



CÍNTHIA BAÚ BETIM CAZARIN

**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DA CASCA DE PASSIFLORA  
EDULIS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA COLITE  
ULCERATIVA INDUZIDA POR TNBS**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CÍNTHIA BAÚ BETIM CAZARIN**

**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DA CASCA DE PASSIFLORA  
EDULIS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA COLITE  
ULCERATIVA INDUZIDA POR TNBS**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição, na área de concentração Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior**

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Cíntia Baú Betim Cazarin, e orientada pelo prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior.

---

**CAMPINAS**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

C318a Cazarin, Cíntia Baú Betim, 1979-  
Avaliação do consumo da casca de *Passiflora edulis* na prevenção e tratamento da colite ulcerativa induzida por TNBS / Cíntia Baú Betim Cazarin. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Junior.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Passiflora edulis*. 2. Colite ulcerativa. 3. Microbiota intestinal. 4. Ácidos graxos de cadeia curta. 5. Atividade antiinflamatória. I. Maróstica Junior, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of *Passiflora edulis* peel intake in prevention and treatment of TNBS induced ulcerative colitis

**Palavras-chave em inglês:**

*Passiflora edulis*

Ulcerative colitis

Intestinal microbiota

Short chain fatty acids

Anti-inflammatory activity

**Área de concentração:** Nutrição Experimental e de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Alimentos e Nutrição

**Banca examinadora:**

Mário Roberto Maróstica Junior [Orientador]

Anderson Luiz Ferreira

Cibele Lima de Albuquerque Galvani

João Ernesto de Carvalho

Clélia Akiko Hiruma

**Data de defesa:** 24-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

---

Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira  
Universidade Federal de Goiás

---

Profª. Dra. Cibele Lima de A. Galvani  
Instituto Federal de São Paulo

---

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho  
CPQBA – UNICAMP

---

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner  
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

---

Profª. Dra. Clélia Akiko Hiruma  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy  
Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

---

Profª. Dra. Juliana Alves Macedo  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP



## RESUMO

A doença inflamatória intestinal (DII) é doença crônica recidivante que atinge milhões de pessoas no mundo, englobando a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). A diferença entre as duas é a sua localização, sendo a RCU específica da região do cólon e reto. O tratamento atual para estas patologias é realizado a base de corticosteróides, imunomoduladores ou anti-TNF- $\alpha$ , conhecido como terapia biológica, os quais apresentam diversos efeitos colaterais ao paciente. A patogênese desta doença está relacionada com fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Acredita-se que o desequilíbrio da microbiota, assim como a ruptura na barreira natural exercida pela mucosa intestinal seja o primeiro passo para o desencadeamento da resposta inflamatória. As fibras alimentares apresentam função sobre a modulação da microbiota, sendo utilizada como substrato para a formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), gerados por meio do processo de fermentação. Em adição, os compostos fenólicos presentes nos alimentos apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória que podem atuar na modulação do processo inflamatório. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de um subproduto da indústria de alimentos, a casca do maracujá, como fonte de fibras e compostos fenólicos, na alimentação de ratos com colite induzida por TNBS e sua influência no processo inflamatório. Ratos Wistar foram alimentados com dieta AIN-93, sendo substituídos 50% da celulose da dieta padrão (AIN) por fibras da casca do maracujá (PFF), em dois ensaios biológicos: prevenção e tratamento. O dano causado à mucosa foi avaliado macro e microscopicamente, assim como a expressão de marcadores inflamatórios. Avaliação da microbiota e formação de AGCC foram realizadas no conteúdo cecal. Embora a avaliação macroscópica da mucosa tenha apresentado um escore maior para o grupo PFF no ensaio prevenção, a avaliação microscópica em ambos os ensaios não mostrou diferença no dano à mucosa entre os grupos. O ensaio tratamento mostrou diminuição da peroxidação lipídica do cólon, diminuição na contagem de enterobactérias e aeróbios totais, assim como aumento de ácido acético e butírico nas fezes do grupo PFF. Já no ensaio prevenção foi observada modulação dos lactobacilos e bifidobactérias. Com relação aos marcadores inflamatórios, foram observadas modulações significativas da expressão de IKK $\beta$ , COX-2 e iNOS nos animais alimentados com a dieta PFF. Estes resultados sugerem que a casca do maracujá *Passiflora edulis* pode modular a microbiota aumentando a produção de AGCC, assim como a expressão de marcadores inflamatórios observados na colite induzida por TNBS. Desta forma, a casca do maracujá poderia ser utilizada como coadjuvante na terapêutica da DII como fonte de fibras e polifenóis.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis*; colite ulcerativa; microbiota, ácidos graxos de cadeia curta, efeito anti-inflamatório.





## ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic relapsing disease that affects millions of people worldwide, encompassing Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). UC is an inflammation specific to the region of the colon and rectum. Current treatments for these diseases are based on the use of corticosteroids, immunomodulators or biological therapy, which have various side effects to the patient. The pathogenesis of IBD is related to genetic, immunological and environmental factors. It is believed that the microbial imbalance as well as natural break in the barrier exerted by the intestinal mucosa is the first step in triggering the inflammatory response. Food dietary fiber presents capacity to modulate the microbiota and improve short chain fatty acids (SCFA) formation, by fermentation process. In addition, the phenolic compounds present in the food have antioxidant and anti-inflammatory activities that can modulate the inflammatory process. Thus, this study aimed to evaluate the use of a byproduct of the food industry, the passion fruit peel, as a source of fiber and phenolic compounds in the diet of rats with TNBS-induced colitis and its influence on the inflammatory process. Wistar rats were fed a modified AIN-93 (50% of cellulose was replaced by passion fruit peel PFF) to evaluate prevention and treatment of colitis induced by TNBS. The damage to the mucosa was evaluated macroscopically and microscopically, as well as the expression of inflammatory markers. Evaluation of the microbiota and formation of SCFA in cecal contents were performed. The macroscopic appearance of the mucosa damage in the group PFF was higher than AIN in prevention trial. However, the microscopic evaluation in both trials showed no difference in mucosal damage amongst the groups. Treatment trial showed that PFF could promote a decrease in lipid peroxidation of the colon, decrease in enterobacteria and total aerobics counts, as well as increase in acetic and butyric acid in the stool. On the other hand, the prevention trial showed that the ingredient could exert modulation on lactobacilli and bifidobacteria. The inflammatory markers showed significant modulation, mainly  $IKK\beta$ , COX-2 and iNOS in animals fed with PFF diet. These results suggest that the passion fruit peel, *Passiflora edulis*, can modulate the microbiota, increase the production of SCFA, and modulate the expression of inflammatory markers observed in TNBS-induced colitis. Passion fruit peel could be used in the treatment of IBD as a source of fiber and polyphenols.

**Keywords:** *Passiflora edulis*; ulcerative colitis; microbiota, short chain fatty acids, anti-inflammatory effect.



## SUMÁRIO

<b>Introdução Geral</b>	1
Referências	5
<b>Objetivos</b>	7
<b>Capítulo 1 – Revisão de Literatura</b>	11
1. Aspectos gerais da doença inflamatória intestinal	13
1.1. Epidemiologia e etiologia	14
1.2. Fisiopatologia da doença inflamatória intestinal	18
2. Modelos experimentais	23
3. Tratamento farmacológico e cirúrgico da doença inflamatória intestinal	25
3.1. Tratamento alternativo da doença inflamatória intestinal	26
4. Maracujá	30
Referências	35
<b>Capítulo 2 - Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)</b>	47
Resumo	51
Abstract	53
Introdução	55
Métodos	56
Resultados e discussão	58
Conclusão	62
Referências	63
<b>Capítulo 3 – <i>Passiflora edulis</i> peel intake and ulcerative colitis: Approches in prevention and treatment</b>	71
Abstract	75
Introduction	77
Material and Methods	78
Passion fruit flour (PFF)	78
Animals and experimental design	79
Blood sampling	80
Tissue sampling	81
Colonic histology	81
pH and cecal microbiota	82
Cecal short chain fatty acids content	83
Statistical analysis	83
Results and Discussion	83
References	100
<b>Capítulo 4 – Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis by <i>Passiflora edulis</i> peel in rats</b>	105
Abstract	109
Introduction	111
Material and Methods	112
Passion fruit flour (PFF)	112
Animals and experimental design	112
Serum and colon tissue cytokines level	115
Colonic samples and immunofluorescence staining	115
Western blotting analyses	116
Statistical analysis	117

Results and discussion	118
References	128
Conclusão geral	133
Anexo	137

## AGRADECIMENTOS

À Deus sempre em primeiro lugar por me guiar sempre e por me dar força para nunca desistir dos meus sonhos.

À minha família que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou.

Ao meu marido (Ricardo) que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas, mesmo tendo que ficar 4 meses longe de mim.

Aos meus bebês (Susi, Gerry Lee, Thor, Leka e Kira) pela companhia em todos os momentos, fiéis companheiros e por me trazerem alegria nos momentos difíceis.

Ao prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior pela orientação, amizade e confiança depositada desde nosso primeiro contato. Espero que nossa parceria seja duradoura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsa no 1º ano de doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa de doutorado (processo 2010/16752-3), bolsa estágio no exterior (2012/24262-1) e financiamento do projeto (processo 2010/10131-7).

Ao meu querido amigo Dag Mendonça Lima que eu admiro muito e que considero um dos responsáveis por eu estar realizando este sonho. Sempre me mostrando a luz no final do túnel e acreditando mais que eu, algumas vezes, no meu potencial.

Ao Saulo Aidar, Vanderlei de Agostini e Sônia produtores de maracujá *P. edulis* amarelo orgânico, pela doação das amostras.

Ao prof. Dr. Flávio Luís Schmidt, à profa. Dra. Niurka Maritza Almeyda Haj-Isa (minha amiga querida) e à profa. Dra. Priscila Efraim por autorizar a utilização das instalações da planta piloto do departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA.

Ao prof. Dr. Benedito Carlos Benedetti da Faculdade De Engenharia Agrícola e aos técnicos do Laboratório de Pós Colheita Rosália, Rosa ou Francisco, a ajuda de vocês foi fundamental para a obtenção das farinhas.

Aos membros da banca de qualificação profa. Dr. Cláudia Cavaglieri e profa. Dra. Raquel Leal pela contribuição na proposta inicial do trabalho. As opiniões apresentadas foram fundamentais para a elaboração da pesquisa.

À Susana pela ajuda no laboratório de ensaios biológicos e ao Sr. Adauto pela ajuda na planta piloto e amizade.

Ao prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner por ceder seu laboratório para a realização das análises de Elisa, Blott e imunofluorescência.

À Conceição A. Villela pela amizade, ajuda técnica e carinho. Conhecer a Espanha na sua companhia foi maravilhoso, até mesmo quando você me levou a uma missa de 7º dia em catalão.

À Margarida (MEG) uma mulher de garra, sincera, mãezona, que estará sempre em meu coração.

À Angélica Iramaia pela atenção e disposição em ensinar e ajudar sempre, muito obrigada!!!!

Às minhas companheiras de trabalho Talita Cristina Colomeu e Juliana Kelly da Silva, pela paciência e companheirismo.

Às minhas companheiras de laboratório Anne (muchacha), Ângela, Gláucia, Nathália (baby) e Vivian pela amizade, risadas e estresse compartilhado.

À Soely pela amizade, ajuda e organização do laboratório LANUM.

Aos amigos do LIAE: Nayara (metadinha), Daniela, Luís Guilherme, Natália, Denise, Karlinha, Luís Felipe.

Aos amigos do Instituto de Biologia - Laboratório de Produtos Naturais: Anderson, Ricardo, Felipe, Luis e Aninha.

Ao pessoal do Instituto de Química: prof. Fábio Augusto, Stanislau, Leandro e Karina pelas análises de ácidos graxos de cadeia curta.

Ao prof. Félix e Jonas pela análise de polifenóis por espectrometria de massas.

Ao pessoal do Ambulatório de Doença Inflamatória Intestinal (Dr. Cláudio, Dra. Lourdes, Dra. Raquel, Dra. Priscila, Dra. Débora, Dra. Elisangela, Dr. Matosinho, Dayse, Claudete, Viviane, Roque .....) pelo carinho e recepção, aprendi muito com vocês.

Aos amigos estrangeiros Noelia (México), Ina (Alemanha), Alba, Francesca, Marta, Teresa, profa. Maria Pilar Utrilla Navarro, Jose Garrido (Pepe), prof. Julio J. Gálvez Peralta (Espanha). A amizade de vocês me fez compreender que não importa onde você esteja, sempre haverá alguém especial na sua vida. Muito obrigada por tudo!!!! Muchas Gracias!!! Thanks!!!

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Cosme e Marcos.

A todos os funcionários do DEPAN, especialmente à Cidinha, Francisco e Alessandra.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.  
Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins,  
para nosso próprio aprendizado.  
Nunca esquecendo do mais importante:  
nada nessa vida é por acaso.  
Absolutamente, nada.  
Por isso, temos que nos preocupar em fazer  
a nossa parte da melhor forma possível.  
A vida nem sempre segue a nossa vontade,  
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.  
(Autor desconhecido)*





## **Lista de Abreviaturas**

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta

CD = Crohn's disease

COBEA = Brazilian College of Animal Experimentation

COX-2 = ciclo-oxigenase-2 / cyclooxygenase-2

DC = doença de Chron

DII = doença inflamatória intestinal

DSS = dextran sulfato de sódio / dextran sulfate sodium

GABA = ácido gama-aminobutírico

HOMA = Homeostasis Model Assessment

IBD = inflammatory bowel disease

IFN- $\gamma$  = interferon *gamma*

IKK $\beta$  = inhibitor of *kappa* B kinase *beta*

IL = interleucina

IL-1 $\beta$  = interleukin 1 *beta*

IL-6 = interleukin 6

IL-8 – interleukin 8

IL-10 – interleukin 10

iNOS = enzima óxido nítrico induzível / inducible nitric oxide synthase

LC<sub>50</sub> = concentração letal 50%

LTB4 = leucotrieno B4

MAPK = proteína quinase ativadora de mitógeno

MCP-1 = proteína quimiotática de monócito-1 / monocyte chemoattractant protein-1

MPO = enzima myeloperoxidase

NF $\kappa$ B = fator nuclear *kappa beta*

NO = óxido nítrico / nitric oxide

PAMPs = padrões moleculares associados a patógenos

PFF = passion fruit flour

PGE2 = prostaglandina E2

RCU = retocolite ulcerativa

RNA<sub>m</sub> = RNA mensageiro

ROS = espécies reativas de oxigênio

RRPs = receptores de reconhecimento de patógenos

SHR = ratos espontaneamente hipertensos

SiO<sub>2</sub> = silicon dioxide

TLR = receptores Toll-like

TLR 2 – Toll-like receptor 2

TLR 4 – Toll-like receptor 4

TNBS = 2,4,6-ácido trinitrobenzosulfônico / 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid

TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa / tumor necrosis factor *alpha*

Treg = células T reguladoras

UC = ulcerative colitis

## *INTRODUÇÃO GERAL*

---



A patogênese da doença inflamatória intestinal (DII) está relacionada a diversos fatores, entre eles fatores genéticos, ambientais, microbiológicos e imunológicos [1-2]. A DII é uma desordem inflamatória do trato gastrointestinal, a qual é constituída basicamente por duas patologias, retocolite ulcerativa inespecífica (RCU) e a doença de Crohn (DC), sendo a RCU uma caracterizada por uma inflamação não-transmural restrita ao colón e a DC uma inflamação transmural que pode atingir a mucosa de todo o trato gastrointestinal [3].

A DII se tornou mais evidente no último século, apresentando um aumento nos casos de RCU, principalmente por influência de fatores ambientais associados ao estilo de vida ocidental, especialmente com relação à ingestão de alimentos e a utilização de antibióticos, os quais estão envolvidos em alterações na microbiota intestinal [4-5]. O desequilíbrio na microbiota intestinal tem sido postulado como o possível responsável pela iniciação e progressão da inflamação, especialmente quando o crescimento de bactérias patogênicas é superior ao das não patogênicas [6].

Somado ao processo inflamatório podemos observar um aumento no estresse oxidativo e uma diminuição na capacidade antioxidante endógena de pacientes com DII, principalmente entre pacientes com doença em atividade [7-8].

Neste sentido, a busca por novas alternativas para a prevenção e tratamento da DII vem sendo realizada nos últimos anos. Os prebióticos tem demonstrado papel benéfico na saúde gastrointestinal aumentando o teor de biomassa e o conteúdo de água nas fezes, melhorando assim trânsito intestinal [9], melhorando a eficácia do sistema imunológico [10], modulando a microbiota [11] e aumentando a produção de AGCC [12-13], a qual se apresenta deficiente na DII [14]. Já os compostos com atividade antioxidante podem auxiliar na terapêutica da DII, uma vez que há uma diminuição na resposta antioxidante endógena da mucosa intestinal dos pacientes com DII, a qual pode contribuir tanto para a patogênese quanto para a perpetuação do processo inflamatório [15].

Desta forma, acredita-se que o consumo de alimentos que favoreçam a produção de ácidos graxos de cadeia curta, estimule a atividade secretória das células caliciformes e diminuam o processo inflamatório, melhorem o status antioxidante e apresentem

capacidade imunomoduladora, como é o caso das fibras solúveis e dos compostos fenólicos, pode ser uma alternativa para a prevenção e controle da DII [2, 16].

A casca do maracujá é um subproduto da indústria de alimentos com elevado potencial tecnológico e funcional. Apresenta em sua composição  $81,9\% \pm 1,4$  de fibra dietética total, sendo  $62,4\% \pm 0,7$  composta por fibras insolúveis e  $17,9\% \pm 0,4$  por fibras solúveis [17]. Além disso, a casca do maracujá *P.edulis* apresenta em sua composição compostos fenólicos com atividade antioxidante e anti-inflamatória, como é o caso da isoorientina ( $1,230 \pm 0,008$  mg/g casca seca) [18].

A tendência das pesquisas em Nutrição vem perdendo o enfoque epidemiológico e fisiológico clássicos. Atualmente é reconhecida a importância de se compreender o efeito dos nutrientes e compostos bioativos presentes nos alimentos em concentrações moleculares e como estes podem atuar na prevenção de patologias, principalmente àquelas diretamente relacionadas à ingestão alimentar [19].

Nesse sentido, o escopo do presente trabalho foi investigar o efeito do consumo da farinha da casca do maracujá na prevenção e no tratamento do processo inflamatório da colite experimental. A presente tese está dividida em quatro capítulos, sendo que os resultados estão apresentados na forma de artigos científicos nos capítulos 2, 3 e 4.

**Referências**

1. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
2. Galvez, J., M.E. Rodriguez-Cabezas, and A. Zarzuelo, *Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(6): p. 601-8.
3. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
4. Paul, G., V. Khare, and C. Gasche, *Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10*. European Journal of Clinical Investigation, 2012. **42**(1): p. 95-109.
5. Loftus, E.V., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-1517.
6. Mylonaki, M., et al., *Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 481-7.
7. Maor, I., et al., *Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease*. Dig Dis Sci, 2008. **53**(8): p. 2208-14.
8. Tuzun, A., et al., *Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease*. Clin Biochem, 2002. **35**(7): p. 569-72.
9. Mihatsch, W.A., J. Hoegel, and F. Pohlandt, *Prebiotic oligosaccharides reduce stool viscosity and accelerate gastrointestinal transport in preterm infants*. Acta Paediatrica, 2006. **95**(7): p. 843-8.
10. Boderia, P., *Influence of prebiotics on the human immune system (GALT)*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2008. **2**(2): p. 149-53.
11. Costalos, C., et al., *The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants*. Early Hum Dev, 2008. **84**(1): p. 45-9.
12. Rodriguez-Cabezas, M.E., et al., *Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (Plantago ovata seeds) in HLA-B27 transgenic rats*. Clin Nutr, 2003. **22**(5): p. 463-71.
13. Rodriguez-Cabezas, M.E., et al., *Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats*. J Nutr, 2002. **132**(11): p. 3263-71.
14. Huda-Faujan, N., et al., *The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects*. Open Biochem J, 2010. **4**: p. 53-8.
15. Kruidenier, L., et al., *Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease*. Journal of Pathology, 2003. **201**(1): p. 17-27.
16. Lima de Albuquerque, C., et al., *Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat*. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2010. **5**(3): p. e111-e116.
17. Yapo, B.M. and K.L. Koffi, *Dietary fiber components in yellow passion fruit rind--a potential fiber source*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(14): p. 5880-3.
18. Zeraik, M.L., et al., *Analysis of passion fruit rinds (Passiflora edulis): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity*. Química Nova, 2012. **35**: p. 541-545.

19. Mead, M.N., *Nutrigenomics: the genome--food interface*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(12): p. A582-9.



## *OBJETIVOS*

---



**Objetivo Geral**

Avaliar a composição centesimal da farinha obtida da casca do maracujá (*Passiflora edulis*) e o impacto do seu consumo agudo e crônico, na diminuição do quadro inflamatório de ratos com doença inflamatória intestinal induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) .

**Objetivos Específicos**

- ✓ Caracterizar a farinha da casca do maracujá quanto ao conteúdo de fibra dietética e/ou fração não digerível e capacidade antioxidante,
- ✓ Avaliar o impacto do consumo da casca do maracujá na formação de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal; modulação da microbiota intestinal; na atividade das enzimas antioxidantes; peroxidação lipídica e atividade da enzima mieloperoxidase no tecido cólico; na expressão das citocinas IL-1  $\beta$  , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-10; na expressão das enzimas óxido nítrico induzível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2); ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF-kB; na expressão dos receptores Toll-like 2 e 4; assim como avaliar alterações na morfologia do tecido cólico.



## *CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA*



## 1. Aspectos gerais da doença inflamatória intestinal

Doença inflamatória intestinal (DII) é um grupo de desordens inflamatórias crônicas que comprometem o trato gastrointestinal, destacando-se a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) [1]. Diferenças histológicas são observadas entre estas doenças, sendo a RCU caracterizada por uma inflamação não-transmural, ou seja, se limitam à mucosa e submucosa, apresentando criptite e abscesso de criptas. Este tipo de inflamação é restrita ao cólon, começando no reto, a qual se espalha proximalmente de maneira contínua, frequentemente envolvendo a região periapendiculares. Os pacientes geralmente apresentam diarreia com sangue, fezes purulentas ou com muco, podendo apresentar ambos, assim como cólicas abdominais durante os movimentos intestinais [1]. Já na DC observa-se uma inflamação transmural, a qual pode afetar de forma descontínua qualquer parte do trato gastrointestinal desde boca até o ânus, sendo mais frequentemente afetadas as regiões do íleo terminal e perianal. Este tipo de inflamação é caracterizada por um espessamento de mucosa, aparecimento de fissuras e granulomas não caseosos; podendo apresentar como complicação o surgimento de restrições, abscessos ou fístulas. O quadro clínico desta doença é caracterizado por diarreia, dor abdominal, febre, perda de peso, podendo apresentar complicações à distância como dores articulares, aftas, lesões da pele, uveíte, cálculo renal e biliar [1].

Pacientes com DII apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer colorretal, risco este que pode aumentar quanto maior o tempo de duração da doença, extensão anatômica e grau da inflamação, presença de colangite esclerosante primária e antecedentes familiares de câncer colorretal [2].

A etiologia da DII é desconhecida, sendo esta uma doença crônica recidivante, caracterizada por períodos de exacerbação dos sintomas seguidos de intervalos de remissão [3]. A DII geralmente se desenvolve a partir da idade adulta jovem [4], no entanto há uma proporção significativa de diagnósticos realizados na infância [5-6]. De maneira geral, a incidência da DII apresenta-se em dois picos de maior relevância, sendo o primeiro momento entre a segunda e terceira década de vida para DC e terceira e quarta década para RCU: seguido por um segundo momento em idades mais avançadas (60-70 anos) [4, 7].

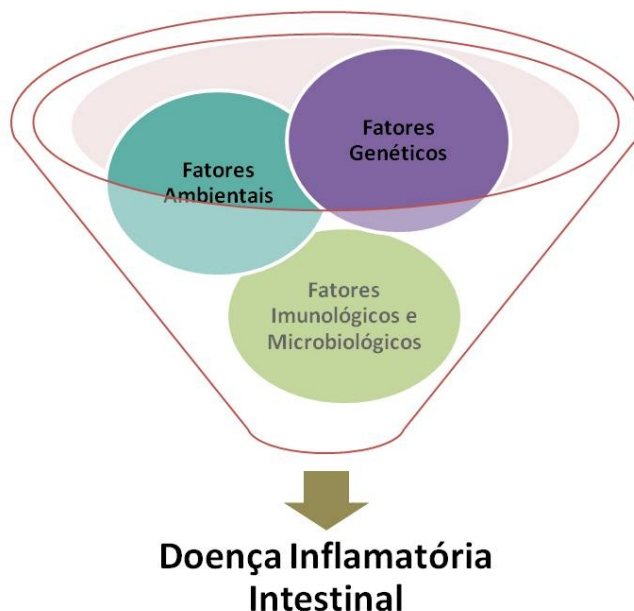
Estas doenças atingem milhões de pessoas no mundo, comprometendo sua qualidade de vida e aumentando de forma significativa os gastos privados e públicos com seu tratamento [4].

As maiores incidências de DII são observadas no norte da Europa, Reino Unido e América do Norte, sendo mais expressiva a incidência de RCU que DC [4]. Nota-se um crescente aumento no número de casos de pessoas com DII em países da Ásia, África e América Latina que antes apresentavam baixa incidência destas doenças, porém são poucos os estudos prospectivos e de base populacional [4, 7-8].

### **1.1. Epidemiologia e etiologia**

A patogênese da DII está relacionada a diversos fatores, entre eles os genéticos, ambientais, microbiológicos e imunológicos [9-10], sendo reconhecida como uma doença multifatorial (Figura 1). A DII se tornou mais evidente no último século, apresentando um aumento nos casos de RCU, principalmente por influência de fatores ambientais associados ao estilo de vida ocidental, especialmente com relação à ingestão de alimentos industrializados e a utilização de antibióticos, os quais estão envolvidos em alterações na microbiota intestinal [7, 11]. O desequilíbrio na microbiota intestinal tem sido postulado como o possível responsável pela iniciação e progressão da inflamação, especialmente quando o crescimento de bactérias patogênicas é superior ao das não patogênicas [12].





**Figura 1.** Fatores relacionados à etiologia da doença inflamatória intestinal.

A incidência de DC nos Estados Unidos da América e Europa é de 50 casos de para cada 100 mil habitantes, com 12 casos de RCU para cada 100 mil habitantes nos Estados Unidos. Esta incidência pode variar de acordo com a localidade conforme Tabela 1. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as taxas de incidência vêm aumentando, porém estes dados epidemiológicos ainda são desconhecidos [13].

Observa-se uma diferença na incidência da DII entre os gêneros, sendo a DC mais prevalente no sexo feminino no final da adolescência e início da idade adulta, sugerindo que fatores hormonais podem estar correlacionados com a expressão da doença; enquanto que a RCU tende a predominar no sexo masculino [4, 7]. Outro fator de risco para o desenvolvimento da DII, em especial DC, entre as mulheres é o uso de contraceptivos orais [14], porém este dado é muito controverso uma vez que ensaios com diferentes modelos experimentais mostram resultados ambíguos [15].

