

**Viviane Scarminio Simoncini**

**“Avaliação da atividade preventiva da dieta enriquecida com banana verde (banana ‘Nanica’ *Musa* sp AAA) e de seus efeitos sinérgicos com a prednisolona no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos”**

**Botucatu**

**2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**CAMPUS DE BOTUCATU**

**"Avaliação da atividade preventiva da dieta enriquecida com banana verde  
(banana 'Nanica' *Musa* sp AAA) e de seus efeitos sinérgicos com a  
prednisolona no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido  
trinitrobenzenosulfônico em ratos"**

**Viviane Scarminio Simoncini**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi**

**Dissertação apresentada ao  
programa de Pós- graduação em  
Ciências biológicas- área de  
concentração Farmacologia,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de mestre**

**Botucatu**

**2010**

**Nome:** Viviane Scarminio Simoncini

**Data de nascimento:** 18/03/1982

**Formação:**

Graduação em licenciatura plena em Ciências Biológicas- UNESP-Botucatu (2002-2006).

Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas- UNESP-Botucatu (2007).

### **Atividades realizadas durante o mestrado (2008-2010)**

- Participação do II Encontro Regional de Recursos Hídricos, realizado em Botucatu-SP, nos dias 17, 18 e 19 de março de 2008.
- Participação do VII Workshop da Pós-Graduação, realizado na cidade de Botucatu-SP, no período de 24 a 26 de abril de 2008.
- Participação do mini-curso: "Desenvolvimento, Planejamento e Gestão Ambiental: Contradições, Desafios e Métodos. No VII Workshop da Pós-Graduação, realizado na cidade de Botucatu-SP, no período de 24 a 26 de abril de 2008. Carga horária de 6 horas.
- Participação do VIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, realizado nos dias 06 e 07 de julho de 2008, no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu.
- Participação do mini-curso: "Uso do composto de resíduos sólidos urbanos na adubação de plantas medicinais de Botucatu". Durante o VIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, realizado nos dias 06 e 07 de julho de 2008, no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu. Carga horária de 6 horas.

- Participação do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, realizado no centro de convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008. Carga horária de 24 horas.
- Apresentação de pôster com o título: *In vitro* antiparasitic activity against *T. cruzi* by *Tabebuia* sp extracts. No XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, realizado no centro de convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008.
- Participação do mini-curso: "Produtos naturais e doenças do trato gastrointestinal", no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, realizado no centro de convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008. Carga horária de 3 horas.
- Participação no curso: "Isso 9001: 2008- Interpretação de Requisitos e Formação de Auditores Internos". Realizado no período de 10 a 12 de junho de 2010. Carga horária de 24 horas.
- Cursos de idiomas: Alemão (intermediário- certificado pela Wizard Brasil 2009) e Inglês (Avançado- certificado pelo ICBEU 2003 e Wizard Brasil 2009).

"Educação não transforma o mundo. Educação muda pessoas.  
Pessoas transformam o mundo".

"O conhecimento exige uma presença curiosa do sujeito em face  
do mundo. Requer uma ação transformadora sobre a realidade.  
Demanda uma busca constante. Implica em invenção e em  
reívenção".

(Paulo Freire)

Ao Nicolas, marido e melhor amigo, por me apoiar e aconselhar sempre! Por estar ao meu lado, sem nunca me deixar desanimar.

Você me faz feliz todos os dias.

À minha mãe, grande amiga que sempre me apóia em todas as decisões que tomo.

Sem seus conselhos e dedicação não teria chegado até aqui...

A Deus por estar ao meu lado, em todos os momentos de minha vida. E iluminar meus caminhos...

Ao meu orientador Prof. Luiz Cláudio Di Stasi, por acreditar em mim, ter me dado essa oportunidade, por ter me ensinado muito sobre o que é pesquisa.



À minha irmã, amiga querida, pelos momentos de alegria e brincadeiras que sempre tivemos e sempre teremos.

Ao Pedro, Deyvid e Andréa por estarem presentes em grandes momentos de minha vida.

Ao pessoal do laboratório, especialmente às amigas: Alíne, Ana Elísa, Andréa, Carol, Patrícia e Tarina por serem grandes amigas que levarei para minha vida.

A toda minha família por compreender os momentos de ausência e por me apoiar a continuar estudando.

As minhas grandes amigas: Carol, Fernandinha, Shelly, Beatriz, Juliana, Paty e Keila por serem simplesmente especiais e únicas. Obrigada.

A todos os meus amigos, que são a base para uma vida feliz. Obrigada por todos os momentos especiais que passamos juntos e por muitos que virão.

À toda família CUPCAKE por todo apoio e amizade desde o início.

À Janete, por ter animado e iluminado com sua alegria os nossos dias no laboratório.

A amizade é um amor que nunca morre.

(Mário Quintana)

## Agradecimentos

---

Ao pessoal do laboratório: Alíne, Ana Elísa, Andréa, Carol, Leonardo, Patrícia, Tarina, Adriano, por me ajudarem e me ensinarem durante todo o mestrado.

Ao laboratório de fisiologia por toda ajuda e amizade.

À Professora Cláudia Helena Pelizzon e ao Ricardo, técnico do departamento de morfologia, pelos ensinamentos para a montagem das lâminas histológicas.

À professora Vera Lúcia Mores Rall, do departamento de microbiologia, por possibilitar as análises microbiológicas, pelos ensinamentos e atenção.

Agradeço de coração pela ajuda, atenção e carinho:

Técnicos do departamento: Luiz e Paulão.

Crístina, secretária da Farmacologia.

Pessoal da Pós-graduação: Luciene, Herivaldo e Sérgio.

Floriano e Víctor técnicos do laboratório da experimental.

A todos os professores do departamento de Farmacologia, por todo conhecimento transmitido.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq PIBIC) e a Capes pelo auxílio financeiro.

A todos, muito obrigada!

A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte.  
(Mahatma Gandhi)

**“O que sabemos é uma gota o que não  
sabemos é um oceano”  
Isaac Newton**

# Sumário

---

<b>1. Resumo</b>	-----	1
<b>2. Abstract</b>	-----	2
<b>3. Introdução</b>	-----	3
<b>4. Objetivo</b>	-----	13
<b>5. Material e Métodos</b>	-----	14
<b>5.1.</b> Elaboração da dieta enriquecida com banana verde- Banana 'Nanica' <i>Musa sp AAA</i> -----		14
<b>5.2.</b> Delineamento experimental-----		15
<b>5.2.1.</b> Efeitos preventivos da dieta enriquecida com a banana 'Nanica' verde ( <i>Musa sp AAA</i> ) e de seu efeito em associação com a droga de referência (prednisolona) na fase aguda do processo inflamatório intestinal----		15
<b>5.3.</b> Animais-----		18
<b>5.3.1.</b> Modelo experimental de inflamação intestinal-----		19
<b>5.3.2.</b> Avaliação macroscópica do processo inflamatório-----		20
<b>5.3.3.</b> Avaliação microscópica de amostras de cólon-----		21
<b>5.3.4.</b> Determinações bioquímicas-----		21
<b>5.3.5.</b> Peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato-----		27
<b>5.3.6.</b> Análise Microbiológica-----		29
<b>5.3.7.</b> Análise estatística-----		30
<b>6. Resultados</b>	-----	31
<b>6.1-</b> Avaliação macroscópica da lesão-----		31
<b>6.2-</b> Avaliação microscópica da lesão-----		34
<b>6.3-</b> Parâmetros bioquímicos-----		36
<b>6.4-</b> Avaliação microbiológica-----		38
<b>6.8-</b> Atividade antioxidante-----		39
<b>7. Discussão</b>	-----	41
<b>8. Conclusão</b>	-----	47
<b>9. Referências</b>	-----	48

---

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BCA	Ácido bichoninico
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DTNB	ácido ditiobisnitrobenzóico
FA	Fosfatase alcalina
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HOCl <sup>-</sup>	Ácido hipoclorídrico
HTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônio
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
IFN-γ	Interferon gama
IL- 1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase indutível
MDA	Malonildialdeído
MPO	Mieloperoxidase
MRS	Meio agar rogosa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico

RCU	Retocolite ulcerativa
TCA	Ácido tricloroacético
Th-1	Células auxiliadoras-1
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral

- Tabela 1** Critério de determinação de escore de lesão colônica.
- Tabela 2** Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos da dieta enriquecida com banana verde nas concentrações de 10% e 20%, da prednisolona (5mg/Kg), e das combinações (Dieta 10% + prednisolona 5mg/Kg), (Dieta 20% + prednisolona 5mg/Kg) na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.
- Tabela 3** Avaliação dos parâmetros do efeito da dieta enriquecida com banana verde nos animais não-colíticos (Branco, Dieta 10% e Dieta 20%) e nos animais colíticos (Controle TNBS, Tratados com Dieta 10%, Tratados com Dieta 20%, Tratados com Dieta 10% + prednisolona 5 mg/Kg e Tratados com Dieta 20% + prednisolona 5 mg/Kg, prednisolona 5 mg/Kg), no conteúdo de glutathiona (GSH), atividade da mieloperoxidase (MPO) e atividade da Fosfatase alcalina (FA) na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.

- Figura 1** Banana 'Nanica' Musa sp AAA (foto obtida do site: <http://colunas.cbn.globoradio.globo.com/files/683/2009/03/banana.bmp>).
- Figura 2** Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutatona total nas amostras de cólon.
- Figura 3** Consumo médio diário de ração dos animais em cada grupo. No décimo quarto dia os animais foram mantidos em jejum alimentar por um período de 24 horas, para posterior indução da colite por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) no décimo quinto dia.
- Figura 4** Relação da massa corporal dos animais durante os 21 dias de experimento. Há uma queda na massa no décimo quinto dia (15º), devido ao período de 24 horas anteriores que permaneceram em jejum alimentar.
- Figura 5** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos na fase aguda da doença, após indução de colite por TNBS. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A- Branco; B- Dieta 10%; C- Dieta 20%; D- Controle TNBS, E- Prednisolona (droga de referência), F- Tratados com Dieta 10%, G- Tratados com Dieta 20%, H- Tratados com Dieta 10% + prednisolona, I- Tratados com Dieta 20% + prednisolona. (material obtido em objetiva de 10x). M: Mucosa, S: Submucosa.
- Figura 6** Análise microbiológica, testando a dieta enriquecida com banana verde na concentração de 10% em bactérias ácido lácticas no meio Agar Rogosa.
- Figura 7** Avaliação da atividade antioxidante do extrato de banana verde em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de peroxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e Teitelbaum, 1972, com modificações).
- Figura 8** Avaliação da atividade da quercetina em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de peroxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e Teitelbaum, 1972, com modificações).



A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba uma série de doenças que afetam o trato intestinal, especialmente o cólon, sendo as principais a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn, ambas com alta taxa de morbidade e mortalidade, além de representarem um dos mais importantes fatores de risco para o câncer colorretal, que no Brasil é o quarto tipo de tumor com maior incidência de mortes. Inúmeros medicamentos são usados no controle e no tratamento destas doenças (aminosalicilatos, glicocorticóides, imunomoduladores e antibióticos), no entanto, todos apresentam sérios efeitos colaterais e são de custo extremamente elevado. Além da busca por novas drogas para o tratamento destas doenças ainda sem cura, uma importante estratégia preventiva e curativa se baseia no uso de prebióticos na dieta, os quais poderiam tanto melhorar as condições de vida do paciente como permitir por efeito sinérgico a redução das doses dos fármacos comumente utilizados nestas doenças e conseqüentemente de seus efeitos adversos e tóxicos. Com base nestas informações, o presente trabalho visou 1. Avaliar os efeitos preventivos da dieta enriquecida com banana verde (Banana 'Nanica' *Musa* sp AAA) na colite ulcerativa experimental induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos; 2. Avaliar a influência do uso da dieta enriquecida com banana verde sobre a atividade antiinflamatória da prednisolona; 3. Comprovar se a dieta enriquecida com banana verde pode ser considerada um prebiótico. Através da realização deste estudo foi possível concluir que a administração da dieta enriquecida com a banana verde nas concentrações de 10% e 20% protege o cólon de ratos da colite experimental através de mecanismo que envolve a diminuição do estresse oxidativo evidenciado com a manutenção dos níveis de glutathione; além disso, a dieta enriquecida não aumenta a atividade antiinflamatória intestinal da prednisolona e os efeitos protetores do tratamento não estão relacionados com atividade prebiótica.

Palavras-chave: prebióticos, inflamação intestinal, *Musa* spp, colite ulcerativa, dieta enriquecida.

