

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa* sp AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

**ERIKA FERREIRA COSTA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI**



Botucatu, SP

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências**

***Campus* Botucatu, SP**

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa* sp AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

**ERIKA FERREIRA COSTA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Botucatu, SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRE 8/7500

Costa, Erika Ferreira.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa sp* AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos / Erika Ferreira Costa. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Banana. 2. Intestinos - Doenças. 3. Doenças inflamatórias intestinais. 4. Stress oxidativo. 5. Muco. 6. Musáceas.

Palavras-chave: Banana prata; Doença inflamatória intestinal; Estresse oxidativo; Muco; *Musa sp* AAB.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências**  
***Campus Botucatu, SP***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Erika Ferreira Costa

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa sp* AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

**BANCA EXAMINADORA**

**1º Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi**

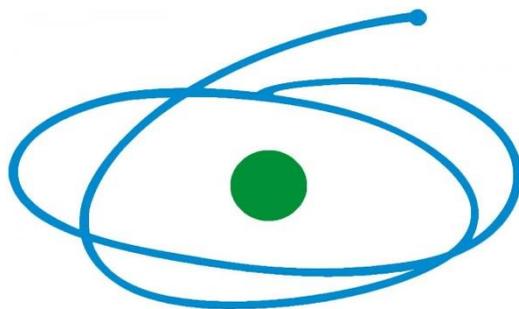
*Professor Titular no Departamento de Farmacologia /Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu – SP*

**2º Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez**

*Professor Livre docente no Departamento de Cirurgia/Faculdade de Medicina – USF, Bragança Paulista – SP*

**3º Profa. Dra. Fabiana Gaspar González**

*Professora no Centro Universitário Lusíada – UNILUS, Santos - SP*



**C A P E S**

(Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior)



(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)

*“E o fim é belo incerto, depende de como você vê o novo, o credo,  
a fé que você deposita em você...e só.”*

*Fernando Anitelli*

## *Dedicatória*

---

*Aos meus pais Lourdes e Cleone,  
em reconhecimento a todos os esforços que fizeram e fazem,  
diariamente, para que eu e meu irmão sejamos pessoas de bem.  
Obrigada por serem a razão de tudo isso, sem vocês eu nada seria.  
A vocês todo o meu amor e minha eterna gratidão.*

*“Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço  
que envolve, palavra que conforta,  
silêncio que respeita (...)”*

*Cora Coralina*

*Ao meu namorado Higor,  
por ser meu porto seguro, meu descanso em meio à loucura, por  
acreditar em mim mais do que eu mesma e  
por compreender minhas ausências.*

*“Só você para dar à minha vida direção, o tom,  
a cor, me fez voltar a ver a luz.  
Estrela no deserto a me guiar,  
farol no mar da incerteza...”*

*Guilherme Arantes*

## *Agradecimentos*

---

Aos colegas de laboratório Lesvi, Késsien, Aline, Luiz, Vinícius, Cristiane, Ana Elisa, Tainan, Celso, Alexandre Tanimoto, Alexandre Silveira e Ariane pelas conversas, convivência e auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos também colegas de laboratório Patrícia, Fernanda, Elisa, Eduardo, Priscila e Michelle pela agradável convivência.

À Lesvi, pela amizade sincera e verdadeira, por dividir comigo todas as angústias, alegrias e planos futuros.

À Késsien, pelo companheirismo durante a realização das nossas análises bioquímicas e microscópicas.

À Aline, por todo o conhecimento transmitido, por estar sempre disposta a sanar minhas dúvidas e pela gentileza com a qual sempre me tratou.

À Tainan, por ter me recebido gentilmente em sua casa em minhas primeiras visitas à Botucatu e por ter cedido seu desenho da espécie *Musa* sp que ilustra este trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências, UNESP, especialmente à Janete Teixeira, Paulo César Mioni, Luiz de Oliveira, Hélio Kushima e Ana Cristina Múrcia, pela ajuda nos momentos em que se fez necessário.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, especialmente ao Davi Müller, por serem tão solícitos e prestativos.

A todos os funcionários da UNIPEX, pelo auxílio durante o preparo das rações.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, por todos os conhecimentos transmitidos.

À CAPES pela bolsa de Mestrado.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Ao Professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi,  
pela orientação e por ter me recebido em seu laboratório mesmo sem me conhecer,  
confiando em mim e no meu trabalho.  
Agradeço pelas conversas e críticas que me fizeram querer ser melhor.*

## Prólogo

---

### Formação:

Graduação em Ciências Biológicas (2011-2015), modalidades Licenciatura e Bacharelado, pela Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Pontal, Ituiutaba – MG.

### Atividades realizadas durante o Mestrado (2016-2018):

#### 1. Disciplinas cursadas

Disciplinas cursadas	Ano	Carga Horária	Conceito
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	2016	45	A
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2016	45	A
Metodologia e Redação Científica	2016	45	A
Plantas Mediciniais Abordagens de Estudo Interdisciplinar	2016	90	B
Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina	2016	30	A
Prática de Ensino em Farmacologia	2016	60	A
Farmacologia e Sociedade	2017	45	A
Farmacologia e Sociedade	2017	45	A
Mediadores da Resposta Inflamatória	2017	45	A
Genética Bacteriana I	2017	60	B
<b>Total</b>		<b>510 h</b>	

#### 2. Participação em eventos científicos:

- XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017)
- VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP, Botucatu – SP (2017)
- XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016)
- XII Workshop de Plantas Mediciniais de Botucatu, Botucatu – SP (2016)
- Simpósio de Ética e Integridade na Pesquisa, Araraquara – SP (2016)

#### 3. Trabalhos apresentados em Eventos Científicos:

- **Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de *Musa sp* AAB (Banana Prata) no Modelo de Indução por TNBS'**, na forma oral. **Autores:** COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017).
- **Avaliação da Atividade Anti-inflamatória da *Cnidocolus aconitifolius* no modelo Experimental de Doença Inflamatória Intestinal.** **Autores:** DALMAU, L. M.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; MORI, C.; CURIMBABA, T. S. F.; DI STASI, L. C. XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017).
- **Implantação de um Horto de plantas medicinais: conexão entre os saberes,** na forma de pôster. **Autores:** COSTA, E. F.; SILVA, W. C.; NOGUEIRA, L. M.; SANTOS, W. L.; ALVES, K. C. H.; SANTOS, G. B.; PALHETA, J. C. B.; POVH, J. A. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da farinha dos frutos de *Musa spp* AAB,** na forma de pôster. **Autores:** COSTA, E. F.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- **Avaliação da atividade antioxidante e dos compostos secundários de *Hibiscus esculentus* L.,** na forma de pôster. **Autores:** OLIVA, K. R. S.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- **Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como potencial protetor da inflamação intestinal,** na forma de pôster. **Autores:** CURIMBABA, T. F. S.; WITAICENIS, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; TANIMOTO, A.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).
- **Caracterização fitoquímica, quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante do fruto verde de *Musa spp* AAA.,** na forma de pôster. **Autores:** MORI, C.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R.