**Tabela 1.** Taxa de incidência de retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Chron (DC) (casos por 100.000 habitantes por ano).

Autor	Localização	Ano	RCU	DC
Jacobsen et al. [16]	Dinamarca	1998 - 2002	0,97	0,5
Nerich et al. [17]	França	2000 - 2003	7,2	8,2
Ng et al. [18]	Austrália	2001	0,76	0,54
Vendrell et al. [19]	Porto Rico	2005	23,3	14,9
Mangat et al. [20]	Vancouver	2006	5,0	7,9
Wilson et al. [21]	Austrália	2007 - 2009	11,2	17,4
Tursi et al. [22]	Itália	2009 - 2012	6	5
Zhao et al. [23]	China	2010	1,45	0,51

Estudos epidemiológicos mostram que os fatores genéticos apresentam forte influência sobre a patogênese da DII, aumentando de 8 a 10 vezes as chances de seu desenvolvimento entre parentes. A incidência de DII entre judeus Ashkenazi, residentes ou não em Israel, é grande; porém não há concordância quando se avalia a incidência entre gêmeos[4, 24]. Dessa forma, embora possa existir influência genética para o desenvolvimento de DII, estudos epidemiológicos com populações migrantes mostram que aspectos ambientais e do estilo de vida são mais relacionados com a incidência destas patologias que fatores genéticos [7].

Dentre os fatores ambientais o tabagismo e a apendicectomia parecem afetar o risco de desenvolvimento da DII. O tabagismo tem sido associado a uma menor incidência de RCU, possivelmente devido ao papel exercido pela nicotina na modulação de citocinas, produção de muco e no fluxo sanguíneo na mucosa cólica [25]; porém não há um consenso em relação ao seu real mecanismo de ação. Já com relação à DC as observações não são muito claras, há relatos de que o tabagismo aumenta sua incidência

[7], por outro lado há dados de baixa incidência de DC em população com elevado número de fumantes como na Ásia e África e elevada incidência em populações com número reduzido de fumantes (Suécia e Canadá) [4]. A apendicectomia parece ser uma intervenção cirúrgica com efeito protetor contra a RCU, mas não para a DC, a qual parece aumentar o risco de desenvolvimento após o procedimento cirúrgico [26].

Com relação aos hábitos alimentares, nota-se que o elevado consumo de gorduras (ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos  $\omega$ -6), assim como carnes, está associado ao aumento no risco de desenvolvimento da DII [27-28]. Diferenças observadas nos hábitos alimentares são os maiores indicadores de que a dieta é um fator de risco para o desenvolvimento da DII, principalmente quando observamos diferenças significativas entre as regiões geográficas e o aumento da incidência destas doenças em populações migrantes [7]. Por outro lado, o consumo de dietas ricas em frutas, vegetais e fibras mostram uma diminuição no risco de desenvolvimento de DC e RCU [27].

Alguns eventos do início da infância têm demonstrado influencia sob o desenvolvimento da DII. Uma meta-análise realizada com 17 artigos científicos sustenta a hipótese de que o aleitamento materno é um fator protetor que diminui o risco de desenvolvimento da DII [29], sendo este mais importante com relação a DC [7]. Outra teoria que tem demonstrado forte correlação com o desenvolvimento da DII é a “hipótese da higiene”. A baixa exposição aos patógenos entéricos na infância, melhora na qualidade do saneamento básico e da higiene que podem conduzir tardiamente a uma resposta imunológica inadequada após exposição a novos antígenos [30]. Viver em zonas rurais (fazenda) e ter uma horta em casa durante a infância também são fatores que parecem diminuir a incidência de DII [31].

Fatores ambientais que resultam em estresse psicológico também podem agravar a DII devido a alterações funcionais e morfológicas na mucosa intestinal [32], as quais levam ao rompimento da barreira intestinal expondo o indivíduo a antígenos presentes no lúmen e conseqüentemente aumentando o risco de desenvolvimento da inflamação intestinal [33].

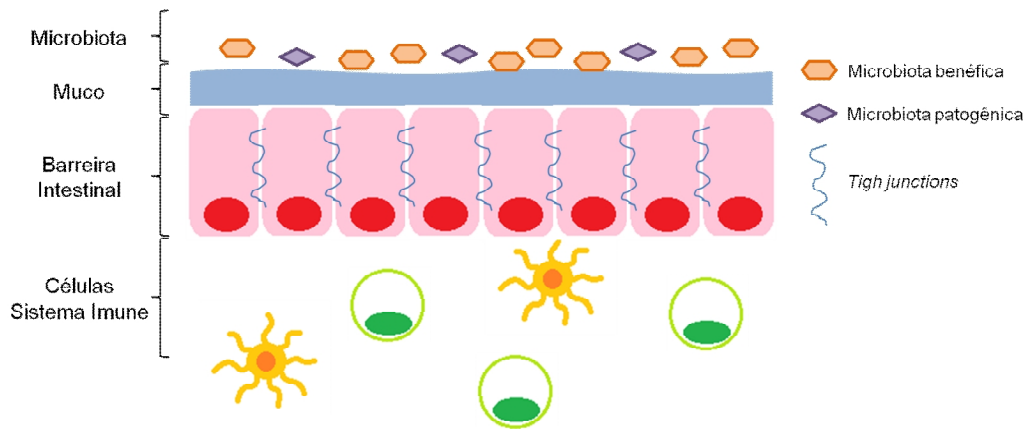
## 1.2. Fisiopatologia da doença inflamatória intestinal

Depois de muitas investigações a respeito, evidências suportam que a DII é um distúrbio multifatorial da homeostase da mucosa, a qual leva a uma hiper-responsividade do sistema imunológico inato e adaptativo da mucosa [34]. A primeira linha de defesa do sistema imunológico da mucosa é uma barreira epitelial, que é protegida por uma camada de muco, composta por glicoproteínas (mucina), água, eletrólitos, macromoléculas celulares e microrganismos. A mucina intestinal é secretada pelas células caliciformes, sendo que qualquer alteração qualitativa ou quantitativa nesta barreira protetora pode favorecer o ataque do epitélio, assim como importantes alterações fisiológicas [35-36]. Faure et al. [36], observaram diminuição na expressão de RNAm de mucina 2, após indução de RCU por dextran sulfato de sódio (DSS) em modelo experimental utilizando ratos da linhagem Sprague-Dawley; demonstrando que há menor produção de muco e maior exposição da mucosa a potenciais agentes agressores na RCU.

A integridade desta barreira protetora exercida pelo epitélio intestinal favorece o tráfego normal de substâncias entre a mucosa e o ambiente cólico. A barreira física do epitélio intestinal se complementa com um sistema imune inato bem evoluído, o qual tem a função de defender contra a invasão de patógenos, assim como controlar a resposta inflamatória inerente à presença da microbiota comensal [37]. O intestino apresenta em seu estado normal uma microbiota constituída por mais de 500 espécies de bactérias, com destaque para a região do cólon. As bactérias comensais são responsáveis pela modulação de diversos genes, envolvidos com diversas funções intestinais, como por exemplo, a fortificação da barreira mucosa, absorção de nutrientes, metabolismo de xenobióticos e maturação intestinal pós-natal [1].

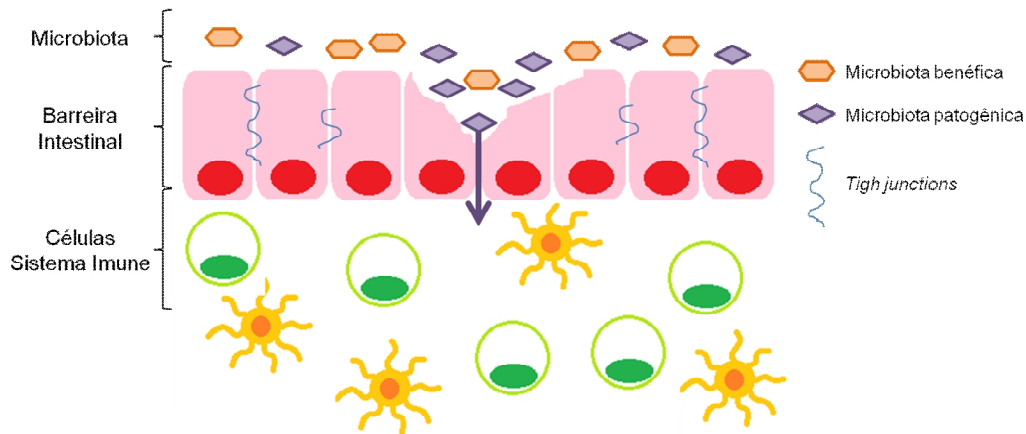
A Figura 2 mostra um esquema da barreira intestinal, a qual é estabelecida por uma monocamada de células epiteliais colunares polarizadas, que são ligadas por junções intercelulares (*tight junctions*), que mantêm a ligação das células e a separação do conteúdo luminal do intestino com o meio intracelular. A análise de biópsias de cólon sigmóide de pacientes com DC leve revelou que há uma diminuição no número destas junções, assim como diminuição da sua capacidade estrutural. Citocinas pró-inflamatórias presentes na DII, dentre outros fatores podem induzir este tipo de defeito

na barreira intestinal, assim como regular a expressão gênica e os processos de redistribuição das junções intercelulares [38].



**Figura 2.** Barreira intestinal em estado fisiológico, com muco, presença de *tigh junctions* entre as células intestinais e a microbiota comensal em estado de homeostase.

A figura 3 mostra que a perda desta barreira física pode levar a alterações na resposta imune, observada na DII, favorecendo um elevado influxo de substâncias presentes no lúmen, como por exemplo, bactérias entéricas e antígenos, promovendo uma sobrecarga do sistema imunológico, induzindo uma resposta inflamatória [39-40].



**Figura 3.** A perda da barreira intestinal, ausência da camada de muco, distribuição irregular e perda de função das *tigh junctions*, disbiose são algumas das características observadas no processo inflamatório da doença inflamatória intestinal.

O reconhecimento de patógenos ou de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), assim como da microbiota comensal, pelas células epiteliais intestinais é realizado por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), dentre eles podemos citar os receptores de membrana Toll-like (TLR). É possível que na inflamação crônica a expressão dos TLR esteja aumentada, principalmente devido à presença de citocinas pró-inflamatórias [41].

O sistema imunológico intestinal utiliza diferentes mecanismos para regular as altas concentrações de micro-organismos presentes na microbiota e proteger a superfície da mucosa contra espécies patogênicas; de forma que quando uma via se apresenta deficiente, outra atuará de forma a compensar esta deficiência [42]. Ainda não está claro como o sistema imune faz o reconhecimento diferenciado da microbiota comensal das espécies patogênicas, visto que o reconhecimento dos PAMPs de ambas as espécies parece ser de igual intensidade. Desta forma, uma das hipóteses levantadas é a de que as espécies patogênicas causem dano ao tecido por meio de seus produtos da matriz extracelular, assim como produtos celulares como ácidos nucleicos, ácido úrico e componentes mitocondriais que são liberados e podem ser detectados por meio de várias RRP, ativando assim uma resposta inflamatória. Isso confirma a possibilidade

de que o bloqueio ou deficiência destes receptores que reconhecem estes produtos celulares pode atenuar a resposta inflamatória [43].

Dentre as estruturas celulares presentes na mucosa, as células dendríticas e os macrófagos estão envolvidos no fenômeno da imunidade inata local, apresentando papel importante na formação da resposta imunológica adaptativa a antígenos intestinais. Na DII e nos modelos experimentais de colite, observa-se um aumento na população de células dendríticas e macrófagos fenótipo ativado, com a expressão aumentada de receptores microbianos, os quais contribuem para a patologia da doença por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias [44-45].

O acúmulo de neutrófilos nas criptas epiteliais e na mucosa intestinal na DII está diretamente relacionado aos aspectos clínicos da doença e à lesão causada ao epitélio. Neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, assim como mieloperoxidase na mucosa intestinal, que induzem ao estresse oxidativo e conseqüentemente ao dano da mucosa, podendo estes agir como mediadores da quebra da barreira intestinal na DII [46-47].

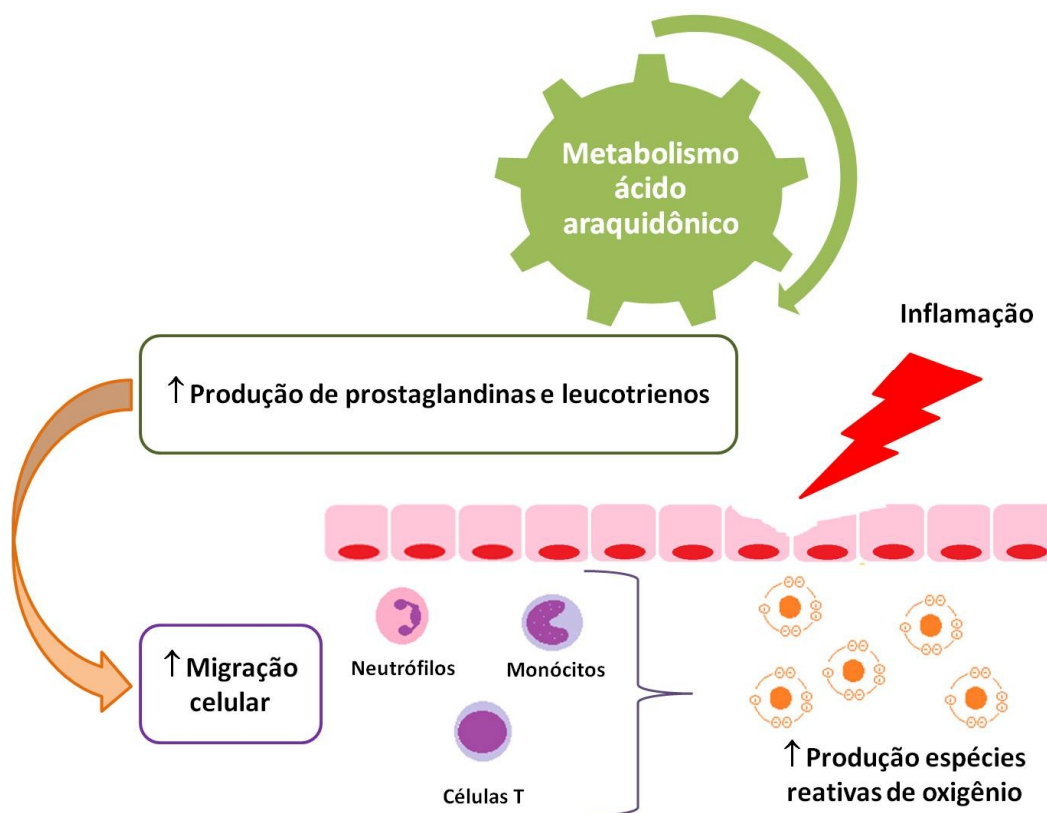
Além da presença de um grande infiltrado celular na DII, podemos observar também produção inadequada de anticorpos e disfunções de células T. Análise do perfil molecular de citocinas produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup> da mucosa de pacientes com DC mostraram aumento na produção de *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ), caracterizando uma resposta do tipo Th1; já quando analisadas células T CD4<sup>+</sup> da lâmina própria de pacientes com RCU observa-se um aumento na produção de IFN- $\gamma$ . Há ainda um aumento significativo na produção de interleucina-5 (IL-5) na RCU comparado aos pacientes com DC e saudáveis, sugerindo que as citocinas do tipo Th2 podem desempenhar importante papel nesta patologia [48]. Recentemente, novas populações de células T foram descobertas, dentre elas estão as células T reguladoras (Treg) e as células Th17, as quais atuam no controle da resposta imune contra auto-antígenos impedindo a auto-imunidade e manutenção da auto-tolerância [49]. Desta forma, o paradigma clássico de resposta Th1/Th2 na DII tem sido contestado por vários trabalhos que sustentam a hipótese de que essas vias podem não ser mutuamente excludentes [50-51].

Outra observação em biópsias da mucosa cólica de pacientes com DII é o aumento de atividade da lipoxigenase e cicloxigenase, metabólitos do ácido araquidônico, e aumento da liberação de prostaglandinas e leucotrienos, principalmente leucotrieno B4 (LTB4) na fase aguda da doença [52-53]. Os leucotrienos são mediadores pró-inflamatórios lipídicos, sendo que o LTB4 apresenta elevada propriedade de quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e células T efectoras para o local da inflamação (Figura 4)[54].

Sheibanie et al. [55] observaram ainda que altos níveis de prostaglandinas (PGE2) podem desempenhar papel pró-inflamatório na DII mudando o perfil de citocinas na lâmina própria, contribuindo para a perpetuação da inflamação e agravamento do processo inflamatório por meio da indução preferencial de células dendríticas e, possivelmente, macrófago derivados de IL-23, expansão de células Th17 autoimunes e sobrevivência de organismos patogênicos. Em adição, o aumento na expressão de mRNA de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) foi observado em carcinomas coloretal de humanos comparado à mucosa saudável, sugerindo que a inibição da COX-2 e seus metabólitos podem atuar na prevenção do câncer coloretal [54], que tem risco aumentado de incidência entre os pacientes com DII [2].

Somado ao processo inflamatório podemos observar um aumento no estresse oxidativo e uma diminuição na capacidade antioxidante endógena de pacientes com DII, principalmente entre pacientes com doença em atividade [56-57]. Os neutrófilos e os monócitos são os maiores produtores de espécies reativas de oxigênio na mucosa, as quais tem a capacidade de oxidar ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática gerando a peroxidação lipídica, assim como proteínas, alterando a funcionalidade das células [58], que podem levar a mutações gênicas envolvidas na etiologia do câncer coloretal [59].





**Figura 4.** Efeito do metabolismo do ácido araquidônico na doença inflamatória intestinal.

## 2. Modelos experimentais

Existem vários modelos animais de DII, dentre os quais alguns apresentam o desenvolvimento espontâneo da doença e outros de maneira induzida. A utilização destes modelos experimentais no ramo científico tem fornecido informações valiosas sobre a patogênese da resposta inflamatória da DII, no entanto nenhum deles reproduz completamente a etiologia e patologia da DII que acomete os humanos [60-61].

Dentre os modelos de desenvolvimento espontâneo da DII estão os micos (*Saguinus oedipus oedipus*), no qual a etiologia é desconhecida [62]; os camundongos C3H/HeJBir, que apresentam aumento de células B, reatividade das células T aos

antígenos da microbiota e disfunção dos receptores de membrana TLR [63-64] e os ratos da linhagem SAMP1/Yit, os quais apresentam senescência acelerada, disfunção das células epiteliais intestinais, assim como aumento da ativação de células B e T efetoras [64-65]. Os animais que desenvolvem

Agentes exógenos capazes de danificar a mucosa intestinal e produzir resposta inflamatória aguda também são utilizados em modelos de DII induzida, dentre eles podemos citar a indução por meio da administração de água com dextrano sulfato de sódio (DSS) 5% [66], enema de 2,4,6-ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) dissolvido em etanol [67], enema de iodometacina [68], enema de ácido acético 4-50% [69], enema de oxazolina dissolvida em etanol [70].

E por fim, os modelos experimentais geneticamente modificados são linhagens de ratos e camundongos com mutações gênicas que afetam a secreção de citocinas ou população de células T CD4+ (Tabela 2).

Os modelos de indução de colite por TNBS e DSS são muito utilizados nas pesquisas científicas, devido principalmente a sua simplicidade e reprodutibilidade. O modelo TNBS consiste, basicamente, na aplicação de um enema de agente químico dissolvido em etanol 50%, podendo ser administradas diferentes doses dependendo do animal de laboratório utilizado (ratos 10 a 30 mg e camundongos 0,5 a 4 mg). O etanol atua como um agente destruidor da barreira intestinal, permitindo que o TNBS acesse a lâmina própria do intestino. O processo inflamatório induzido por este hapteno se assemelha muito à DC humana, incluindo inflamação transmural grave associada com diarreia, prolapso retal, anorexia e perda de peso. O mecanismo exato de atuação do DSS na indução da colite ainda não está completamente esclarecido, porém evidências suportam que esse composto exerça efeito tóxico nas células epiteliais do intestino afetando a integridade da barreira mucosa, permitindo a translocação bacteriana do lúmen, a qual promove infiltração de granulócitos e células imunitárias mononucleares. As principais manifestações clínicas são perda de peso animal, diarreia e sangramento retal [61].

**Tabela 2.** Alguns exemplos de modelos experimentais geneticamente modificados para o desenvolvimento da DII.

<b>Modelo</b>	<b>Referência</b>
Rato IL-10 knockout	[71]
Rato IL-2 knockout	[72]
Camundongo IL-10 e TNF knockout	[73]
Camundongo transgênico STAT-4	[74]
Rato knockout receptor $\alpha$ células T	[75]
Rato transgênico HLA-B27	[76]

### 3. Tratamento farmacológico e cirúrgico da doença inflamatória intestinal

Ainda não existe uma cura para a DII, o tratamento inclui medidas conservadoras, assim como abordagem cirúrgica. Alguns fármacos e suplementos podem ser utilizados na terapêutica com o objetivo de manutenção dos períodos de remissão, melhora na qualidade de vida e estado nutricional, assim como o fornecimento de suporte psicológico pela forte influência de fatores psicossomáticos sobre a DII [77]. A escolha pelo tratamento aplicado a cada paciente dependerá basicamente do tipo de DII, grau de severidade da doença e localização no caso da DC.

Na RCU leve geralmente utiliza-se a sulfassalazina oral isoladamente ou em combinação com medicamentos tópicos (enema e/ou supositório de mesalamina, corticoides), podendo ser utilizados outros fármacos (mesalamina, olsalazina, e balsalazide) em pacientes que apresentam muitos efeitos adversos devido ao uso da sulfassalazina [60, 78]. Pacientes com RCU que apresentam sintomas de estágio moderado ou grave da doença podem necessitar de internação hospitalar para acompanhamento clínico rigoroso e administração intravenosa de medicamentos, reposição hídrica e nutricional [60]. A azatioprina e 6-mercaptopurina também são

utilizadas na terapêutica da DII, devido ao seu efeito poupador de esteróides, já que aproximadamente 50% dos pacientes sofrem de efeitos adversos de corticosteroides [60, 78]. Em casos em que o paciente não responde à terapêutica, ou apresente megacolon tóxico, perfuração e sangramento retal descontrolado, recomenda-se a colectomia [79].

No caso da DC, o uso de corticosteróides é eficaz na diminuição da atividade e indução remissão da doença para a maioria dos pacientes; no entanto apresenta diversos efeitos secundários indesejáveis não sendo recomendado seu uso por longos períodos. A sulfassalazina e a mesalazina são utilizadas em casos leves e moderados da doença, favorecendo a remissão induzida pelos corticosteróides. Para pacientes com dependência de esteroides, acometimento de extensas áreas do intestino delgado, histórico de ressecção anterior e doenças gastroduodenais recomenda-se o uso de 6-mercaptopurina e azatioprina [60].

Nos últimos anos, tem crescido as pesquisas com a terapia biológica anti-TNF- $\alpha$  (infliximabe e adalimumabe), a qual tem melhorado significativamente o tratamento da DII refratária aos tratamentos convencionais [80-81]. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é um mediador crucial da resposta imune anormal da DII.

### **3.1. Tratamento alternativo da doença inflamatória intestinal**

Com base no exposto acima e considerando que os fármacos disponíveis para o tratamento da DII causam diversos efeitos colaterais, sem contar que alguns apresentam elevado custo pelo uso contínuo, a busca por novas alternativas para a prevenção e tratamento da DII tem sido considerada por vários cientistas. Neste sentido, novos compostos que apresentem atividade na modulação da inflamação têm sido investigados para a prevenção e tratamento da DII.

Sabendo da relação entre a microbiota e o desenvolvimento da DII, o uso de probióticos na modulação do processo inflamatório tem sido utilizado uma vez que podem suprimir o crescimento ou a aderência de micro-organismos patogênicos na mucosa [82], aumentar a produção de AGCC [83], promover a secreção de bacteriocinas [84], apresentar atividade antimicrobiana [85], diminuir a permeabilidade

da mucosa [86], estimular a produção de mucina [87] e exercer atividade imunomoduladora [85, 88].

Existem vários estudos que demonstram que os prebióticos apresentam papel benéfico na saúde gastrointestinal, podendo desta forma ser utilizados na prevenção e tratamento da DII (Figura 5). Dentre estes efeitos podemos citar o aumento do teor de biomassa e o conteúdo de água nas fezes, melhorando o trânsito intestinal [89], melhora da eficácia do sistema imunológico [90], modulação da microbiota [91] e aumento da produção de AGCC [92-93], que se apresenta deficiente na DII [94]. O aumento da produção de AGCC, em especial o ácido butírico, é algo que vem sendo estudado ao longo dos anos, pois este AGCC é considerado principal substrato energético para os colonócitos [95], atua na proliferação e diferenciação celular [96-97], modula a barreira intestinal por meio da restituição das *tigh junctions* [98], além de apresentar ação anti-carcinogênica [99-100] e imunomoduladora [101-102].

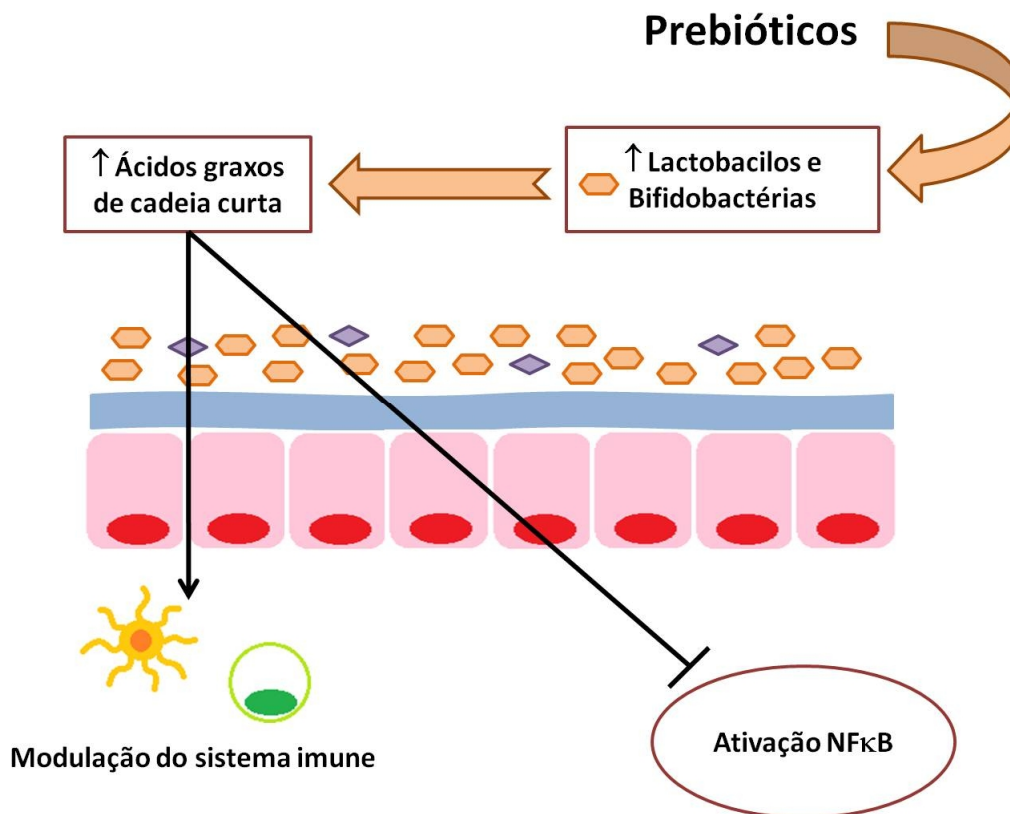
O NF- $\kappa$ B é, ainda, via central pra a regulação da expressão dos genes que codificam a via da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) [93, 103]. A inflamação intestinal está associada a um aumento na produção de óxido nítrico (NO), o qual está relacionado com o estresse oxidativo e sinalização da apoptose celular, tendo sido observado resultados em modelos experimentais e em humanos [10, 92, 104-106]. Reguladores da expressão da iNOS seriam uma alternativa para a redução dos níveis de NO em pacientes com DII. Os AGCC podem atuar como reguladores da expressão da iNOS, uma vez que estes inibem a ativação do NF- $\kappa$ B [107].