The inflammatory bowel disease (IBD) consists in two major diseases that affect the gastrointestinal tract, specially the colon, ulcerative colitis and Crohn's disease, both with high mortality and morbidity. These diseases represent a major risk for the development of colorectal cancer, which, in Brazil is correlated with a high mortality. Many drugs are used to control these illnesses but most of them present serious side effects and/or are very expensive. The search of new drugs is still a viable method to discovery different treatments for IBD however a new preventive and curative method can be the use of prebiotics. These prebiotics can improve the patients' life conditions and possibly permit the decrease of the drugs doses that are used and consequently side and toxics effects. In light of this, the aims of the present study was to evaluate the preventive effects of dietary supplementation with green banana (Banana 'Nanica' *Musa* sp AAA) in experimental models of rat colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS), evaluate the influence of the dietary supplementation in the dose of a corticoid (prednisolone) and then be able to analyze if the dietary supplementation can be considerate a prebiotic. Our results revealed that the ingestion of the dietary supplementation with green banana in 10% and 20% showed significant anti-inflammatory activities in the experimental model of rat colitis induced by TNBS. This activity was related with the reduction of the oxidative stress indicated with the maintenance of glutathione levels; besides, the anti-inflammatory activity of prednisolone was not altered with the dietary supplementation and the anti inflammatory preventive effects of the dietary supplementation was not correlated with a prebiotic activity.

Key- words: prebiotics, inflammatory bowel disease, *Musa* sp, ulcerative colitis, dietary supplementation.

Doença Inflamatória Intestina (DII) é uma doença crônica que atinge o trato gastrointestinal, sendo constituída principalmente por duas doenças distintas: a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). A DC foi descrita pela primeira vez em 1932 por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer e a RCU por Wilks e Moxon, em 1859 (KIRSNER, 1985).

A retocolite ulcerativa e a doença de Crohn representam um importante problema de saúde pública, pois são doenças que podem atingir os jovens, apresentando períodos de atividade e remissão, podendo resultar em uma diminuição expressiva na qualidade de vida dessas pessoas, afetando a escolaridade, gerando prejuízos no trabalho e diminuindo a produtividade além de afetar de maneira significativa a vida social dessas pessoas (VICTORIA, *et al.* 2009). Ambas as doenças são casos clínicos complexos, cuja etiologia envolve vários fatores como genéticos, ambientais, a microbiota entérica, possíveis agentes infecciosos além de ativar o sistema imune e não-imune que compõe o sistema de defesa da mucosa intestinal (VICTORIA, *et al.* 2009, FIOCCHI, 1998).

Tanto a DC como a RCU tornaram-se mais evidentes no último século, principalmente pela influência de fatores ambientais associados ao estilo de vida moderno e urbanizado (CROHN, 2000), já que fatores como estresse e dieta estão envolvidos na origem desta doença. Parece existir uma pequena diferença na incidência da DII entre os sexos. Em geral a doença de Crohn ocorre predominantemente na mulher, enquanto que a RCU tende a predominar em indivíduos do sexo masculino (LOFTUS, 2000). Segundo

Zaltman (2007) nos Estados Unidos a incidência da DC é de cinco casos em cada 100 mil habitantes, enquanto a RCU é de 12 casos para cada 100 mil habitantes. Contudo, esses dados podem estar comprometidos devidos à dificuldade nos diagnósticos da DII (HANAUER, 2006).

Apesar de não haver dados epidemiológicos oficiais, no Brasil, a incidência dessas duas doenças, tem aumentado nos últimos anos segundo a Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn (ABCD, 2009), atingindo níveis similares aos de países desenvolvidos (LOFTUS, 2004).

A DC é caracterizada por uma inflamação transmural envolvendo todas as camadas da parede do trato gastrointestinal, podendo ocasionar formação de abscessos severos e recorrentes, aparecimento de perfurações, estenoses e fístulas com órgãos adjacentes (KNIGGE, 2002). Essa doença pode também atingir a boca, esôfago, apêndice, reto e ânus (KNIGGE, 2002). Segundo Stenson, 1995 a severidade da doença é muito variável e sua apresentação clínica é observada através dos locais da inflamação, sendo que os locais mais afetados incluem o intestino delgado (30% dos casos), cólon (25%), íleo associado ao cólon (40%) e estômago associado ao duodeno (5%).

A RCU ocorre somente no cólon, atingindo o reto e o cólon descendente em 40% dos casos e sendo este último acometido em toda sua extensão em 30% dos casos (STENSON, 1995).

Apesar de haver diferenças quanto às análises histológicas entre a DC e a RCU, ambas apresentam maciça infiltração de células inflamatórias e danos na mucosa e submucosa, com uma ulceração extensa no epitélio da mucosa (HENDRICKSON *et al.*, 2002).

A DC apresenta células de muco normal, escassos abscessos nas criptas; arquitetura glandular preservada, o infiltrado linfocítico apresenta-se fragmentado; há presença de granulomas, a muscular da mucosa apresenta-se normal, sendo que a inflamação na submucosa é intensa (MISIEWICZ *et al.*, 1994). Os pacientes acometidos com DC podem apresentar sintomas extra-intestinal como uveíte, osteoporose, espondilite anquilosante, artrite periférica, pioderma gangrenoso, edema entre outros (MISIEWICZ *et al.*, 1994).

Já a RCU apresenta as células de muco depletadas (MISIEWICZ *et al.*, 1994). A RCU é uma doença idiopática caracterizada por episódios recorrentes de inflamação que acomete predominantemente a camada da mucosa do cólon. Muitos pacientes apresentam remissão por longos períodos, sendo que a probabilidade de ausência de recidiva é de apenas 20%. As recidivas geralmente ocorrem na mesma região do cólon que houve o aparecimento anterior da inflamação (JEWELL, 1998).

A apresentação clínica da DII está relacionada com a ocorrência de sangramento retal, dor abdominal, perda de peso e eliminação de muco nas fezes. Geralmente os pacientes que apresentam DII precisam ser tratados cirurgicamente por causa de complicações como: perfuração intestinal, hemorragia e megacólon tóxico, a cirurgia ocorre como uma possibilidade à falta de tratamentos clínicos específicos e também como prevenção para um possível surgimento de câncer colorretal (CLEVERS, 2004).

Apesar de a etiologia da DII permanecer desconhecida, sabe-se que uma resposta imune exagerada do intestino a estímulos inócuos representa um papel chave na patofisiologia destas doenças inflamatórias (FIOCCHI, 1998). As DII são caracterizadas por uma migração de neutrófilos e uma alta produção de

mediadores inflamatórios (PODOLSKY, 2000), podendo ocorrer uma resposta imune exacerbada, resultando em uma super produção de mediadores pro-inflamatórios, como por exemplo, os eicosanóides, fator de agregação plaquetária, citocinas (fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ÉLSON, *et al.* 1995; STOBER, 1998; FIOCCHI, 1998; KATZ, *et al.* 1999).

Além da resposta imune, a mucosa intestinal também pode ser um importante meio para proteção contra as DII. O meio que circunda a mucosa intestinal é uma mistura complexa de antígenos de três origens: da dieta, da microbiota bacteriana normal e também dos produtos bacterianos, estes últimos podendo representar patógenos potenciais. Por este motivo, é essencial que o sistema imune da mucosa tenha a capacidade de discriminar os estímulos prejudiciais dos estímulos inofensivos, prevenindo assim a entrada maciça de patógenos através da mucosa e, por outro lado, não produzindo resposta imune frente aos agentes inofensivos (GITNICK, 1996).

Sabe-se que o epitélio intestinal atua como defesa contra a invasão de toxinas e bactérias do lúmen, no entanto, devido a inflamação, a função de barreira deste epitélio é desestabilizada e uma subsequente translocação de endotoxinas e antígenos intensifica a resposta imune (MACDERMOTT, 1996). A melhora na integridade da função de barreira da mucosa intestinal resultará em uma redução do processo inflamatório intestinal (YAMADA *et al.*, 1992; HIGA *et al.*, 1993). Além da defesa através da mucosa, a utilização de compostos antioxidantes, também pode ser útil para limitar os danos causados pelas DII. Foi proposto que a atividade antioxidante pode ser responsável por efeitos

benéficos mostrados através da utilização dos derivados 5-aminossalilatos em humanos com DII (GRISHAM *et al.*, 1994).

Os medicamentos utilizados para tratamento das DII incluem drogas como derivados do ácido 5-aminossalílico (sulfassalazina, balsalazina, olsalazina e mesalazina), glicocorticóides (prednisolona, prednisona e budesonida), imunossupressores (azatioprina e 6-mercaptopurina), imunomoduladores (YAMAMOTO-FURUSHO, 2007), terapia biológica (agentes anti-TNF como: infliximab, adalimumab e o certolizumab) (MORRISON *et al.*, 2009) que apresentam efeitos benéficos através da combinação de diferentes mecanismos que resultam em uma diminuição da resposta imune exacerbada que é característico dessas doenças (STEIN e HANAUER, 2000).

Essas drogas são consideradas de alto custo, frequentemente tóxicas e não são efetivas em todos os pacientes (SHANAHAN, 2004). Por essas razões, o desenvolvimento de novas possibilidades que combine eficácia e segurança é um importante aliado para a terapia das DII.

No Brasil, os medicamentos mais utilizados no tratamento destas doenças são os aminossalilatos e os glicocorticóides, e menos frequentemente, os imunomoduladores ou a terapia biológica (DEWULF 2005, BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003, SOUZA *et al.*, 2002).

Nos países industrializados, a partir da década de 80 incorporou-se o conceito de que certos componentes não digeríveis da dieta poderiam favorecer o surgimento de determinadas cepas de bactérias no intestino que se associam a efeitos benéficos para a saúde (FUSTER e GONZÁLES- MOLERO, 2007). Com base neste conceito, o uso de probióticos, prebióticos ou simbióticos tornou-se

uma alternativa para tratamento das DII, visto que poderiam atuar-modificando a microbiota intestinal (FUSTER e GONZÁLES- MOLERO, 2007).

A iniciação e a progressão da inflamação intestinal pode estar relacionada às bactérias luminais no intestino, provavelmente devido ao desequilíbrio na microbiota intestinal com relativa predominância de bactérias patogênicas e insuficiente quantidade de espécies de bactérias protetoras da mucosa (FIOCCHI, 1998; SHANAHAN, 2004).

Estas evidências explicariam a remissão dos sintomas do processo inflamatório intestinal após tratamento com antibióticos como o metronidazol e a ciprofloxacina (Chung e Peppercorn, 1999), e também que em animais livres de patógenos (*germ free*) não se consegue induzir experimentalmente o processo inflamatório colônico (VENTURI *et al.*, 1999).

Um importante papel na manutenção da homeostase colônica tem sido atribuído aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente acetato, propionato e butirato, os quais são produzidos no intestino pela fermentação bacteriana anaeróbica de carboidratos e polissacarídeos não digeríveis (MORTENSEN e CLAUSEN, 1996). Tem sido descrito que os prebióticos podem aumentar os níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) além de melhorar a resposta do tecido ao processo inflamatório intestinal devido ao maior aporte energético (MORTENSEN e CLAUSEN, 1996).

Vários estudos mostram que níveis baixos destes ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o butirato, estão envolvidos na patogênese da RCU (ROEDIGER e NANCE, 1986; VERNIA e *et al.*, 1988; STONEROOK *et al.*, 1996), enquanto que outros demonstram que o uso de enemas de butirato aliviam os



sintomas de retocolite ulcerativa pela restauração dos níveis de butirato facilitando a recuperação da mucosa inflamada (PATZ *et al.*, 1996).

Da mesma forma, agentes probióticos, reconhecidos como organismos que contribuem para um equilíbrio da microbiota intestinal (SPERTI, 1971) atuam aumentando o número de agentes não patogênicos, melhorando assim, a microbiota intestinal (FULLER *et al.*, 1989).

Estudos mostram benefícios do uso de probióticos na Doença Inflamatória Intestinal. Foi relatado que a administração de uma mistura de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (VENTURI *et al.*, 1999) ou *Escherichia coli* não-patogênica (REMBACKEN *et al.*, 1999) preveniu o aparecimento de retocolite ulcerativa, sendo tão efetiva quanto a administração de uma baixa dose de ácido 5-aminossalicílico. Camuesco *et al.* (2005) relataram que as *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* preveniram a colonização do intestino pelas bactérias patogênicas além de prevenirem a remissão da doença.

Considera-se prebióticos como alimentos não digeríveis que afetam benéficamente o paciente, pela estimulação seletiva do crescimento e/ou da atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, resultando em uma melhora para o paciente (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Segundo Gibson e Roberfroid (1995) para um alimento ser classificado como um prebiótico, ele deve obedecer 3 critérios: a) não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato digestório, b) ser um substrato seletivo para uma ou um número limitado de bactérias comensais benéficas para o cólon, c) além de ser capaz de alterar a microbiota intestinal. Como exemplos de ingredientes alimentares considerados prebióticos podem ser citados: carboidratos não-digeríveis (oligo e polissacarídeos), alguns peptídeos e proteínas e certos

lipídeos. Além desses prebióticos, já citados, existem outros tipos, incluindo fibras, cevada germinada, *Plantago ovata*, lactulose. O uso de fibras dietárias presentes em sementes de *Plantago ovata* Forssk (tanchagem) e em fibra de cevada germinada, tem demonstrado eficácia para o tratamento das DII. Em pacientes com retocolite ulcerativa, a ingestão de sementes de *Plantago ovata*, quando comparadas ao uso de mesalazina, apresentou maior eficácia na prevenção da remissão da doença (FERNÁNDEZ-BAÑARES *et al.*, 1999).