S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; STASI, L. C. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Belo Horizonte – MG (2016).

#### **4. Prêmios**

- Premiação em 1º lugar pela apresentação do trabalho “Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de *Musa* sp AAB (Banana Prata) no Modelo de Indução por TNBS” na forma oral. **Autores: COSTA, E. F.**; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”, Araraquara – SP (2017).

#### **5. Formação complementar:**

##### **Minicursos:**

- Bioensaios Aplicados ao Estudo de Plantas Mediciniais, na XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos, Araraquara – SP (2017)
- Jardins Sensoriais, no XII Workshop de Plantas Mediciniais de Botucatu - Plantas Mediciniais e suas fronteiras: tradição e tecnologia, Botucatu – SP (2016)

##### **Workshops:**

- Seminário “Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil e obter melhores resultados (2016)
- Técnicas de Centrifugação Hettich: Princípios e Aplicações (2016)

#### **6. Colaboração em outros projetos de Pesquisa**

- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do óleo de *Bertholletia excelsa* Bonpl.
- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com quiabo (*Hibiscus esculentus*) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos
- Avaliação das propriedades anti-inflamatórias de *Cnidioscolus aconitifolius* no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos
- Efeitos da dieta enriquecida com os frutos de *Euterpe oleraseae* Mart. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS

## 7. Outras atividades

- Membro da comissão organizadora do VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP, Botucatu – SP (2017)
- Visita técnica monitorada no Laboratório de Análises *In Vitro* e *Ex Vivo* da empresa Chemyunion (Sorocaba – SP), totalizando 30 horas. A visita teve como objetivo o acompanhamento da rotina de cultivo de células humanas e de linhagens, a fim de obter conhecimento para implantação da técnica no laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia – FitoFarmatec/IBB-UNESP (Julho, 2017).
- Participação na elaboração da disciplina intitulada ”Drogas: Ciência, Cultura e Sociedade” oferecida aos cursos de Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado), Nutrição, Física Médica e Biomedicina. Nesta disciplina a mestranda ministrou uma aula com duração de 2 horas sobre a temática “Cafeína” para uma turma de aproximadamente 35 alunos.

## RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença inflamatória crônica e idiopática do intestino que inclui duas doenças distintas: a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa. Os pacientes acometidos pela DII podem sofrer de dor abdominal, diarreia e de outros sintomas socialmente inaceitáveis que comprometem sua qualidade de vida. Embora exista uma grande quantidade de fármacos destinados ao tratamento da DII, fatores como o alto custo de aquisição, os efeitos colaterais e o fato de uma parte dos pacientes não responderem inicialmente ao tratamento, têm despertado o interesse de pesquisadores na busca de novas abordagens de tratamento para a doença. Uma das alternativas é a utilização de produtos naturais com propriedades antioxidante e/ou imunomoduladora, assim como de produtos que possam modular a microbiota intestinal, prevenindo recidivas ou complementando o tratamento de pacientes acometidos pela DII. Com base nisso, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com a farinha de banana nanica verde (*Musa sp AAA*) demonstraram que a espécie apresentou um efeito anti-inflamatório intestinal. Considerando a similaridade química, a espécie *Musa sp AAB* (banana prata) foi selecionada para a realização do presente estudo. As bananas são ricas em fibras, amido resistente e fenóis, além de apresentarem alto valor nutricional por serem excelentes fontes de potássio, cálcio, fósforo e vitaminas A, B e C. De forma geral, as bananas apresentam atividades anti-diarreica, antiulcerogênica, antimicrobiana, hipoglicemiante, antioxidante, anti-hipertensiva e diurética, sendo que a variedade *Musa sp AAA* aumentou a produção de AGCCs provavelmente por produzir efeitos prebióticos devido a presença de fibras e amido resistente em sua composição. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa sp AAB*) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Para isso, a farinha de banana prata verde foi incorporada nas proporções de 5% e 10% na dieta de ratos machos *Wistar* por 28 dias antes e 7 dias após a indução do processo inflamatório intestinal. Após a morte dos animais, ocorrida no 35º dia, foram realizadas análises macroscópicas, microscópicas e bioquímicas. Neste trabalho também foi realizada uma prospecção fitoquímica do extrato etanólico 70% da farinha de banana prata verde, e avaliado o teor de fenóis totais presente nesse extrato e sua atividade antioxidante por dois diferentes métodos. Os resultados mostraram a presença de fenóis, taninos e saponinas no extrato da farinha de *Musa sp AAB*, e demonstrou que nos métodos *in vitro* utilizados, a farinha teve discreta atividade antioxidante. Contudo, *in vivo* a dieta enriquecida com o produto foi capaz de evitar a depleção de glutathiona colônica, além de reduzir a extensão da lesão causada pela instilação do TNBS, diminuir a ocorrência de aderência entre o intestino e os órgãos adjacentes e evitar a depleção de muco no epitélio e lúmen intestinal. Assim, o presente estudo demonstrou que a dieta enriquecida com farinha de banana prata verde nas concentrações de 5% e 10% melhora o processo inflamatório intestinal devido sua propriedade antioxidante, que está provavelmente relacionada ao seu conteúdo de compostos antioxidantes, fibras e amido resistente.