Embora muitos efeitos benéficos tenham sido relatados com relação aos AGCC, especialmente o butirato, vale ressaltar que não é apenas o fornecimento deste por meio de enemas ou pela fermentação das fibras dietéticas que garantirá tais efeitos. Deve-se atentar à sua absorção e posterior utilização celular, que irá desencadear os efeitos desejados. O efeito inibitório da ativação do NF- $\kappa$ B, pelo butirato, apresenta-se reduzido quando sua absorção pelas células epiteliais do cólon através dos receptores de membrana MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) encontra-se diminuída, e portanto seus efeitos regulatórios envolvidos com os processos de proliferação, diferenciação, apoptose e inflamação [108-110]. Uma menor expressão do RNAm

MCP-1, pode estar relacionada com a presença de citocinas pró-inflamatórias, de maneira dose-dependente [111].

Estudos realizados com polissacarídeos solúveis de diversas fontes alimentares tem demonstrado efeito benéfico sobre o processo inflamatório, por meio da diminuição da expressão do NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , na infiltração de neutrófilos e na formação de espécies reativas de oxigênio [93, 112-115]. Desta forma, acredita-se que o consumo de alimentos que favoreçam a produção de ácidos graxos de cadeia curta, estimule a atividade secretória das células caliciformes e diminua o processo inflamatório, como é o caso das fibras solúveis, podem ser uma alternativa para a prevenção e controle das DII.

Há ainda um crescente interesse na aplicação de compostos com atividade antioxidante na DII, uma vez que há uma diminuição na resposta antioxidante endógena da mucosa intestinal de pacientes com DII, a qual pode contribuir tanto para a patogênese quanto para a perpetuação do processo inflamatório [116]. Desta forma, a busca por novos produtos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora poderia representar uma opção eficaz na prevenção e no tratamento da DII.



**Figura 5.** Efeito do consumo de prebióticos na formação dos ácidos graxos de cadeia curta e sua ação na doença inflamatória intestinal.

Albuquerque et al. [117], demonstraram, em ratos com colite, que a suplementação com farinha de couve e mamão papaia, suplemento fonte de carotenóides, fibras solúveis e insolúveis, proporcionou redução na extensão da lesão, assim como significativa diminuição na expressão da iNOS, e na produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esse tratamento favorece ainda, o restabelecimento da razão entre os *Lactobacillus/Bifidobacterium* e bactérias patogênicas, que pode estar relacionada com a diminuição na produção de TNF- $\alpha$  e menor expressão da iNOS.

Varilek et al. [118] observaram que a ingestão oral de polifenóis do chá verde diminuiu a atividade da doença e a produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em camundongos IL-2<sup>-/-</sup>, demonstrando os efeitos dos compostos bioativos presentes no chá verde no modelo experimental de desenvolvimento espontâneo da DII. Diminuição do estresse oxidativo

e da inflamação foram também observados por Denis et al. [119] utilizando polifenóis extraídos da casca da maçã em testes *in vitro*, utilizando células Caco-2/15.

Outro polifenol, o ácido elágico (10-20 mg/kg), encontrado em diversas frutas como romã e framboesas, promoveu diminuição da severidade e extensão das lesões intestinais, diminuição do infiltrado celular, aumento da produção de muco, além de efeito protetor por meio da inibição das vias de sinalização proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e NFκB em modelo de DII induzida por TNBS [120].

Polifenóis, como o flavonóide quercetina [121], kaempferol [122], genisteína [123], naringenina [124], dentre outros, demonstraram efeito no restabelecimento da barreira intestinal, por meio do aumento da expressão de proteínas de *tight junctions*.

#### 4. Maracujá

Maracujá é um nome popular dado a várias espécies do gênero *Passiflora*, sendo este o maior e mais importante da família Passifloraceae. São 500 espécies distribuídas por regiões de clima tropical e subtropical do globo, sendo o Brasil seu maior produtor com mais de 79 espécies [125-126], com uma produção anual de 923 mil toneladas de frutos, com destaque para as regiões produtoras nordeste e sudeste [127]. O maracujá *Passiflora edulis* conhecido como maracujá azedo ou amarelo é o mais produzido e comercializado [126, 128], representando a espécie, presente em 95% dos pomares [129] (Figura 6).



**Figura 6.** Plantação de maracujás *Passiflora edulis* em Torre de Pedra/SP.



O maracujazeiro apresenta frutos amarelos com formato arredondado, ovalado ou ovóide, sendo aproximadamente um terço de seu peso constituído por suco e o restante composto por casca, albedo e sementes. O cultivo do maracujá está basicamente voltado para a indústria de sucos e polpas [126], destacando entre suas diversas propriedades, a atividade ansiolítica [130-131] e anti-inflamatória [132] de suas folhas, devido principalmente à presença de compostos fenólicos (lucenina-2, vicenina-2, isoorientina, isovitexina e luteolina) [131].

Porém não somente as folhas como também subprodutos do fruto como casca e semente, embora pouco estudados, apresentam características de interesse tecnológico e biológico [133]. Mais de 75% deste resíduo pode ser transformado em ingrediente com propriedades bioativas para promoção de saúde, baseado na extração de compostos fenólicos [134]. Além disso, nos últimos anos a conscientização com relação à conservação ambiental e ações que envolvam o combate à pobreza e a miséria tem crescido em todo o mundo, assim como no Brasil. Desta forma, buscar soluções para diminuir o desperdício de alimentos e o aproveitamento de resíduos agroindustriais é uma alternativa para a preservação do meio ambiente, assim como colaborar na solução de algumas questões econômicas e sociais.

A avaliação de sementes desengorduradas de maracujá *P. edulis* roxo mostra que este subproduto pode ser fonte de compostos bioativos com capacidade antioxidante e protoprotetora devido à presença de quercetina e ácido rosmarínico, ingredientes potencialmente úteis na indústria de cosméticos [135]. O consumo por 30 dias de dieta hipercolesterolêmica contendo a fração insolúvel das fibras presentes nas sementes de maracujá foi eficaz na redução dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total de hamsters, além de aumentar a excreção de lipídeos e ácidos biliares [136]; sugerindo que as mesmas poderiam ser utilizadas na prevenção ou tratamento de dislipidemias.

A casca do maracujá é composta pelo flavedo que corresponde à camada externa de coloração verde a amarelo rico em fibras insolúveis e o albedo, que corresponde à camada interna branca, que é rica em fibra solúvel, em especial a pectina, com pequenas quantidades de mucilagens [137]. A casca do maracujá amarelo apresenta  $81,9 \pm 1,4\%$  de fibra dietética total,  $62,4 \pm 0,7\%$  composta por fibras insolúveis e  $17,9 \pm 0,4\%$  por fibras solúveis [138]. A administração da pectina da casca do maracujá *P. edulis* (0,1-

100 ng / mL), em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina, diminuiu volume do edema, a liberação de mieloperoxidase (MPO), a infiltração de neutrófilos e a expressão de TNF- $\alpha$  e iNOS [139].

Além disso, a casca do maracujá *P. edulis* apresenta compostos fenólicos com atividade antioxidante e anti-inflamatória, como é o caso da isoorientina (1,230  $\pm$  0,008 mg/g casca seca) [140]. A este flavonoide tem sido atribuído potencial de modulação da inflamação, por meio da eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas por neutrófilos estimulados com PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), assim como pela inibição da atividade da MPO. Extrato preparado a partir da casca de *P. edulis* na concentração de 0,1 mg/mL foi capaz de inibir em 50% a atividade de MPO de equino [141].

O interesse pela extração de biopolímeros com atividade biológica da casca do maracujá vem crescendo. Tommonaro et al. [142] realizaram a extração de polissacarídeos da casca de *P. liguralis* e avaliaram sua atividade anticitotóxica frente ao avarol, um sesquiterpeno muito tóxico, em camarão de água salgada (*Artemia salina*), demonstrando resultados similares aos de ensaios *in vitro* com culturas de células cancerosas. Os autores observaram que a adição de 500 ppm deste biopolímero xiloglucano aumentava a concentração letal (LC<sub>50</sub>) do avarol de 0,18 para 2,1268  $\mu$ g/mL, conferindo ao mesmo capacidade biológica protetora e bioativa.

A administração de dose única de extrato metanólico da casca de *P. edulis* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), nas concentrações de 10 e 50 mg/kg, foi efetiva na redução da pressão arterial [143]. Os autores deste estudo correlacionam o efeito observado à presença de compostos fenólicos no extrato (20  $\mu$ g/g luteolina e 41  $\mu$ g/g de luteolina-6-C-glucosídeo), assim como elevadas concentrações de ácido gama-aminobutírico (2,4 mg/g de GABA). O efeito hipotensivo do extrato da casca do maracujá também foi observado por Lewis et al. [144] em ratos espontaneamente hipertensos na dose de 2,5 a 50 mg/Kg de peso corpóreo, com diminuição na pressão sanguínea e frequência cardíaca. A avaliação da atividade hipotensora de frações isoladas de ácido edulílico e antocianinas, presentes no extrato mostraram que estes compostos tiveram ação efetiva na modulação da pressão arterial dos animais.

O consumo da casca de maracujá na forma de farinha também tem demonstrado efeitos fisiológicos interessantes. A obtenção da farinha da casca do maracujá segue basicamente os passos descritos na Figura 7. Pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com 57 a 73 anos, de ambos os sexos, apresentaram diminuição significativa na glicemia de jejum, redução na hemoglobina glicada, aumento no índice HOMA beta (avalia o funcionamento das células beta pancreáticas) e diminuição no HOMA IR (índice de insulino-resistência) após 60 dias de consumo diário de 30 g de farinha da casca de *P. edulis* [145]. O consumo de 30 gramas de farinha da casca do maracujá por 60 dias reduziu colesterol total e fração LDL-colesterol de mulheres hipercolesterolêmicas (30 a 60 anos) [146]. Reduções significativas na glicose, colesterol e triglicerídeos séricos foram também observadas em ensaio realizado com ratos *Wistar*, após administração diária (2 mL), por 30 dias de extrato aquoso preparado com a casca do maracujá (20g de casca em 500 mL de água) [147]. Estes resultados demonstram que a casca do maracujá poderia ser utilizada como tratamento coadjuvante no controle glicêmico e lipídico.



**Figura 7.** Fases do processamento para obtenção da farinha da casca do maracujá *Passiflora edulis*. **A.** Cascas in natura após separação da polpa; **B.** Cascas após secagem em estufa com circulação de ar 50°C até obtenção de um material com teor de umidade igual ou inferior a 10%; **C.** Farinha obtida da moagem das cascas secas.

O consumo de fibras dietéticas, principalmente a fração solúvel, em estudos realizados com humanos e animais tem revelado efeito positivo na normalização do trânsito intestinal e modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma melhora no quadro inflamatório [92-93, 148-152]; assim como aumento da atividade secretória das células caliciformes, por meio da ação de produtos gerados pela sua degradação bacteriana [35, 153-154].

No entanto, ainda são escassos os dados da literatura científica que comprovem a efetividade do uso destes subprodutos da indústria de alimentos na prevenção e promoção de saúde. Desta maneira, poderiam ser realizados novos estudos para elucidar os reais efeitos do consumo, assim como a via metabólica utilizada por estes compostos bioativos presentes nestes subprodutos.

## Referências

1. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
2. Triantafyllidis, J.K., G. Nasioulas, and P.A. Kosmidis, *Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies*. Anticancer Res, 2009. **29**(7): p. 2727-37.
3. Yamamoto, T., M. Nakahigashi, and A.R. Saniabadi, *Review article: diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. **30**(2): p. 99-112.
4. Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik, and A. Cortot, *Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases*. Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1785-1794.e4.
5. Henderson, P. and D.C. Wilson, *The rising incidence of paediatric-onset inflammatory bowel disease*. Archives of Disease in Childhood, 2012. **97**(7): p. 585-586.
6. Pant, C., M.P. Anderson, A. Deshpande, J.E. Grunow, J.A. O'Connor, J.R. Philpott, and T.J. Sferra, *Trends in Hospitalizations of Children With Inflammatory Bowel Disease Within the United States From 2000 to 2009*. J Investig Med, 2013.
7. Loftus, E.V., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-1517.
8. Gismera, C.S. and B.S. Aladren, *Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing?* World J Gastroenterol, 2008. **14**(36): p. 5491-8.
9. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
10. Galvez, J., M.E. Rodriguez-Cabezas, and A. Zarzuelo, *Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(6): p. 601-8.
11. Paul, G., V. Khare, and C. Gasche, *Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10*. European Journal of Clinical Investigation, 2012. **42**(1): p. 95-109.
12. Mylonaki, M., N.B. Rayment, D.S. Rampton, B.N. Hudspith, and J. Brostoff, *Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 481-7.
13. Zaltman, C., *Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil?* Cadernos de Saúde Pública, 2007. **23**: p. 992-993.
14. Cornish, J.A., E. Tan, C. Simillis, S.K. Clark, J. Teare, and P.P. Tekkis, *The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(9): p. 2394-400.
15. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 521-74.
16. Jacobsen, B.A., J. Fallingborg, H.H. Rasmussen, K.R. Nielsen, A.M. Drewes, E. Puho, G.L. Nielsen, and H.T. Sorensen, *Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. **18**(6): p. 601-6.

17. Nerich, V., E. Monnet, A. Etienne, S. Louafi, C. Ramee, S. Rican, A. Weill, N. Vallier, V. Vanbockstael, G.R. Auleley, H. Allemand, and F. Carbonnel, *Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(3): p. 218-26.
18. Ng, S.C., W. Tang, J.Y. Ching, M. Wong, C.M. Chow, A.J. Hui, T.C. Wong, V.K. Leung, S.W. Tsang, H.H. Yu, M.F. Li, K.K. Ng, M.A. Kamm, C. Studd, S. Bell, R. Leong, H.J. de Silva, A. Kasturiratne, M.N.F. Mufeena, K.L. Ling, C.J. Ooi, P.S. Tan, D. Ong, K.L. Goh, I. Hilmi, P. Pisespongsa, S. Manatsathit, R. Rerknimitr, S. Aniwan, Y.F. Wang, Q. Ouyang, Z. Zeng, Z. Zhu, M.H. Chen, P.J. Hu, K. Wu, X. Wang, M. Simadibrata, M. Abdullah, J.C. Wu, J.J.Y. Sung, and F.K.L. Chan, *Incidence and Phenotype of Inflammatory Bowel Disease Based on Results From the Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(1): p. 158-165.e2.
19. Vendrell, R., H.L. Venegas, C.M. Perez, C. Morell, R.V. Roman, and E.A. Torres, *Differences in prevalence of inflammatory bowel disease in puerto rico between commercial and government-sponsored managed health care insured individuals*. *Bol Asoc Med P R*, 2013. **105**(2): p. 15-9.
20. Mangat, B.K., C. Evaschen, T. Lee, E.M. Yoshida, and B. Salh, *Ethnic variation in the annual rates of adult inflammatory bowel disease in hospitalized patients in Vancouver, British Columbia*. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 2011. **25**(2): p. 73-7.
21. Wilson, J., C. Hair, R. Knight, A. Catto-Smith, S. Bell, M. Kamm, P. Desmond, J. McNeil, and W. Connell, *High incidence of inflammatory bowel disease in Australia: a prospective population-based Australian incidence study*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(9): p. 1550-6.
22. Tursi, A., W. Elisei, and M. Picchio, *Incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases in gastroenterology primary care setting*. *European Journal of Internal Medicine*, 2013.
23. Zhao, J., S.C. Ng, Y. Lei, F. Yi, J. Li, L. Yu, K. Zou, Z. Dan, M. Dai, Y. Ding, M. Song, Q. Mei, X. Fang, H. Liu, Z. Shi, R. Zhou, M. Xia, Q. Wu, Z. Xiong, W. Zhu, L. Deng, M.A. Kamm, and B. Xia, *First Prospective, Population-Based Inflammatory Bowel Disease Incidence Study in Mainland of China: The Emergence of "Western" Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2013. **19**(9): p. 1839-1845.
24. Katsanos, K.H. and E.V. Tsianos, *Inflammatory bowel disease in coloured Middle East and black African immigrant population groups: individual and familial cases*. 2006. 2006.
25. Thomas, G.A., J. Rhodes, J.T. Green, and C. Richardson, *Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy*. *Postgraduate Medical Journal*, 2000. **76**(895): p. 273-9.
26. Radford-Smith, G.L., *What is the importance of appendectomy in the natural history of IBD?* *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008. **14**(S2): p. S72-S74.
27. Hou, J.K., B. Abraham, and H. El-Serag, *Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 563-73.
28. Andersen, V., A. Olsen, F. Carbonnel, A. Tjonneland, and U. Vogel, *Diet and risk of inflammatory bowel disease*. *Dig Liver Dis*, 2012. **44**(3): p. 185-94.

29. Klement, E., R.V. Cohen, J. Boxman, A. Joseph, and S. Reif, *Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **80**(5): p. 1342-1352.
30. Molodecky, N.A. and G.G. Kaplan, *Environmental risk factors for inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2010. **6**(5): p. 339-46.
31. Gearry, R.B., A.K. Richardson, C.M. Frampton, A.J. Dodgshun, and M.L. Barclay, *Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors*. J Gastroenterol Hepatol, 2010. **25**(2): p. 325-33.
32. Mazzon, E., G.C. Sturniolo, D. Puzzolo, N. Frisina, and W. Fries, *Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum*. Gut, 2002. **51**(4): p. 507-13.
33. Soderholm, J.D., P.C. Yang, P. Ceponis, A. Vohra, R. Riddell, P.M. Sherman, and M.H. Perdue, *Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1099-108.
34. Strober, W., M. Zeitz, and R.S. Blumberg, *Preface*. Mucosal Immunology, 0000. **1**(1s): p. S1-S4.
35. Barcelo, A., J. Claustre, F. Moro, J.A. Chayvialle, J.C. Cuber, and P. Plaisancie, *Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon*. Gut, 2000. **46**(2): p. 218-24.
36. Faure, M., D. Moennoz, F. Montigon, C. Mettraux, S. Mercier, E.J. Schiffrin, C. Obled, D. Breuille, and J. Boza, *Mucin production and composition is altered in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats*. Digestive Diseases and Sciences, 2003. **48**(7): p. 1366-1373.
37. Podolsky, D.K., *The current future understanding of inflammatory bowel disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(6): p. 933-43.
38. Hering, N.A., M. Fromm, and J.D. Schulzke, *Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 5): p. 1035-44.
39. Lauritsen, K., *Drug-Treatment and Formation of Eicosanoids in Patients with Chronic Inflammatory Bowel-Disease*. Danish Medical Bulletin, 1989. **36**(4): p. 378-393.
40. Silva, M.A., J. Jury, M. Porras, P. Vergara, and M.H. Perdue, *Intestinal epithelial barrier dysfunction and dendritic cell redistribution during early stages of inflammation in the rat: role for TLR-2 and -4 blockage*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(5): p. 632-44.
41. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function (vol 10, pg 131, 2010)*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(3): p. -.
42. Abraham, C. and R. Medzhitov, *Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1729-1737.
43. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
44. Rutella, S. and F. Locatelli, *Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(33): p. 3761-75.
45. Spöttl, T., M. Hausmann, M. Kreutz, A. Peuker, D. Vogl, J. Schölmerich, W. Falk, R. Andreesen, T. Andus, H. Herfarth, and G. Rogler, *Monocyte*

- differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells.* Journal of Leukocyte Biology, 2001. **70**(2): p. 241-251.
46. Chin, A.C. and C.A. Parkos, *Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 276-87.
  47. Naito, Y., T. Takagi, and T. Yoshikawa, *Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease.* Journal of Gastroenterology, 2007. **42**(10): p. 787-98.
  48. Monteleone, G., D. Fina, R. Caruso, and F. Pallone, *New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease.* Curr Opin Gastroenterol, 2006. **22**(4): p. 361-4.
  49. Brand, S., *Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease.* Gut, 2009. **58**(8): p. 1152-67.
  50. Gor, D.O., N.R. Rose, and N.S. Greenspan, *TH1-TH2: a procrustean paradigm.* Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 503-5.
  51. Bamias, G., M.R. Nyce, S.A. De La Rue, and F. Cominelli, *New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease.* Annals of Internal Medicine, 2005. **143**(12): p. 895-904.
  52. Pavlenko, V.V. and A.V. Iagoda, *[Synthesis of eicosanoids in the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis].* Klin Med (Mosk), 2003. **81**(10): p. 39-43.
  53. Jupp, J., K. Hillier, D.H. Elliott, D.R. Fine, A.C. Bateman, P.A. Johnson, A.M. Cazaly, J.F. Penrose, and A.P. Sampson, *Colonic expression of leukotriene-pathway enzymes in inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(5): p. 537-46.
  54. Massoumi, R. and A. Sjolander, *The role of leukotriene receptor signaling in inflammation and cancer.* ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 1413-21.
  55. Sheibanie, A.F., J.H. Yen, T. Khayrullina, F. Emig, M. Zhang, R. Tuma, and D. Ganea, *The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis.* Journal of Immunology, 2007. **178**(12): p. 8138-47.
  56. Maor, I., T. Rainis, A. Lanir, and A. Lavy, *Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease.* Dig Dis Sci, 2008. **53**(8): p. 2208-14.
  57. Tuzun, A., A. Erdil, V. Inal, A. Aydin, S. Bagci, Z. Yesilova, A. Sayal, N. Karaeren, and K. Dagalp, *Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease.* Clin Biochem, 2002. **35**(7): p. 569-72.
  58. Haklar, G., E. Sayin-Ozveri, M. Yuksel, A.O. Aktan, and A.S. Yalcin, *Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors.* Cancer Letters, 2001. **165**(2): p. 219-24.
  59. Perse, M., *Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence?* BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 9.
  60. Hendrickson, B.A., R. Gokhale, and J.H. Cho, *Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease.* Clinical Microbiology Reviews, 2002. **15**(1): p. 79-94.
  61. Gálvez, J., M. Comalada, and J. Xaus, *Chapter 35 - Prebiotics and Probiotics in Experimental Models of Rodent Colitis: Lessons in Treatment or Prevention of Inflammatory Bowel Diseases,* in *Bioactive Foods in Promoting Health:*



- Probiotics and Prebiotics*, W.R. Ross and R.P. Victor, Editors. 2010, Academic Press: Boston. p. 589-610.
62. Wood, J.D., O.C. Peck, K.S. Tefend, M.M. Rodriguez, M.J. Rodriguez, C.J. Hernandez, M.J. Stonerook, and H.M. Sharma, *Colitis and colon cancer in cotton-top tamarins (Saguinus oedipus oedipus) living wild in their natural habitat*. *Dig Dis Sci*, 1998. **43**(7): p. 1443-53.
  63. Elson, C.O., Y. Cong, and J. Sundberg, *The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis*. *International Reviews of Immunology*, 2000. **19**(1): p. 63-75.
  64. Nemoto, Y. and M. Watanabe, *The Th1, Th2 and Th17 paradigm in inflammatory bowel disease*, in *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis from epidemiology and immunobiology to a rational diagnostic and therapeutic approach*, D.C. Baumgart, Editor. 2012, Springer: New York. p. 183-194.
  65. Matsumoto, S., Y. Okabe, H. Setoyama, K. Takayama, J. Ohtsuka, H. Funahashi, A. Imaoka, Y. Okada, and Y. Umesaki, *Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain*. *Gut*, 1998. **43**(1): p. 71-8.
  66. Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, and R. Nakaya, *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 694-702.
  67. Morris, G.P., P.L. Beck, M.S. Herridge, W.T. Depew, M.R. Szewczuk, and J.L. Wallace, *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
  68. Satoh, H., F. Sato, K. Takami, and S. Szabo, *New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis*. *Japanese Journal of Pharmacology*, 1997. **73**(4): p. 299-309.
  69. MacPherson, B.R. and C.J. Pfeiffer, *Experimental production of diffuse colitis in rats*. *Digestion*, 1978. **17**(2): p. 135-50.
  70. Boirivant, M., I.J. Fuss, A. Chu, and W. Strober, *Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4*. *J Exp Med*, 1998. **188**(10): p. 1929-39.
  71. Scheinin, T., D.M. Butler, F. Salway, B. Scallan, and M. Feldmann, *Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **133**(1): p. 38-43.
  72. Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A.C. Feller, and I. Horak, *Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 253-61.
  73. Hale, L.P. and P.K. Greer, *A Novel Murine Model of Inflammatory Bowel Disease and Inflammation-Associated Colon Cancer with Ulcerative Colitis-Like Features*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41797.
  74. Wirtz, S., S. Finotto, S. Kanzler, A.W. Lohse, M. Blessing, H.A. Lehr, P.R. Galle, and M.F. Neurath, *Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens*. *Journal of Immunology*, 1999. **162**(4): p. 1884-8.
  75. Bhan, A.K., E. Mizoguchi, R.N. Smith, and A. Mizoguchi, *Spontaneous chronic colitis in TCR alpha-mutant mice; an experimental model of human ulcerative colitis*. *International Reviews of Immunology*, 2000. **19**(1): p. 123-38.

76. Hammer, R.E., S.D. Maika, J.A. Richardson, J.P. Tang, and J.D. Taurog, *Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders*. Cell, 1990. **63**(5): p. 1099-112.
77. Triantafyllidis, J.K., E. Merikas, and F. Georgopoulos, *Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease*. Drug Des Devel Ther, 2011. **5**: p. 185-210.
78. Carter, M.J., A.J. Lobo, and S.P.L. Travis, *Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults*. Gut, 2004. **53**(suppl 5): p. v1-v16.
79. Dayan, B. and D. Turner, *Role of surgery in severe ulcerative colitis in the era of medical rescue therapy*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(29): p. 3833-8.
80. Magro, F. and F. Portela, *Management of inflammatory bowel disease with infliximab and other anti-tumor necrosis factor alpha therapies*. BioDrugs, 2010. **24 Suppl 1**: p. 3-14.
81. Owczarek, D., D. Cibor, M. Szczepanek, and T. Mach, *Biological therapy of inflammatory bowel disease*. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej-Polish Archives of Internal Medicine, 2009. **119**(1-2): p. 84-8.
82. Fernandez, M.F., S. Boris, and C. Barbes, *Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract*. J Appl Microbiol, 2003. **94**(3): p. 449-55.
83. Sakata, T., T. Kojima, M. Fujieda, M. Takahashi, and T. Michibata, *Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro*. Proc Nutr Soc, 2003. **62**(1): p. 73-80.
84. Oh, S., S.H. Kim, and R.W. Worobo, *Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, Lactobacillus acidophilus 30SC*. Journal of Dairy Science, 2000. **83**(12): p. 2747-52.
85. Zoumpopoulou, G., B. Foligne, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot, and E. Tsakalidou, *Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models*. Int J Food Microbiol, 2008. **121**(1): p. 18-26.
86. Akama, F., R. Nishino, S. Makino, K. Kobayashi, K. Kamikaseda, J. Nagano, and Y. Koga, *The effect of probiotics on gastric mucosal permeability in humans administered with aspirin*. Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(7-8): p. 831-6.
87. Mack, D.R., S. Ahrne, L. Hyde, S. Wei, and M.A. Hollingsworth, *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. Gut, 2003. **52**(6): p. 827-833.
88. Liu, C., Z.Y. Zhang, K. Dong, and X.K. Guo, *Adhesion and immunomodulatory effects of Bifidobacterium lactis HN019 on intestinal epithelial cells INT-407*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(18): p. 2283-90.
89. Mihatsch, W.A., J. Hoegel, and F. Pohlandt, *Prebiotic oligosaccharides reduce stool viscosity and accelerate gastrointestinal transport in preterm infants*. Acta Paediatrica, 2006. **95**(7): p. 843-8.
90. Boderá, P., *Influence of prebiotics on the human immune system (GALT)*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2008. **2**(2): p. 149-53.
91. Costalos, C., A. Kapiki, M. Apostolou, and E. Papathoma, *The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants*. Early Hum Dev, 2008. **84**(1): p. 45-9.