Os prebióticos mais estudados são a inulina e os frutoligossacarídeos, sendo que o primeiro aumenta a atividade fermentativa de *Lactobacillus*, e o segundo estimula o crescimento de *Bifidobacterium*, que são os dois principais grupos de bactérias com efeitos benéficos no trato gastrointestinal (MARTI DEL MORAL *et al.*, 2003).

A fermentação dos prebióticos pela microbiota do trato gastrointestinal gera como metabólitos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o acetato, o propionato, o butirato e o lactato, os quais podem atuar de forma direta (trófica), ou indireta, modificando o pH e diminuindo iNOS (óxido nítrico sintetase indutiva) e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) nas células do trato gastrointestinal, controlando assim, vários processos como a inflamação intestinal, a diarreia e o câncer de cólon (MARTI DEL MORAL *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostraram que a ingestão oral de lactulose possui um papel protetor contra patógenos potenciais da mucosa, agindo como um prebiótico e promovendo efeitos benéficos sobre a DII experimental, visto que seu efeito antiinflamatório intestinal foi evidenciado por uma significativa redução da atividade da mieloperoxidase e por uma diminuição marcante da

produção colônica de THF- $\alpha$  e leucotrieno-B<sub>4</sub>, acompanhados simultaneamente pelo aumento das taxas de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no conteúdo colônico (CAMUESCO *et al.*, 2005).

Já os simbióticos são produtos contendo probióticos e prebióticos (BENGMARK, 2001). Todo probiótico e prebiótico apresentam propriedades distintas, com seu modo de ação através da modulação na microbiota (DAMASKOS e KOLIOS, 2008). Várias combinações de probióticos e prebióticos já foram estudadas. Roller *et al.* (2004) demonstraram que a combinação de oligofrutose, inulina, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* suprimiu a carcinogênese colônica, enquanto que a mesma mistura estimula a secreção de IgA e IL-10 no ceco. Furrie *et al.* (2005), em triagem clínica com 18 pacientes de retocolite ulcerativa, demonstraram que a combinação de *B. longum*, inulina e oligofrutose reduz o escore inflamatório de biopsias retais e sigmóides, com a redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

A dieta enriquecida com banana verde, *Musa* sp, tem sido alvo de algumas pesquisas no Brasil devido a suas propriedades nutricionais e especialmente pelo seu alto teor de fibra insolúvel e não-digerível, características que conferem a este produto a potencialidade de uso como prebiótico. De acordo com Borges *et al.* (1998), a banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, produzida na maioria dos países tropicais, sendo o Brasil o segundo maior produtor, responsável por 9,8% da produção mundial e o maior consumidor. Em muitas populações, é utilizada para tratamentos de muitas desordens intestinais, inclusive para diarreia (RABBANI *et al.*, 2001).

Um recente estudo realizado por Da Motta *et al.* (2000) reporta que a dieta enriquecida com banana verde, em seu estágio imaturo, é rica em grânulos de amido com uma composição química de 61 a 76,5% de amido, 19 a 23% de amilose, 2,5 a 3,3% de proteína, 4 a 6% de umidade, 0,3 a 0,8% de lipídeos, 2,6 a 3,5% de cinzas e 6 a 15,5% de fibra total. Parte da composição de amido, aproximadamente 9,8 a 23,6%, é de amido resistente (BORGES *et al.*, 1998) definido como a soma de amido e de seus produtos de degradação que não são absorvidos pelo intestino (DAVIDSON e MACDONALD,1998).

Portanto, do ponto de vista químico, o amido resistente pode ser classificado em fibra alimentar juntamente com os constituintes da parede celular, a celulose, hemicelulose, pectina (polissacarídeos não amido) e lignina (não carboidrato). Esse amido tem a capacidade de aumentar o volume fecal e diluir compostos potencialmente tóxicos ou cancerígenos (MUIR *et al.*, 1993), além de reduzir os níveis plasmáticos pós-prandial de glicose, insulina, triglicérides e de lipoproteínas de baixa densidade (MUIR *et al.*, 1993).

Dunjić *et al.* (1993) avaliaram a banana verde em lesões gástricas (aguda e crônica) e observaram que a fruta reduziu as lesões agudas, no entanto, o mecanismo de proteção gástrico ocorrido, devido a utilização da banana verde, ainda não foi elucidado.

Rabbani *et al.* (2001) relataram que a banana verde é rica em amido resistente que estimula a produção colônica de ácidos graxos de cadeia curta, sendo utilizada para tratar diarreias. Rabbani *et al.* (2009) também estudaram a utilização da banana verde em crianças que apresentaram shigelose (ou disenteria bacteriana) e demonstraram que a banana verde diminuiu a

severidade da doença, podendo ser considerada uma boa aliada contra a doença, quando utilizada juntamente com a dieta alimentar.

Desta forma, a dieta enriquecida com banana 'Nanica' verde (*Musa spp AAA*) por possuir altos índices de amido resistente, atuaria como uma fibra alimentar melhorando as funções do intestino grosso por meio da redução do tempo de trânsito, pelo aumento do peso e frequência das fezes, pela diluição do conteúdo do intestino grosso e pelo fornecimento de substrato fermentável à microbiota, normalmente presente no intestino grosso (COLLI *et al.*, 2002; RABBANI *et al.*, 2001).

Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivo:

- a) Avaliar os efeitos preventivos da dieta enriquecida com banana verde (Banana 'Nanica' *Musa* sp AAA) na colite experimental induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos;
- b) Avaliar a influência do uso da dieta enriquecida com banana verde sobre a atividade antiinflamatória da prednisolona;
- c) Avaliar se a dieta enriquecida com banana verde pode ser considerada um prebiótico.

### **5.1. Elaboração da dieta enriquecida com banana verde- Banana**

#### **'Nanica' *Musa sp AAA***

Os frutos das bananas foram coletados verdes, no mês de dezembro de 2009, no período matinal. Foram obtidas de um sítio localizado na região de Botucatu, situado no estado de São Paulo, Brasil, e foram identificadas por especialistas do Herbário "Irina Felanova Gemtchjnicov" – BOTU, no Campus da Unesp de Botucatu, como sendo banana 'Nanica' (*Musa sp AAA*).

Após a coleta as bananas foram submetidas à higienização, cortadas e secas em estufa com circulação de ar à 55°C por 48 horas. Após esse período, foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em câmara fria (à 4°C) para posterior utilização.

Foi preparada uma dieta enriquecida com 10% e 20% de banana verde (banana 'Nanica' *Musa sp AAA*) para a realização dos ensaios biológicos. Para 10kg de ração enriquecida com banana verde a 10%, utilizou-se 1kg de banana verde processada e 9kg da ração normal (purina- Labina). Já para 10kg de ração enriquecida com banana verde a uma concentração de 20%, utilizou-se 2kg de banana verde processada e 8kg da ração normal (purina- Labina).



**Fig.1-** Banana 'Nanica' *Musa* sp AAA (foto obtida do site: <http://colunas.cbn.globoradio.globo.com/files/683/2009/03/banana.bmp>)

## **5.2. Delineamento experimental**

Para a análise dos efeitos da dieta enriquecida com a banana verde (banana 'Nanica' *Musa* sp AAA) realizou-se o protocolo experimental descrito abaixo.

### **5.2.1. Efeitos preventivos da dieta enriquecida com a banana 'Nanica' verde *Musa* sp AAA e de seu efeito em associação com o fármaco de referência (prednisolona) na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos**

Para realizar os testes preventivos da dieta enriquecida com banana verde foram utilizados 9 (nove) grupos experimentais:



## **A. animais não-colíticos**

- a.** Branco
- b.** Dieta 10%
- c.** Dieta 20%

## **B. animais colíticos**

- a.** Controle TNBS;
- b.** Tratado com Dieta 10%;
- c.** Tratado com Dieta 20%;
- d.** Tratado com Dieta 10% + prednisolona;
- e.** Tratado com Dieta 20% + prednisolona
- f.** Prednisolona (droga de referência)

### **A. Grupos não- colíticos:**

**a.** Branco: animais sem colite e que receberam dieta normal por um período de 21 dias;

**b.** Dieta 10%: animais sem colite e que receberam dieta enriquecida com banana verde a 10% durante 21 dias;

**c.** Dieta 20%: animais sem colite e que receberam dieta enriquecida com banana verde a 20% durante 21 dias;

Esses dois grupos, Dieta 10% e Dieta 20%, foram utilizados como parâmetro de comparação com os animais do grupo branco, tendo-se em vista avaliar se a dieta enriquecida com a banana verde, nas duas concentrações mencionadas, possui sabor palatável ou se influencia os parâmetros avaliados.

## **B. Animais colícticos:**

**a.** Controle TNBS: animais colícticos, que não receberam tratamento farmacológico, receberam dieta normal (purina- Labina) por um período de 14 dias antes da indução do processo inflamatório e continuaram se alimentando com a ração normal durante os sete dias após a indução.

**b.** Tratado com dieta 10%, receberam dieta enriquecida com banana verde a uma concentração de 10% por um período de 14 dias antes da indução do processo inflamatório e 7 dias após a indução.

**c.** Tratado com dieta 20%, foram tratados com dieta enriquecida com banana verde a uma concentração de 20% por um período de 14 dias antes da indução do processo inflamatório e 7 dias após a indução.

**d.** Tratado com dieta 10% + prednisolona, receberam dieta enriquecida com banana verde a uma concentração de 10% durante os vinte e um dias de tratamento, e nos quais foi administrado 5 mg/Kg do fármaco de referência (prednisolona) 3 dias antes da indução do processo inflamatório e 7 dias após a indução.

**e.** Tratado com dieta 20% + prednisolona, receberam dieta enriquecida com banana verde a uma concentração de 20% durante os vinte e um dias de tratamento, e nos quais foi administrado 5 mg/Kg do fármaco de referência (prednisolona) 3 dias antes da indução do processo inflamatório e 7 dias após a indução.

**f.** Prednisolona: grupo de animais que receberam dieta normal (purina- Labina) por um período de 14 dias antes da indução do processo inflamatório e 7 dias após a indução da colite. Eles foram tratados com o

fármaco a uma dose de 5mg/kg, 3 dias antes de receberem a indução do processo inflamatório e 7 dias após.

### **5.3. Animais**

Ratos machos albinos da Cepa Wistar brancos, de 180 a 220 gramas de peso, oriundos do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo foram utilizados para os testes de atividade antiinflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos 7 dias antes do início dos experimentos. Este biotério possui temperatura ambiente controlada de  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo de claro-escuro de 12 horas.

Os ratos que não receberam tratamento com a dieta enriquecida com banana verde (branco, controle TNBS, e prednisolona) foram alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo quatro (4) animais por caixa e foram alimentados com ração de manutenção (purina- Labina) e água corrente *ad libitum*. Já os animais que receberam tratamento com a dieta enriquecida com banana verde (grupos: dieta 10%, dieta 20%, tratados com dieta 10%, tratados com dieta 20%, dieta 10% + prednisolona, dieta 20% + prednisolona) ficaram em caixas individuais (um animal por caixa) receberam ração controlada- 30g por dia da ração enriquecida com banana verde com 10% e 20% e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (Protocolo n.042/04-CEEA/IB/UNESP).

### **5.3.1. Modelo experimental de inflamação intestinal**

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

A solução de TNBS foi preparada a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v). Os animais do grupo branco, dieta 10% e dieta 20% foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

### 5.3.2. Avaliação macroscópica do processo inflamatório

Os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarréicas. Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, os cólons foram extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se os parâmetros macroscópicos e bioquímicos.

Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Critério de determinação de escore de lesão colônica

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

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 4 (quatro) fragmentos longitudinais, dois deles foram congelados a  $-30^{\circ}\text{C}$  para determinação de proteínas, fosfatase alcalina (FA) e mieloperoxidase (MPO),

enquanto um fragmento foi processado para determinação dos níveis de glutathiona total (GSH). Este fragmento foi pesado e congelado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase (Anderson, 1985).

### **5.3.3. Avaliação microscópica de amostras de cólon**

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico, amostras de tecido (0,5mm) adjacentes à área de lesão foram coletadas para processamento histológico. Essas amostras foram fixadas em Bouin por 24 horas sendo, a seguir desidratadas em série alcoólica etílica crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609) e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6 $\mu$ M (micrômetros) de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando série alcoólica etílica decrescente. A seguir, as amostras foram submetidas à coloração em eosina-hematoxilina para a análise morfológica das lesões.