Palavras-chave: Banana prata; *Musa sp AAB*; Doença Inflamatória Intestinal; Muco; Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic and idiopathic inflammation of gastrointestinal tract that comprises two major disorders: Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Patients affected by IBD may suffer abdominal pain, diarrhea and other socially unacceptable symptoms that compromise their quality of life. Although there are a large number of drugs for the treatment of IBD, factors such as the high cost of acquisition, side effects and the fact that many patients do not respond initially to the available treatment, have aroused the interest of researchers to evaluate new therapeutic approaches to disease. One of these alternatives is the use of natural products with antioxidant and/or immunomodulatory properties, as well as products which can modulate the intestinal microbiota, preventing relapses or complementing patient treatments. Based on this, our research group conducted studies with green dwarf banana flour (*Musa* sp AAA) and demonstrated its intestinal anti-inflammatory effect. Bananas are rich in fiber, resistant starch and phenols, and have high nutritional value as they are excellent sources of potassium, calcium, phosphorus and vitamins A, B and C. Generally, bananas present antidiarrheal, antiulcerogenic, antimicrobial, hypoglycemic, antihypertensive, antihypertensive and diuretic activities. Indeed, *Musa* sp AAA variety increased the production of SCFAs probably because they produce prebiotic effects due to the presence of fibers and resistant starch in its composition. Considering the chemical similarity, *Musa* sp AAB (green dwarf prata) was selected in the present study to evaluate the intestinal anti-inflammatory activity of the diet enriched with poovan green banana flour (*Musa* sp AAB) in the experimental model of intestinal inflammation induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in rats. Green dwarf prata flour was incorporated in concentrations of 5% and 10% in the diet of male *Wistar* rats for 28 days before and 7 days after induction of intestinal inflammation by TNBS. The animals were killed on the 35th day and macroscopic, microscopic, biochemical and microscopic analysis were performed. Phytochemical prospection of ethanol extract 70% of banana green flour was also performed and the total phenol content present in this extract and its antioxidant activity were evaluated by two different methods: 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and lipid peroxidation in membranes of rat brains. The results showed the presence of phenols, tannins and saponins in the *Musa* sp AAB flour extract, and a low antioxidative potential in *in vitro* methods used. However, enriched diet showed protective and anti-inflammatory effects *in vivo*, evidenced by reduction of lesion extension induced by inflammation and occurrence of adhesion between intestine and adjacent organs. Diets were also able to prevent depletion of glutathione and mucus in the colon, improving oxidative stress generated during the inflammatory process. Thus, the present study demonstrated that diets enriched with green banana flour at 5% and 10% concentrations improve intestinal inflammatory process due to its anti-inflammatory and antioxidant effects, which may be associated to its chemical composition.

Key-words: Dwarf prata; *Musa* sp AAB; Inflammatory bowel disease; Mucus; Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Preparo da farinha dos frutos verdes de <i>Musa</i> sp AAB.....	12
<b>Figura 02:</b> Esquema representativo do Delineamento Experimental seguido.....	18
<b>Figura 03:</b> Avaliação de parâmetros bioquímicos em animais submetidos à inflamação intestinal induzida por TNBS.....	30
<b>Figura 04:</b> Efeito da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde ( <i>Musa</i> sp AAB) nas proporções de 5 e 10% no escore microscópico, segundo Stucchi et al. (2000).....	31
<b>Figura 05:</b> Fotomicrografias do epitélio intestinal de ratos dos diferentes grupos experimentais sete dias após a indução do processo inflamatório por TNBS.....	32
<b>Figura 06:</b> Fotomicrografias do epitélio intestinal de ratos dos diferentes grupos experimentais sete dias após a administração de TNBS, indicando a presença de muco.....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Principais ingredientes presentes na dieta oferecida aos ratos.....	17
<b>Tabela 02:</b> Critérios de avaliação da severidade e da extensão da lesão cólica, segundo Bell et al. (1995) .....	20
<b>Tabela 03:</b> Critério de avaliação microscópica de lesão cólica segundo Stucchi et al (2000).....	22
<b>Tabela 04:</b> Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico 70% de <i>Musa sp</i> AAB.....	25
<b>Tabela 05:</b> Determinação do teor de fenóis totais e da atividade antioxidante do extrato etanólico 70% de <i>Musa sp</i> AAB.....	27
<b>Tabela 06:</b> Consumo de alimento, peso corpóreo inicial, peso corpóreo final e ganho de peso de ratos saudáveis, com inflamação intestinal induzida e com inflamação induzida que receberam dietas enriquecidas com farinha de banana prata verde a 5% ou 10% por 35 dias.....	27
<b>Tabela 07:</b> Efeito da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde ( <i>Musa sp</i> AAB) nas proporções de 5 e 10% no escore macroscópico, extensão da lesão e relação peso/comprimento no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.....	28

## LISTA DE ABREVIATÖES

**AIEC:** *Escherichia coli* aderente invasiva

**AGCCs:** Ácidos Graxos de Cadeia Curta

**ALFAC:** Álcool 80%, Formaldeído 40% e Ácido Acético

**CAT:** Catalase

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**DII:** Doença Inflamatória Intestinal