92. Rodriguez-Cabezas, M.E., J. Galvez, D. Camuesco, M.D. Lorente, A. Concha, O. Martinez-Augustin, L. Redondo, and A. Zarzuelo, *Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (Plantago ovata seeds) in HLA-B27 transgenic rats*. Clin Nutr, 2003. **22**(5): p. 463-71.
93. Rodriguez-Cabezas, M.E., J. Galvez, M.D. Lorente, A. Concha, D. Camuesco, S. Azzouz, A. Osuna, L. Redondo, and A. Zarzuelo, *Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats*. J Nutr, 2002. **132**(11): p. 3263-71.
94. Huda-Faujan, N., A.S. Abdulmir, A.B. Fatimah, O.M. Anas, M. Shuhaimi, A.M. Yazid, and Y.Y. Loong, *The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects*. Open Biochem J, 2010. **4**: p. 53-8.
95. Roediger, W.E., *Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon*. Gastroenterology, 1982. **83**(2): p. 424-9.
96. Bai, Z., Z. Zhang, Y. Ye, and S. Wang, *Sodium butyrate induces differentiation of gastric cancer cells to intestinal cells via the PTEN/phosphoinositide 3-kinase pathway*. Cell Biol Int, 2010. **34**(12): p. 1141-5.
97. Orchel, A., Z. Dzierzewicz, B. Parfiniewicz, L. Weglarz, and T. Wilczok, *Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent*. Dig Dis Sci, 2005. **50**(3): p. 490-8.
98. Peng, L., Z.R. Li, R.S. Green, I.R. Holzman, and J. Lin, *Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1619-25.
99. Zhuang, Y.Q., J.Y. Li, Z.X. Chen, and X.Z. Wang, *[Effects of sodium butyrate on proliferation and differentiation of human gastric carcinoma cell line AGS]*. Ai Zheng, 2008. **27**(8): p. 828-34.
100. Zhang, Y., L. Zhou, Y.L. Bao, Y. Wu, C.L. Yu, Y.X. Huang, Y. Sun, L.H. Zheng, and Y.X. Li, *Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells*. Chem Biol Interact, 2010. **185**(3): p. 174-81.
101. Saemann, M.D., G.A. Bohmig, C.H. Osterreicher, H. Burtscher, O. Parolini, C. Diakos, J. Stockl, W.H. Horl, and G.J. Zlabinger, *Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production*. Faseb Journal, 2000. **14**(15): p. 2380-2.
102. Segain, J.P., D. Raingeard de la Bletiere, A. Bourreille, V. Leray, N. Gervois, C. Rosales, L. Ferrier, C. Bonnet, H.M. Blottiere, and J.P. Galmiche, *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
103. Choi, C.Y., H.J. You, and H.G. Jeong, *Nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by oleanolic acid via nuclear Factor-kappa B activation in macrophages*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **288**(1): p. 49-55.
104. Aiko, S. and M.B. Grisham, *Spontaneous Intestinal Inflammation and Nitric-Oxide Metabolism in Hla-B27 Transgenic Rats*. Gastroenterology, 1995. **109**(1): p. 142-150.
105. Kimura, H., S. Miura, T. Shigematsu, N. Ohkubo, Y. Tsuzuki, I. Kurose, H. Higuchi, Y. Akiba, R. Hokari, M. Hirokawa, H. Serizawa, and H. Ishii,

- Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease.* Digestive Diseases and Sciences, 1997. **42**(5): p. 1047-1054.
106. Camuesco, D., M. Comalada, M.E. Rodríguez-Cabezas, A. Nieto, M.D. Lorente, A. Concha, A. Zarzuelo, and J. Galvez, *The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression.* Br J Pharmacol, 2004. **143**(7): p. 908-18.
107. Liu, T., J. Li, Y. Liu, N. Xiao, H. Suo, K. Xie, C. Yang, and C. Wu, *Short-Chain Fatty Acids Suppress Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines Through Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway in RAW264.7 Cells.* Inflammation, 2012. **35**(5): p. 1676-1684.
108. Butzner, J.D., R. Parmar, C.J. Bell, and V. Dalal, *Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat.* Gut, 1996. **38**(4): p. 568-73.
109. Hamer, H.M., D. Jonkers, K. Venema, S. Vanhoutvin, F.J. Troost, and R.J. Brummer, *Review article: the role of butyrate on colonic function.* Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(2): p. 104-19.
110. Thibault, R., F. Blachier, B. Darcy-Vrillon, P. de Coppet, A. Bourreille, and J.P. Segain, *Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency.* Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(4): p. 684-95.
111. Thibault, R., P. De Coppet, K. Daly, A. Bourreille, M. Cuff, C. Bonnet, J.F. Mosnier, J.P. Galmiche, S. Shirazi-Beechey, and J.P. Segain, *Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation.* Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1916-27.
112. Kanauchi, O., T. Nakamura, K. Agata, K. Mitsuyama, and T. Iwanaga, *Effects of germinated barley foodstuff on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats.* Journal of Gastroenterology, 1998. **33**(2): p. 179-188.
113. Kanauchi, O., K. Mitsuyama, A. Andoh, Y. Araki, T. Bamba, A. Toyonaga, and M. Sata, *Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: A comparison with probiotic or antibiotic treatment.* Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. A676-A676.
114. Kanauchi, O., K. Mitsuyama, A. Andoh, Y. Fujiyama, M. Sata, T. Bamba, Y. Araki, K. Takeuchi, and H. Hanau, *Beneficial effects of prebiotics, germinated barley foodstuff, in the long term treatment of ulcerative colitis: A multi-center open control study.* Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. A260-A260.
115. Naito, Y., T. Takagi, K. Katada, K. Uchiyama, M. Kuroda, S. Kokura, H. Ichikawa, J. Watabe, N. Yoshida, T. Okanoue, and T. Yoshikawa, *Partially hydrolyzed guar gum down-regulates colonic inflammatory response in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.* Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. **17**(6): p. 402-409.
116. Kruidenier, L., I. Kuiper, W. Van Duijn, M.A. Mieremet-Ooms, R.A. van Hogezaand, C.B. Lamers, and H.W. Verspaget, *Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease.* Journal of Pathology, 2003. **201**(1): p. 17-27.
117. Lima de Albuquerque, C., M. Comalada, D. Camuesco, M.E. Rodríguez-Cabezas, A. Luiz-Ferreira, A. Nieto, A.R. Monteiro de Souza Brito, A. Zarzuelo, and J. Gálvez, *Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat.* European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2010. **5**(3): p. e111-e116.

118. Varilek, G.W., F. Yang, E.Y. Lee, W.J. deVilliers, J. Zhong, H.S. Oz, K.F. Westberry, and C.J. McClain, *Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity*. J Nutr, 2001. **131**(7): p. 2034-9.
119. Denis, M.C., A. Furtos, S. Dudonné, A. Montoudis, C. Garofalo, Y. Desjardins, E. Delvin, and E. Levy, *Apple Peel Polyphenols and Their Beneficial Actions on Oxidative Stress and Inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53725.
120. Rosillo, M.A., M. Sanchez-Hidalgo, A. Cardeno, and C.A. de la Lastra, *Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(7): p. 737-45.
121. Amasheh, M., S. Schlichter, S. Amasheh, J. Mankertz, M. Zeitz, M. Fromm, and J.D. Schulzke, *Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells*. J Nutr, 2008. **138**(6): p. 1067-73.
122. Suzuki, T., S. Tanabe, and H. Hara, *Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells*. J Nutr, 2011. **141**(1): p. 87-94.
123. Wells, C.L., R.P. Jechorek, K.M. Kinneberg, S.M. Debol, and S.L. Erlandsen, *The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes*. J Nutr, 1999. **129**(3): p. 634-40.
124. Azuma, T., M. Shigeshiro, M. Kodama, S. Tanabe, and T. Suzuki, *Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice*. J Nutr, 2013. **143**(6): p. 827-34.
125. Dhawan, K., S. Dhawan, and A. Sharma, *Passiflora: a review update*. Journal of Ethnopharmacology, 2004. **94**(1): p. 1-23.
126. Zeraik, M.L., C.A.M. Pereira, V.G. Zuin, and J.H. Yariwake, *Passion fruit: a functional food?* Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2010. **20**(3): p. 459-471.
127. IBGE, I.B.d.G.e.E.-. (2012) *Anuário Estatístico do Brasil 72*.
128. Secretaria de Agricultura, I.e.R.A.-G.d.B. *Cultura - Maracujá*. 2013 [cited 2013 16/08]; Available from: [www.seagri.ba.gov.br/Maracuja.htm](http://www.seagri.ba.gov.br/Maracuja.htm).
129. Meletti, L.M.M. and C.H. Brukner, *Melhoramento Genético*, in *Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-Colheita, Agroindústria e Mercado*, C.H. Brukner and M.C. Picanço, Editors. 2001, Cinco Continentes: Porto Alegre. p. 345-385.
130. Movafegh, A., R. Alizadeh, F. Hajimohamadi, F. Esfehiani, and M. Nejatfar, *Preoperative oral Passiflora incarnata reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study*. Anesthesia & Analgesia, 2008. **106**(6): p. 1728-32.
131. Li, H., P. Zhou, Q. Yang, Y. Shen, J. Deng, L. Li, and D. Zhao, *Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of Passiflora edulis 'edulis' and Passiflora edulis 'flavicarpa'*. J Ethnopharmacol, 2011. **133**(3): p. 1085-90.
132. Montanher, A.B., S.M. Zucolotto, E.P. Schenkel, and T.S. Frode, *Evidence of anti-inflammatory effects of Passiflora edulis in an inflammation model*. J Ethnopharmacol, 2007. **109**(2): p. 281-8.
133. Martinez, R., P. Torres, M.A. Meneses, J.G. Figueroa, J.A. Perez-Alvarez, and M. Viuda-Martos, *Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate*. Food Chemistry, 2012. **135**(3): p. 1520-6.

134. Arvanitoyannis, I.S., *1 - Potential and Representatives for Application of Environmental Management System (EMS) to Food Industries*, in *Waste Management for the Food Industries*, S.A. Ioannis, Dr, and D.P.D. Ph.D.A2 - Ioannis S. Arvanitoyannis, Editors. 2008, Academic Press: Amsterdam. p. 3-38.
135. Lourith, N. and M. Kanlayavattanakul, *Antioxidant activities and phenolics of Passiflora edulis seed recovered from juice production residue*. J Oleo Sci, 2013. **62**(4): p. 235-40.
136. Chau, C.F. and Y.L. Huang, *Effects of the insoluble fiber derived from Passiflora edulis seed on plasma and hepatic lipids and fecal output*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(8): p. 786-90.
137. Janebro, D.I., M.S.R. Queiroz, A.T. Ramos, A.U.O. Sabaa-Srur, M.A.L. Cunha, and M.F.F.M. Diniz, *Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008. **18**: p. 9.
138. Yapo, B.M. and K.L. Koffi, *Dietary fiber components in yellow passion fruit rind--a potential fiber source*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(14): p. 5880-3.
139. Silva, D.C., A.L. Freitas, C.D. Pessoa, R.C. Paula, J.X. Mesquita, L.K. Leal, G.A. Brito, D.O. Goncalves, and G.S. Viana, *Pectin from Passiflora edulis shows anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypotriglyceridemic properties in diabetic rats*. J Med Food, 2011. **14**(10): p. 1118-26.
140. Zeraik, M.L., J.H. Yariwake, J.-N. Wauters, M. Tits, and L. Angenot, *Analysis of passion fruit rinds (Passiflora edulis): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity*. Química Nova, 2012. **35**: p. 541-545.
141. Zeraik, M.L., D. Serteyn, G. Deby-Dupont, J.N. Wauters, M. Tits, J.H. Yariwake, L. Angenot, and T. Franck, *Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (Passiflora edulis and Passiflora alata) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays*. Food Chemistry, 2011. **128**(2): p. 259-265.
142. Tommonaro, G., C.S. Rodriguez, M. Santillana, B. Immirzi, R.D. Prisco, B. Nicolaus, and A. Poli, *Chemical composition and biotechnological properties of a polysaccharide from the peels and antioxidative content from the pulp of Passiflora ligularis fruits*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(18): p. 7427-33.
143. Ichimura, T., A. Yamanaka, T. Ichiba, T. Toyokawa, Y. Kamada, T. Tamamura, and S. Maruyama, *Antihypertensive effect of an extract of Passiflora edulis rind in spontaneously hypertensive rats*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2006. **70**(3): p. 718-21.
144. Lewis, B.J., K.A. Herrlinger, T.A. Craig, C.E. Mehring-Franklin, Z. Defreitas, and C. Hinojosa-Laborde, *Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2013. **24**(7): p. 1359-66.
145. Queiroz, M.S.R., D.I. Janebro, M.A.L. Cunha, J.S. Medeiros, A.U.O. Sabaa-Srur, M.F.F.M. Diniz, and S.C. Santos, *Effect of the yellow passion fruit peel flour (Passiflora edulis f. flavicarpa deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients*. Nutrition Journal, 2012. **11**: p. 89.
146. Ramos, A.T., M.A.L. Cunha, A.U.O. Sabaa-Srur, V.C.F. Pires, A.A. Cardoso, M.d.F.M. Diniz, and C.C.M. Medeiros, *Uso de Passiflora edulis f. flavicarpa na*

- redução do colesterol*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2007. **17**: p. 592-597.
147. Barbalho, S.M., M.d.S. Soares de Souza, J.C. e Silva, C.G. Mendes, G.A. de Oliveira, T. Costa, and F.M. Farinazzi-Machado, *Yellow passion fruit rind (Passiflora edulis): an industrial waste or an adjuvant in the maintenance of glycemia and prevention of dyslipidemia?* Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism, 2012. **1**(1).
  148. Davies, P.S. and J. Rhodes, *Maintenance of remission in ulcerative colitis with sulphasalazine or a high-fibre diet: a clinical trial*. Br Med J, 1978. **1**(6126): p. 1524-5.
  149. Hallert, C., M. Kaldma, and B.G. Petersson, *Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission*. Scand J Gastroenterol, 1991. **26**(7): p. 747-50.
  150. Fernandez-Banares, F., J. Hinojosa, J.L. Sanchez-Lombrana, E. Navarro, J.F. Martinez-Salmeron, A. Garcia-Puges, F. Gonzalez-Huix, J. Riera, V. Gonzalez-Lara, F. Dominguez-Abascal, J.J. Gine, J. Moles, F. Gomollon, and M.A. Gassull, *Randomized clinical trial of Plantago ovata seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU)*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(2): p. 427-33.
  151. Hallert, C., I. Bjorck, M. Nyman, A. Pousette, C. Granno, and H. Svensson, *Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(2): p. 116-21.
  152. Kanauchi, O., I. Serizawa, Y. Araki, A. Suzuki, A. Andoh, Y. Fujiyama, K. Mitsuyama, K. Takaki, A. Toyonaga, M. Sata, and T. Bamba, *Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment*. Journal of Gastroenterology, 2003. **38**(2): p. 134-141.
  153. Lundin, E., J.X. Zhang, C.B. Huang, C.O. Reuterving, G. Hallmans, C. Nygren, and R. Stenling, *Oat bran, rye bran, and soybean hull increase goblet cell volume density in the small intestine of the golden hamster. A histochemical and stereologic light-microscopic study*. Scand J Gastroenterol, 1993. **28**(1): p. 15-22.
  154. Ito, H., M. Satsukawa, E. Arai, K. Sugiyama, K. Sonoyama, S. Kiriya, and T. Morita, *Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1640-7.





## *CAPÍTULO 2*

---

(Artigo submetido para publicação na Revista Ciência Rural)



**Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*)**

Cynthia Baú Betim Cazarin<sup>1</sup>, Juliana Kelly da Silva<sup>1</sup>, Talita Cristina Colomeu<sup>2</sup>, Ricardo de Lima Zollner<sup>2</sup>, Mário Roberto Maróstica Junior<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, tel: +55-19-35214078, fax +55-19-35214060, Campinas/SP, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887, Campinas/SP, Brazil.

\* Autor para correspondência: [mario@fea.unicamp.br](mailto:mario@fea.unicamp.br)



**Resumo**

O objetivo do estudo foi avaliar a composição centesimal da farinha obtida da casca do maracujá e sua atividade antioxidante *in vitro*, buscando viabilizar suas potencialidades para incorporação em produtos alimentares. Os frutos foram higienizados, as cascas foram separadas da polpa, secas em estufa com circulação de ar e moídas para obtenção de uma farinha. Foi determinada a composição centesimal e os polifenóis presentes na casca foram extraídos por três metodologias, tendo sido quantificados o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante por três métodos distintos (sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH, capacidade antioxidante de redução do ferro - FRAP e capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC). Os resultados mostram que a farinha apresenta elevado teor de fibras ( $65,22 \pm 0,27\%$ ), das quais 74% são fibras insolúveis. Embora os resultados do teor de polifenóis indique que possivelmente há um predomínio de compostos com características hidrofílicas na casca, visto que a água foi o solvente que apresentou maior rendimento na extração dos fenóis totais; a avaliação da atividade antioxidante dos extratos mostra que o poder antioxidante dos compostos lipofílicos presentes no extrato metanólico/acetona foram superiores ao dos compostos presentes no extrato aquoso e etanólico. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a casca do maracujá poderia ser utilizada como fonte de fibras e antioxidantes; no entanto, sua incorporação em formulações alimentares deve atentar as suas características físicas, químicas e sensoriais, para garantir seu melhor aproveitamento e aceitação entre os consumidores.

**Termos de indexação:** *Passiflora edulis*, casca do maracujá, fibra dietética, compostos fenólicos, atividade antioxidante.



**Abstract**

The aim of the study was to evaluate the chemical composition of flour obtained from the peel of passion fruit and their antioxidant activity in vitro. The fruits were cleaned, the peels were separated from pulp, dried in an oven with circulating air and ground to obtain the flour. The centesimal composition was determined and the polyphenols present in the peel were extracted by three methodologies. Total phenolic content and antioxidant activity were determined using three different methods (scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - DPPH free radical, Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP e Oxigen Radical Absorbance Capacity - ORAC). The results show that the flour has high fiber content ( $65.22 \pm 0.27$  %) and 74% of which correspond to insoluble fraction. Although the results of total polyphenol indicate that there is a predominance of compounds with hydrophilic characteristics in the peel, the evaluation of the antioxidant activity of the extracts showed that the antioxidant power of lipophilic compounds present in the methanol / acetone extract was superior to the compounds present in the aqueous and ethanol extracts. The results of this study demonstrate that the passion fruit peel could be used as a source of fiber and antioxidants, however , its incorporation into food formulations must address their physical, chemical and sensory, to ensure their best use and acceptance among consumers.

**Indexing terms:** *Passiflora edulis*, passion fruit peel, dietary fiber, phenolic compounds, antioxidant activity.





**Introdução:**

Maracujá é um nome popular dado a várias espécies do gênero *Passiflora*, do qual há 500 espécies distribuídas por regiões de clima tropical e subtropical do globo, sendo o Brasil seu maior produtor com mais de 79 espécies (ZERAİK, M.L. *et al.*, 2010). Sua produção anual equivale a 923 mil toneladas, com destaque para as regiões produtoras nordeste e sudeste (IBGE, 2012). O maracujá *Passiflora edulis* conhecido como maracujá azedo ou amarelo é o mais produzido e comercializado (ZERAİK, M. L. *et al.*, 2010), representando 95% dos pomares (MELETTI & BRUKNER, 2001). Seu cultivo está basicamente voltado para a indústria de sucos e polpas, em especial devido ao seu sabor mais ácido e maior rendimento (ZERAİK, M. L. *et al.*, 2010); além de apresentar em sua composição elevado teor de carotenóides (15,36 a 27,14mg/g) (SILVA & MERCADANTE, 2002).

Casca e semente do maracujá, subprodutos da indústria de alimentos, podem apresentar características de interesse tecnológico e biológico (MARTINEZ *et al.*, 2012), sendo que mais de 75% deste resíduo poderia ser transformado em ingrediente com propriedades bioativas para promoção de saúde (ARVANITOYANNIS, 2008).

A casca do maracujá é composta pelo flavedo que corresponde à camada externa de coloração verde a amarelo rico em fibras insolúveis e o albedo, que corresponde à camada interna branca, que é rica em fibra solúvel, em especial a pectina, com pequenas quantidades de mucilagens (JANEBRO *et al.*, 2008). Além disso, a casca do maracujá *P.edulis* apresenta em sua composição compostos fenólicos com atividade antioxidante e

anti-inflamatória, como é o caso da isoorientina ( $1,230 \pm 0,008\text{mg/g}$  casca seca) (ZERAİK *et al.*, 2012).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição centesimal e a atividade antioxidante *in vitro* da farinha obtida da casca do maracujá, um subproduto da indústria de alimentos.

## **Métodos**

Foram utilizadas amostras de maracujá (*Passiflora edulis*), colhidas em junho de 2010, provenientes de um produtor de cultivo orgânico em Torre de Pedra/SP. Os frutos foram lavados, a polpa foi separada da casca que foi seca em estufa com circulação de ar  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Marconi, Piracicaba/SP - Brasil) até obtenção de teor de umidade igual ou inferior a 10%. As cascas foram moídas em moinho de martelos (20 mesh) até obtenção da farinha (FCM), que foi estocada em frasco âmbar em temperatura ambiente até o momento das análises ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

A atividade de água ( $a_w$ ) da farinha foi avaliada em equipamento AquaLab (Pullman, WA, USA) a  $24,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a composição centesimal foi determinada quanto ao teor de umidade, cinzas e proteínas (AOAC, 2006), lipídeos (BLIGH & DYER, 1959). O conteúdo de fibra dietética total e fração insolúvel foram determinados por método gravimétrico (PROSKY *et al.*, 1988) e a fração solúvel calculada a partir da diferença entre fibra dietética total e fração insolúvel.

O teor de polifenóis e a avaliação da atividade antioxidante da casca foram determinados em três extratos distintos: aquoso, metanólico + acetona e etanólico. Para o preparo do extrato aquoso foi pesado 1 g da FCM e adicionados 25 mL de água fervente. Após 35 minutos o extrato foi filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração (2 to 8 °C) protegido da luz até momento da análise.

O preparo do extrato metanólico + acetona baseou-se na metodologia descrita por Larrauri, Ruperez and SauraCalixto (LARRAURI et al., 1997) e o extrato etanólico foi preparado baseado na metodologia descrita por (SPAGOLLA et al., 2009).

O conteúdo total de fenólicos foi determinado de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu (SWAIN & HILLIS, 1959). A presença dos compostos fenólicos vitexina, isovitexina, iso-orientina e apigenina foi investigada por meio de análise cromatográfica com um sistema de cromatografia líquida acoplada a um detector de fotiodo (Agilent Technologies 1200 series – Englewood, CO, USA). As condições cromatográficas utilizadas estão descritas em um estudo prévio realizado com as folhas de *P. edulis* (DA SILVA et al., 2013).

A capacidade antioxidante dos extratos foi testada pelas técnicas de DPPH (BRACA et al., 2001), FRAP (BENZIE & STRAIN, 1999) e ORAC Hidrofílico (PRIOR et al., 2003).

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) e todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As determinações foram efetuadas em triplicata e os dados submetidos à análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## Resultados e discussão

A farinha obtida da moagem da casca do maracujá (*P. edulis*) apresentou baixo teor de umidade e de  $a_w$  (Tabela 1), a qual promove proteção à farinha contra alterações microbiológicas, visto que o crescimento bacteriano se dá em  $a_w$  entre 0,6 e 0,9 (LABUZA & ALTUNAKAR, 2008).

**Tabela 1:** Composição centesimal da farinha da casca do maracujá (g/100g, base seca).

Componente	Média $\pm$ DP
Atividade de água ( $a_w$ )	0,43 $\pm$ 0,02
Umidade	9,48 $\pm$ 0,26
Cinzas	6,88 $\pm$ 0,02
Proteínas	3,94 $\pm$ 0,18
Lipídeos	0,31 $\pm$ 0,01
Fibra dietética total	65,22 $\pm$ 0,27
Fibra insolúvel	48,12 $\pm$ 1,10
Fibra solúvel	17,11 $\pm$ 1,36
Carboidratos*	79,39

\* Valor obtido por meio da diferença entre a soma dos macronutrientes subtraído de 100%.

O teor de fibra alimentar total (FDT) (Tabela 1) encontrado na FCM foi 1,25 vezes menor que a anteriormente descrita, no entanto, a relação fibra insolúvel e solúvel encontrada na FCM se manteve similar (YAPO & KOFFI, 2008), o que se encontra de acordo com o esperado para a obtenção de efeitos fisiológicos benéficos (70:30)

(SCHNEEMAN, 1987). O conteúdo de FDT supera os resultados encontrados em outros subprodutos da indústria de alimentos, como cascas de manga ( $51,2 \pm 1,1\%$ ) (AJILA *et al.*, 2010), goiaba ( $48,55 \pm 2,16\%$ ) (JIMENEZ-ESCRIG *et al.*, 2001), laranja (57%) (CHAU & HUANG, 2003), banana ( $50,3 \pm 0,2\%$ ) (WACHIRASIRI *et al.*, 2009). Em geral, as cascas utilizadas como fonte de fibras apresentam em sua composição maior concentração de fibras insolúveis, que garantem aos vegetais, dentre outras funções, a manutenção de sua morfologia. O consumo humano das fibras dietéticas promovem diversos efeitos fisiológicos benéficos, dentre os quais podemos citar formação de ácidos graxos de cadeia curta, os quais apresentam atividade anti-carcinogênica (TANG *et al.*, 2011); promoção do aumento do volume e da viscosidade fecal e diminuição do tempo de contato de substâncias potencialmente carcinogênicas com a mucosa (VUKSAN *et al.*, 2008); além de aumentar o status antioxidante (GOÑI & SERRANO, 2005).