### **5.3.4. Determinações bioquímicas**

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica, sendo que a homogeneização foi realizada a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflon e um recipiente de vidro de 10ml de capacidade.

## **Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

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

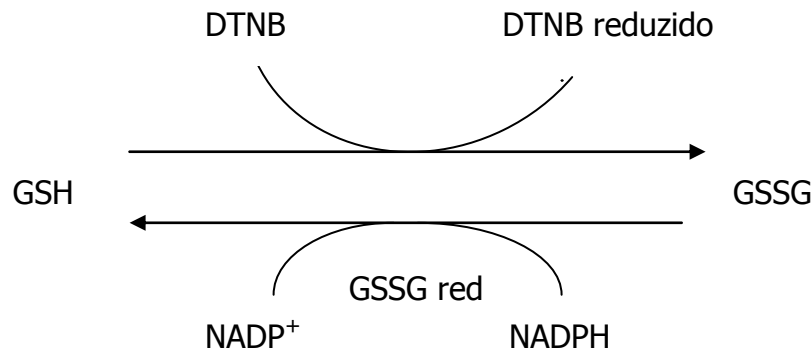
A determinação foi realizada em fragmentos de cólon (150-300mg), os quais após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesouras e com 1 ml de tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma H-5882)), durante 15 segundos. O tampão HTAB, ao funcionar como um detergente facilita a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, nos quais está armazenada. Em seguida o material picado é transferido para um tubo de vidro, adicionando-se o restante de tampão, de modo a se obter uma proporção 1:20 (p/v), homogeneizando-se durante 45 segundos a frio, usando o homogeneizador Heidoph. O homogeneizado resultante foi dividido em 2 alíquotas de 1,0 ml, armazenadas em tubos tipo *ependorff*. O material foi sonicado por 10 segundos em sonicador ultra cleaner 1420 e submetido a um triplo processo de congelamento/descongelamento durante 1-2 dias, o que facilita a ruptura das estruturas celulares, favorecendo também a liberação da enzima. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 8.300 rpm, por 5 minutos a uma temperatura de 4°C e foi realizada a determinação da atividade da MPO seguindo a cinética da reação frente a água oxigenada. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 5 µl do sobrenadante de cada amostra em pocilhos distintos, 150µl do tampão de reação, cloridrato de orto-

dianisidina (0,167mg/ml) (Sigma D-3252), e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,0005% (p/v) em tampão fosfato (50mM, pH 6,0) a 37°C. Em seguida, foi determinado o incremento de absorvância a 450nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com peroxidase de rábano (Sigma P 8250). Uma unidade de mieloperoxidase (U) se considera como aquela que degrada 1nmol/min de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

### **Determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH)**

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson, 1985, que está baseado na oxidação total da glutathiona na forma reduzida (GSH) presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo (Figura 2), no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu conseqüente incremento de absorvância a 412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG).





**Fig.2-** Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutathiona total nas amostras de cólon.

Para efetuar a determinação do conteúdo de glutathiona total, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA). As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador Heidoph. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante se utiliza 20µl que foi colocado em uma placa de 96 poços, onde se adiciona 140 µl de NADPH (Sigma N-7505) 298µM (0,248mg em 1ml de PBS), 5 µl de tampão fosfato (PBS) com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (PBS-EDTA, solução aquosa de fosfato sódico 143mM e EDTA 6,3mM, pH 7,5) e 20µl DTNB (Sigma D-8130) 6mM (23,778mg em 10ml de PBS) respectivamente. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 5 minutos em uma temperatura de 30°C. Após este período adiciona-se 15µl de glutathiona redutase (Sigma G-3664) e 256 UI/ml (45µl de glutathiona redutase em 2,955ml de PBS) e registrou-se o incremento de

absorbância a 412 nm no espectrofotômetro. A concentração de glutationa foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com Glutationa (GSH) e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

**Determinação do conteúdo de proteínas: método do ácido  
bicinchoninico (BCA)**

A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método clássico descrito por Smith *et al.*, 1985. Este método é utilizado quando no tampão de homogeneização pode haver detergentes ou outro tipo que apresentam interferências com o reativo azul de Coomassie do método convencional de Bradford. O fundamento da técnica se baseia na capacidade das proteínas reduzirem o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , de forma que o  $\text{Cu}^+$  reage com o BCA formando um complexo púrpura com a substância máxima de 562nm.

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

As amostras de cólon foram picadas e homogeneizadas em homogeneizador automático com tampão glicina (50mM e pH 10,5 com 0,5mM de  $\text{MgCl}_2$ ) na proporção 1:10 (p/v). Após a homogeneização, o material foi

centrifugado a 3000rpm por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante das amostras utilizou-se 4µl que foi colocado em uma placa de 96 poços, adicionando-se 200µl do reativo do BCA. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 25 minutos em temperatura de 37°C. A leitura da placa foi realizada a 562nm. O cálculo do conteúdo de produtos foi feito por interpolação em curva padrão de albumina sérica bovina e os resultados foram expressos em µg/µl de proteína.

### **Determinação da atividade da fosfatase alcalina (FA) colônica**

A determinação da atividade da FA foi realizada através do método descrito por Bradford, 1976 e Bessey *et al.*, 1946. A FA que se encontra presente na amostra serve como um catalizador para a hidrólise do grupo fosfato de um reativo colorido, o nitrofenilfosfato sódico em tampão glicina, que incorpora MgCl<sub>2</sub>, dando lugar ao *p*-nitrofenol, molécula que apresenta absorção máxima de 405 nm. Para a avaliação da atividade da fosfatase alcalina, foram colocados 5µl da amostra do homogenato anterior (para determinação do conteúdo de proteínas) em placa de 96 poços, sendo adicionados 25µl de água destilada, após isso foi adicionado 50µl do reativo de coloração, o qual é composto por 2,2957g do sal *p*-nitrofenilfosfato bis-ciclohexilamônio, (Sigma N 3129-5), a 5,5mM em tampão glicina a 50mM com 0,5mM MgCl<sub>2</sub> (pH 10,5). A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, a qual permaneceu incubada durante 25 minutos a uma temperatura de 37°C. Após isso, adicionou-se 120µl de NaOH 2N (10g de NaOH

em 125ml de água), com o objetivo de interromper a reação. A leitura da placa foi realizada a 405 nm e a atividade da FA calculada em mU/mg de proteína.

### **5.3.5. Peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato**

Para avaliar a atividade antioxidante da banana 'Nanica' verde foi realizada uma avaliação através do modelo de inibição lipídica da lipoperoxidação induzida por solução de sulfato férrico e ácido ascórbico (100 µM) em membranas de cérebro de rato (STOCKS *et al.*, 1974 e FEE e TEITELBAUM, 1972).

A técnica se baseia na produção de malonildialdeído (MDA) como indicativo de lipoperoxidação. Para precipitar as proteínas de membranas foi utilizado o ácido tricloroacético (TCA), enquanto o reativo tiobarbitúrico (TBARS) que reage com o malonildialdeído (MDA) gera coloração cuja intensidade é determinada por espectrofotometria, mediante curva padrão.

Os cérebros de ratos que foram utilizados para a realização desse teste, foram obtidos de animais normais. Esses cérebros foram pesados e triturados com homogeneizador automático, em gelo, com tampão PBS na proporção 1:4 (p/v) (solução A- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, e solução B- NaHPO<sub>4</sub> 10mM, pH 7). O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 3000rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a uma temperatura de 80°C em alíquotas de 1ml. Para a realização do ensaio, o homogenato estocado foi descongelado em temperatura ambiente e diluído em PBS na proporção de 1:10 (v/v). A reação de lipoperoxidação foi realizada em tubos tipo *ependorf* de

2ml. Os grupos, os quais foram submetidos aos testes foram: Branco com incubação, branco sem incubação, controle incubado (DMSO 20%, solvente utilizado para solubilizar o extrato de banana verde), controle não incubado, controle máximo (tecido sulfato férrico e ácido ascórbico) e tubos testes (com concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu$ M de extrato de banana verde em soluções de reação de quercetina com concentrações de 1,25; 0,625; 0,315; 0,15625; 0,078125 $\mu$ M em solução de reação).

Para a obtenção do extrato vegetal foi realizado o seguinte procedimento: o material vegetal foi desidratado em estufa com circulação e renovação de ar à temperatura de 45°C durante 48 horas. Após a completa desidratação do material, foi pulverizado em moinhos de facas para a produção de um pó. Após pulverização, foram preparados extratos em metanol absoluto na proporção de 10% (peso/volume) por processo de maceração a frio durante 48 horas. Três extrações consecutivas foram realizadas, com o mesmo material vegetal e o filtrado dessas três extrações foi reunido e concentrado. Após a concentração os extratos foram armazenados em câmara fria à 3°C.

Para cada amostra, exceto nos brancos, adicionou-se 50 $\mu$ l da solução de sulfato ferroso ( $\text{SO}_4\text{FeH}_2\text{O}$ ) e ácido ascórbico, os dois são responsáveis por ocorrer a lipoperoxidação. Os tubos com as soluções foram incubados a uma temperatura de 37°C durante 12 minutos em banho-maria sob constante agitação. Após isso, adicionou-se 0,5ml do TBAR 0,5% em TCA 20%. Os tubos foram fechados e recolocados sob aquecimento em banho-maria a 100°C durante 10 minutos, dessa vez sem agitação. Alíquotas de 1ml foram colocadas em *ependorff* de 1,5ml e centrifugados a 3000rpm, durante 15 minutos a uma temperatura de 4°C. Retirou-se 200 $\mu$ l do sobrenadante da amostra e colocado

em placa de 96 poços para realização da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532nm. O cálculo da porcentagem de inibição da produção de MDA foi obtido em relação aos valores encontrados com as amostras de lipoperoxidação máxima (cérebro, ferro e ácido ascórbico a 100µM) e a IC<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% da lipoperoxidação) determinada por regressão.

### **5.3.6- Análise Microbiológica**

Amostras do conteúdo luminal foram pesadas, diluídas na proporção de 1:9 (p/v), homogeneizadas e seriadamente diluídas em salina à 0,85% em razão de 10. As séries de 10 diluições dos homogeneizados foram plaqueadas em meio Agar Rogosa (MRS). Este meio, Agar Rogosa, é utilizado para crescimento de bactérias do tipo ácido lácticas (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*).

As placas com o meio Agar Rogosa foram incubadas por 5 dias em estufa controlada com 5% de CO<sub>2</sub> à 35°C. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias e reportadas em log<sub>10</sub> unidades formadoras de colônias por grama de material fecal.

### **5.3.7. Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores e dados microscópicos- histológicos) foram expressos como mediana e foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. Dados descontínuos foram analisados pelo teste  $\chi^2$ . Significância estatística foi considerada para valores a partir de  $p < 0,05$ . . A análise estatística para avaliar a associação entre a droga e a dieta enriquecida foi realizada de acordo com metodologia descrita por Slinker, 1998.