**DC:** Doença de Crohn

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

**DTNB:** Ácido Ditiobisnitrobenzóico

**EAG:** Equivalente de Ácido Gálico

**EROS:** Espécies Reativas de Oxigênio

**FA:** Fosfatase Alcalina

**FT:** Fenóis Totais

**GSH:** Glutathiona

**GSR:** Glutathiona Redutase

**GSSG:** Glutathiona Oxidada

**HE:** Eosina-hematoxilina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrogênio

**HTAB:** Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

**IC<sub>50</sub>:** Concentração Inibitória 50%

**IL:** Interleucina

**MDA:** Malondialdeído

**MPO:** Mieloperoxidase

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reduzida

**NF-κB:** Fator Nuclear Kappa B

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Superóxido

**•OH:** Radical Hidroxila

**RCU:** Retocolite Ulcerativa

**RPM:** Rotação por minuto

**SOD:** Superóxido Dismutase

**TCA:** Ácido Tricloroacético

**TGI:** Trato Gastrointestinal

**TNBS:** Ácido Trinitrobenzenosulfônico

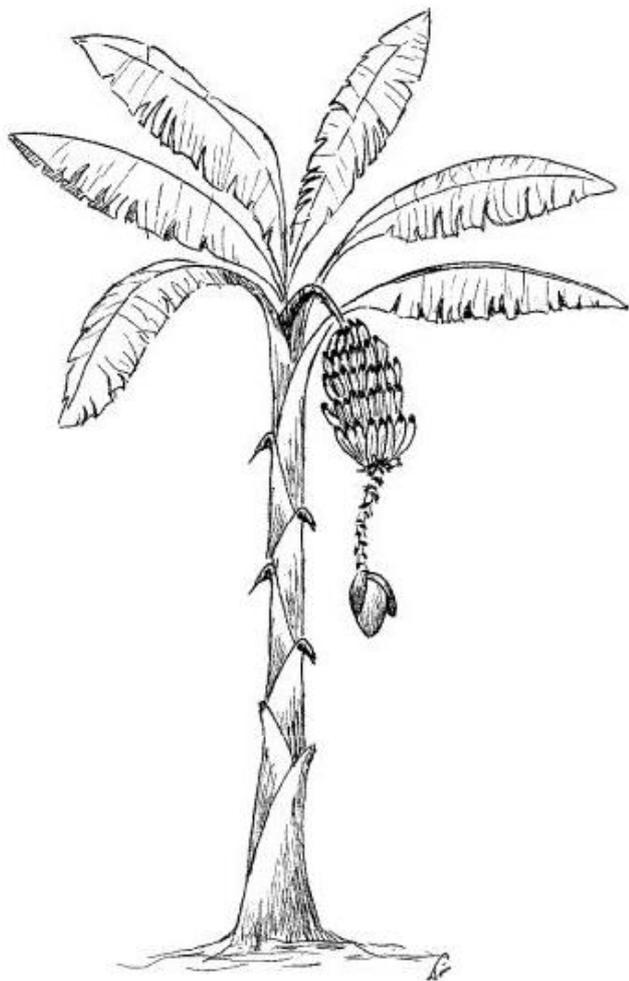
**TNF:** Fator de Necrose Tumoral

**UNIPEX:** Unidade de Pesquisa Experimental

## SUMÁRIO

Introdução .....	1
Objetivo .....	11
Material e Métodos .....	12
1. Material Vegetal e preparo da farinha de <i>Musa</i> sp AAB .....	12
2. Caracterização fitoquímica da farinha de <i>Musa</i> sp AAB .....	13
2.1. Avaliação qualitativa do extrato etanólico 70% .....	13
2.2. Avaliação quantitativa do teor de Fenóis Totais (FT) .....	13
2.3. Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH .....	14
2.4. Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebros de ratos .....	15
3. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal .....	16
3.1. Animais .....	16
3.2. Preparo da ração .....	16
3.3. Grupos experimentais .....	17
3.4. Delineamento Experimental .....	18
3.5. Indução do processo inflamatório intestinal .....	19
3.6. Avaliação macroscópica do processo inflamatório intestinal .....	20
3.7. Avaliação microscópica do processo inflamatório intestinal .....	20
3.8. Análises bioquímicas .....	22
3.8.1. Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO).....	23
3.8.2. Determinação do conteúdo de Glutathiona total (GSH) .....	23
3.8.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da enzima Fosfatse Alcalina (FA) .....	24
4. Análises estatísticas .....	24
Resultados .....	25
1. Caracterização fitoquímica da farinha de <i>Musa</i> sp AAB .....	25
2. Atividade antioxidante do extrato etanólico da farinha de <i>Musa</i> sp AAB.....	26
3. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal .....	27
3.1. Avaliações Macroscópicas .....	27
3.2. Avaliações Bioquímicas .....	28
3.3. Avaliações Microscópicas .....	31

Discussão .....	35
Conclusão .....	43
Referências Bibliográficas .....	44
Anexo .....	52



## INTRODUÇÃO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença inflamatória crônica e idiopática do intestino que inclui duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Diferentemente de outras desordens inflamatórias que afetam o trato gastrointestinal, a DII ainda apresenta etiologia pouco elucidada (FIOCCHI, 1998; NI et al., 2017), no entanto sabe-se que o desenvolvimento desta grave doença é de origem multifatorial e está associado a fatores genéticos, ambientais e a uma desordem do sistema imune (ANANTHAKRISHNAN, 2015; FIOCCHI, 1998).

A DII pode ser considerada uma doença associada ao estilo de vida moderno e tem as maiores taxas de incidência em países desenvolvidos (SHEEHAN; SHANAHAN, 2016). Estima-se que a DII afete cerca de 1,5 milhão de pessoas nos Estados Unidos da América, 2 milhões na Europa e várias centenas de milhares em todo o mundo (ANANTHAKRISHNAN, 2015). No Brasil, especificamente, estima-se que a taxa de incidência da DC e RCU sejam de 3,5 e 4,48 para cada 100.000 habitantes, respectivamente (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009).

Os pacientes acometidos por essa doença podem sofrer de dor abdominal, diarreia e de outros sintomas socialmente inaceitáveis que expõem esses indivíduos a situações constrangedoras e interferem em sua qualidade de vida (BOUMA; STROBER, 2003; MOURA et al., 2015).

Embora a DC e a RCU apresentem características clínicas e patológicas em comum, acredita-se que os principais processos patológicos dessas doenças sejam distintos (BOUMA; STROBER, 2003). A DC pode comprometer qualquer porção do trato gastrointestinal (TGI), desde a boca até o ânus, apresentando-se, normalmente, de forma descontínua com a presença de segmentos de tecido íntegro entre as áreas afetadas (BOUMA; STROBER, 2003). É uma doença tipicamente caracterizada por uma inflamação transmural, densa infiltração de neutrófilos e macrófagos, fissuras e

granulomas que conduzem, frequentemente, a formação de fístulas e abscessos (BOUMA; STROBER, 2003; LIU et al., 2015; MIYOSHI; CHANG, 2016). A taxa de incidência da DC varia entre 0-20 e entre 0,3-12,7 para cada 100.000 habitantes na América do Norte e na Europa, respectivamente (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Já a RCU envolve exclusivamente o cólon, atingindo o reto e podendo se estender de forma ascendente e contínua. A RCU atinge camadas superficiais da mucosa e é caracterizada pela infiltração de neutrófilos e outros granulócitos, bem como pela perda de células caliciformes (BOUMA; STROBER, 2003). Sua incidência varia de 0 a 19,2 e de 0,6 a 24,3 para cada 100.000 habitantes na América do Norte e na Europa, respectivamente (ANANTHAKRISHNAN, 2015).

A DII é resultado da interação de uma série de fatores, e sabe-se que fatores isolados não são suficientes para promover seu desenvolvimento (FIOCCHI, 1998). Um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento da DII é a composição da microbiota intestinal. A microbiota intestinal humana é formada por trilhões de microrganismos e seu metabolismo é qualitativamente e quantitativamente similar ao de um órgão (SIVAPRAKASAM; PRASAD; SINGH, 2016). Estima-se que exista cerca de 1.000 diferentes espécies de bactérias no lúmen intestinal, que pertencem predominantemente aos filos Firmicutes (gram-positivas) e Bacteroidetes (gram-negativas), e em menor proporção aos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria e Verrucomicrobia (SIVAPRAKASAM; PRASAD; SINGH, 2016; TAN; O'TOOLE, 2015).