Estudos têm demonstrado que o consumo da casca do maracujá pode ajudar no tratamento coadjuvante do controle glicêmico, com diminuição significativa na glicemia de jejum, hemoglobina glicada, índice HOMA IR e aumento no índice HOMA (QUEIROZ *et al.*, 2012); assim como no controle lipêmico, promovendo redução do colesterol total e fração LDL (RAMOS *et al.*, 2007). Além disso, estudo com modelo experimental demonstrou efeito anti-inflamatório, com diminuição do volume do edema, liberação de mieloperoxidase, infiltração de neutrófilos e da expressão de TNF- $\alpha$  e iNOS (SILVA *et al.*, 2011).

**Tabela 2:** Avaliação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais da farinha obtida da casca do maracujá *Passiflora edulis*.

Componente	Extratos		
	Aquoso	Metanólico/Acetona	Etanólico
Fenóis totais*	2,53 ± 0,03a	2,30 ± 0,01b	2,06 ± 0,08c
DPPH (%)	46,35 ± 0,85a	32,5 ± 2,52b	29,6 ± 0,66c
FRAP**	36,56 ± 0,99b	38,65 ± 1,55a	34,95 ± 2,02b
ORAC Hidrofilico**	40,83 ± 1,75b	68,58 ± 0,06a	63,48 ± 0,03a

\*(mg equivalentes de ácido gálico EAG/g de amostra); \*\*( $\mu$ mol Trolox equivalentes TE/g de amostra). Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

O conteúdo de polifenóis totais na FCM (Tabela 2) foi semelhante ao encontrado em outras cascas de frutas (tangor, limão, kumquat, calamondin, pamplemousses e bergamota de  $1882 \pm 65$  a  $7667 \pm 57 \mu\text{g/g}$ ) (RAMFUL *et al.*, 2010). Em geral, o teor de polifenóis neste tipo de subproduto mostra-se superior ao encontrado na porção comestível ou polpa dos frutos (TEHRANIFAR *et al.*, 2011), possivelmente porque os polifenóis são metabólitos secundários dos vegetais, os quais estão geralmente envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou a agressão por agentes patogênicos. Aos compostos fenólicos encontrados na casca do maracujá têm sido atribuídos efeitos anti-inflamatório (ZERAIK *et al.*, 2011; ZERAIK *et al.*, 2012) e anti-hipertensivo (LEWIS *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos vitexina, isovitexina, isoorientina e apigenina previamente

encontrados na casca do maracujá de distintas espécies (ZERAİK *et al.*, 2012; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2013), não foram identificados na análise cromatográfica dos extratos utilizados no presente. Existem vários fatores que podem ter contribuído para a não identificação dos mesmos nos extratos, dentre elas podemos citar a baixa concentração de casca na preparação dos extratos e ineficiência dos solventes na extração destes compostos.

A avaliação da atividade antioxidante (Tabela 2) avaliada pelo método DPPH, mostrou maior atividade antioxidante no extrato aquoso em comparação com os extratos metanólico / acetona e etanólico. Quando avaliado pela técnica FRAP o extrato metanólico / acetona apresentou maior atividade antioxidante que os extratos etanólico e aquoso, além disso, a capacidade antioxidante de redução do ferro da FCM foi superior ao encontrada em algumas frutas colombianas (CONTRERAS-CALDERÓN *et al.*, 2011). Os resultados de ORAC mostraram diferença estatística significativa ( $P < 0,0001$ ) entre os extratos (metanólico / acetona > etanólico > aquoso). Em suma, a água foi o melhor solvente na extração dos polifenóis, no entanto, apresentou menor atividade antioxidante comparado ao extrato metanólico / acetona nos ensaios FRAP e ORAC. A utilização de solventes orgânicos na extração de polifenóis vem sendo utilizado há décadas, porém há uma preocupação com relação aos efeitos tóxicos e viabilidade de aplicação destes extratos na indústria de alimentos e farmacêutica. Desta maneira, os estudos vêm ao longo dos anos tentando identificar solventes (diferentes polaridades) que não sejam nocivos e que assegurem um melhor rendimento na extração dos polifenóis (AGARWAL *et al.*, 2012). A escolha do solvente utilizado na extração influenciará diretamente o tipo de composto extraído devido a característica química dos polifenóis.

## **Conclusão**

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a casca do maracujá, subproduto da indústria de sucos e polpas, poderia ser utilizada como fonte de fibras. Sua incorporação na formulação de alimentos deve atentar as suas características físicas, químicas e sensoriais, para garantir seu melhor aproveitamento e aceitação entre os consumidores.



---

**Referências**

AGARWAL, M. et al. Extraction of polyphenol, flavonoid from *Emblica officinalis*, citrus limon, *cucumis sativus* and evaluation of their antioxidant activity. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 993-998,2012 Disponível em: < [www.orientjchem.org](http://www.orientjchem.org) >.

AJILA, C. M. et al. Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 219-224,2010 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.004> >.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th. Gaithersburg: : AOAC International., 2006.

ARVANITOYANNIS, I. S. 1 - Potential and Representatives for Application of Environmental Management System (EMS) to Food Industries. In: IOANNIS, S. A.;DR, *et al* (Ed.). **Waste Management for the Food Industries**. Amsterdam: Academic Press, 2008. p.3-38. ISBN 978-0-12-373654-3.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol**, v. 299, p. 15-27,1999

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-7,1959 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13671378> >.

BRACA, A. et al. Antioxidant Principles from Bauhinia tarapotensis. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 7, p. 892-895,2001 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np0100845> >. Acesso em: 16 ago 2012.

CHAU, C.-F.; HUANG, Y.-L. Comparison of the Chemical Composition and Physicochemical Properties of Different Fibers Prepared from the Peel of Citrus sinensis L. Cv. Liucheng. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2615-2618,2003 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf025919b> >. Acesso em: 17 ago 2012.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047-2053,2011 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>>. Acesso em: 14 nov 2013.

DA SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882-890,2013 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.043> >. Acesso em: 14 nov 2013.

GOÑI, I.; SERRANO, J. The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 11, p. 1877-1881,2005 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2213> >. Acesso: 14 nov 2013.

IBGE, I. B. D. G. E. E.-. **Anuário Estatístico do Brasil** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 72 2012.

JANEBRO, D. I. et al. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 9,2008.

JIMENEZ-ESCRIG, A. et al. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493,2001.

LABUZA, T. P.; ALTUNAKAR, L. Water Activity Prediction and Moisture Sorption Isotherms. In: (Ed.). **Water Activity in Foods**: Blackwell Publishing Ltd, 2008. p.109-154. ISBN 9780470376454.

LARRAURI, J. A. et al. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393,1997.

LEWIS, B. J. et al. Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1359-66,2013.

MARTINEZ, R. et al. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1520-6,2012.

MELETTI, L. M. M.; BRUKNER, C. H. Melhoramento Genético. In: BRUKNER, C. H. e PIKANÇO, M. C. (Ed.). **Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-Colheita, Agroindústria e Mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279,2003.

PROSKY, L. et al. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 71, n. 5, p. 1017-23,1988  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2853153> >. Acesso em: 14 nov 2013.

QUEIROZ, M. S. R. et al. Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. **Nutrition Journal**, v. 11, p. 89,2012 Disponível em: < <http://www.nutritionj.com/content/11/1/89> >. Acesso em: 14 nov 2013.

RAMFUL, D. et al. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. **Toxicology**, v. 278, n. 1, p. 75-87,2010.

RAMOS, A. T. et al. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 592-597,2007.

SCHNEEMAN, B. O. Soluble Vs Insoluble Fiber-Different Physiological-Responses. **Food Technology**, v. 41, n. 2, p. 81-82,1987.

SILVA, D. C. et al. Pectin from *Passiflora edulis* shows anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypotriglyceridemic properties in diabetic rats. **J Med Food**, v. 14, n. 10, p. 1118-26,2011.

SILVA, S. R. D.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 22, p. 254-258,2002.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1672-1692,2013.

SPAGOLLA, L. C. et al. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 187-191,2009.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68,1959 Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>>. Acesso em: 14 nov 2013.

TANG, Y. et al. The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer. **Autophagy**, v. 7, n. 2, p. 235-7,2011.

TEHRANIFAR, A. et al. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1523-1527,2011 Disponível em: <

---

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011001415> >. Acesso em: 14 nov 2013.

VUKSAN, V. et al. Using cereal to increase dietary fiber intake to the recommended level and the effect of fiber on bowel function in healthy persons consuming North American diets. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 5, p. 1256-1262,2008 Disponível em: < <http://ajcn.nutrition.org/content/88/5/1256.abstract> >. Acesso em: 14 nov 2013.

WACHIRASIRI, P. et al. The effects of banana peel preparations on the properties of banana peel dietary fibre concentrate. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 605-611,2009.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Dietary fiber components in yellow passion fruit rind--a potential fiber source. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 14, p. 5880-3,2008 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558700> >.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 459-471,2010.

ZERAIK, M. L. et al. Passion fruit: a functional food? **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 459-471,2010.

ZERAIK, M. L. et al. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 259-265,2011.

ZERAIK, M. L. et al. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. **Química Nova**, v. 35, p. 541-545,2012.





## *CAPÍTULO 3*

---

(Artigo aprovado para publicação em Experimental Biology and Medicine)



---

***Passiflora edulis* peel intake and ulcerative colitis: Approaches for prevention and treatment**

Running title: *Passiflora edulis* peel intake and ulcerative colitis

Cynthia B.B. Cazarin<sup>1</sup>, Juliana K. da Silva<sup>1</sup>, Talita C. Colomeu<sup>2</sup>, Ângela G. Batista<sup>1</sup>,  
Conceição A. Vilella<sup>2</sup>, Anderson L. Ferreira<sup>3</sup>, Stanislaw Bogusz Junior<sup>4</sup>, Karina  
Fukuda<sup>4</sup>, Fabio Augusto<sup>4</sup>, Luciana R. de Meirelles<sup>5</sup>, Ricardo de L. Zollner<sup>2</sup>, Mário  
Roberto Maróstica Junior<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>University of Campinas, Department of Food and Nutrition, School of Food  
Engineering, Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862,  
Campinas/SP, Brazil.

<sup>2</sup>University of Campinas, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Science  
– Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887,  
Campinas/SP, Brazil.

<sup>3</sup>University of Campinas, Department of Structural and Functional Biology – Rua  
Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP,  
Brazil.

<sup>4</sup>University of Campinas, Institute of Chemistry, Instituto Nacional de Ciência e  
Tecnologia em Bioanalítica (INCTBio), PO Box: 6154, 13083-970, Campinas/SP,  
Brazil.

<sup>5</sup>University of Campinas – Department of Pathology, Faculty of Medical Science – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887, Campinas/SP, Brazil.

\*Corresponding author:

Mário Roberto Maróstica Júnior

Contact details: Departamento de Alimentos e Nutrição. Rua Monteiro Lobato, 80.

Cidade Universitária. Campinas-SP. Brasil. E-mail: [mario@fea.unicamp.br](mailto:mario@fea.unicamp.br)

Telephone/FAX: 55-19-3521-4059.

**Abstract**

Inflammatory bowel disease is a chronic relapsing disease that affects millions of people worldwide; its pathogenesis is influenced by genetic, environmental, microbiological and immunological factors. The aim of this study was to evaluate the effects of short and long-term *Passiflora edulis* peel intake on the antioxidant status, microbiota and short-chain fatty acids formation in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis using two ‘*in vivo*’ experiments: chronic (prevention) and acute (treatment). The colitis damage score was determined using macroscopic and microscopic analyses. In addition, the antioxidant activity in serum and other tissues (liver and colon) was evaluated. Bifidobacteria, lactobacilli, aerobic bacteria and enterobacteria and the amount of short-chain fatty acids (acetic, butyric and propionic acids) in cecum content were counted. Differences in the colon damage scores were observed; *Passiflora edulis* peel intake improved serum antioxidant status. In the treatment protocol, decreased colon lipid peroxidation, a decreased number of aerobic bacteria and enterobacteria, and an improvement in acetic and butyric acid levels in the feces were observed. An improvement in the bifidobacteria and lactobacilli was observed in the prevention protocol. These results suggested that *Passiflora edulis* peel can modulate microbiota and could be used as source of fiber and polyphenols in the prevention of oxidative stress through the improvement of serum and tissue antioxidant status.

**Keywords:** *Passiflora edulis* peel; ulcerative colitis; antioxidant status; microbiota; short chain fatty acids.



## Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic relapsing disease that encompasses Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) and affects millions of people worldwide. The difference between CD and UC is related to the location and severity of the mucosa; CD is a transmural inflammation that can affect the entire gastrointestinal tract, and UC is a non-transmural inflammation restricted to the colon (1). The pathogenesis of IBD is influenced by genetic, environmental, microbiological and immunological factors (2-4). An imbalance in the intestinal microbiota has been postulated to be responsible for the initiation and progression of this inflammation, especially when the pathogenic bacteria grow faster than non-pathogenic bacteria (5). The use of probiotics and prebiotics has been shown to have a modulatory effect on IBD, through direct microbiota modulation and by modulation of their end-products, such as short-chain fatty acids (6-7). Experiments using orally administration, enema and *in vitro* assays have shown that butyric acid has an anti-inflammatory effect by reducing neutrophil migration and by modulating interleukin production (8-10). Many inflammatory mediators, including reactive oxygen species (ROS) and cytokines, contribute to the inflammatory cascade that modulates the immune system in UC (11-14). In contrast, depletion of glutathione enzyme in chronic inflammation, which can improve the damage in tissue, has been reported (15-16).

In addition to prebiotics and probiotics, some polyphenolic compounds have shown anti-inflammatory activity in UC, especially by inhibiting proinflammatory markers (17-18). Moreover, in the last few years, many studies have used microbiota substrates that improve the formation of short-chain fatty acids and protect the mucosal tissue against inflammatory damages (6, 19-22). *Passiflora edulis* is largely cultivated in

Brazil and for the production of juices and pulps. However, a great amount of waste is generated by this industry because half of the fruit is peel, which is a source of pectin (23) and flavonoids (24). The consumption of *Passiflora edulis* peel has been shown to improve insulin sensitivity (25) and blood pressure (26); additionally, its polysaccharides have antitumor properties *in vitro* and its flavonoids have antioxidant activity (24).

*Passiflora edulis* is a great source of polyphenols, soluble and insoluble fiber, which could modulate inflammatory markers of ulcerative colitis. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of *Passiflora edulis* peel consumption in experimental model of rat colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS).

## **Materials and Methods**

### **Passion fruit flour (PFF)**

Organic *Passiflora edulis* (passion fruit) crops from Torre de Pedra/SP harvested in June 2010 were used to produce the flour. The fruit was cleaned and separated into pulp and peel (flavedo + albedo). The peels were cut into small pieces and dried in an oven with air circulation at 50 °C (Marconi, Piracicaba/SP - Brazil) until they reached a moisture content of 10% or less. The dried peel was ground into a fine powder using a hammer mill (20 mesh) and the flour was stored in an amber flask at room temperature (24 °C).



## Animals and experimental design

This study was carried out in accordance with the ‘Guide for the Care and Use of Laboratory Animals’ proposed by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The study was approved by the Animal Research and Ethic Committee of the University of Campinas (Brazil) (protocol 2257-1/2010).

Male *Wistar* rats were housed under standard temperature ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), humidity (60 – 70 %), and light-dark cycle (19 – 07 h). Forty eight rats were randomized into two experiments: the treatment and prevention protocols. In the treatment protocol 24 rats (77 days old) were divided into control and PFF groups (n=12). They were fed with control and experimental diet, respectively, for a week. The diets were prepared in accordance with the American Institute of Nutrition (27) with 50% of the cellulose substituted with dietary fiber from PFF in the experimental diet. After 7 days, colitis was induced in 6 animals from each group. The animals were maintained for 7 days; afterwards they were anesthetized with ketamine and xylazine and sacrificed by exsanguinations through cardiac puncture. In the prevention protocol, 24 rats (21 days old) were divided into control and PFF groups (n=12). They were fed with the control or experimental diets for 84 days, at which point colitis was induced in 6 animals per group. After 7 days, they were sacrificed as described above. Access to food and drink was *ad libitum* and monitored three times a week.

Briefly, colitis induction was carried out using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS). The animals were anaesthetized with halothane and given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v/v) using a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus (28). The same procedure was performed on non-colitic animals, which were

referred to as saline group, through intracolonic administration of 0.25 ml of phosphate-buffered saline instead of TNBS.

### **Blood sampling**

Blood samples were obtained by cardiac puncture under anesthesia, collected in tubes sprayed internally with clot accelerator ( $\text{SiO}_2$ ) and centrifuged at 2600 g for 20 min. Serum was stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  until the analyses were performed. Serum albumin and total proteins were measured using commercial kits (Laborlab, Guarulhos, São Paulo, Brazil). Serum was treated with ethanol:ultrapure water (40:20, v/v) and  $0.75\text{ mol L}^{-1}$  metaphosphoric acid (29) and these extracts were used to determine the antioxidant activity of the samples using hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (30) and to measure the ability of the antioxidants to reduce the ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine complex  $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  (FRAP) (31).

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) method was developed by Benzie and Strain (31). This methodology is based on the capacity to reduce the complex ferric ion and 2,3,5-triphenyl-1,3,4-triazin-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride (TPTZ). The binding of  $\text{Fe}^{2+}$  to the ligand creates a very intense blue color. Changes in this color are monitored by measuring the absorption at 593 nm.

The oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay measures the antioxidant scavenging activity against the peroxy radical. AAPH (2,2-azobis 2-amidopropane dihydrochloride) is used to generation of free radical and the loss of fluorescence is recorded, which indicates the extent of the radical scavenging (32).

### **Tissue sampling**

The liver and colon were quickly removed, cleaned with physiologic solution (0.9% NaCl) and weighed. The colon's length was measured, and the macroscopically visible damage was evaluated on a 0–10 scale according to previously reported criteria (33). Afterwards, the specimens were frozen in liquid nitrogen and kept at - 80 °C. Tissue homogenates were prepared in 50 mmol phosphate buffer (pH 7.4) using a Polytron homogenizer (MA102/Mini, Marconi, Piracicaba - SP, Brazil), and the supernatant was kept at - 80 °C until analyses.

Lipid peroxidation was determined in the tissue homogenates based on Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay (34), reduced glutathione (GSH) activity (35), glutathione reductase (GR) activity (36), glutathione peroxidase (GPx) activity (37) and superoxide dismutase (SOD) activity (38).

Myeloperoxidase activity (MPO) in the colon tissue homogenates was measured by the method proposed by Krawist et al.(39); the results were expressed as MPO units per mg of protein, where 1 unit of MPO activity was defined as the amount able to degrade 1  $\mu\text{mol}$  hydrogen peroxide. $\text{min}^{-1}$  at 25 °C.

### **Colonic histology**

For the histological analyses, freshly dissected colon samples were washed with physiologic solution (0.9% NaCl) and cryoconserved in a freezing medium (Jung; Leica Instruments, Nussloch, Germany). Serial cross-sections (7  $\mu\text{m}$ ) were prepared using a cryostat (CM 1850 Cryostat, Leica) and fixed on silanized slides. After staining the

samples with Haematoxylin-Eosin, the severity of each colitis case was analyzed (Eclipsi 80i microscope, Nikon) by a pathologist according to the criteria described by Chinen et al. (40).

### **pH and cecal microbiota**

Fecal samples were collected from the cecum, diluted with deionized water ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) and homogenized to measure the fecal pH using a pH meter (Tecnal model TEC-5, Piracicaba, SP - Brazil) (41).

The cecal microbiota was evaluated in fecal samples homogenized in peptone water ( $100\text{mg mL}^{-1}$ ) followed by ten-fold serial dilutions in the same medium. Aliquots of 0.1 ml of the appropriate dilution were spread onto the MRS agar media for the Lactobacillus count and supplemented MRS agar ( $0.5\text{mg L}^{-1}$  dicloxacillin,  $1\text{g L}^{-1}$  LiCl and  $0.5\text{g L}^{-1}$  L-cysteine hydrochloride) for Bifidobacterium. The cultured plates were incubated in anaerobic condition at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24–48 h. Similarly, 1 mL of each diluted sample was spread onto a specific count plates Petrifilm (3M®, São Paulo, MN) for Enterobacteriaceae and total aerobic bacteria. The plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 - 48h. After the incubation, the specific colonies grown on the selective culture media were counted, and the number of viable microorganism  $\text{g}^{-1}$  feces ( $\text{CFU g}^{-1}$ ) was calculated. The mean and standard error were calculated from the log 10 values of the  $\text{CFU g}^{-1}$ .

### **Cecal short-chain fatty acid content**

Short-chain fatty acids (SCFAs) were analyzed by gas chromatography (42) using Agilent 6890N equipment with a flame ionization detector (FID) and an autosampler N10149 (Agilent, EUA). A 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm Nukol™ capillary column (Supelco, Bellefonte, PA, US) was used. The chromatographic conditions were as follows: injector and detector temperatures, 250 °C; injected volume, 1 μL with split ratio set to 1:10; and carrier gas, hydrogen at 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The column oven was programmed as follows: the temperature was kept at 100 °C for 0.5 min, then heated at 8 °C min<sup>-1</sup> until it reached 180°C, held for 1 min, heated 20 °C min<sup>-1</sup> until it reached 200 °C and then held for 5 min.

### **Statistical analysis**

The statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparisons test. All data were expressed as the means ± SEM and the difference was considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ . Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) software.

### **Results and Discussion**

The consumption of fruits and vegetables are important to diminish the risk of UC, as they are rich sources of fibers and antioxidants (43-44). The consumption of *Passiflora edulis* peel could improve the intake of fibers and antioxidants and could play a role in

UC (23-24). Thus, flour (PFF) from *P. edulis* peel was prepared and incorporated into the rats' diet by using it to replace 50% of the standard source of fiber (cellulose). The effects of PFF intake in a short-term (treatment protocol) and in a long-term (prevention protocol) were evaluated in a TNBS-induced colitis model.

The symptoms of colitis were observed immediately after the administration of TNBS when the animals started to show bleeding on the rectum and in the feces. During the 7 days after colitis induction, all of the animals showed colitis symptoms, such as bloody feces, diarrhea, weight loss and a decrease on food intake. This decrease in food intake observed in the colitis groups had an important influence on the body weight loss (Table 1).

**Table 1.** Food intake, body weight changes and serum analyses of rats fed control and PFF diets in the treatment and prevention protocols.

	Control Saline	Control Colitis	PFF Saline	PFF Colitis
	<b>Treatment protocol</b>			
Food intake daily (g)	24.9 ± 1.02 <sup>a</sup>	13.8 ± 1.16 <sup>b</sup>	22.8 ± 1.46 <sup>a</sup>	14.6 ± 1.97 <sup>b</sup>
Total weight gain (g)	41.8 ± 2.86 <sup>a</sup>	13.8 ± 4.00 <sup>b</sup>	36.5 ± 4.27 <sup>a</sup>	9.5 ± 1.78 <sup>b</sup>
Colon weight/length ratio	0.1 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>a</sup>
Serum total protein (mg/dL)	5.2 ± 0.15 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.22 <sup>ab</sup>	5.9 ± 0.21 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.12 <sup>ab</sup>
Serum albumin (mg/dL)	3.0 ± 0.04 <sup>c</sup>	3.4 ± 0.17 <sup>abc</sup>	3.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.03 <sup>b</sup>
Serum FRAP (μM TE/mL)	598.9 ± 32.95 <sup>a</sup>	504.1 ± 35.17 <sup>abc</sup>	481.8 ± 12.75 <sup>c</sup>	550.1 ± 17.36 <sup>b</sup>
Serum ORAC (μM TE/L)	265.0 ± 13.72 <sup>b</sup>	429.0 ± 4.76 <sup>a</sup>	438.1 ± 38.55 <sup>a</sup>	387.2 ± 23.84 <sup>a</sup>
	<b>Prevention protocol</b>			
Food intake daily (g)	24.9 ± 0.38 <sup>a</sup>	22.7 ± 0.53 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.20 <sup>c</sup>	10.0 ± 0.31 <sup>c</sup>
Total weight gain (g)	391.7 ± 4.15 <sup>a</sup>	312.2 ± 14.01 <sup>b</sup>	164.8 ± 8.10 <sup>c</sup>	141.8 ± 11.77 <sup>d</sup>
Colon weight/length ratio	0.1 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.03 <sup>a</sup>
Serum total protein	5.9 ± 0.13 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.12 <sup>bc</sup>	5.6 ± 0.19 <sup>ab</sup>	5.1 ± 0.13 <sup>c</sup>
Serum albumin	3.7 ± 0.08 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.13 <sup>d</sup>	5.7 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.13 <sup>b</sup>
Serum FRAP (μM TE/mL)	465.5 ± 49.38 <sup>b</sup>	496.8 ± 32.67 <sup>b</sup>	563.1 ± 66.53 <sup>ab</sup>	649.6 ± 57.90 <sup>a</sup>
Serum (ORAC (μM TE/L)	420.3 ± 16.24 <sup>a</sup>	402.2 ± 35.52 <sup>ab</sup>	398.1 ± 22.16 <sup>ab</sup>	349.6 ± 21.96 <sup>b</sup>

Values are expressed as the mean ± SEM (n = 6 rats per group). Different superscript letters in the same line denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.

The short-term intake of the PFF diet in the treatment protocol did not promote changes in food intake and weight gain. However, in the prevention protocol the long-

term intake of the PFF diet resulted in a decreases in food intake and body weight gain that could be attributed to the changes in the types of fibers presents in the diet (soluble and insoluble). In contrast to the control diet, in which cellulose was the only source of dietary fiber, the PFF diet included cellulose and soluble and insoluble fibers from the *P. edulis* peel flour. Thus, this modification of the dietary fiber composition could have an influence on the satiety, gastric emptying, bowel transit time, and in the digestion and absorption of fat and carbohydrates, all of which can contribute to decreases in weight gain (45-47).

Malnutrition occurs very frequently in IBD patients (48), and they often have a lower level of serum albumin in the acute phase compared to healthy individuals, likely due to a decrease in serum albumin synthesis, an increase in transcapillary losses and degradation (49). Therefore, evaluating serum albumin could be a simple and inexpensive way to predict the nutritional status of IBD patients (50). Consumption of the PFF diet increased the levels of serum albumin in both healthy and colitis animals in the prevention protocol, which led us to believe that these animals, although they exhibited less weight gain compared to the control group, most likely were not malnourished (Table 1).