### **6.1-Avaliação Macroscópica da lesão**

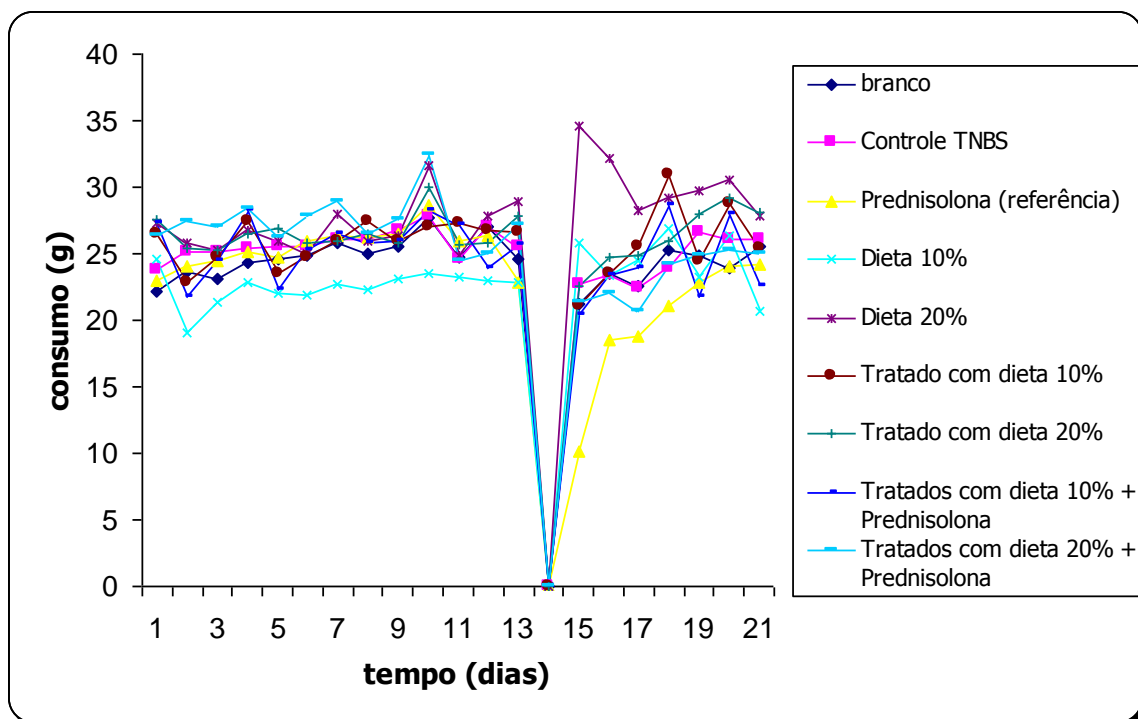
A administração intracolônica de TNBS/etanol 50% nos animais, promoveu inflamação no cólon em todos os grupos experimentais, a qual foi evidenciada 72 horas após a indução da colite pela presença de danos no cólon de extensão entre 0,5cm e 7,5cm, aos quais foram atribuídos um escore macroscópico (Tabela 2). O processo inflamatório, responsável pela lesão colônica, também foi associado a um aumento na razão peso-comprimento (mg/cm) do cólon. A presença de diarreia e aderências, características da indução de inflamação intestinal por TNBS, foi detectada, respectivamente, em 100% e 50% dos animais controles. Os diferentes tratamentos utilizados nos animais colíticos mostram que o tratamento com a dieta a 20%, assim como a associação entre os tratados com dieta 10% e 20% em associação com a prednisolona reduziram o escore de lesão em relação ao grupo controle. Apesar destes resultados não serem significativos, o mesmo foi acompanhado pela redução da relação peso/comprimento colônico e de incidência de aderências a órgãos adjacentes (Tabela 2). Não foram detectadas alterações no consumo de ração e na evolução do peso corporal em nenhum dos grupos estudados (Figuras 3 e 4).



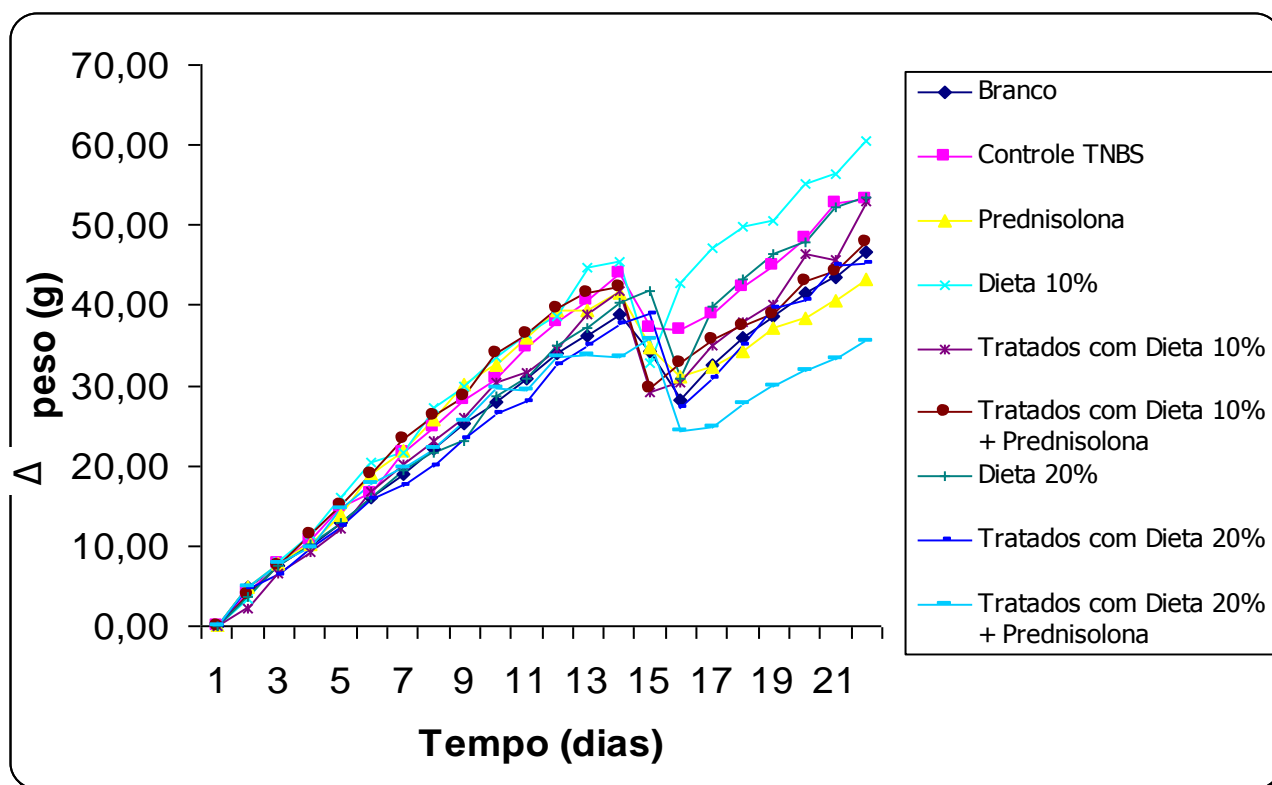
**Tabela2-** Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos da dieta enriquecida com banana verde nas concentrações de 10% e 20%, da prednisolona (5mg/Kg), e das combinações (Dieta 10% + prednisolona 5mg/Kg), (Dieta 20% + prednisolona 5mg/Kg) na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.

Grupo Experimental	Escore de lesão <sup>(a)</sup> (0-10)	Extensão da Lesão(cm) <sup>(b)</sup>	Relação peso/comprimento (mg/cm)	Incidência de diarreia (%)	Incidência de aderência(%)	Escore microscópico (a)
Branco	0	0**	99,39 ± 7,90**	0***	0**	7,5 ± (6-8)***
Dieta 10%	0 ***	0**	102,07 ± 2,64**	0***	0**	9 ± (8-10)**
Dieta 20%	0 ***	0**	122,12 ± 8,33**	0***	0**	8 ± (7-10)***
Controle TNBS	6 (0-10)+++	2,85 ± 0,76 ++	216,43 ± 32,67 ++	100	50,0++	14 ± (12-17)+++
Prednisolona	4 (0-7) +++	1,41 ± 0,29	162,21 ± 8,14 +	100	35,71+	11 ± (8-14)+++
Tratados com Dieta 10%	5 (0-10) ++	1,81 ± 0,76	160,37 ± 22,00	100	12,5	10 ± (9-11)++
Tratados com Dieta 20%	2,5 (0-6) +	1,37 ± 0,35	138,30 ± 8,71*	100	12,5	9,5 ± (8-13)*+
Tratados com Dieta 10% + Prednisolona	1,5 (0-7)	1,16 ± 0,71	149,59 ± 13,47*	100	12,5	13 ± (11-13)+++
Tratados com Dieta 20% + Prednisolona	2 (0-4)	4,25 ± 1,01++	171,00 ± 11,10+	100	0**	8 ± (7-10)***

<sup>(a)</sup> escore são expressos em mediana (intervalo), <sup>(b)</sup> extensão da lesão, relação massa-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M. \* p< 0,05, \*\* p< 0,01, \*\*\* p< 0,001 , comparados ao grupo controle e + p< 0,05, ++p< 0,01, +++ p< 0,001 comparados ao grupo branco.



**Fig. 3-** Consumo médio diário de ração dos animais em cada grupo. No décimo quarto dia os animais foram mantidos em jejum alimentar por um período de 24 horas, para posterior indução da colite por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) no décimo quinto dia.



**Fig. 4-** Relação da peso corporal dos animais durante os 21 dias de experimento. Há uma queda no peso no décimo quinto dia (15<sup>o</sup>), devido ao período de 24 horas anteriores que permaneceram em jejum alimentar.

## 6.2-Avaliação microscópica da lesão

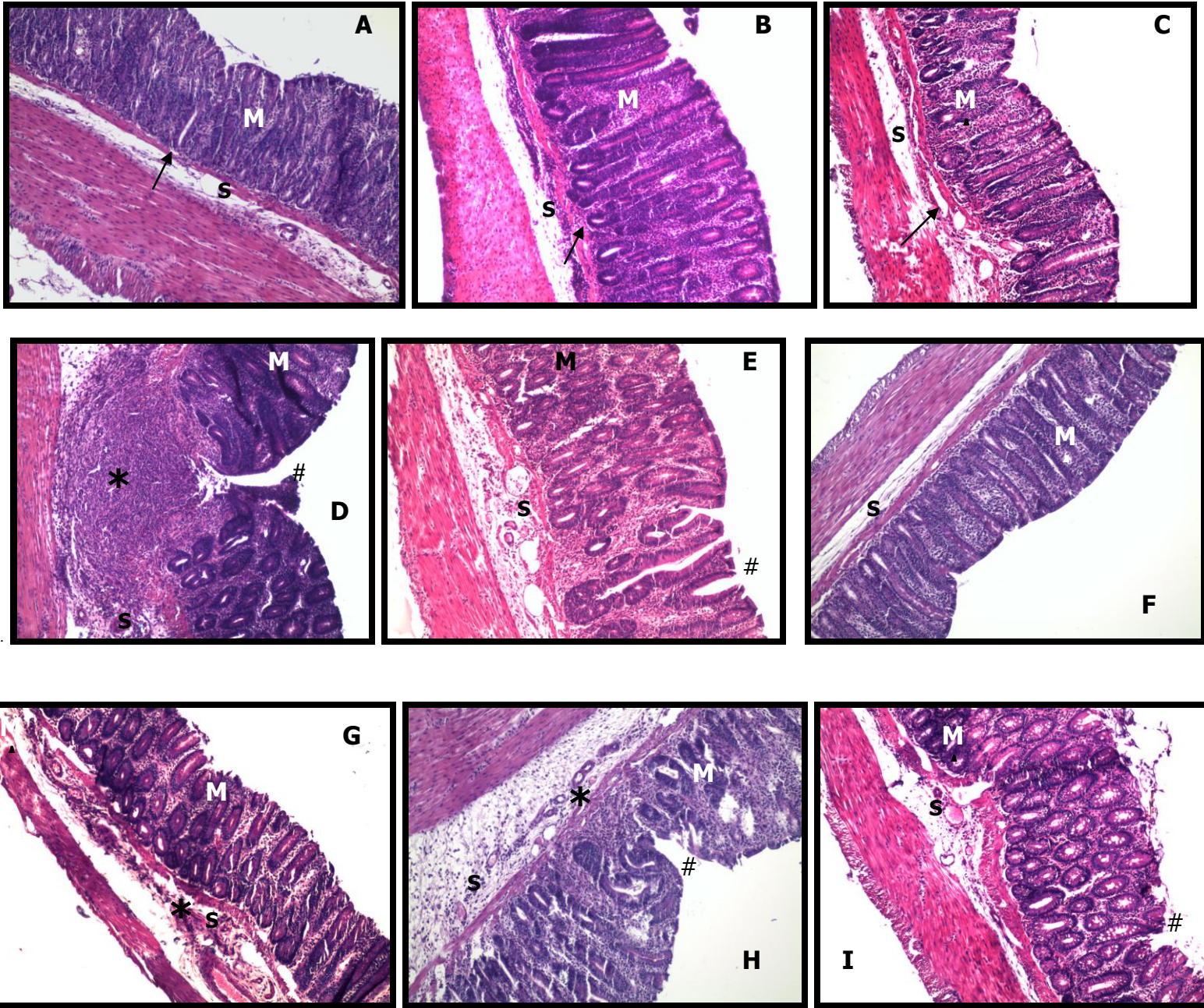
No grupo branco, dieta 10% e dieta 20% (não-colíticos) há numerosas glândulas tubulares com muitas células caliciformes (seta preta); o epitélio luminal está intacto (figura 5; A, B e C).

No grupo dos animais controle TNBS as glândulas tubulares são menores e as células caliciformes estão diminuídas. Apresentou moderada ulceração na camada mucosa (#) e inflamação envolvendo as camadas da mucosa e submucosa (\*). Nas criptas houve leve depleção de muco na lâmina própria, além de se observar maciça presença de infiltração de monócitos e uma moderada infiltração de granulócitos (Figura 5; D).

Os animais do grupo prednisolona, apresentaram suave ulceração na camada mucosa (#); na mucosa e na submucosa houve moderado número de células inflamatórias (Figura 5; E). Esses dados podem ser observados com escore microscópica (tabela 2).

Nos animais tratados com dieta enriquecida com banana verde na concentração de 10% não foi observado infiltração de células inflamatórias na mucosa e na submucosa, mostrando melhora no processo inflamatório (Figura 5, F). Já os animais tratados com a dieta 20% apresentaram uma discreta infiltração de células inflamatórias na submucosa (Figura 5, G).