A microbiota intestinal desempenha funções de grande importância para a saúde do hospedeiro, atuando como uma linha de defesa contra a colonização de patógenos e participando do desenvolvimento e regulação do sistema imune intestinal (CHANG; LIN; MEDICINE, 2016). A colonização do intestino pelos microrganismos se inicia

imediatamente após o nascimento e continua ao longo da vida do indivíduo (SIVAPRAKASAM; PRASAD; SINGH, 2016). Diversos fatores influenciam na composição dessa microbiota, como idade e estado de saúde do indivíduo, fatores geográficos e ambientais, e dieta (CHANG; LIN; MEDICINE, 2016; KOSTIC; XAVIER; GEVERS, 2014; TAN; O'TOOLE, 2015). Esse último apresenta um importante papel na modificação da microbiota intestinal humana, uma vez que as bactérias intestinais interagem entre si e com o hospedeiro através da produção de metabólitos e da fermentação do substrato (TAN; O'TOOLE, 2015).

A alteração da diversidade da microbiota intestinal conduz a um quadro de disbiose, que consiste no aumento do número de bactérias patogênicas e redução das bactérias benéficas. Sabe-se que este desequilíbrio está relacionado à DII, contudo alguns estudos recentes têm questionado se esta condição é verdadeiramente uma causa ou apenas uma consequência da inflamação (CONTE et al., 2014; NI et al., 2017). De fato, alguns estudos evidenciaram a ocorrência de disbiose em pacientes acometidos pela DII, onde havia maior presença de bactérias patogênicas, especialmente *Escherichia coli* aderente invasiva (AIEC), em relação às bactérias comensais, como as do filo Firmicutes (CONTE et al., 2014).

Outro importante fator diretamente relacionado ao desenvolvimento da DII, seja como causa ou consequência da inflamação, é o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal. A permeabilidade desregulada ou incontrolada indica a perda da integridade da barreira epitelial e pode induzir a uma resposta imune exacerbada e inflamação intestinal crônica (GOYAL et al., 2014; HAMER et al., 2008). O aumento da permeabilidade também pode conduzir a quadros de diarreia (OSHIMA; MIWA; JOH, 2008). Parte dessa integridade é mantida pela barreira de muco, que representa uma barreira física contra agentes agressivos presentes no lúmen do TGI, como enzimas digestivas, microrganismos

patogênicos e suas toxinas (BUISINE et al., 1999). O muco é secretado pelas células caliciformes presentes no epitélio intestinal e formado, principalmente, por glicoproteínas de alto peso molecular denominadas mucinas, que podem ser codificadas por pelo menos 21 genes MUC diferentes, sendo o MUC2 o mais abundante no cólon humano (BOLTIN et al., 2013). Mudanças no sistema imune do hospedeiro, assim como fatores genéticos ou ambientais podem estar relacionados a alterações na secreção de mucinas e podem ser fundamentais para a patogênese da DII (BOLTIN et al., 2013).

A integridade do epitélio intestinal também é mantida por complexos juncionais intracelulares tais como *tigh junctions*, junções aderentes e desmossomos (OSHIMA; MIWA; JOH, 2008). Entre essas, as *tigh junctions* estão localizadas na parte mais apical das membranas laterais da célula e em estudos realizados com amostras oriundas de biópsia retal de pacientes acometidos pela RCU, essas proteínas se encontravam diminuídas (OSHIMA; MIWA; JOH, 2008).

Outro aspecto importante na etiologia da DII é o nível de estresse oxidativo, que é caracterizado pela ocorrência de um desequilíbrio entre as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) formadas naturalmente durante o metabolismo do oxigênio intracelular e o sistema de defesa antioxidante, que resulta em uma cascata de reações onde moléculas como lipídeos, proteínas e o próprio DNA podem ser danificados (BINDER, 2010; HAMER et al., 2008). As principais EROS formadas durante esse processo são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BIRBEN et al., 2012; ZHANG et al., 2016); e os principais antioxidantes presentes nas células intestinais são a glutatona (GSH) e as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (BIRBEN et al., 2012; MOURA et al., 2015).

Evidências clínicas e experimentais demonstraram que na DII há uma superprodução de EROS por células inflamatórias infiltradas na mucosa intestinal e

depleção do sistema antioxidante. Essa condição pode amplificar a resposta inflamatória, desencadear a lesão na mucosa e acelerar a ulceração mucosa na patogênese da DII (DAGLI et al., 1997; GRISHAM, 1994; SIMMONDS, 1993).

Os fatores ambientais são tão importantes quanto os demais aspectos no desenvolvimento da DII. Agentes ambientais potencialmente relevantes incluem aleitamento materno, excesso de higiene na infância, uso de contraceptivos orais, apendicectomia, clima, poluição, estresse, tabagismo, sedentarismo e dieta, os quais estão envolvidos de forma diferencial na RCU e DC (ANANTHAKRISHNAN, 2015; SHEEHAN; SHANAHAN, 2016).

Mudanças na dieta decorrentes da globalização e industrialização também estão diretamente relacionadas com a DII. Estudos mostraram que uma dieta rica em gorduras e com baixo conteúdo de fibras altera drasticamente a microbiota intestinal (MIYOSHI; CHANG, 2016). As fibras solúveis, especialmente, são metabolizadas pela microbiota intestinal em ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que entre outros efeitos benéficos, inibem a transcrição de mediadores pró-inflamatórios (ANANTHAKRISHNAN, 2015; HAMER et al., 2008; SIVAPRAKASAM; PRASAD; SINGH, 2016). Além disso, as fibras ajudam a manter a integridade do epitélio intestinal e melhoram o funcionamento das células intestinais (ANANTHAKRISHNAN, 2015; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; MACFARLANE; MACFARLANE, 2011). Embora seja pouco investigada, sabe-se que existe uma associação entre a DII e micronutrientes. Em pacientes acometidos pela doença, observou-se uma deficiência comum de vitamina D, e mais elevada do que em indivíduos saudáveis (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Uma deficiência de zinco associada a disfunção imunológica também tem sido documentada em pacientes com DC (ANANTHAKRISHNAN, 2015; FIOCCHI, 1998).

A DII devido ao seu caráter etiológico multifatorial ainda não tem cura farmacológica definitiva, de modo que a terapêutica atual disponível visa apenas aumentar o tempo de remissão e minimizar os sintomas, melhorar a qualidade de vida do paciente e evitar a progressão e complicações da doença (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017).

Atualmente existe uma grande quantidade de fármacos destinados ao tratamento da DII, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticoides, os imunossupressores e a terapia biológica (CUFFARI; HUNT; BAYLESS, 2001; UMA MAHADEVAN, 2004; YAMAMOTO-FURUSHO, 2007). Embora o diagnóstico da DC e da RCU siga uma rota similar, o tratamento das duas formas da DII difere significativamente e é considerado individual (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017).