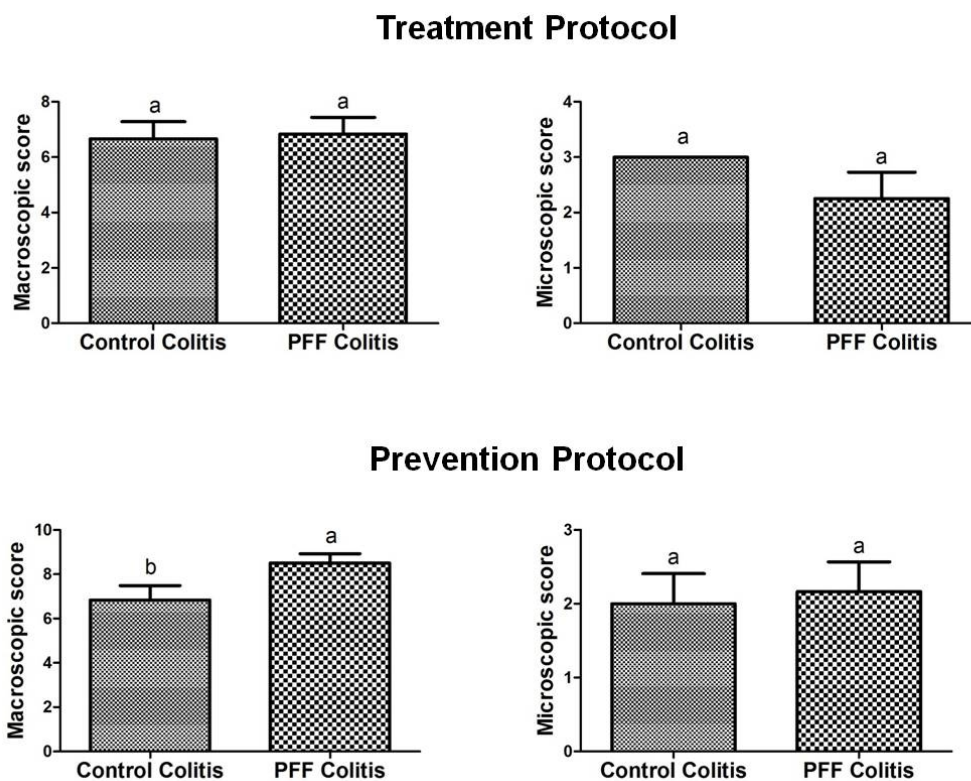
The macroscopic evaluation of the inflamed mucosa was used to determine the presence and extension of the hyperemia and ulceration in the tissue compared to normal colon. TNBS-induced colitis is characterized by severe necrosis of the mucosa, typically extending 4–6 cm along the colon, bowel wall thickening, hyperemia and focal adhesions to adjacent organs (Figure 1). In addition, transmural intense inflammatory infiltrations of lymphocytes and neutrophils, edema in the mucosa and a focal loss of crypts and superficial epithelium were observed, similar to previous studies (28, 51).



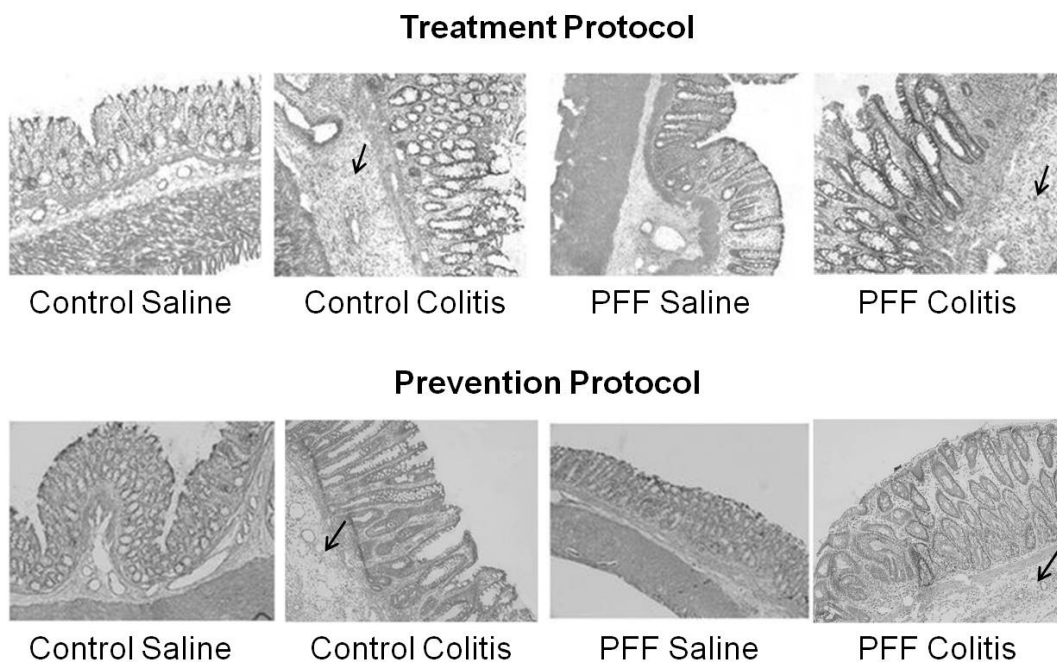


**Figure 1.** Macroscopic changes in the architecture of the colon tissue in the TNBS model of colitis. a) normal mucosa; b) typically inflamed mucosa observed in this experimental model, characterized by bowel wall thickening, hyperemia and areas of necrosis.

Consumption of the PFF diet did not attenuate the macroscopic tissue damage observed in the TNBS-induced colitis model; the microscopic score was similarly unaffected (Figure 2 and 3). In addition, there were no decreases in the colonic weight/length ratio in the PFF groups compared to the control groups in either protocols (Table 1).



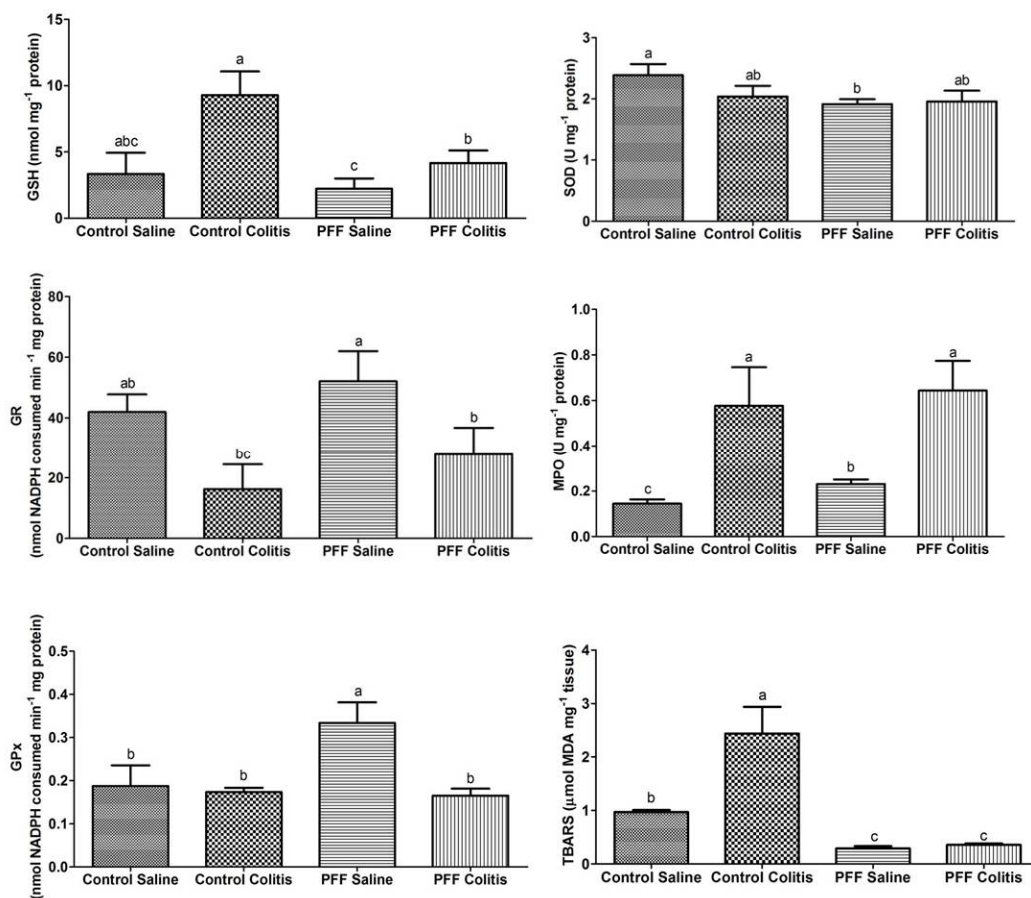
**Figure 2.** Evaluation of the macroscopic and microscopic scores in inflamed colonic mucosa in the TNBS-induced colitis model. Inflammation severity is scored in comparison to healthy animals (score = zero). Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.



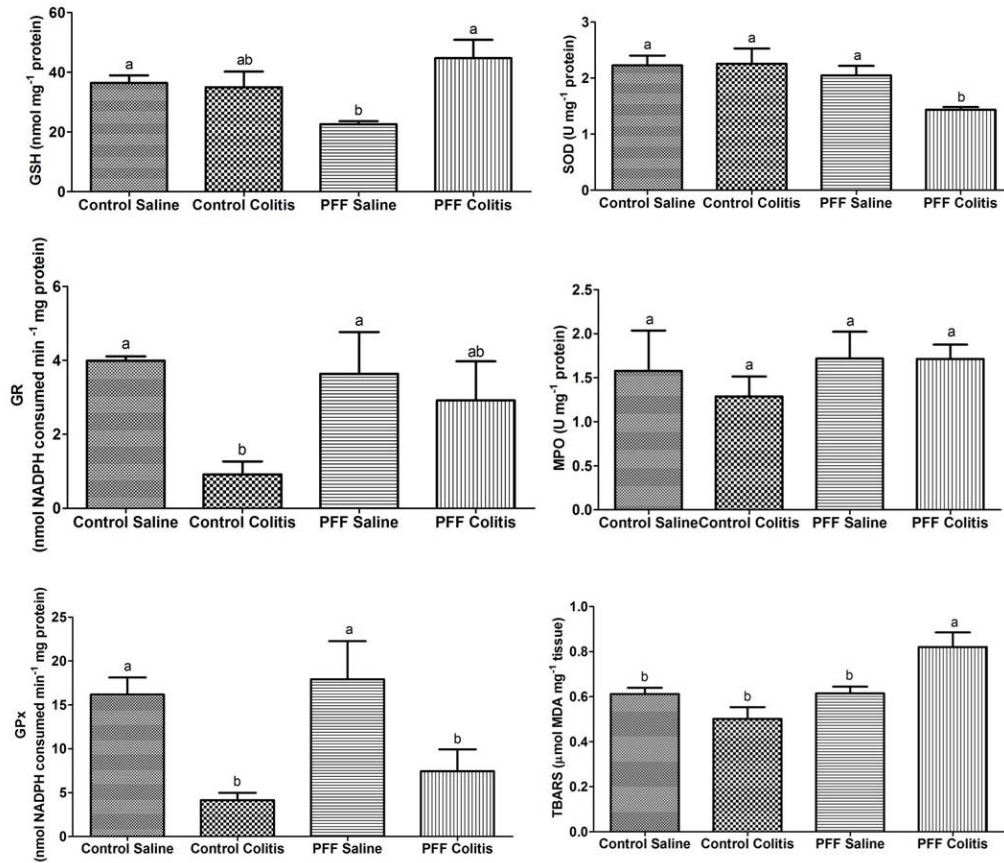
**Figure 3.** Effects of PFF on the histological evaluation of colon tissues from rats submitted to TNBS-induced colitis (original magnification,  $\times 100$ ). This experimental model is characterized by a continuous lesion, restricted to the distal colon, with a large area of necrosis and the transmural involvement of the mucosa. The colon of colitis groups showed loss of crypts and epithelial integrity, submucosal edema (indicated by arrows), and intense inflammatory cellular infiltration in all layers.

The concept of oxidative stress is defined globally as an imbalance between pro-oxidants and antioxidants, but it has been discussed based on the inconclusive results shown in interventional trials, where limited increases in protection after an increase in antioxidants supply were reported. Based on those results, Jones (52) stated that the definition of oxidative stress should be changed to a condition in which there is a disruption in redox signaling and control. In the present study, these changes were investigated in the serum and colonic and hepatic tissue of the rats in the treatment and prevention protocols.

The level of lipid peroxidation in the colon mucosa was evaluated using the TBARS assay and by measuring the antioxidants and myeloperoxidase (MPO) enzymes activities (Figure 4 and 5). The TBARS assay quantifies the level of malondialdehyde (MDA) synthesis, which is a validated marker for evaluating the lipid peroxidation caused by the action of ROS. PFF consumption in the treatment protocol protected the animals' colon tissue from lipid peroxidation; however, it did not affect the levels of endogenous antioxidants enzymes or decrease MPO synthesis.



**Figure 4.** Evaluation of the effects of the treatment protocol (PFF short-term intake) on the endogenous antioxidant enzymes activity and the level of lipid peroxidation in inflamed colonic mucosa in the TNBS-induced colitis model. TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  rats per group). Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.



**Figure 5.** Evaluation of the effects of the prevention protocol (PFF long-term intake) on the endogenous antioxidant enzymes activity and the level of lipid peroxidation in inflamed colonic mucosa in the TNBS-induced colitis model. TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  rats per group). Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.

MPO is an enzyme found in neutrophils that, following stimulation, causes an increase in ROS production and proinflammatory mediators. In a study of patient rectal biopsies, Dagli et al. (53) observed an increase in ROS concentration and, neutrophil-derived MPO activity, which was in accordance with an increase in MDA levels and a decrease in SOD enzyme. Silva et al. (54) observed a dose-dependent decrease in MPO, and a significant reduction in carrageenan-induced paw edema in rats that received pectin isolated from the peels of *P. edulis*. In addition, the flavonoid isoorientin extracted from *P. edulis* peel was shown to be more effective in MPO activity reduction than the methanolic extract from the pulp. The technique that was used provided evidence that MPO inactivation might be related to a structural modification or linkage between the flavonoid and the active site on the enzyme's protein chain (55).

In contrast, in the prevention protocol, the consumption of PFF tended to improve the level of the antioxidant enzymes, but there was no significant difference between the control and PFF colitis groups. The increase in the MDA level of the PFF colitis group could be responsible for the significant decrease in the SOD enzyme. This enzyme converts the  $O_2^-$  radical into  $O_2$  and  $H_2O_2$  and then, the  $H_2O_2$  is converted into  $H_2O$  by GSH oxidation (11). These findings suggest that long-term PFF intake could have a protective effect on the antioxidant status of the colonic tissue.

Antioxidant status was also evaluated in the serum, and changes in serum antioxidant activity were observed in both protocols (Table 1). In the prevention protocol, the PFF colitis group exhibited an improvement in FRAP serum antioxidant activity compared to the control colitis group. The serum antioxidant activity measured by FRAP in a previously study was inversely associate with the level of serum C-reactive protein (56). In addition, the FRAP assay does not measure the SH-group present on the antioxidants (57), which reinforces the effect of long-term PFF intake on

the improvement of antioxidant status in colitis animals. The main source of sulfydryl (SH) groups in plasma is albumin, which has been reported to be increased in the PFF groups in the prevention protocol (58).

The consumption of *P. edulis* juice did not improve antioxidant enzyme status but did decrease the blood TBARS levels, indicating that the antioxidant capacity may be related to the addition of exogenous antioxidants present in the juice (59). However, although Rudnicki et al. (60) did not observe changes in liver MDA levels, the consumption of the hydroalcoholic extracts of both *P. alata* and *P.edulis* leaves had significant protective effects against carbonyl protein formation and advanced glycation end-products. In addition, those authors observed a linear relationship between total phenolic content and total antioxidant activity, indicating that these compounds might be the major contributors to animal's antioxidant activities.



**Table 2.** Effects of PFF on hepatic antioxidant status in TNBS-induced colitis rats.

	Control Saline	Control Colitis	PFF Saline	PFF Colitis
<b>Treatment protocol</b>				
Liver weight (g)	13.7 ± 0.58 <sup>a</sup>	14.4 ± 0.82 <sup>a</sup>	16.1 ± 0.85 <sup>a</sup>	15.2 ± 0.73 <sup>a</sup>
Reduced GSH (μM GSH/mg protein)	40.0 ± 9.46 <sup>a</sup>	35.2 ± 3.38 <sup>a</sup>	35.4 ± 5.50 <sup>a</sup>	35.0 ± 3.95 <sup>a</sup>
GPx*	10.7 ± 0.77 <sup>ab</sup>	12.0 ± 0.82 <sup>a</sup>	8.9 ± 0.80 <sup>bc</sup>	6.28 ± 1.30 <sup>c</sup>
GR*	9.6 ± 1.16 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.79 <sup>b</sup>	12.9 ± 1.37 <sup>ab</sup>	18.1 ± 1.35 <sup>a</sup>
SOD (Units/mg protein)	10.5 ± 1.88 <sup>a</sup>	6.9 ± 1.36 <sup>b</sup>	10.8 ± 1.97 <sup>a</sup>	6.5 ± 1.82 <sup>b</sup>
TBARS (μM MDA/mg tissue)	1.2 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.5 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.5 ± 0.11 <sup>a</sup>
<b>Prevention protocol</b>				
Liver weight (g)	15.4 ± 1.32 <sup>a</sup>	14.0 ± 0.76 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.34 <sup>b</sup>	8.7 ± 0.52 <sup>b</sup>
Reduced GSH (μM GSH/mg protein)	59.7 ± 2.48 <sup>a</sup>	69.4 ± 8.54 <sup>a</sup>	69.4 ± 7.07 <sup>a</sup>	71.1 ± 11.17 <sup>a</sup>
GPx*	10.6 ± 1.12 <sup>a</sup>	12.0 ± 1.42 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.29 <sup>b</sup>	7.3 ± 1.15 <sup>ab</sup>
GR*	21.3 ± 2.13 <sup>b</sup>	21.1 ± 3.21 <sup>b</sup>	41.3 ± 3.82 <sup>a</sup>	31.0 ± 3.29 <sup>a</sup>
SOD (Units/mg protein)	2.0 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.81 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.18 <sup>b</sup>
TBARS (μM MDA/mg tissue)	1.1 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.2 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.10 <sup>a</sup>

\*nmol NADPH consumed/min mg protein. Values are expressed as mean ± SEM (n = 6 rats per group). TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances. Different superscript letters in the same line denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.

Animals from the PFF intake group showed changes in their liver antioxidant status (Table 2), with a decrease in GPx level and, an increase in GR and MDA levels, but no changes in the hepatic reduced glutathione level. GPx catalyzes the reduction of hydroperoxides, including hydrogen peroxides, by reducing glutathione, which can be recycled by GR; GR, reduces the oxidized glutathione (GSSG) using Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) as an electron donor. Thus, the level of GPx is often discussed in parallel with GR, which maintains a constant supply of GSH from GSSG for enzymatic activity. GSSG can be translocated to the blood across the liver, and its plasmatic levels may reflect ROS activity *in vivo* (61). Thus, this increase in GR in the PFF groups could be related to an influx of circulating GSSG. The decrease in liver weight observed in the PFF groups in the prevention protocol requires further investigation, specifically with respect the lipids and glycogen contents and histological modifications of the liver. A reduction in the liver weight has been observed in others studies (62-63), in which the level of fiber in the diet was modified, but the reason why long-term consumption of PFF decreases the liver weight remains undetermined.

PFF is a source of flavonoids and fibers that can act as a substrate to the microbiota, yielding high levels of short-chain fatty acids (SCFAs) that improves gastrointestinal health (64). Changes in the microbiota and SCFA levels were observed in both protocols (Table 3). Consumption of PFF in the treatment protocol decreased the count of total aerobic bacteria and enterobacterias, and improved the acetic and butyric acid levels in the feces. When PFF was used in the prevention protocol, an increased count of bifidobacterias and lactobacilli was observed but modifications in SCFA levels were not. Increases in butyrate concentrations have been suggested to contribute to the down-regulation of pro-inflammatory cascades and oxidative stress in IBD (65-66).

**Table 3.** Effects of PFF on the microbiota and short-chain fatty acids in TNBS-induced colitis rats.

	Control Saline	Control Colitis	PFF Saline	PFF Colitis
<b>Treatment Protocol</b>				
pH	8.46 ± 0.14 <sup>b</sup>	8.80 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.98 ± 0.13 <sup>c</sup>	8.44 ± 0.23 <sup>ab</sup>
Bifidobacterias (CFU/g wet feces)	9.86 ± 0.20 <sup>ab</sup>	10.34 ± 0.23 <sup>a</sup>	9.22 ± 0.22 <sup>c</sup>	9.35 ± 0.29 <sup>b</sup>
Lactobacilli (CFU/g wet feces)	10.35 ± 0.11 <sup>ab</sup>	10.52 ± 0.29 <sup>ab</sup>	10.33 ± 0.13 <sup>b</sup>	10.74 ± 0.16 <sup>a</sup>
Total aerobic (CFU/g wet feces)	9.64 ± 0.12 <sup>ab</sup>	9.81 ± 0.16 <sup>a</sup>	9.08 ± 0.26 <sup>bc</sup>	8.77 ± 0.15 <sup>c</sup>
Enterobacterias (CFU/g wet feces)	9.56 ± 0.23 <sup>a</sup>	9.28 ± 0.22 <sup>a</sup>	8.67 ± 0.29 <sup>b</sup>	8.28 ± 0.18 <sup>b</sup>
Acetic acid (μM/mg wet feces)	0.08 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>
Propionic acid (nM/mg wet feces)	14.20 ± 1.89 <sup>ab</sup>	11.96 ± 1.52 <sup>b</sup>	21.05 ± 3.27 <sup>a</sup>	12.01 ± 1.73 <sup>b</sup>
Butiric acid (nM/mg wet feces)	11.09 ± 1.28 <sup>c</sup>	10.27 ± 1.53 <sup>c</sup>	23.21 ± 1.97 <sup>a</sup>	17.28 ± 1.53 <sup>b</sup>
<b>Prevention Protocol</b>				
pH	8.53 ± 0.09 <sup>b</sup>	8.60 ± 0.20 <sup>ab</sup>	8.26 ± 0.23 <sup>b</sup>	9.00 ± 0.15 <sup>a</sup>
Bifidobacterias (CFU/g wet feces)	9.50 ± 0.03 <sup>b</sup>	8.72 ± 0.08 <sup>c</sup>	10.09 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.42 ± 0.18 <sup>b</sup>
Lactobacilli (CFU/g wet feces)	9.40 ± 0.20 <sup>b</sup>	8.87 ± 0.13 <sup>c</sup>	10.20 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.52 ± 0.25 <sup>b</sup>
Total aerobic (CFU/g wet feces)	8.63 ± 0.40 <sup>a</sup>	8.29 ± 0.16 <sup>a</sup>	8.43 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.48 ± 0.24 <sup>a</sup>
Enterobacterias (CFU/g feces)	7.83 ± 0.44 <sup>a</sup>	8.02 ± 0.23 <sup>a</sup>	8.43 ± 0.37 <sup>a</sup>	8.35 ± 0.27 <sup>a</sup>
Acetic acid (μM/mg wet feces)	0.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>bc</sup>
Propionic acid (nM/mg wet feces)	4.20 ± 0.33 <sup>a</sup>	4.25 ± 0.66 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.38 <sup>a</sup>
Butiric acid (nM/mg wet feces)	3.72 ± 0.44 <sup>ab</sup>	2.39 ± 0.67 <sup>b</sup>	4.55 ± 0.35 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.42 <sup>b</sup>

The data are expressed as mean ± SEM (n = 6 rats per group). Different superscript letters in the same line denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.

A recent investigation showed that UC patients did not exhibit differences in mucosa-associated lactobacilli compared to healthy patients; however, a reduction in the bifidobacteria count was observed compared to healthy patients' microbiota (5). Divergent results pertaining to these findings have been reported in the literature, especially because many different techniques are used to evaluate the microbiota. Nevertheless, an imbalance between the commensal protective and pathogenic bacteria in the microbiota has been postulated to be a factor in the pathogenesis of IBD. Long-term consumption of PFF improves the count of beneficial bacterias in the microbiota.

A search for new sources of substrate (prebiotics) for the selective growth of probiotics is underway (6, 20-21). The consumption of a prebiotic enzyme-treated rice fiber (ERF) showed no differences in bifidobacteria and lactobacilli compared to untreated group; however, decreases in *Clostridium* and *Eubacterium* were observed, were increases in acetic and butyric acids in the feces of male Sprague–Dawley rats (6). Histological analysis showed significant decreases in mucosal damage scores of rats that consumed ERF, which could be related to the changes in SCFA production. Increases in bifidobacteria and lactobacilli were observed in HLA-B27 transgenic rats after 7 weeks of intake of a prebiotic containing a mixture of chicory-derived long-chain inulin-type fructans and short-chain inulin fraction oligofructose (1:1), without modification of SCFA levels compared with the untreated group (20). Female Wistar rats receiving lactulose at 2.5% in their drinking water for 3 weeks showed higher counts of bifidobacteria and lactobacilli in their colonic contents compared to the control colitis group (19). A mixture of 60% kale leaves plus 40% papaya pulp administrated orally for 2 weeks in female Wistar rats, resulted in a significant increase in lactobacilli and a decrease in aerobic bacteria and enterobacteria in the colon luminal content; changes that improve the ratio of beneficial/pathogen bacterias in the feces

(21). However, intake of green dwarf banana flour, a rich source of resistant starch and amylase, did not promote changes on microbiota (22).

Intestinal protective mechanisms of PFF are still relatively unknown. Our data shows that PFF intake exhibit effect in modulating the intestinal microbiota. In the treatment protocol the increases on butyric acid could be directly related to decreases in TBARS levels; and in the prevention protocol the consumption of PFF improves bifidobacterias and lactobacillus in cecal content. Thus, more studies need to be developed to evaluate the effects of PFF intake in the maintaining the intestinal barrier and in the immune response.

In conclusion, PFF consumption provided benefits in both protocols; however, the consumption of PFF in the prevention protocol showed that long-term intake could have more benefits compared to short-term consumption. Long-term intake of PFF improved antioxidant status and modulated the microbiota in TNBS-induced colitis. However, an improvement in the mucosal damage score was not observed. PFF could be incorporated into the diet as a source of fiber and polyphenols, which could prevent oxidative stress in liver and colon tissue and improve serum antioxidant status.