Os animais tratados com dieta 10% + prednisolona apresentaram moderada ulceração na camada mucosa (#) com uma discreta infiltração de células inflamatórias na mucosa e submucosa (\*) (Figura 5, H). No tratamento dos animais que receberam dieta 20% + prednisolona apresentaram leve ulceração na camada mucosa (#), e discreto número de células inflamatórias na lâmina própria e submucosa (Figura 5, I). Esse resultado pode ser confirmado com o escore microscópico, que diferiu estatisticamente do controle (Tabela 2).



**Fig.5-** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos na fase aguda da doença, após indução de colite por TNBS. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A- Branco; B- Dieta 10%; C- Dieta 20%; D- Controle TNBS, E- Prednisolona (droga de referência), F- Tratados com dieta 10%, G- Tratados com dieta 20%, H- Tratados com dieta 10% + prednisolona, I- Tratados com dieta 20% + prednisolona. (material obtido em objetiva de 10x). M: Mucosa, S: Submucosa.

### **6.3- Parâmetros bioquímicos**

Os fragmentos de cólon foram analisados bioquimicamente para a determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH) e das atividades enzimáticas da mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina (FA). A indução da colite ulcerativa por TNBS foi acompanhada pela depleção nos níveis de glutathiona e aumento da atividade enzimática da mieloperoxidase e fosfatase alcalina (Tabela 3). Os animais colíticos submetidos aos diferentes tratamentos isolados ou em combinação foram capazes de impedir a depleção dos níveis de glutathiona, exceto aqueles apenas tratados com a dieta a 10%. Nenhum dos tratamentos foi capaz de inibir a atividade da mieloperoxidase, no entanto, os tratamentos dos animais colíticos com dieta 10% e tratados com dieta 10% em combinação com a prednisolona foram eficazes em reduzir a atividade da fosfatase alcalina (Tabela 3). O uso das diferentes dietas em animais não-colíticos mostram que não houve nenhuma interferência nos parâmetros avaliados.

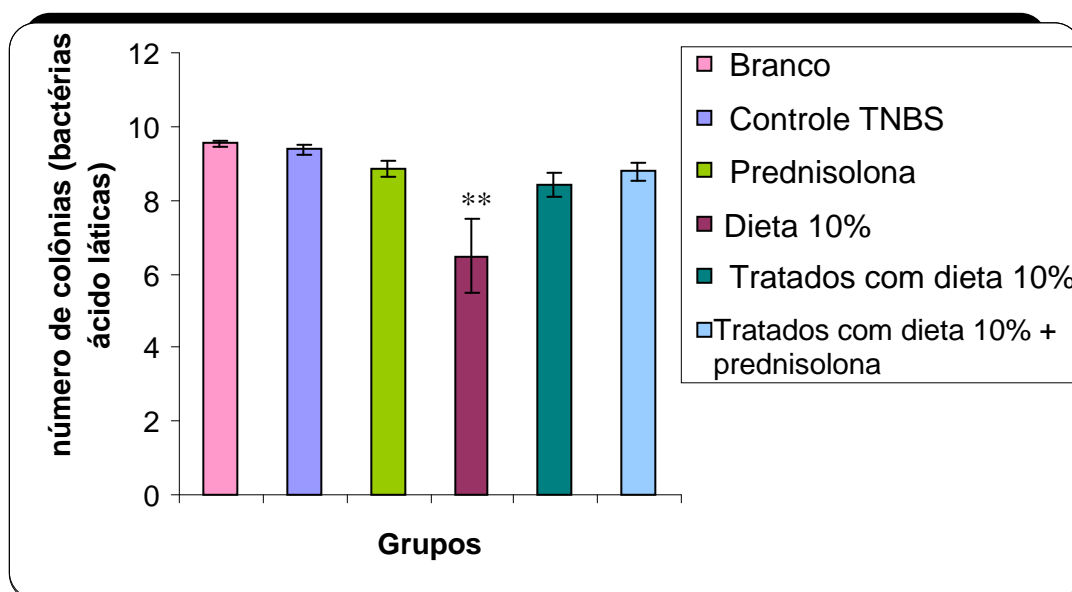
**Tabela 3-** Avaliação dos parâmetros do efeito da dieta enriquecida com banana verde nos animais não-colíticos (Branco, dieta 10% e dieta 20%) e nos animais colíticos (Controle TNBS, prednisolona 5 mg/Kg, tratados com dieta 10%, tratados com dieta 20%, tratados com dieta 10% + prednisolona 5 mg/Kg e tratados com dieta 20% + prednisolona 5 mg/Kg), no conteúdo de glutathiona (GSH), atividade da mieloperoxidase (MPO) e atividade da Fosfatase alcalina (FA) na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.

	GSH	MPO	FA
<b>Branco</b>	2302,29 ± 86,13**	243,66 ± 14,58**	4,040 ± 0,64**
<b>Dieta 10%</b>	2373,46 ± 109,15**	442,14 ± 137,77	2,147 ± 0,22**
<b>Dieta 20%</b>	2278,24 ± 117,27**	223,29 ± 11,69*	5,967 ± 0,46 <sup>++</sup>
<b>Controle TNBS</b>	1794,71 ± 78,63 <sup>++</sup>	526,260 ± 106,97	8,695 ± 1,77 <sup>++</sup>
<b>Prednisolona</b>	2210,06 ± 46,45**	576,07 ± 71,16 <sup>+</sup>	7,275 ± 1,36
<b>Tratados com dieta 10%</b>	2027,92 ± 113,64	729,29 ± 145,61 <sup>++</sup>	3,840 ± 0,79*
<b>Tratados com dieta 20%</b>	2523,23 ± 151,90**	378,03 ± 63,52	9,673 ± 0,88
<b>Tratados com dieta 10% + prednisolona</b>	2257,82 ± 72,11**	605,13 ± 155,24	3,133 ± 0,33**
<b>Tratados com Dieta 20% + prednisolona</b>	2143,73 ± 99,03*	573,74 ± 161,21	6,650 ± 0,89

Os valores são expressos em média ± EPM, \* P<0, 05, \*\* P<0,01, comparado ao grupo controle (colítico) e <sup>+</sup> P<0, 05, <sup>++</sup> P<0,01, comparado ao grupo branco (não-colítico).

## 6.4- Avaliação microbiológica

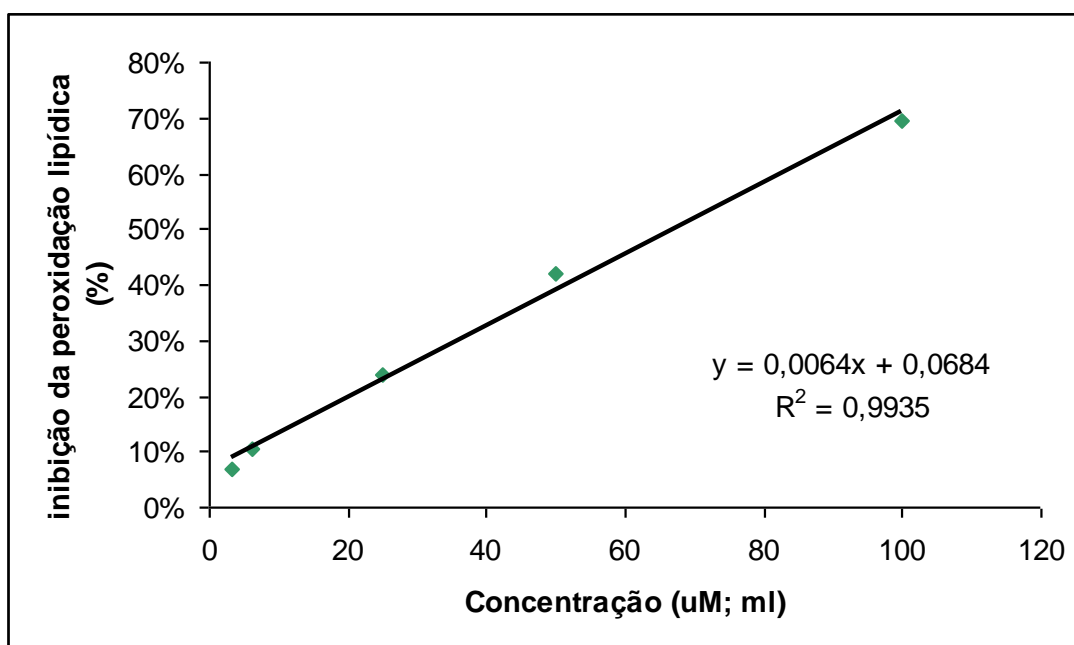
A análise microbiológica para o meio Agar Rogosa, específico para bactérias ácido lácticas (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*), mostrou que nenhum tratamento foi capaz de aumentar o número das bactérias quando comparado ao grupo controle (Figura 6). Curiosamente, o uso da dieta enriquecida a 10% a animais saudáveis promoveu uma redução neste número.



**Fig.6-** Análise microbiológica, testando a dieta enriquecida com banana verde na concentração de 10% em bactérias ácido lácticas no meio Agar Rogosa.

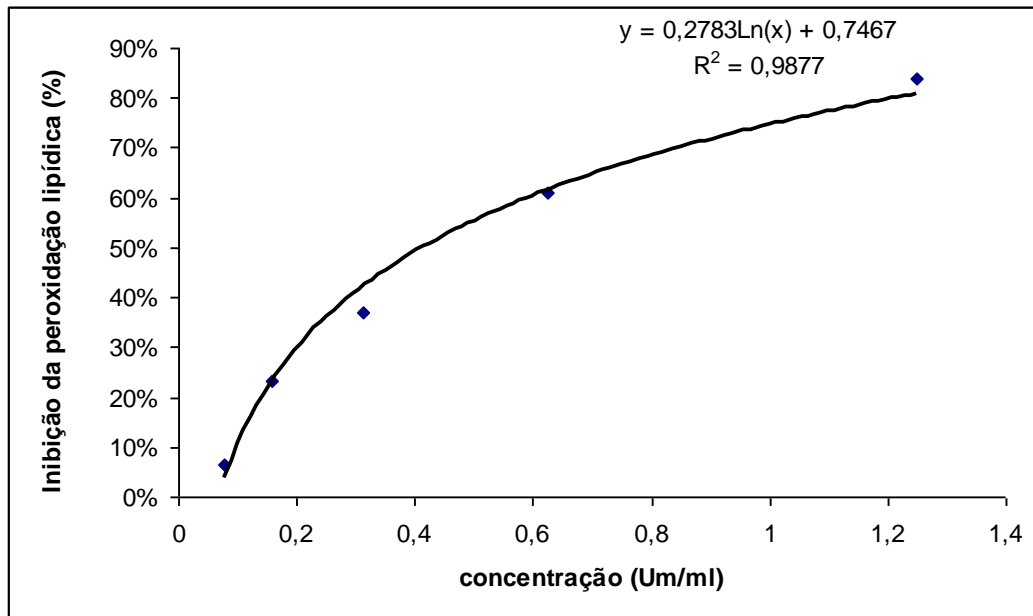
## 6.5- Atividade antioxidante

O extrato de banana verde apresentou atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato induzida por ferro e ácido ascórbico onde a  $IC_{50}$  (concentração inibitória de 50% da peroxidação lipídica) do extrato da banana verde foi de  $67,605 \pm 0,235\mu M$  (Figura 7). No mesmo teste, a quercetina, flavonóide antioxidante usado como referência, apresentou uma  $IC_{50}$  de  $0,4121 \pm 0,001735\mu M$  (Figura 8).



**Fig.7-** Avaliação da atividade antioxidante do extrato de banana verde em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de peroxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e Teitelbaum, 1972, com modificações).





**Fig.8-** Avaliação da atividade da quercetina em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de peroxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e Teitelbaum, 1972, com modificações).

Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU) são as principais doenças englobadas como Doença Inflamatória Intestinal (DII). Apesar de sua etiologia não ser completamente conhecida, a DII se caracteriza por possuir um período crônico, o qual se alterna períodos de remissão com atividade de duração variável. Não existe, até o momento, nenhum tratamento farmacológico definitivo para essas doenças, no entanto os fármacos mais utilizados como forma de tratamento apresentam uma série de efeitos adversos quando utilizados em altas doses ou por períodos prolongados (RANSFORD e LANGMAN, 2002).

Os dados relativos ao tratamento farmacológico das DII indicam, que ao menos no Brasil, a maioria dos pacientes tanto com a DC, quanto com RCU é tratada com corticosteróides, principalmente na fase aguda das doenças, e os aminossalicilatos são utilizados mais freqüentemente nos portadores de RCU que na DC (SOUZA, *et al.*,2002).