Na RCU a escolha do tratamento é baseada na severidade da doença, de modo que os aminossalicilatos, como sulfassalazina, olsalazina e mesalazina são escolhidos para um quadro clínico leve a moderado além de serem utilizados para a manutenção da remissão da RCU. Os aminossalicilatos também são utilizados em quadros leves de DC, porém para um estado moderado a severo os glicocorticoides, como prednisolona, prednisona e outros são os mais indicados (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017; TRAVIS et al., 2005). Os imunossupressores como azatioprina e 6-mercaptopurina podem induzir a remissão em pacientes com DC (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). A terapia biológica, representada pelos anti-TNF, pode ser utilizada no tratamento de DC moderada a severa ou quando os glicocorticoides são contraindicados (PRESENT et al., 1999; SANDS et al., 2004).

Mesmo com a existência desses fármacos, alguns fatores limitam o uso de fármacos no tratamento da doença, como por exemplo, o alto custo de aquisição, os efeitos

colaterais apresentados, além do fato de uma parte dos pacientes não responderem inicialmente ao tratamento ou apresentarem perda da eficácia ou intolerância às drogas.

A problemática apresentada em relação ao uso da terapêutica atualmente disponível para a DII tem despertado o interesse de pesquisadores na busca de novas abordagens de tratamento para a doença. Uma das alternativas que tem sido largamente estudada é a utilização de produtos naturais com propriedades antioxidante e/ou imunomoduladora, assim como de produtos que possam modular a microbiota intestinal, prevenindo recidivas ou complementando o tratamento de pacientes acometidos pela DII (COSTA et al., 2015; DI STASI et al., 2004; WITAICENIS et al., 2010).

Considerando a importância que a microbiota intestinal tem no desenvolvimento de doenças do TGI e em outras doenças crônicas, a possibilidade de modular esta comunidade bacteriana é uma das estratégias mais promissoras que permite reduzir o número dos microrganismos prejudiciais e/ou enriquecer a microbiota com bactérias benéficas (DE BOSSCHER; HAEGEMAN, 2009) e, desta forma, melhorar a resposta intestinal e conseqüentemente prevenir e/ou tratar as doenças inflamatórias crônicas do intestino.

Dentre os vários produtos alimentares utilizados na prevenção e tratamento da DII e outras doenças crônicas destacam-se os probióticos, prebióticos e os simbióticos. Os probióticos são definidos como alimentos contendo microrganismos vivos, pertencentes principalmente aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que quando consumidos em quantidades adequadas afetam benéficamente a saúde humana por meio de uma série de efeitos, principalmente modulando a resposta imune do hospedeiro (ROBERFROID, 2000; SHANAHAN, 2004) via fermentação de produtos prebióticos (ROBERFROID et al., 2010). Os prebióticos são ingredientes não-digeríveis, tais como fibras, amido resistente, frutooligossacarídeos e outros utilizados como substrato de fermentação pelos

probióticos e que afetam de maneira benéfica o hospedeiro, estimulando de forma seletiva o crescimento e/ou atividade de bactérias do cólon (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2002). Já os simbióticos representam a administração conjunta de probióticos e prebióticos.

Está claramente estabelecido que muitas das propriedades benéficas da microbiota intestinal são atribuídas à fermentação de prebióticos pela microbiota intestinal, com consequente produção de AGCCs, como o acetato, propionato e principalmente o butirato (MACFARLANE; MACFARLANE, 2011). Uma vez produzidos, aproximadamente 95% desses AGCCs são prontamente absorvidos pelos colonócitos (DEMIGNE; REMESY; MORAND, 1999) e sua disponibilidade plasmática garante uma série de efeitos farmacológicos importantes no controle de inúmeras doenças, principalmente agindo como agentes imunomoduladores, antioxidantes e anti-inflamatórios, visto que são capazes de afetar positivamente o estresse oxidativo; aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10; e inibir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, reduzindo consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias e atenuando o processo inflamatório em pacientes com DII (HAMER et al., 2008; PRYDE et al., 2002; TAN; O'TOOLE, 2015).

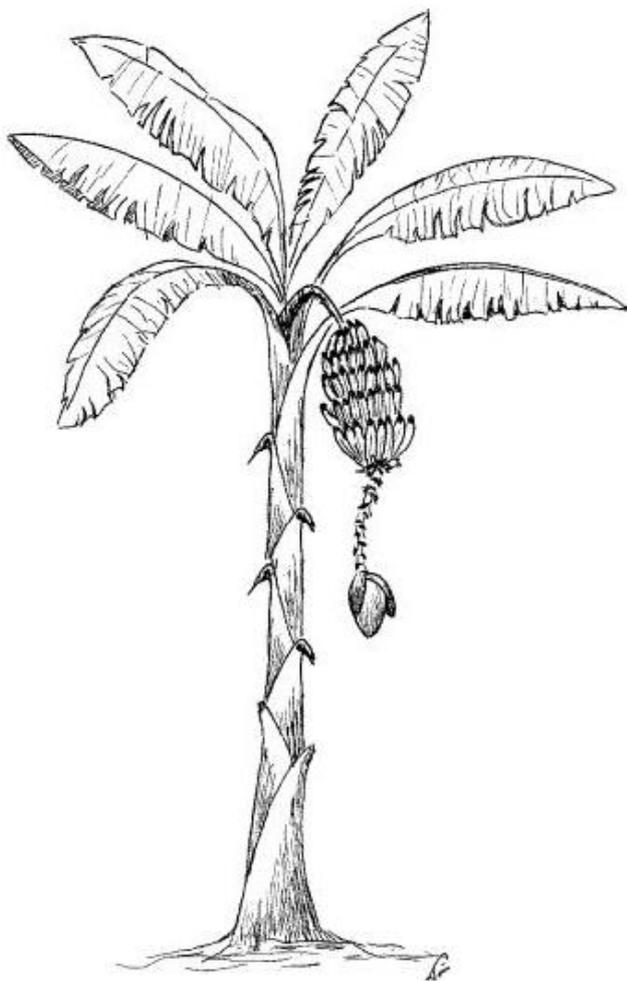
Devido a estes efeitos, vários prebióticos são potenciais produtos complementares para a prevenção e tratamento da DII em humanos, entre eles as fibras e amido resistente. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado nos últimos anos a estudar diferentes produtos com base na hipótese que atuem como prebióticos, incluindo a lactulose (CAMUESCO et al., 2005), polidextrose (WITAICENIS et al., 2010), banana nanica verde (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; SCARMINIO et al., 2012), rizomas de taboa (FRUET et al., 2012), frutos de jatobá (ORSI; SEITO; DI STASI, 2014). Um dos produtos investigados, a farinha de banana nanica verde (*Musa* sp AAA), apresentou um efeito anti-inflamatório

intestinal, reduzindo a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) no modelo de inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, e antioxidante pelo fato de evitar a depleção de glutathiona cólica (GSH) (SCARMINIO et al., 2012), além de aumentar a produção de AGCCs (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017).

