovariectomized Rats. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0166751, 2016.

ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28033335>>.

ZHU, H.; LI, Y. R. Oxidative Stress and Redox Signaling Mechanisms of Inflammatory Bowel Disease: Updated Experimental and Clinical Evidence. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 5, p. 474–480, 2012.

ZOU, X. et al. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 8, p. 994-1006, Aug 2012. ISSN 1873-4847. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937211>>.

10.0 ANEXO – 01

APÊNDICE A - FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

Fármacos

Fármaco	Princípio Ativo	Fabricante
Calmin	Xilazina 2%	Agener União
Cetamin	Cloridrato de cetamina 10%	Syntec
Decadron	Injetável Fosfato dissódico de dexametasona	Aché
Ácido Acético 8%	Ácido acético 8%	Êxodo científica
Extrato de Naringina Maria	Extrato de Naringina	Cedida pela Dra. Elenir Nobre do departamento de química da UFC adquirida da Xi'an Quanao localizada em
		Biotech Co., Xi'an, China.

Reagentes

Reagentes/materiais	Fabricante
Acetona	Dinâmica
Ácido acético científica	Êxodo
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) fina	Vetec química
Ácido tiobarbitúrico (TBA) Mp	biomedicals

Ácido tricloroacético (TCA)	Dinâmica
Ácido tricloroacético (TCA) a 50%	Dinâmica
Álcool Absolute	Êxodo
científica	
Anticorpo COX-2	Abcam
Anticorpo de captura (IL-1 β e TNF- α) IL1: e TNF- α :	Santa cruz Abcam
Anticorpo IL1	Santa cruz
Anticorpo INOS	Abcam
Anticorpo TNF- α e polímero	Abcam
Avidina-peroxidase	Dako
Cloreto de potássio (KCL)	Dinâmica
Cloreto de Sódio (NaCl)	Sigma-
Aldrich	
Cloreto de Tolonio (Azul de Toluidina)	Gasypath
DAB	Dako
Diidrocloreto de O-dianisidina	Sigma-
Aldrich	
Diluyente de anticorpo Spring	Bioscience
DPPH	Sigma-
Aldrich	
DTNB	Sigma-
Aldrich	
EDTA bissódico P.A	Êxodo
científica	
Estreptomicina	Gibco
Etanol	Dinâmica
Fosfato de Potássio Dibásico	Dinâmica
Fosfato de Potássio Monobásico	Dinâmica
Fosfato Sódio (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-
Aldrich	
GSH	Sigma-
Aldrich	
HCL	Dako

Hexano	Dinâmica
Hidróxido de cálcio	Sigma-
Aldrich	
HTAB	Dinâmica
Insulina	Sigma-
Aldrich	
KiT citocinas para TNF e IL1	R&D
Systems	
Metanol	Dinâmica
MTT brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)- 2,5- difeniltetrazólio]	Sigma-
Aldrich	
n-Butanol	Dinâmica
OPD o-fenilenediaminadiidrocloreto	Dako
Peróxido de Hidrogênio	Dako
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D
Systems	
Sulfato anidro	Synth
Tris	Promega
Trolox	Sigma-
Aldrich	
Tween 20	Biorad
Xilol	Dinâmica
Formol (H ₂ CO)	Dinâmica
Solução Salina Tamponada de Fosfato (PBS)	Dulbecco
Soluções	
Preparo	
Anticorpo biotinilado Tampão de lavagem	
1% de soro de carneiro	
Formol tamponado 10%	

6,5g de fosfato de sódio dibásico

4g de fosfato de sódio monobásico

800 mL de água destilada

Após dissolver as substâncias,
adicionar 100 mL de formaldeído 37%.

Completar para 1000 mL.

Solução Ácido Fosfórico 1% 1,176ml do H₃PO₄ 85% para,
100mL de H₃PO₄ 1%

Solução Acido Tiobarbitúrico 0,6% 0,6g de Ácido tiobarbitúrico em,
100mL de Ácido acético 7%

Solução de Dianisidina 27mL de água destilada

5mg de Dianisidina (cromóforo-cancerígeno)

3ml do tampão fosfato,

15µl de H₂O₂ 1%.

OBS: Fazer esse procedimento protegido da luz;

Solução de DTNB 13,2 mg de DTNB

3,33 mL de metanol

Solução de EDTA 0,02M 10mL de solução de EDTA 0,2M

100mL de água destilada

Solução de EDTA 0,2M 1,737g EDTA 23,3mL de água destilada

Solução de H₂O₂ a 3% 3mL de peróxido de hidrogênio (água oxigenada)

97mL de água destilada.

OBS: manter em vidro âmbar

Solução de H₂O₂ 1% 30 µl de H₂O₂ 30%

970 µL de água destilada.

25 mmol/L de glicose,

10 mg de insulina (10 µg/mL)

50 UI/mL de penicilina

50 µg/mL de estreptomicina

Solução KCL 1,15% (0,15M) 1,15g de KCl

100ml de água destilada
Tampão citrato pH 6,0 29,4g Citrato de Sódio
1000 mL H₂O
Ajustar pH 6,0 com HCL 1M

Tampão fosfato de potássio Solução A: 6,8g de fosfato de potássio monobásico em 1L de água destilada.
Solução B: 8,7g de fosfato de potássio dibásico em 1L de água destilada.

OBS: Armazenar ambos em refrigeração.

Tampão fosfato: 988mL de A + 12mL de B para preparar 1L de tampão
Tampão HTAP 0,5% 5g de HTAB (pó) + 1L de Tampão fosfato de potássio.
Ajustar o pH em 6,0.

OBS: Armazenar ambos em refrigeração.

Tampão TRIS 4,84g de tris
10 mL de 0,2 M EDTA
Ajustar o pH para 8,9
Tripsina a 0,05% Pesar 0,5 g de tripsina e dissolver em 50 mL de PBS [10X].
Completar o volume para 400 mL (água MilliQ).
Metanol aquoso a 5% 5mL de metanol
95mL de H₂O
Água destilada acidificada com HCl 0,1M Dissolver 8,4mL de HCL concentrado em água e completar à 1L
PBS- Tween 20 a 0,1% Cloreto de sódio 137 mM
Cloreto de Potássio 2,7 mM
Fosfato dissódico 4,3 mM
Fosfato monopotássico 1,4 mM

0,1% (v / v) de Tween-20 (Polisorbato 20)

Solução tamponada de fosforo (PBS) Solução Tampão PBS – pH 7.2 [10x]

NaCl.....82 gr

Na₂HPO₄.....10,5 gr qsp 1L de

H₂O NaH₂PO₄ + H₂O.....3,55 gr

OBS: Solução concentrada, portanto

diluir 100 ml de PBS para cada 900 ml

de H₂O (Milli-Q).

Solução de DPPH a 0,1mm 0,0394g DPPH

Completar com 10mL de metanol

OBS: Preparo em ambiente escuro e armazenar em refrigeração

Preparo do DPPH à 1:100 v/v:

100 µL da solução de DPPH a 0,1mm

100 mL de metanol a 80%