Fuster e González-Molero (2007) descrevem a superfície da luz intestinal tendo cerca de 100 trilhões de microorganismos ( $10^{14}$ ), por isso, o intestino se torna um verdadeiro ecossistema essencial para a absorção eficiente de nutrientes e para a manutenção da saúde em geral (FUSTER e GONZÁLEZ-MOLERO, 2007). Possivelmente durante a evolução, os seres humanos foram condicionando o trato gastrointestinal a um aporte diário de bactérias ácido lácticas vivas, essas foram relacionados a diferentes problemas gastrointestinais e imunológicos (FUSTER e GONZÁLEZ-MOLERO, 2007). Na década de 80 incorporou-se o conceito de que certos componentes não digeríveis da dieta poderiam favorecer o crescimento de determinadas cepas de bactérias no intestino que se associam a efeitos benéficos para a saúde (FUSTER e GONZÁLEZ-MOLERO, 2007).

Considerando-se o grande número de evidências que apóiam o papel de bactérias benéficas no trato gastrointestinal (FUSTER E GONZÁLEZ-MOLERO, 2007) e o aumento ou o reforço da barreira da mucosa colônica, esses mecanismos podem ser considerados como papel chave para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais. Há evidências de que a microbiota intestinal desempenha um importante papel na patogênese da retocolite ulcerativa e que sua modulação por meio do uso de prebióticos, probióticos e antibióticos podem ser benéficos no controle da inflamação intestinal (FUKUDA *et al.*, 2002).

Existem diversos modelos para estudar os efeitos de novos fármacos ou produtos para o tratamento das DII, tais como: colite induzida por ácido acético, dextran sulfato de sódio e ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Neste estudo, o modelo de indução por TNBS foi escolhido porque reproduz mais fielmente o que ocorre na doença em humanos, especialmente considerando-se suas características histopatológicas, bioquímicas e clínicas (MORRIS *et al.*, 1989). Neste modelo, a instilação de uma solução alcoólica (etanol 50%) rompe as membranas celulares e o TNBS, agindo como um hapteno, evoca uma resposta imunológica (MORRIS *et al.*, 1989). Este modelo é considerado simples, sem necessidade de cirurgia e de sensibilização prévia, tem uma alta reprodutibilidade e um custo relativamente baixo, quando comparado a outros modelos experimentais (MORRIS *et al.*, 1989). Neste estudo, utilizou-se a menor dose (10mg) de TNBS proposta por Morris *et al.*(1989) e sugerida por Cruz *et al.* (1998), visto que a mesma evoca uma resposta qualitativamente idêntica à dose máxima utilizada de 30mg.

O processo inflamatório induzido pela instilação de 10 mg de TNBS em etanol 50% (v/v) progrediu com características similares àqueles relatados por Di Stasi *et al.* (2004). Na fase aguda do processo inflamatório intestinal, a dieta enriquecida com banana verde produziu redução do escore da lesão nos animais tratados com a dieta enriquecida nas concentrações de 10% e 20%. Este efeito foi acompanhado pela manutenção dos níveis de glutathiona (GSH) que são reduzidos

no processo inflamatório intestinal. Os animais com colite experimental que receberam dieta enriquecida com 20% de banana verde apresentaram ainda uma diminuição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

A mucosa gástrica contém altos níveis de glutathione (Robert, 1984). A GSH é muito importante para a integridade da função e estrutura do intestino visto que animais que não apresentam níveis normais de glutathione apresentam grave degeneração do jejuno e da mucosa colônica, além de apresentarem perda de peso e diarreia (MARTENSSON *et al.*, 1990). A GSH é considerada um importante seqüestrador celular de radicais livres por sua capacidade antioxidante e por ser substrato para a ação de glutathione peroxidase e glutathione transferase. Esse tripeptídeo é essencial na manutenção da integridade da mucosa sendo que a redução de seus níveis está associada às inflamações colônicas em humanos (LAUTERBURG *et al.*, 1988) e na experimentação animal (PAVILICK *et al.*, 2002; GÁLVEZ *et al.*, 1997; SÁNCHEZ de MEDINA *et al.*, 1996; LOGUECIO *et al.*, 1996; BUFFINTON e DOE, 1995).

Considerando-se que a administração de um bloqueador de radicais sulfidrílica a ratos promove inflamação colônica (Loguercio *et al.*, 2003) e que a suplementação com GSH melhora o dano colônico em colite experimental (Ardite *et al.*, 2000), novos compostos que impeçam a redução dos níveis de glutathione caracterizam-se como potenciais no tratamento das DII. De fato, muitos estudos demonstraram que compostos com efeitos antiinflamatórios no modelo de TNBS agem impedindo a depleção de GSH (GÁLVEZ *et al.*, 2006, DI STASI *et al.*, 2004, GONZÁLEZ *et al.*, 2001, CRUZ *et al.*, 2001, OCETE *et al.*, 1998, SANCHÉS de MEDINA *et al.*, 1996) e que a liberação de GSH pelo probiótico *Lactobacillus fermentum* facilita a recuperação do tecido inflamado (PERAN *et al.*, 2007).

A dieta enriquecida com banana verde na concentração de 20% apresentou uma tendência em reduzir a infiltração neutrofílica no ensaio agudo, demonstrada pela menor atividade da enzima

MPO colônica. Os neutrófilos polimorfonucleares (PNMs) têm sido propostos como sendo o principal tipo celular na injúria tecidual em doenças inflamatórias intestinais (DALLEGRI *et al.*, 1990) e em modelos experimentais de colite (WALLACE *et al.* 1992; YAMADA *et al.*, 1991). Seu papel na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias tem se mostrado interessante na descoberta de novos compostos para modular este processo (MIDDLETON Jr. *Et al.*, 2000). Os PNM's produzem peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que é convertido pela enzima MPO em ácido hipoclorídrico (HOCl<sup>-</sup>), um poderoso oxidante. Assim, a redução observada na atividade da enzima MPO colônica indica um menor estresse oxidativo. Compostos com atividade antiinflamatória intestinal tais como morina (GÁLVEZ *et al.*, 2001), curcumina (JIANG *et al.*, 2006), quercitrina (CAMUESCO *et al.*, 2004, SÁNCHEZ de MEDINA *et al.*, 1996) e rutosídeo (CRUZ *et al.*, 1998) também foram capazes de reduzir a atividade enzimática da MPO, assim como, o probiótico *Lactobacillus acidophilus* (PERAN *et al.*, 2006) e os prebióticos: fibra dietária de *Plantago ovata* (RODRIGUES-CABEZAS *et al.*, 2002), glúten de milho (MOCHIZUKI *et al.*, 2010), farelo de centeio e mirtilo desidratado (blueberry husks) (HÅKANSSON *et al.*, 2009).

A dieta enriquecida com banana verde na concentração de 10% e os animais tratados com dieta 10% em combinação com a prednisolona foram capazes de reduzir a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) colônica na fase aguda do processo inflamatório intestinal. A razão para o aumento da atividade da enzima FA colônica encontrado em retocolite ulcerativa é desconhecida, mas essa relação foi demonstrada pela primeira vez por Sánchez de Medina *et al.* (1996) quando relataram que a FA constitui um marcador sensível e seguro de colite experimental em ratos. Posteriormente, Sánchez de Medina *et al.* (2004) demonstraram que em diferentes modelos de colite, caracterizados por estresse oxidativo e infiltração neutrofílica significantes, a atividade da FA estava aumentada e esse aumento foi atribuído a células epiteliais e células da lâmina própria, principalmente leucócitos.

Neste trabalho os resultados obtidos do processo inflamatório mostram que a dieta enriquecida com banana verde não promoveu melhora na função absorptiva colônica, ocorrendo diarreia em todos os grupos tratados tanto nos animais que receberam dieta enriquecida com banana verde a 10% como a 20%. A diarreia é um importante sintoma da doença tanto nos animais como em humanos, e indica uma perda da capacidade absorptiva do cólon, que fica bastante prejudicada durante o processo inflamatório colônico (SANCHÉZ DE MEDINA, et al., 2002).

A restauração da função absorptiva colônica pode contribuir para a melhora da colite experimental, como observado com a administração do probiótico *Bifidobacterium lactis* (PERAN, et al., 2006). Apesar dos animais não terem apresentado melhora quanto a incidência de diarreia, houve uma redução da extensão e severidade da lesão observadas através do escore, principalmente nos animais que receberam tratamento com dieta enriquecida com banana verde na concentração de 10%, assim como na razão entre peso e comprimento colônico.

O peso corporal e o consumo dos animais foram avaliados dia a dia, no entanto, não houve valores significantes estatisticamente. Os animais que foram tratados com a dieta enriquecida com banana verde apresentaram consumo igual ou algumas vezes superior aos animais que receberam ração normal, o que sugere que a dieta enriquecida com banana verde possui sabor palatável para os animais testados.

Segundo Grisham (1994), na análise histológica, a presença de infiltrado inflamatório é acompanhada de lesão na mucosa, aumento da permeabilidade vascular, rompimento da matriz extracelular, edema, dano nas células epiteliais e ulceração. Este estudo revelou que na avaliação microscópica da lesão colônica, somente o grupo tratado com dieta 20% em associação a prednisolona promoveu melhora em quase todos os critérios analisados. De um modo geral, a dieta enriquecida com banana verde promoveu uma diminuição no infiltrado inflamatório e

consequentemente uma menor ulceração. Tais resultados caracterizam a presença de atividade antiinflamatória, para a dieta enriquecida com banana verde nas concentrações de 10% e 20%, efeitos estes que também foram confirmados bioquimicamente, por evitar a depleção nos níveis de glutathione. O processo inflamatório colônico é caracterizado pelo estresse oxidativo, o que debilita as defesas antioxidantes, promovendo uma depleção deste antioxidante endógeno não enzimático.

Neste trabalho, verificou-se uma ação antioxidante da banana verde, dados comprovados por Vijayakumar *et al.* (2008) que estudaram a atividade da banana como um antioxidante. Esses autores enfatizaram que os flavonóides das bananas agem como um efetivo antioxidante. Além de ter um efetivo protetor para o corpo contra o estresse oxidativo. Esses dados também puderam ser comprovados nesse trabalho, revelando que a banana verde é um potente agente antioxidante.

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

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

Quanto a análise microbiana realizada neste estudo não foi possível observar diferença estatística entre os tratamentos e o grupo Controle TNBS. Apesar de a banana conter altos níveis de açúcar, sendo a maioria do tipo: glicose, sacarose e frutose, todas adequadas para fermentação microbiana, neste trabalho não foi possível verificar um aumento do número de bactérias, o qual era esperado. Além disso, a banana contém fruto-oligossacarídeos (FOS), que são considerados importantes produtos promotores da proliferação de bactérias (algumas do tipo ácido lácticas: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) no cólon humano (TSEN *et al.*, 2003). No entanto, nas bananas são encontrados flavonóides, esses possuem muitas atividades biológicas como: antiinflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, anti-trombótica, anti-viral, anti-carcinogênica, ações vasodilatadoras, além de atividade antibacteriana (MIDDLETON Jr. E KANDASWAMI, 2000), sendo que muitas dessas funções biológicas têm sido atribuídas a sua atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres.



Com base nos resultados obtidos e discussões apresentadas, através da realização deste estudo foi possível concluir:

1. A administração da dieta enriquecida com a banana verde nas proporções de 10% e 20% protege o cólon de ratos da colite experimental através de um mecanismo que envolve a diminuição do estresse oxidativo evidenciado com a manutenção dos níveis de glutathione.
2. A administração da dieta enriquecida com a banana verde não aumenta a atividade antiinflamatória intestinal da prednisolona;
3. Os efeitos protetores do tratamento com a dieta enriquecida com a banana verde não estão relacionados com atividade prebiótica.

---

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

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

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

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

BENGMARK, S.; Pre-, pro- and synbiotics. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**;v.4, p.571-579. 2001.

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

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev. Bras. Coloproct.**, v.23, p.172-182, 2003.

BORGES, A.L.; OLIVEIRA, A.M.G.; DA CUNHA COSTA, D.; DE ALMEIDA, C.O.; ALVES, E.J.; COELHO, E.F.; MATSUURA, F.C.A.U.; DA SILVA SOUZA, L. cultura da banana. 2ª ed. Brasília: **Embrapa-SPI**, 1998. 97p. BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **J. Biol. Chem.**, v.164, p. 321-329, 1976.

BUNFFINTON, G.D.; DOE, W.F. Depleted mucosal antioxidant defenses in inflammatory bowel disease. **Free Rad. Biol. Med.**, v.19, p.911-918, 1995.

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

CAMUESCO, D.; PERAN, L.; COMALADA, M.; NIETO, A.; STASI, L.C.D.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, E.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Preventive effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic Acid model of rat colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, 2005.

CHUNG, P.Y.; PEPPERCORN, M.A. Antibiotics in inflammatory bowel disease. *Drugs Today*, v.35, p.89-103, 1999.