Com base no exposto, e considerando a similaridade química selecionamos a espécie *Musa* sp AAB (banana prata) para a realização do presente estudo. O termo banana se refere a frutos de espécies monocotiledôneas, perenes, encontradas exclusivamente em regiões tropicais e subtropicais pertencentes ao gênero *Musa*, família Musaceae. As bananas comestíveis são híbridos diploides, triploides ou tetraploides com genomas A e B evoluídos de espécies selvagens (SINGH et al., 2016). As duas principais espécies selvagens progenitoras dos genomas A e B são *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla, respectivamente (AURORE; PARFAIT; FAHRASMANE, 2009; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007; SINGH et al., 2016). Atualmente, os principais grupos de genomas produzidos por meio de intervenções humanas são AA, AB, AAA, AAB e ABB (AURORE; PARFAIT; FAHRASMANE, 2009; SINGH et al., 2016).

Banana é um dos frutos mais consumidos mundialmente, sendo consumida não só em sua forma *in natura*, mas também processada, o que permite que seja aproveitada em todos os seus estágios de amadurecimento. Bananas são ricas em fibras, amido resistente e fenóis como taninos, ácido gálico, catequinas, antocianinas (HAPPI EMAGA et al., 2008, 2011; SINGH et al., 2016), além de apresentarem alto valor nutricional por serem excelentes fontes de potássio, cálcio, fósforo e vitaminas A, B e C (JIMÉNEZ-MARTÍNEZ et al., 2016).

Os frutos assim como outras partes da planta como raízes, folhas e flores, são utilizados pela medicina popular em diversas partes do mundo, principalmente na África, Índia, Ásia e América. De uma forma geral, as bananas apresentam uma série de atividades farmacológicas tais como antidiarreica, antiulcerogênica, antimicrobiana, hipoglicemiante, antioxidante, anti-hipertensiva e diurética (IMAM; AKTER, 2011), sendo que a variedade *Musa* sp AAA aumentou a produção de AGCCs provavelmente por produzir efeitos prebióticos devido a presença de fibras e amido resistente em sua composição (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017).



*OBJETIVO*

Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa sp* AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.



*MATERIAL E MÉTODOS*

## 1. Material Vegetal e preparo da farinha de *Musa sp.* AAB

Os frutos verdes da espécie *Musa sp.* AAB (banana prata) foram obtidos de cultivo orgânico de produtores rurais do município de Botucatu-SP em abril de 2016. Os frutos com casca foram cortados transversalmente em partes de 0.2-0.4 mm, excluindo-se apenas os talos, e foram levados em bandejas à estufa com renovação e circulação de ar forçado à temperatura de 50°C por 96 horas para desidratação. Após desidratação, o material foi pulverizado em liquidificador resultando na formação de uma farinha, que foi armazenada em sacos plásticos lacrados e levados à câmara fria a 4°C, onde ficaram até o momento da realização dos experimentos e do preparo da ração (Figura 01).



**Figura 01: Preparo da farinha dos frutos verdes de *Musa sp.* AAB. A:** Frutos verdes cortados transversalmente. **B:** Frutos secos após 96h em estufa com renovação e circulação de ar forçado à temperatura de 50°C. **C:** Frutos pulverizados em liquidificador (obtenção da farinha). **D:** Farinha sendo peneirada. **E:** Farinha sendo armazenada em sacos plásticos lacrados.

## **2. Caracterização fitoquímica da farinha de *Musa* sp AAB**

### **2.1. Avaliação qualitativa do extrato etanólico 70%**

O perfil fitoquímico da farinha de frutos verdes de *Musa* sp AAB foi realizado conforme metodologia descrita por Matos (1988) e adaptada por González e Di Stasi (2002), a partir do extrato da farinha feito na proporção de 100 g de farinha e 300 ml de etanol 70% (1:3, m/v), por maceração a frio e com três filtrações sequenciais (intervalos de 48h). A caracterização fitoquímica qualitativa do extrato é baseada na observação de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característicos para algumas classes de substâncias. Assim, as análises visaram a detecção de fenóis, flavonóis, flavononas, xantonas, chalconas, auronas, flavonas, leucoantocianidinas, antocianidinas, catequinas, taninos, cumarinas, terpenoides, saponinas, alcaloides e bases quaternárias.

### **2.2. Avaliação quantitativa do teor de fenóis totais (FT)**

O teor de fenóis totais foi determinado através do método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu e curva padrão de ácido gálico. O reagente Folin-Ciocalteu é constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco. Na presença de certos agentes redutores, como compostos fenólicos, o estado de oxidação média destes metais fica entre 5-6, adquirindo coloração azul, que pode ser monitorada em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) em 750 nm.

Para a avaliação do teor de FT o extrato foi previamente rotaevaporado, de modo que sua concentração final fosse 241,5 mg/mL. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). Os resultados foram determinados por interpolação da

absorbância do extrato contra a curva de calibração construída com ácido gálico, segundo a equação:

$$FT = \frac{[F]}{[A]} \times 1000$$

onde:

FT: teor de fenóis totais

[F]: concentração de fenóis da amostra-teste ( $\mu\text{g/mL}$ ), obtida pela leitura da absorbância da amostra e posterior interpolação da [ ] pela curva de calibração do padrão

[A]: concentração da amostra-teste ( $\mu\text{g/mL}$ )

### **2.3. Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH**

A capacidade das moléculas antioxidantes presentes no extrato em sequestrarem o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi avaliada conforme metodologias de Bolis (1958) e Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), adaptadas para microplaca de 96 poços.

Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. Para a determinação da atividade sequestradora do radical livre DPPH foi construída uma curva padrão de ácido gálico (0-15  $\mu\text{M/mL}$  em metanol 70%). As medidas das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 517 nm. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em  $\text{IC}_{50}$ , que representa a concentração de extrato necessária para consumir 50% da concentração inicial de DPPH.

## **2.4. Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebros de ratos**

A atividade antioxidante do extrato etanólico feito a partir da farinha dos frutos verdes de *Musa* sp AAB também foi avaliada pelo ensaio de peroxidação lipídica em membranas de cérebro de ratos segundo o protocolo descrito por Gálvez et al. (1995) com algumas modificações.