**References**

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1641-57.
2. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg*. 1998 Apr;22(4):382-9.
3. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):417-29.
4. Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Jun;49(6):601-8.
5. Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, Hudspith BN, Brostoff J. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 May;11(5):481-7.
6. Komiyama Y, Andoh A, Fujiwara D, Ohmae H, Araki Y, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Kanauchi O. New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scand J Gastroentero*. 2011 Jan;46(1):40-52.
7. Zhao HM, Huang XY, Zuo ZQ, Pan QH, Ao MY, Zhou F, Liu HN, Liu ZY, Liu DY. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol*. 2013 Feb 7;19(5):742-9.
8. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000 Sep;47(3):397-403.
9. Hu R, Ouyang Q, Wang H. Investigation of the effect of Na-butyrate on TNBS induced rat colitis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003 Jul;34(3):562-4.
10. Vieira EL, Leonel AJ, Sad AP, Beltrao NR, Costa TF, Ferreira TM, Gomes-Santos AC, Faria AM, Peluzio MC, Cara DC, Alvarez-Leite JI. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem*. 2012 May;23(5):430-6.
11. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathology - Research and Practice*. 2008;204(7):511-24.
12. Roda G, Marocchi M, Sartini A, Roda E. Cytokine Networks in Ulcerative Colitis. *Ulcers*. 2011;2011.
13. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1756-67.
14. Rodriguez-Peralvarez ML, Garcia-Sanchez V, Villar-Pastor CM, Gonzalez R, Iglesias-Flores E, Muntane J, Gomez-Camacho F. Role of serum cytokine profile in ulcerative colitis assessment. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Oct;18(10):1864-71.
15. Ruan EA, Rao S, Burdick JS, Stryker SJ, Telford GL, Otterson MF, Opara EC, Koch TR. Glutathione levels in chronic inflammatory disorders of the human colon. *Nutrition Research*. 1997 Mar;17(3):463-73.
16. Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, Gil A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digest Dis Sci*. 2000 Sep;45(9):1820-7.
17. de Faria FM, Luiz-Ferreira A, Socca EA, de Almeida AC, Dunder RJ, Manzo LP, da Silva MA, Vilegas W, Rozza AL, Pellizzon CH, Dos Santos LC, Souza Brito

- AR. Effects of *Rhizophora mangle* on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:753971.
18. Algieri F, Zorrilla P, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa N, Bañuelos Ó, González-Tejero MR, Casares-Porcel M, Molero-Mesa J, Zarzuelo A, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Journal of Ethnopharmacology.* 2013;146(3):750-9.
19. Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 Mar;11(3):265-71.
20. Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, Lien K, Churchill TA, Lupicki M, Dieleman LA. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 Nov;11(11):977-85.
21. Lima de Albuquerque C, Comalada M, Camuesco D, Rodríguez-Cabezas ME, Luiz-Ferreira A, Nieto A, Monteiro de Souza Brito AR, Zarzuelo A, Gálvez J. Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat. *European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism.* 2010;5(3):e111-e6.
22. Scarminio V, Fruet AC, Witacenis A, Rall VLM, Di Stasi LC. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp AAA*) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Nutrition Research.* 2012 Mar;32(3):202-9.
23. Pinheiro EsR, Silva IMDA, Gonzaga LV, Amante ER, Teófilo RF, Ferreira MMC, Amboni RDMC. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology.* 2008;99(13):5561-6.
24. Zeraik ML, Yariwake JH, Wauters J-N, Tits M, Angenot L. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. *Química Nova.* 2012;35:541-5.
25. Queiroz MSR, Janebro DI, Cunha MAL, Medeiros JS, Sabaa-Srur AUO, Diniz MFFM, Santos SC. Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg.*) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Journal.* 2012;11:89.
26. Lewis BJ, Herrlinger KA, Craig TA, Mehring-Franklin CE, Defreitas Z, Hinojosa-Laborde C. Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* 2013 Jul;24(7):1359-66.
27. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents - Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76a Rodent Diet. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
28. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon. *Gastroenterology.* 1989 Mar;96(3):795-803.
29. Leite AV, Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Pastore GM, Maróstica Júnior MR. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba

- Peel (Myrciaria jaboticaba Vell Berg). *J Agr Food Chem.* [doi: 10.1021/jf103181x]. 2011 2011/03/23;59(6):2277-83.
30. Prior RL, Hoang H, Gu LW, Wu XL, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang DJ, Ou BX, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agr Food Chem.* 2003 May 21;51(11):3273-9.
31. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999;299:15-27.
32. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2013;21(2):143-52.
33. Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 1):G622-30.
34. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry.* 1979;95(2):351-8.
35. Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Barseel, Boston, Berlim: Birkhauser Verlag; 1995.
36. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione-Reductase. *Method Enzymol.* 1985;113:484-90.
37. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iinuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M. Role of Active Oxygen, Lipid-Peroxidation, and Antioxidants in the Pathogenesis of Gastric-Mucosal Injury-Induced by Indomethacin in Rats. *Gut.* 1993 Jun;34(6):732-7.
38. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.* 1975 Feb;85(2):337-41.
39. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984 Dec;87(6):1344-50.
40. Chinen T, Komai K, Muto G, Morita R, Inoue N, Yoshida H, Sekiya T, Yoshida R, Nakamura K, Takayanagi R, Yoshimura A. Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance. *Nat Commun.* 2011 Feb;2:190.
41. Asvarujanon P, Ishizuka S, Hara H. Promotive effects of non-digestible disaccharides on rat mineral absorption depend on the type of saccharide. *Nutrition.* 2005 Oct;21(10):1025-35.
42. Zhao GH, Nyman M, Jonsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2006 Aug;20(8):674-82.
43. Silva AFd, Schieferdecker MEM, Rocco CS, Amarante HMBdS. Food intake in patients with inflammatory bowel disease. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo).* 2010;23:154-8.
44. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Korzenik JR, Fuchs CS, Willett WC, Richter JM, Chan AT. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2013 Nov;145(5):970-7.
45. Liu S, Willett WC, Manson JE, Hu FB, Rosner B, Colditz G. Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 2003 Nov;78(5):920-7.



46. Lattimer JM, Haub MD. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1266-89.
47. Wanders AJ, van den Borne JJGC, de Graaf C, Hulshof T, Jonathan MC, Kristensen M, Mars M, Schols HA, Feskens EJM. Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*. 2011;12(9):724-39.
48. Shamir R. Nutritional Aspects in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2009;48:S86-S88. 10.1097/MPG.0b013e3181a15ca0.
49. Eiden KA. Nutritional Considerations in Inflammatory Bowel Disease. *Practical Gastroenterology*. 2003;XXVII(5):33-54.
50. Mijač DD, Janković GLJ, Jorga J, Krstić MN. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: Prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. *Eur J Intern Med*. 2010;21(4):315-9.
51. Celiński K, Dworzański T, Korolczuk A, Słomka M, Radej S, Piasecki R, Czechowska G. Comparison of main models of experimental colitis essential for studies on novel therapies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterologia Polska*. 2010;17(3):195-202.
52. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.
53. Dagli Ü, Balk M, Yücel D, Ülker A, Över H, Saydam G, Çahin B. The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 1997;3(4):260-4.
54. Silva DC, Freitas AL, Pessoa CD, Paula RC, Mesquita JX, Leal LK, Brito GA, Goncalves DO, Viana GS. Pectin from *Passiflora edulis* shows anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypotriglyceridemic properties in diabetic rats. *J Med Food*. 2011 Oct;14(10):1118-26.
55. Zeraik ML, Serteyn D, Deby-Dupont G, Wauters J-N, Tits M, Yariwake JH, Angenot L, Franck T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chem*. 2011;128(2):259-65.
56. Kobayashi S, Murakami K, Sasaki S, Uenishi K, Yamasaki M, Hayabuchi H, Goda T, Oka J, Baba K, Ohki K, Watanabe R, Sugiyamama Y. Dietary total antioxidant capacity from different assays in relation to serum C-reactive protein among young Japanese women. *Nutr J*. 2012;11:91.
57. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 1998 June 1, 1998;44(6):1309-15.
58. Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Annals of Intensive Care*. 2013;3(1):4.
59. Souza MSS, Barbalho SM, Damasceno DC, Rudge MV, de Campos KE, Madi AC, Coelho BR, Oliveira RC, de Melo RC, Donda VC. Effects of *Passiflora edulis* (yellow passion) on serum lipids and oxidative stress status of Wistar rats. *J Med Food*. 2012 Jan;15(1):78-82.
60. Rudnicki M, de Oliveira MR, Veiga Pereira Td, Reginatto FH, Dal-Pizzol F, Fonseca Moreira JC. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chem*. [doi: 10.1016/j.foodchem.2005.10.043]. 2007;100(2):719-24.

61. Abdalla EK, Caty MG, Guice KS, Hinshaw DB, Oldham KT. Arterial levels of oxidized glutathione (GSSG) reflect oxidant stress in vivo. *J Surg Res.* 1990 Apr;48(4):291-6.
62. Weber TE, Trabue SL, Ziemer CJ, Kerr BJ. Evaluation of elevated dietary corn fiber from corn germ meal in growing female pigs. *J Anim Sci.* 2010 Jan;88(1):192-201.
63. Teng Z, Qian L, Zhou Y. Hypolipidemic activity of the polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013;62(0):254-6.
64. Topping DL, Clifton PM. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews.* 2001 July 1, 2001;81(3):1031-64.
65. Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, Vanhoutvin SA, Fischer MA, Kodde A, Troost FJ, Venema K, Brummer RJ. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr.* 2009 Feb;28(1):88-93.
66. Hamer HM, Jonkers DMAE, Vanhoutvin SALW, Troost FJ, Rijkers G, de Bruine A, Bast A, Venema K, Brummer RJM. Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. *Clin Nutr.* 2010 Dec;29(6):738-44.

## *CAPÍTULO 4*

---

(Artigo a ser submetido a Nutrition Research)



**Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis by *Passiflora edulis* peel in rats.**

Short running head: Protection against TNBS-induced colitis by PFF.

Cynthia B. B. Cazarin<sup>1</sup>, Juliana K. da Silva<sup>1</sup>, Nayara S. G. Schumacher<sup>2</sup>, Talita C. Colomeu<sup>2</sup>, Daniella de Figueiredo<sup>2</sup>, Luciana R. de Meirelles<sup>3</sup>, Ricardo de L. Zollner<sup>2</sup>, Mário R. Maróstica Junior<sup>\*1</sup>.

<sup>1</sup>University of Campinas – Department of Food and Nutrition, School of Food Engineering – Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP, Brazil;

<sup>2</sup>University of Campinas – Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Science – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887, Campinas/SP, Brazil;

<sup>3</sup>University of Campinas – Department of Pathology, Faculty of Medical Science – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887, Campinas/SP, Brazil.

\*Corresponding author: Mário Roberto Maróstica Junior. Tel: +55-19-35214078, fax +55-19-35214060. Address: Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP, Brazil. e-mail: [mario@fea.unicamp.br](mailto:mario@fea.unicamp.br)



**Abstract**

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic relapsing disease. Its pathogenesis is related to genetic, environmental, microbiological and immunological factors. *Passiflora edulis* is a fruit produced in Brazil that generates an industrial waste rich in pectin and polyphenols. The aim of the present study was to evaluate the effects passion fruit flour (PFF) intake on the attenuation of colonic mucosal damage and the expression of inflammatory markers in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis in two *in vivo* experiments. Wistar rats were fed a diet containing PFF for 7 days in the treatment protocol and for 84 days in the prevention protocol before colitis induction. Colitis was induced by intracolonic administration of TNBS and, one week later, damage scores and the expression of inflammatory markers were evaluated. Changes in body weight and food intake were observed in the colitis groups. PFF intake did not decrease the damage caused by TNBS in colonic tissue; however, rats fed the fruit peel showed changes in the expression of some inflammatory markers in the colonic mucosa induced by TNBS. Differences in these parameters were observed between the treatment and prevention protocols. These results suggest that PFF intake did not suppress intestinal inflammation but could modulate some inflammatory markers. The results point out that the effect of PFF on colitis should be evaluated in a different experimental model without an acute phase. In addition, PFF could be used as an additional therapeutic strategy for prevent IBD.

**Keywords:** *Passiflora edulis* peel; TNBS-induced colitis in rat; inflammatory bowel disease; trinitrobenzenesulfonic acid; anti-inflammatory effect.





## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic immune-mediated intestinal disorder that encompasses Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). CD is transmural inflammation that can affect the entire gastrointestinal tract while UC is non-transmural inflammation restricted to the colon [1]. There are many factors related to the pathogenesis of these diseases, such as genetic, environmental, microbiological and immunological factors [2-4]. The Western lifestyle, especially regarding food intake and the use of antibiotics, leads to changes in the gut microbiome [5]. This imbalance in the intestinal microbiota has been postulated as a possible factor in the initiation and progression of gut inflammation, especially when the growth of pathogenic bacteria is greater than that of non-pathogenic bacteria [6].

In the last few years, many researchers have investigated the effect of phenolic compounds and flavonoids, naturally present in foods, on inflammation [7-9], as well as the development of microbiota substrates that improve the formation of short-chain fatty acids [10-14] which prevent or prolong remission in ulcerative colitis. *Passiflora edulis* peel is a waste from food industry that is rich in pectin [15] and flavonoids [16]. Some reports show that peel consumption improves insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients [17] and blood pressure in animal models [18]. Furthermore, the polysaccharides in this peel have shown antitumor properties *in vitro*, and flavonoids have demonstrated antioxidant activity [16]. Recent findings have been demonstrate that the consumption of sources of dietary fiber and phenolic compounds suppresses the overexpression of inflammatory mediators [2, 7, 9, 13-14, 19], as well as their generation through the inhibition the activation of nuclear factor *kappa* B (NF $\kappa$ B).

The aim of the present study was to evaluate the effect of *Passiflora edulis* peel flour (PFF) intake in an experimental model of rat colitis induced by 2,4,6-

trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). The effect of PFF was evaluated in treatment and prevention protocols and the impact on colonic mucosal damage and the expression of inflammatory markers was evaluated.

## **2. Materials and Methods**

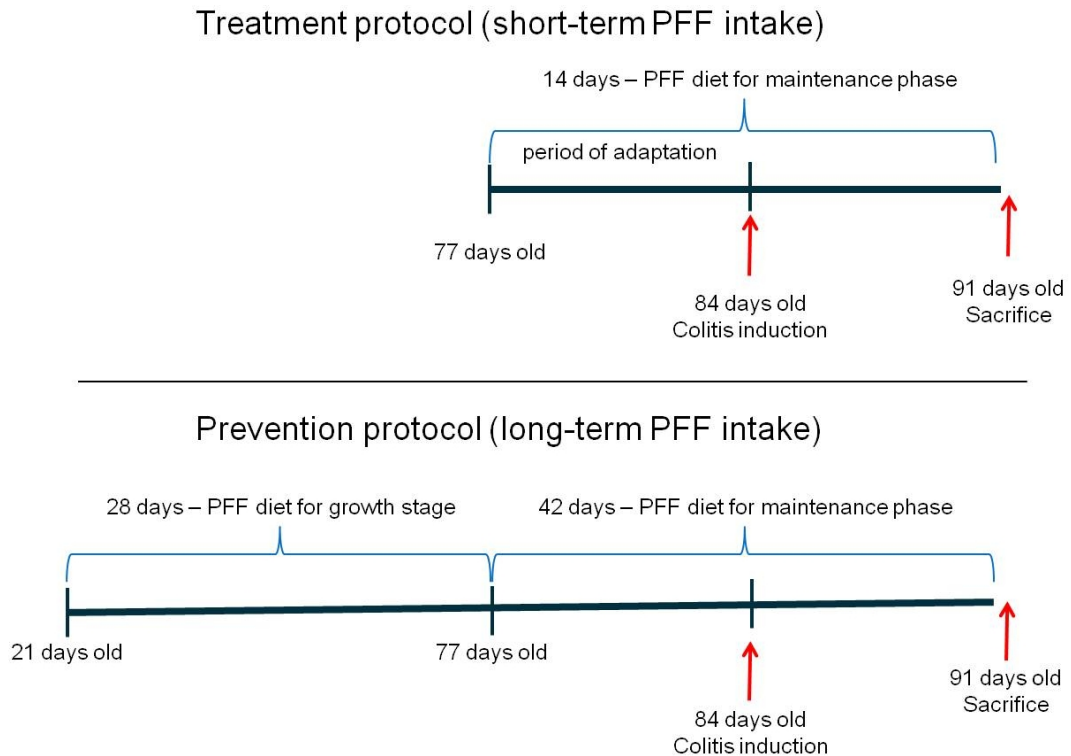
### **2.1. Passion fruit flour (PFF)**

Organic crops of *Passiflora edulis* (passion fruit) from Torre de Pedra/SP, harvested in June 2010, were used to produce the flour. The fruits were cleaned and separated into pulp and peel (flavedo + albedo). Peels were cut into small pieces and dried in an oven with air circulation at 50°C (Marconi, Piracicaba/SP - Brazil) until the moisture content was 10% or less. Dried peel was ground into a fine powder using a hammer mill (20 mesh) and the flour was stored in amber flasks at room temperature (24°C).

### **2.2. Animals and experimental design**

This study was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as promulgated by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The study was approved by the Animal Research and Ethics Committee of the University of Campinas (Brazil) (protocol 2257-1/2010).

Male Wistar rats were housed under standard conditions of temperature (22 °C ± 2), humidity (60-70 %), and dark cycle (7:00 am to 7:00 pm). Forty-eight rats were randomized into two experiments, i.e. the treatment (short-term intake) and prevention (long-term intake) protocols (Figure 1).



**Figure 1.** Experimental design.

In the treatment protocol (short-term PFF intake), 24 rats (77 days old) were divided into the control and PFF groups ( $n=12$ ). They were fed with the control and experimental diet (maintenance phase) for 1 week (84 days old). Diets were prepared in accordance with American Institute of Nutrition [20]; 50% of the cellulose was replaced with dietary fiber from PFF in the experimental diet (Table 1). After 7 days, colitis was induced in six animals in each group. The animals were kept for another 7 days; afterwards, they were anesthetized with ketamine and xylazine and culled by exsanguination via cardiac puncture.

**Table 1.** Formulations of the experimental diets used in the experiments.

	AIN-93G (g.kg <sup>-1</sup> diet)		AIN-93M (g.kg <sup>-1</sup> diet)	
	Control	PPF	Control	PPF
Corn starch	428,99	420,01**	465,69	456,71**
Casein (≥85% protein)	150,00	148,49**	140,00	138,49**
Dextrinized corn starch (90-94%)	142,50	142,50	155,00	155,00
Sucrose	108,00	108,00	100,00	100,00
Soybean oil	70,00	69,88**	40,00	39,88**
Cellulose	50,00	25,00	50,00	25,00
<i>Passiflora</i> peel flour	-	38,33*	-	38,33*
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35,00	32,28**	35,00	32,28**
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cysteine	3,00	3,00	1,80	1,80
Choline bitartrate (41.1% choline)	2,50	2,50	2,50	2,50
Butylhydroquinone	0,01	0,01	0,01	0,01

AIN-93G refers to the growth phase and AIN-93M refers to the maintenance phase<sup>20</sup>. \* amount needed to obtain 25 g of *Passiflora* fiber, \*\* values were corrected according to the content of these nutrients in the PPF.

In the prevention protocol (long-term PPF intake), 24 rats (21 days old) were divided into the control and PPF groups (n=12). They were fed with the control and experimental diets (growth stage) until they were 77 days old. The diet was changed to supply the nutritional needs (maintenance phase) and the animals were fed for 1 week until they were 84 days old, when colitis was induced in six animals per group. After 7

days, they were culled as described above. Access to food and drink was *ad libitum* and monitored three times a week.

Briefly, colitis induction was carried with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). The animals were anaesthetized with halothane and given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus [21]. The same procedure was performed with the control group (animals without colitis induction), i.e. the saline group, via the intracolonic administration 0.25 ml of phosphate-buffered saline instead of TNBS.

Animal body weights, the occurrence of diarrhea, blood in the feces, and water and food intake were recorded daily after colitis induction.

### **2.3. Serum and colon tissue cytokine levels**

Blood samples were obtained by cardiac puncture under anesthesia, collected in tubes treated with a clot accelerator (SiO<sub>2</sub>) and centrifuged at 2600 g for 20 min. Serum was stored at -80°C until the analyses were performed. Tissue homogenate was centrifuged, and the supernatant was stored at -80°C. Cytokine concentrations (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) were measured by ELISA using PeproTech kits (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). The operating procedure provided by the manufacturer was strictly followed. The protein concentration of the homogenate was determined following Bradford's colorimetric method [22].

### **2.4. Colonic samples**

Freshly dissected colon samples were washed with physiological solution (0.9% NaCl) and macroscopically visible damage was evaluated according to previously reported criteria [23]. Samples were conserved at -80°C in a freezing medium (Jung;

Leica Instruments, Nussloch, Germany). Serial cross-sections (7  $\mu\text{m}$ ) were prepared using a cryostat (CM 1850 Cryostat, Leica) and fixed on silanized slides. After staining, the samples were stained with hematoxylin-eosin to assess the severity of colitis (Eclipse 80i microscope, Nikon) by a pathologist, according to the criteria described by Chinen et al. [24].

The expression of IL-8 was performed by immunofluorescence microscopy (Nikon Eclipse 80i, Japan) using histological sections of colonic tissue fixed in acetone, and blocked with 2% goat serum (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) in PBS for 2 h at room temperature. The sections were then incubated with rabbit polyclonal anti-IL-8 (1:100; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) with an overnight incubation at 4°C. Bound antibody against IL-8 was detected with a FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology).

### **2.5. Western blotting analysis**

Frozen colon samples were homogenized in 1 ml of cold buffer (100 mM TRIS, pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 0.1 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg aprotinin. $\text{ml}^{-1}$ ). Homogenates were centrifuged (10,000 $\times$  g, 15 min, 4°C) and the supernatants were collected and stored at -80°C. The protein concentration of the homogenate was determined following Bradford's colorimetric method [22]. The supernatant was resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5 min before separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) using a mini-Protean<sup>®</sup> apparatus (Bio Rad, Richmond, CA). Equal amounts of protein from samples (4 mg. $\text{ml}^{-1}$ ) were separated on gradient acrylamide gel (5-20%) by SDS PAGE. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 20 min at 15 V (constant). The nitrocellulose transfers

were probed with specific antibodies. The antibodies  $\beta$ -actin (sc-81178), IKK $\beta$  (sc-34674), COX-2 (sc-7951), TLR2 (sc-10739), TLR4 (sc-16240), MCP-1 (sc-28879) and IL-10 (sc-1783) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. The iNOS antibody (ab 15323) was obtained from Abcam. The dilution used to incubate  $\beta$ -actin was 1:1000; 1:500 for COX-2, iNOS, TLR2 and TLR4, and 1:400 for IKK $\beta$ , MCP-1 and IL-10. Subsequently, the membranes were incubated with HRP-conjugate antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Immunodetection was performed using the Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The results were visualized by an ImageQuant 400 digital imaging system (GE Healthcare Life Science, Sweden). Band intensities were quantified using UN-SCAN-IT software (Silk Scientific, Inc., Utah, USA) and the intensities of the bands were normalized to  $\beta$ -actin.

## **2.6. Statistical analysis**

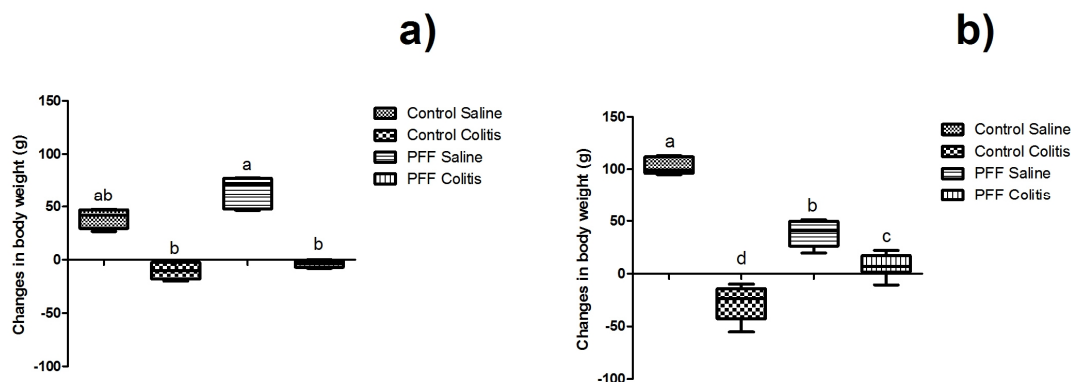
The statistical analyses were carried out using one-way ANOVA followed by a Tukey multiple comparisons test for parametric data and the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for non-parametric data. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM and differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

### 3. Results and Discussion

The consumption of fruits and vegetables is correlated with decrease in the incidence of non-communicable chronic diseases [25]. In the last few years, many researchers have studied the mechanisms involved in the protection provided by food compounds, such as vitamins, minerals, pectin, bioactive compounds, organic acids, flavonoids and polyphenols [17, 26] against diseases. In the last century, the IBD incidence increased, especially due to environmental influences like increased industrial food intake and the use of antibiotics [27]. *Passiflora edulis* peel is a byproduct of the juice industry, a source of dietary fiber and antioxidant compounds [28-30], and is considered an industrial waste. The consumption of dietary fiber can modulate the gut microbiota and improve cecal short chain fatty acid production, which provides fuel to colonocytes and stimulates cell proliferation [31]. The consumption of dietary fiber is associated with a lower risk of IBD [32].

Weight loss is one the symptoms observed in IBD patients, and during the experimental period after colitis induction, weight loss was observed in the animals in both protocols (Figure 2). However, significantly better weight maintenance was observed in the PFF colitis group compared to the control colitis group in the prevention protocol (long-term PFF intake). Weight maintenance is very important in IBD, as malnutrition is usually observed in these patients [33].





**Figure 2.** Changes in body weight after TNBS-induced colitis and the effect of PFF intake on body weight in the a) treatment protocol and b) prevention protocol. Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups.

TNBS administration promotes colonic inflammation with the presence of necrosis in the mucosa, bowel wall thickening, an increased colonic weight/length ratio, adherence of the colon to adjacent organs and hyperemia; these observations have been previously described in the literature [34]. Nonetheless, slight alleviation in terms of diarrhea and blood in the feces was observed in PFF colitis animals compared to control colitis animals.

Inflammation is a natural physiological process in the body for protection against damage or infection; however, when inflammation becomes persistent, even in the absence of pathogenic microbes, the intestine develops IBD [35]. The enhanced production of mucosal proinflammatory cytokines like IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  may be related to the amplification of the inflammatory cascade and the perpetuation of inflammation in IBD [36-38]. Nowadays, biological therapies for IBD are especially focused on the use of specific cytokine inhibitors, like anti-TNF [39]. The consumption

of PFF proved to exert a similar effect, as the colitis animals that received the fruit peel showed decreases in TNF- $\alpha$  levels in both protocols (Table 2). In addition, in the prevention protocol, systemic decreases in the TNF- $\alpha$  level and decreases in IL-1 $\beta$  and IL-6 were observed in the colonic tissue of the PFF colitis group.

**Table 2.** Serum and colonic levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the treatment and prevention protocols.

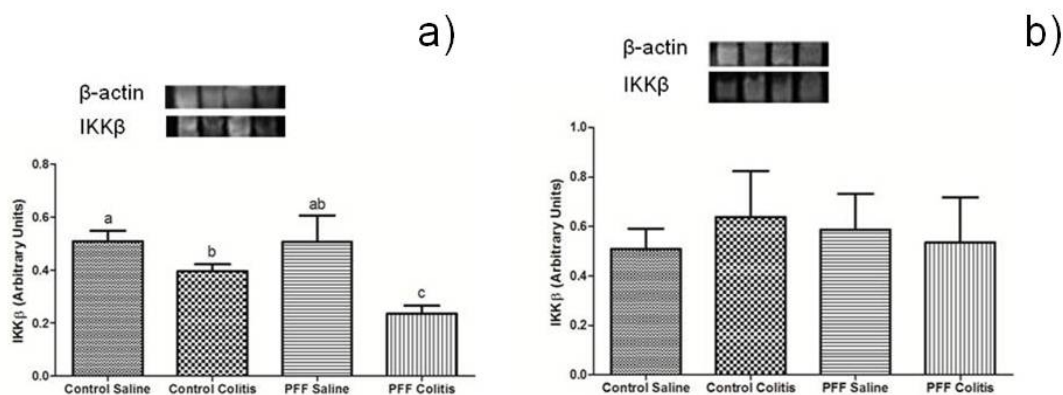
	Treatment protocol (short-term intake)			
	Control Saline	Control Colitis	PFF Saline	PFF Colitis
<b>Serum*</b>				
IL-1 $\beta$	0,6 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
IL-6	0,4 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,7 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	2,4 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$	0,4 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
<b>Homogenates**</b>				
IL-1 $\beta$	0,5 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	3,5 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>
IL-6	2,3 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$	0,22 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
	Prevention protocol (long-term intake)			
	Control Saline	Control Colitis	PFF Saline	PFF Colitis
<b>Serum*</b>				
IL-1 $\beta$	1,3 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
IL-6	9,8 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,25 <sup>bc</sup>	7,1 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,85 <sup>c</sup>
TNF- $\alpha$	0,4 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,2 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>
<b>Homogenates**</b>				
IL-1 $\beta$	0,3 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	2,7 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	1,1 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>
IL-6	0,4 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	1,3 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,25 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 <sup>bc</sup>

\*ng.ml<sup>-1</sup>; \*\*ng.mg protein<sup>-1</sup>. Values are represented by mean  $\pm$  SEM (n = 6 rats per group). Different superscript letters in the same line denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups.