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

COLLI, C.; SARDINHA, F.; FILISETTI, T. M. C. C. Alimentos funcionais. In: CUPPARI, L. (Ed). **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar UNIFESP/ Escola Paulista de Medicina:** nutrição clínica no adulto. São Paulo: Manole, 2002. p. 55-70.

CROHN, B.B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G.D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity.. **J. Med.**, v. 67, p. 263- 271, 2000.

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

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

DAMASKOS, D.; KOLIOS, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. **Br. J. Clin. Pharmacol.**; v.65, p. 453–467, 2008.

DA MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; CIACCO, C.; CORDENUNSI, B.R. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. **Starch.** v.52, p.63-68, 2000.

DAVIDSON, M.H.; MCDONALD, A. Fiber: forms and functions. **Nutr. Res.**, v.18, p. 617-624, 1998.

DEWULF, N.L.S. **Investigação sobre a adesão ao tratamento medicamentoso em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais.** Ribeirão Preto, 2005.

DI STASI, L.C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVÉZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, and isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rats colitis. **Planta Med.**, v.70, p.315-320, 2004.

DUNJIC, B.S.; SVENSSON, I.; AXELSON, J.; ADLERCREUTZ, P.; Ar' RAJAB, A.; LARSSON, K.; BENGMARK, S. Green banana protection of gastric mucosa against experimentally induced injuries in rats. A multicomponent mechanism? **Scand. J. Gastroenterol.**, v.28, p.894-898, 1993.

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

FEE, J.A.; TEITELBAUM, H.D. Evidence that superoxide dismutase play a role in protecting red blood cells against peroxidase hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.49, p.150-158, 1972.

FERNÁNDEZ-BAÑARES F., HINOJOSA J., SÁNCHEZ-LOMBRAÑA L., NAVARRO E., MARTÍNEZ-SALMERÓN J.F., GARCÍA-PUGÉS A. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v.94, p. 427-433, 1999.

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

FUKUDA, M.; KANAUCHI, O.; ARAKI, Y.; ANDOH, A.; MITSUYAMA, K.; TAKAGI, K.; TOYONAGA, A.; SATA, M.; FUJIYAMA, Y.; FUKUOKA, M.; MATSUMOTO, Y.; BAMBA, T. Prebiotic treatment of

experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. **Int. J. Mol. Med.**, v.9, p.65-70, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-378, 1989.

FURRIE, E.; MACFARLANE, S.; KENNEDY, A.; CUMMINGS, J.H.; WALSH, S.V.; O'NEIL, D.A. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. **Gut**; v.54, p.242-249, 2005.

FUSTER, O.G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. **Nutr. Hosp.** v.22 Supl.2, p. 26-34, 2007.

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

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

GÁLVEZ, J.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in natural products chemistry: bioactive natural products (Part f)**. Amsterdam: Elsevier. 2001. p.607-649.

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

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. **J Nutr.** v.125, p.1401-1412, 1995.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scand. J. Gastroenterol.** v.31 Suppl 220, p.83-86, 1996.

GRISHAM, M.B.; SPECIAN, R.D.; ZIMMERMAN, T.E.; **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.271, p.1114-1121, 1994.

HÅKANSSON, A.; BRÄNNING, C.; ADAWI, D.; MOLIN, G.; NYMAN, M.; JEPSSON, B.; AHRNÉ, S. Blueberry husks, rye bran and multi-strain probiotics affect the severity of colitis induced by dextran sulphate sodium. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.44, p.1213-1225, 2009.

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

HANAUER, S.B.; Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. **Inflam. Bowel. Dis.**; v.12, p. S3-S9, 2006.

HENDRICKSON, B.A.; GOKHALE, R.; CHO, J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin. Microbiol. Rev.** v.15, p.79-94, 2002.

HIGA, A.; MCKNIGHT, W.; WALLACE, J.L. Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. **Eur. J. Pharmacol.**, v.239, p.171-176, 1993.

JEWELL, D.P. Ulcerative colitis. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B.F.; SLEISENGER, M.H. Eds. 6t Philadelphia, WB Saunders Co. 1998.

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

KATZ, J.A.; ITOH, J.; FIOCCHI, C. *Curr. Opin. Gastroenterology*, v.15, p.291-297, 1999.

KIRSNER, J.B. Inflammatory bowel disease at the University of Chicago- the first 50 years: some personal reflections. **Am. J. Gastroenterol.**, v.80, p. 219-226, 1985.

KNIGGE, K.L. Inflammatory bowel disease. [review]. **Clin. Cornerstone**, v.4, p.49-60, 2002.

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

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

LOFTUS JR.; E.V.; SILVERSTEIN, M.D.; SANDBORN, W.J.; TREMAINE, W.J.; HARMSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R. Ulcerative colitis in Olmsted Country, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence and survival, **Gut**, v.46, p. 336-343, 2000.

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

LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, C.G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Dig. Liver Dis.**, v.35, p.635-641, 2003.

LUQUE-ORTEGA, J.R.; MARTÍNEZ, S.; SAUGAR, J.M.; ISQUIERDO, L.R.; ABAD, T.; LUIS, J.G.; PIÑERO, J.; VALLADARES, B.; RIVAS, L. Fungus-Elicited Metabolites from Plants as an Enriched Source for New Leishmanicidal Agents: Antifungal Phenyl-Phenalenone Phytoalexins from the Banana Plant (*Musa acuminata*) Target Mitochondria of *Leishmania donovani* Promastigotes. **Amer. Soc. for Microbiol.**, v.48, p.1534-1540, 2004.

MACDERMOTT, R.P. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease **J. Gastroenterol.**, v.31, p.907-916, 1996.

MARTENSSON, J.; JAIN A, MEISTER A. Glutathione is required for intestinal function. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, p.1715-1724, 1990.

MARTI DEL MORAL, A.; MORENO-ALIAGA, M.J.; MARTÍNEZ-HERNANDEZ, A. efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. Una revisión. **Nutri. Hosp.** v.18, p.181-188, 2003.

MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacol. Rev.** v.52, p.673-751, 2000.

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

MOCHIZUKI, M.; SHIGEMURA, H.; HASEGAWA, N. Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysate of corn gluten in an experimental model of colitis. **J. Pharm. Pharmacol.** v.62, p.389-392, 2010.

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

MORRISON, G.; HEADON, B.; GIBSON, P. update in inflammatory bowel disease. **Austr. Family. Phys.,** v.38, 2009.

MORTENSEN, P.B.; CLAUSEN, M.R. short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scand. J. Gastroenterol.,** v.31,p.132S-148S, 1996.

MUIR, I.G.; YOUNG, G.P.; O'DEA, K.; CAMERON-SMITH, D.; BROWN, I.L.; COLLIER, G.R. Resistant starch- the neglected dietary fiber? Implications for health. **Diet.. Fiber Bibliogr. Rev.,** v.1, p.33-47, 1993.

OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; CRESPO, M.E.; CRUZ, T.; GONZALEZ, M.; TORRES, M.I.; ZARZUELO, A. Effects of morin on experimental modelo f acute colitis in rats. **Pharmacology.,** v.57, p.261-270, 1998.

PATZ, J.; JACOBSON, W.Z.; GOTTSCHALK-SABAG, S.; ZEIDES, S.; BRAVERMAN, D.Z. Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. **Am. J. Gastroenterol.,** v.91, p.731-734, 1996.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Rad. Biol. Med.,** v.33, p.311-322, 2002.

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

PERAN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M; BAILON, E.; HERIKSSON, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. **J. Appli. Microbiol.,** p. 836-844, 2007.

- PODOLSKY, D. K.; Inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 16, p.295-296, 2000.
- RABBANI, G.H.; TEKA, T.; ZAMAN, B.; MAJID, N.; KHATUN, M.; FUCHS, G.J. Clinical studies in persistent diarrhea: dietary management with green banana or pectin in Bangladeshi children, **Gastroenterology**, v. 121, p. 554-560, 2001.
- RABBANI, G.H.; AHMED, S.; HOSSAIN, I.; ISLAM, R.; MARNI, F.; AKHTAR, M.; MAJID, N. Green banana reduces clinical severity of childhood shigellosis: a double-blind, randomized, controlled clinical trial. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.28, p. 420-425, 2009.
- RANSFORD, R.A.J.; LANGMAN, M.J.S. sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the committee on safety of medicines. **Gut**, v.51, p.536-539, 2002.
- REMBACKEN, B.J.; SNELLING, A.M.; HAWKEY, P.M.; CHALMERS, D.M.; AXON, A.T.R. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. **Lancet**, v.354, p. 635-639, 1999.
- ROBERT, A.; EBERLE, D.; KAPLOWITZ, N. Rule of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. **Am. Physiological. Soc.**, v.193, p.1857-1884, 1984.
- RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; GÁLVEZ, J.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; CAMUESCO, D.; AZZOUZ, S. Dietary Fiber Down-Regulates Colonic Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Nitric Oxide Production in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitic Rats. **J. Nutr.**, v.132, p.3263-3271, 2002.
- ROEDIGER, W.E.; NANCE, S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.67, p.773-782, 1986.
- ROLLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis modulates intestinal immune functions in rats. **J. Nutr.**; v.134, p. 153-156, 2004.
- SANCHÉZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercetrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.278, p.771-779, 1996.
- SANCHÉZ DE MEDINA F.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; NIETO, A.; GÁLVEZ, J. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochem. Pharmacol.**, v.68, p. 2317-2326, 2004.
- SANCHÉZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercetrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sci.**, v.70, p. 3097-3108, 2002.
- SHANAHAN, F. Probiotics in inflammatory bowel disease- therapeutic rationale and role. **Drug Deliv.** v.56, p. 809-818, 2004.
- SMITH, P.D.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H. Measurement of protein using BCA. **Anal. Biochem.** v.150, p.76-85, 1985.

SOUZA, M.H.; TRONCON, L.F.; RODRIGUES, C.M.; VIANNA, C.F.; ONOFRE, P.H.; MONTEIRO, A. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in an university hospital in the southeastern Brazil. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, p.98-105, 2002.

SPERTI, G.S. Probiotics. Avi Publishing Co.; West Point, CT., 1971.

STEIN, R.B.; HANAUER, S.B. *Drug Saf.*, v.23, p.429-448, 2000.

STENSON, W. Inflammatory bowel disease. In: YAMADA, T.; ALPES, D.; CHUNG, O. (Eds.) **Textbook of gastroenterology**. Filadélfia: JB Lippincott. v.1, 1995, p. 1754-1757

STOBER, W. Ann. N.Y. **Acad. Sci.**, v.859, p.37-45, 1998.

STOCKS, J.G.; GUTTERIDGE, J.M.C.; DORMANDY, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. Clin. **Sci. Mol. Med.**, v.47, p.215-222, 1974.

STONEROOK, M.J.; TEFEND, K.S.; SHARMA, U.M.; PECK, O.C.; WOOD, J.D. Faecal short-chain fatty acids associated with inflammation in cotton-top tamarin model for idiopathic colitis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, p.618-624, 1996.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat. Res.**, v.579, p.200-213, 2005.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A. PASSOS, A.D.C.; MARTINELLIA, A.L.C.; MENEGHELLI, E.U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerative idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudoeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, 2002.

TSEN, J.H.; LIN, Y.P.; KING, V.A.E. Bnana puree fermentation by *Lactobacillus acidophilus* immobilized in Ca-alginate. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.49, p.357-361, 2003.

TUIN, A.; POELSTRA, K.; JAGER-KRIKKEN, A.; BOK, L.; RAABEN, W.; VELDERS, M.P.; DIJKSTRA, G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. **Gut.**, v. 58, p.379-387, 2009.

VENTURI, A.; GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; JOHANSSON, R.; ZUCCONI, E.; BRIGIDI, P.; MATTEUZZI, D.; CAMPIERI, M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.13, p.1103-1108, 1999.

VERNIA, P.; GNAEDINGER, A.; HAUCK, W.; BREUER, R.I. Organic anions and the diarrhoea of inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.33, p.1353-1358, 1988.

VICTORIA, C.R.; SASSAKI, L.Y.; NUNES, H.R.C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in Midwestern of São Paulo state, Brazil. **Arq. Gastroenterol.**, v.46, p.20-25. 2009.

VIJAYAKUMAR, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia.**, v.79, p.279-282, 2008.



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

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

YAMADA, T., FIJIMOTO, K., TSO, P. FIJIMOTO, T., GAGINELLA, T.S.; GRISHAM, M.B. Misoprostol accerelates colonic mucosal repair in acetic acid-induced colitis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.260, p.313-318, 1992.

YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v.13, p.1893-1896, 2007.

ZALTMAN, C. Doença inflamatória Intestinal: qual a relevância da doença no Brasil? Cad. **Saúde Pública**, v.23, p.992-993, 2007.