The transcription factor NF- $\kappa$ B is a key regulator of the inflammatory response and can be activated by lipopolysaccharide present in bacterial cell walls, pro-inflammatory cytokines, viruses and DNA damaging agents. This activation occurs through IKK $\beta$  (inhibitor of *kappa* B kinase *beta*) in the classical pathway [40]. The activation of this transcription factor increases the production of cytokines and adhesion molecules that modulate the influx and activation of leukocytes to the site of infection or tissue damage. IKK $\beta$  also affects the transcription of proteins that protect cells against apoptosis and necrosis, like cellular inhibitors of apoptosis (c-IAPs), caspase-8-c-FLIP and TNFR-associated factor 1 [41].

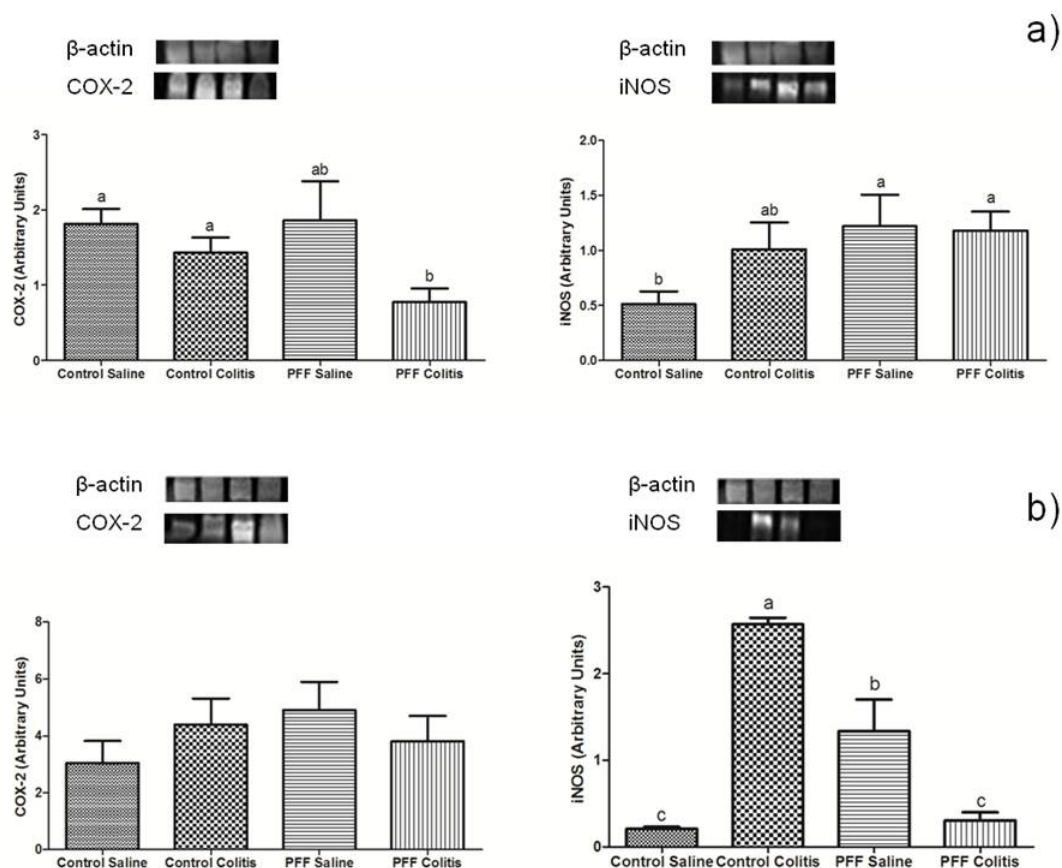
The importance of IKK $\beta$  in the development of IBD can be seen in *villin-Cre/Ikk $\beta$ <sup>F/ $\Delta$</sup>*  mice which are deficient in IKK $\beta$  in colonic epithelial cells; these mice develop severe and spontaneous acute colitis [42]. The administration of dextran sulfate sodium (DSS) in the drinking water of mice lacking IKK $\beta$  in intestinal epithelial cells leads to severe mucosal inflammation and greater areas of ulceration in comparison with control animals, demonstrating the protective function of IKK $\beta$  in the intestinal mucosa under conditions of acute, ulcerating colitis [35].

The consumption of PFF in the treatment protocol decreased the expression of IKK $\beta$  in the PFF colitis group compared to the other groups (Figure 3). However, in the prevention protocol, the long-term intake of PFF was not found to reduce IKK $\beta$  expression. These findings suggest that a short-term intake of PFF could diminish the classical activation of the NF $\kappa$ B pathway compared long-term intake.



**Figure 3.** Effects of PFF on IKK $\beta$  expression in colon tissue from rats submitted to TNBS-induced colitis in the a) treatment protocol and b) prevention protocol. Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible enzyme that converts arachidonic acid to inflammatory mediators after stimulation by IL-1, tumor necrosis factor and other mediators. The overexpression of COX-2 has been found to correlate with neoplastic progression and could play a role in the pathophysiological processes of IBD [43-44]. A significant decrease in COX-2 expression was observed in the PFF colitis group compared to the control colitis group in the treatment protocol (Figure 4). The long-term intake of PFF in the prevention protocol did not decrease the expression of COX-2 compared to the control group. In this way, short-intake of PFF appears to be beneficial as a nutritional intervention and could contribute to inhibiting the neoplastic progression observed in this disease [44-46].

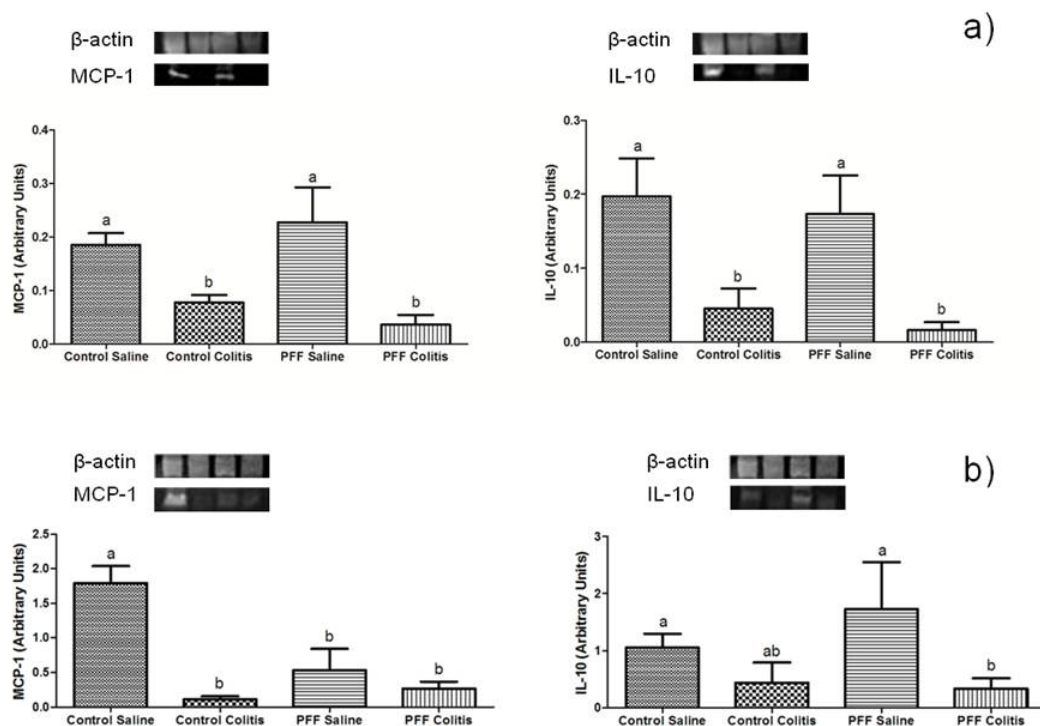


**Figure 4.** Effects of PFF on COX-2 and iNOS expression in colon tissue from rats submitted to TNBS-induced colitis in the a) treatment protocol and b) prevention protocol. Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups.

In addition, increased nitric oxide (NO) expression is observed during colonic inflammation, generated through the activity of iNOS [47]. NO is a potent oxidant that reacts with proteins, lipids and DNA and can induce cell death. Increased iNOS expression and activity in the rat colon as well as a significant increase in apoptosis were observed in the colonic tissue of TNBS-induced colitis rats, suggesting that NO

contributes to colon epithelial cell apoptosis during the acute phase of inflammation [48]. In this way, the inhibition of NO production in IBD could decrease tissue injury. The animals that consumed PFF in the prevention protocol showed decreased iNOS expression in colonic tissue (Figure 4). This result is in accordance with previous studies [49] that correlated the consumption of dietary fiber and anti-inflammatory effects.

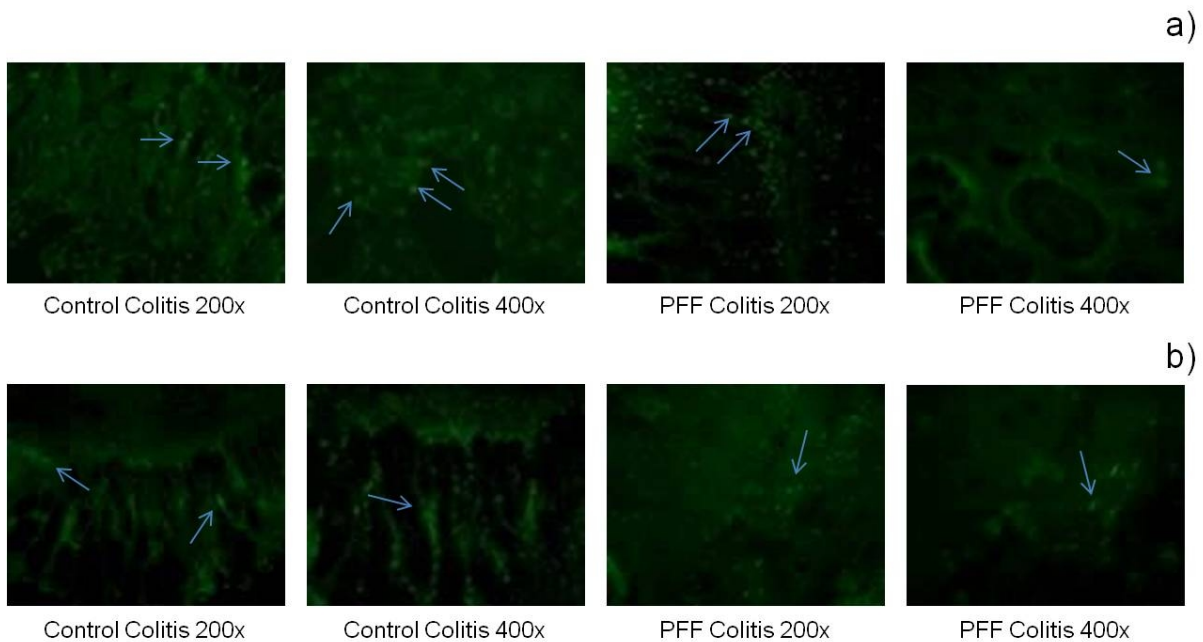
Toll-like receptors (TLR) are inducible or constitutively expressed trans-membrane pattern recognition receptors that play a role in the induction of pro- and anti-inflammatory genes and control adaptive immune responses in the entire gastrointestinal tract. TLR2 and TLR4 are expressed in the intestine at the apical pole of differentiated enterocytes; they recognize lipopeptides and lipopolysaccharide, respectively. Under normal conditions, their expression in intestinal epithelial cells and lamina propria mononuclear cells is low; however, this expression increases during inflammation [50]. The consumption of PFF in both protocols did not change the expression on TLR2 or TLR4 in the colitis groups, suggesting that the effects of PFF intake in colitis do not involve TLR signaling.



**Figure 5.** Effects of PFF on MCP-1 and IL-10 expression in colon tissues from rats submitted to TNBS-induced colitis in the a) treatment protocol and b) prevention protocol. Different superscript letters in the columns denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups.

Takada et al. [51] observed that monocyte chemoattractant protein (MCP-1) knockout mice produce less interleukin-10 than wild-type mice; this may be due to impaired recruitment of macrophage  $\phi 2$  to the lamina propria. This chemokine plays an important role in recruitment of monocytes and macrophages from the bloodstream to inflamed tissue, and its action regarding the reduction of inflammation may be related to the production of anti-inflammatory cytokines, like IL-10, by macrophages [51]. In both protocols, the consumption of PFF did not promote changes in MCP-1 and IL-10

expression in the colonic mucosa of colitic rats compared to the control animals. The PFF saline group in the prevention protocol showed decreases in MCP-1 expression compared to the control saline group; however, a reduction was not observed in IL-10 expression. Interestingly, the PFF saline group showed higher expression of IL-10, but this was not a significant difference compared to the control saline group (Figure 5).



**Figure 6.** Immunofluorescence analysis for the detection of IL-8 in histological sections of colon tissue from rats submitted to TNBS-induced colitis fed the control or PFF diet in the a) treatment protocol and b) prevention protocol. The images were captured using a Nikon Eclipse 80i microscope.

On the other hand, the expression of interleukin-8 (IL-8), a neutrophil chemoattractant and activator, was increased in the colonic mucosa of colitic animals in both groups compared to control animals (saline) (Figure 6). Labeled IL-8 was mainly detected in the lamina propria of the colonic tissue in the colitis groups. Increases in the



expression of this interleukin have been reported in inflamed tissue, especially during active disease [52], which can be correlated with the grade of inflammation in UC patients [53].

Our results suggest that TNBS-induced colitis is characterized by neutrophil accumulation. The intake of PFF, a rich source of dietary fiber and polyphenols, did not suppress intestinal inflammation; however, it modulated some inflammatory markers like proinflammatory cytokines, mainly when PFF consumption was long-term. PFF intake cannot cure colitis, but could be an additional therapeutic strategy to prevent the exacerbation of inflammatory bowel disease.

## References

1. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
2. Galvez, J., M.E. Rodriguez-Cabezas, and A. Zarzuelo, *Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(6): p. 601-8.
3. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
4. Rogler, G. and T. Andus, *Cytokines in inflammatory bowel disease*. World Journal of Surgery, 1998. **22**(4): p. 382-9.
5. Paul, G., V. Khare, and C. Gasche, *Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10*. European Journal of Clinical Investigation, 2012. **42**(1): p. 95-109.
6. Mylonaki, M., N.B. Rayment, D.S. Rampton, B.N. Hudspith, and J. Brostoff, *Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 481-7.
7. Algieri, F., P. Zorrilla, A. Rodriguez-Nogales, N. Garrido-Mesa, Ó. Bañuelos, M.R. González-Tejero, M. Casares-Porcel, J. Molero-Mesa, A. Zarzuelo, M.P. Utrilla, M.E. Rodriguez-Cabezas, and J. Galvez, *Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis*. Journal of Ethnopharmacology, 2013. **146**(3): p. 750-759.
8. Hur, S.J., S.H. Kang, H.S. Jung, S.C. Kim, H.S. Jeon, I.H. Kim, and J.D. Lee, *Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease*. Nutr Res, 2012. **32**(11): p. 801-16.
9. de Faria, F.M., A. Luiz-Ferreira, E.A. Socca, A.C. de Almeida, R.J. Dunder, L.P. Manzo, M.A. da Silva, W. Vilegas, A.L. Rozza, C.H. Pellizzon, L.C. Dos Santos, and A.R. Souza Brito, *Effects of *Rhizophora mangle* on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 753971.
10. Lima de Albuquerque, C., M. Comalada, D. Camuesco, M.E. Rodriguez-Cabezas, A. Luiz-Ferreira, A. Nieto, A.R. Monteiro de Souza Brito, A. Zarzuelo, and J. Gálvez, *Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat*. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2010. **5**(3): p. e111-e116.
11. Camuesco, D., L. Peran, M. Comalada, A. Nieto, L.C. Di Stasi, M.E. Rodriguez-Cabezas, A. Concha, A. Zarzuelo, and J. Galvez, *Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(3): p. 265-71.
12. Hoentjen, F., G.W. Welling, H.J. Harmsen, X. Zhang, J. Snart, G.W. Tannock, K. Lien, T.A. Churchill, M. Lupicki, and L.A. Dieleman, *Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(11): p. 977-85.
13. Komiyama, Y., A. Andoh, D. Fujiwara, H. Ohmae, Y. Araki, Y. Fujiyama, K. Mitsuyama, and O. Kanauchi, *New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal*

- homeostasis and the mucosal immune system*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2011. **46**(1): p. 40-52.
14. Scarminio, V., A.C. Fruet, A. Witacenis, V.L.M. Rall, and L.C. Di Stasi, *Dietary intervention with green dwarf banana flour (Musa sp AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis*. Nutrition Research, 2012. **32**(3): p. 202-209.
  15. Pinheiro, E.s.R., I.M.D.A. Silva, L.V. Gonzaga, E.R. Amante, R.F. Teófilo, M.M.C. Ferreira, and R.D.M.C. Amboni, *Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (Passiflora edulis flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology*. Bioresource Technology, 2008. **99**(13): p. 5561-5566.
  16. Zeraik, M.L., J.H. Yariwake, J.-N. Wauters, M. Tits, and L. Angenot, *Analysis of passion fruit rinds (Passiflora edulis): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity*. Química Nova, 2012. **35**: p. 541-545.
  17. Queiroz, M.S.R., D.I. Janebro, M.A.L. Cunha, J.S. Medeiros, A.U.O. Sabaa-Srur, M.F.F.M. Diniz, and S.C. Santos, *Effect of the yellow passion fruit peel flour (Passiflora edulis f. flavicarpa deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients*. Nutrition Journal, 2012. **11**: p. 89.
  18. Lewis, B.J., K.A. Herrlinger, T.A. Craig, C.E. Mehring-Franklin, Z. Defreitas, and C. Hinojosa-Laborde, *Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2013.
  19. Lima de Albuquerque, C., M. Comalada, D. Camuesco, M.E. Rodríguez-Cabezas, A. Luiz-Ferreira, A. Nieto, A.R. Monteiro de Souza Brito, A. Zarzuelo, and J. Gálvez, *Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat*. European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2010. **5**(3): p. e111-e116.
  20. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, *Ain-93 Purified Diets for Laboratory Rodents - Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76a Rodent Diet*. Journal of Nutrition, 1993. **123**(11): p. 1939-1951.
  21. Morris, G.P., P.L. Beck, M.S. Herridge, W.T. Depew, M.R. Szewczuk, and J.L. Wallace, *Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
  22. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
  23. Bell, C.J., D.G. Gall, and J.L. Wallace, *Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. G622-30.
  24. Chinen, T., K. Komai, G. Muto, R. Morita, N. Inoue, H. Yoshida, T. Sekiya, R. Yoshida, K. Nakamura, R. Takayanagi, and A. Yoshimura, *Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance*. Nature Communications, 2011. **2**: p. 190.
  25. Lock, K., J. Pomerleau, L. Causer, D.R. Altmann, and M. McKee, *The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet*. Bull World Health Organ, 2005. **83**(2): p. 100-8.

26. Salman, H., M. Bergman, M. Djaldetti, J. Orlin, and H. Bessler, *Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(9): p. 579-82.
27. Loftus, E.V., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-1517.
28. López-Vargas, J.H., J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez, and M. Viuda-Martos, *Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products*. Food Research International, 2013. **51**(2): p. 756-763.
29. Lewis, B.J., K.A. Herrlinger, T.A. Craig, C.E. Mehring-Franklin, Z. DeFreitas, and C. Hinojosa-Laborde, *Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013. **24**(7): p. 1359-1366.
30. Yapo, B.M. and K.L. Koffi, *Dietary fiber components in yellow passion fruit rind--a potential fiber source*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(14): p. 5880-3.
31. Brownawell, A.M., W. Caers, G.R. Gibson, C.W. Kendall, K.D. Lewis, Y. Ringel, and J.L. Slavin, *Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals*. J Nutr, 2012. **142**(5): p. 962-74.
32. Ananthakrishnan, A.N., H. Khalili, G.G. Konijeti, L.M. Higuchi, P. de Silva, J.R. Korzenik, C.S. Fuchs, W.C. Willett, J.M. Richter, and A.T. Chan, *A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 970-7.
33. Mijac, D.D., G.L. Jankovic, J. Jorga, and M.N. Krstic, *Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment*. European Journal of Internal Medicine, 2010. **21**(4): p. 315-9.
34. Cazarin, C.B.B., J.K. da Silva, T.C. Colomeu, A.G. Batista, C.A. Vilella, A.L. Ferreira, S. Bogusz Júnior, K. Fukuda, L.R. Meirelles, R.L. Zollner, and M.R. Maróstica Junior, *Passiflora edulis peel intake and ulcerative colitis: Approaches for prevention and treatment*. Experimental Biology and Medicine, 2014.
35. Eckmann, L., T. Nebelsiek, A.A. Fingerle, S.M. Dann, J. Mages, R. Lang, S. Robine, M.F. Kagnoff, R.M. Schmid, M. Karin, M.C. Arkan, and F.R. Greten, *Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15058-63.
36. Ishiguro, Y., *Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis*. Journal of Gastroenterology, 1999. **34**(1): p. 66-74.
37. Gotteland, M., M. Lopez, C. Munoz, R. Saez, H. Altshiller, P. Llorens, and O. Brunser, *Local and Systemic Liberation of Proinflammatory Cytokines in Ulcerative Colitis*. Digestive Diseases and Sciences, 1999. **44**(4): p. 830-835.
38. Indaram, A.V., S. Nandi, S. Weissman, S. Lam, B. Bailey, M. Blumstein, R. Greenberg, and S. Bank, *Elevated basal intestinal mucosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2000. **6**(1): p. 49-52.
39. Bosani, M., S. Ardizzone, and G.B. Porro, *Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases*. Biologics, 2009. **3**: p. 77-97.

40. Atreya, I., R. Atreya, and M.F. Neurath, *NF-kappaB in inflammatory bowel disease*. *Journal of Internal Medicine*, 2008. **263**(6): p. 591-6.
41. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 221-7.
42. Chae, S., L. Eckmann, Y. Miyamoto, C. Pothoulakis, M. Karin, and M.F. Kagnoff, *Epithelial Cell IκB-Kinase β Has an Important Protective Role in Clostridium difficile Toxin A-Induced Mucosal Injury*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(2): p. 1214-1220.
43. Agoff, S.N., T.A. Brentnall, D.A. Crispin, S.L. Taylor, S. Raaka, R.C. Haggitt, M.W. Reed, I.A. Afonina, P.S. Rabinovitch, A.C. Stevens, Z. Feng, and M.P. Bronner, *The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(3): p. 737-45.
44. Paiotti, A.P.R., R. Artigiani Neto, N.M. Forones, C.T.F. Oshima, S.J. Miszputen, and M. Franco, *Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2007. **40**: p. 911-918.
45. Fratila, O.C. and T.I. Ilias, *COX-2 and Ki-67 immunohistochemical markers in the assessment of long-standing ulcerative colitis associated dysplasia*. *Rom J Morphol Embryol*, 2013. **54**(1): p. 143-9.
46. Sklyarov, A.Y., N.B. Panasyuk, and I.S. Fomenko, *Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis*. *J Physiol Pharmacol*, 2011. **62**(1): p. 65-73.
47. Rachmilewitz, D., F. Karmeli, E. Okon, and M. Bursztyn, *Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity*. *Gut*, 1995. **37**(2): p. 247-55.
48. Yue, G., P.S. Lai, K. Yin, F.F. Sun, R.G. Nagele, X. Liu, K.K. Linask, C. Wang, K.T. Lin, and P.Y. Wong, *Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxynitrite production*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **297**(3): p. 915-25.
49. Rodriguez-Cabezas, M.E., J. Galvez, D. Camuesco, M.D. Lorente, A. Concha, O. Martinez-Augustin, L. Redondo, and A. Zarzuelo, *Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (Plantago ovata seeds) in HLA-B27 transgenic rats*. *Clin Nutr*, 2003. **22**(5): p. 463-71.
50. Cario, E., *Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(9): p. 1583-97.
51. Takada, Y., T. Hisamatsu, N. Kamada, M.T. Kitazume, H. Honda, Y. Oshima, R. Saito, T. Takayama, T. Kobayashi, H. Chinen, Y. Mikami, T. Kanai, S. Okamoto, and T. Hibi, *Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset*. *Journal of Immunology*, 2010. **184**(5): p. 2671-6.
52. Tsukada, Y., T. Nakamura, M. Iimura, B.-e. Iizuka, and N. Hayashi, *Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(11): p. 2820-2828.
53. Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, K. Watanabe, H. Tateishi, T. Nishiyama, T. Saiki, H. Ikeda, O. Tsuruta, and K. Tanikawa, *IL-8 as an*

*important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease.* Clin Exp Immunol, 1994. **96**(3): p. 432-6.

## *CONCLUSÃO GERAL*

---





Com base nos resultados apresentados nos dois últimos capítulos desta tese, pode-se observar que o consumo da casca do maracujá apresenta efeitos biológicos positivos na modulação da inflamação intestinal, modulando a microbiota intestinal de forma a aumentar a contagem de bactérias benéficas (lactobacilos e bifidobactérias), aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta, melhorando o status antioxidante e modulando a expressão de marcadores inflamatórios.

A utilização de subprodutos da indústria de alimentos reduz o impacto ambiental dos resíduos gerados no processamento dos alimentos, além de oferecer uma matéria prima fonte de fibras e compostos bioativos. Além disso, por se tratar de um alimento a farinha da casca do maracujá poderia ser introduzida na dieta habitual dos pacientes, aumentando desta forma o aporte de fibras e compostos antioxidantes, auxiliando na prevenção e/ou tratamento da doença inflamatória intestinal.

Estudos realizados com humanos utilizando a farinha de maracujá relatam que o sabor residual da casca pode ser um fator decisivo na adesão ao seu consumo, desta forma a busca por novos produtos ou formulações que incorporem a casca seria uma opção para aumentar seu consumo, não somente entre os pacientes com a doença inflamatória intestinal, mais também entre a população sadia.



*ANEXO*

---





CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

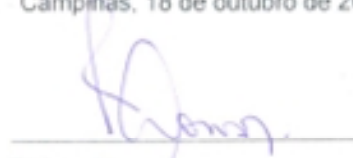
Certificamos que o Protocolo nº 2257-1, sobre "Avaliação do consumo da casca de *Passiflora edulis* e seu impacto na inflamação intestinal de ratos com colite ulcerativa", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior / Cinthia Baú Betim Cazarin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 18 de outubro de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2257-1, entitled "Assessment of consumption of the peel of *Passiflora edulis* and its impact on intestinal inflammation in rats with ulcerative colitis", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 18, 2010.

Campinas, 18 de outubro de 2010.

  
Profª. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13063-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [cometi@unicamp.br](mailto:cometi@unicamp.br)  
<http://www.fo.unicamp.br/ceua/>