Primeiramente, membranas de cérebro foram obtidas de ratos machos *Wistar* saudáveis de aproximadamente 2 meses de idade. Amostras de tecido foram homogeneizadas com homogeneizador automático na proporção de 1:4 (p/v) em solução tampão PBS (pH 7.4) contendo 19 partes de fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 10 mM) e 81 partes de fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 10 mM), e posteriormente centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e diluído na proporção 1:10 (v/v) na solução tampão utilizada para a homogeneização.

A peroxidação lipídica foi induzida com solução de Ferro/Ácido Ascórbico (100  $\mu\text{M}$ ) e a atividade antioxidante do extrato etanólico de banana prata verde foi avaliada em diferentes concentrações num range de 0,71 a 363  $\mu\text{g/mL}$ , concentração final na reação. A amostra contendo extrato, membrana de cérebro e solução de Ferro/Ácido Ascórbico foi incubada à 37°C por 12 minutos em banho-maria com agitação. A reação foi interrompida com a adição do reativo tiobarbitúrico 0,5% preparado em ácido tricloroacético (TCA) 20%. O reativo tiobarbitúrico reage com o malondialdeído (MDA), que é um metabólito liberado durante a reação de lipoperoxidação, gerando uma cor cuja intensidade é determinada no espectrofotômetro. Quanto maior a intensidade da cor, maior a concentração de MDA. Assim, um composto será antioxidante quando inibir a lipoperoxidação causada pela solução de Ferro/Ácido Ascórbico, reduzindo os valores de MDA. A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis (Power

wave 340, Bio-TEK) a 532 nm e utilizada para calcular a IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração do extrato capaz de inibir 50% da peroxidação lipídica induzida nas membranas de cérebro de ratos. A quercetina foi utilizada como referência e testada nas concentrações de 1.81 a 0.11 ug/ml.

### **3. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal**

#### **3.1. Animais**

No experimento foram utilizados ratos machos albinos da linhagem *Wistar* com peso entre 200 e 250 g adquiridos do biotério Anilab®, Paulínia-SP. Os animais passaram por um período de adaptação durante 11 dias antes do início dos experimentos, onde foram mantidos no biotério do laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) em estantes climatizadas com temperatura de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de claro-escuro de 12 horas controlados.

#### **3.2. Preparo da ração**

A ração foi produzida na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. O preparo da ração foi feito por meio de uma diluição seriada, misturando-se a farinha de frutos verdes de *Musa* sp AAB com a ração em pó para roedores marca Nuvilab® nas proporções de 5% e 10% com agitação manual até obtenção de uma mistura homogênea. Após a mistura, o material passou por uma peletizadora e a ração enriquecida com a farinha dos frutos verdes de *Musa* sp AAB nas diferentes proporções foi obtida na forma de pellets (Tabela 01).

**Tabela 01:** Principais ingredientes presentes na dieta oferecida aos ratos. Dados fornecidos pelo fabricante.

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta Controle (g/100g)</b>	<b>Dieta 5% (g/100g)</b>	<b>Dieta 10% (g/100g)</b>
Umidade	12,5	11,875	11,25
Proteína bruta (min.)	22	20,9	19,8
Material mineral (máx.)	9	8,55	8,1
Fibra bruta (máx.)	7	6,65	6,3
Gordura (min.)	4	3,89	3,6
Mistura de minerais <sup>a</sup>	2,5	2,37	2,25
Mistura de vitaminas <sup>b</sup>	0,2	0,19	0,18
Lisina (min)	1,2	1,14	1,08
Metionina (min)	0,4	0,38	0,36
BHT (min)	0,01	0,0095	0,009
Banana prata	-	5	10

\* (min.): quantidade mínima/ (máx.): quantidade máxima.

<sup>a</sup> Mistura de minerais representa os seguintes valores (em mg/kg): Ca (14.000); P (8.000); Na (2.700); Fe (50); Mg (60); Zn (60); Cu (10); I (2); Se (0,05); Co (1,5); F (80).

<sup>b</sup> Mistura de vitaminas representa os seguintes valores (em mg/kg): vitamina A (13.000UI); vitamina B1 (5mg); vitamina B2 (6mg); vitamina B6 (7mg); vitamina B12 (22mg); ácido fólico (1mg); biotina (0,05mg); niacina (60mg); pantotenato de cálcio (20mg).

### 3.3. Grupos experimentais

Os animais (n = 7 por grupo) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais e alojados em caixas. Os grupos experimentais foram:

- Saudáveis: animais saudáveis que não passaram pelo processo de indução da inflamação intestinal e foram alimentados com ração Nuvilab® por 35 dias;
- Grupo Controle-TNBS: animais que tiveram o processo inflamatório intestinal induzido e receberam ração Nuvilab® por 28 dias antes da indução do processo inflamatório intestinal e 7 dias após;
- Grupo Dieta 5%: animais que passaram pela indução do processo inflamatório intestinal e foram alimentados com ração enriquecida com a farinha da banana prata verde na proporção de 5% por 28 dias antes da indução do processo inflamatório intestinal e 7 dias após;
- Grupo Dieta 10%: animais que tiveram a inflamação intestinal induzida e receberam ração enriquecida com a farinha da banana prata verde na proporção

de 10% por 28 dias antes da indução do processo inflamatório intestinal e 7 dias após.

### 3.4. Delineamento experimental

O protocolo experimental seguido nesse experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências/UNESP sob o nº 847-CEUA (Anexo 01). Toda a parte experimental foi realizada no Laboratório FitoFarmaTec, localizado no Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu-SP.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Saudáveis, Controle-TNBS, Dieta 5% e Dieta 10%. Todos os animais foram alimentados com suas respectivas rações durante 28 dias, tendo o processo inflamatório induzido com a instilação de TNBS via retal no 28º dia, com exceção do grupo saudável, onde o TNBS foi substituído por salina. Após a indução, os animais foram alimentados por mais sete dias, sendo mortos no 35º dia através de deslocamento cervical antecedido por anestesia (Figura 02).



**Figura 02:** Esquema representativo do Delineamento Experimental seguido

### **3.5. Indução do processo inflamatório intestinal**

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris et al. (1989), com algumas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas e posteriormente anestesiados com uma solução de Ketamina-Xilazina na concentração de 116 mg/ml de ketamina e 23 mg/ml de xilazina, de modo a permitir a administração do anestésico na proporção ideal anestésica de 50 mg/kg de ketamina e 7mg/Kg de xilazina. Uma vez os ratos anestesiados, realizou-se a administração retal (intracólica) de 0,25 mL de uma solução contendo 10 mg de TNBS em etanol 50% (v/v). Durante a administração da solução os animais foram mantidos de cabeça para baixo e com o auxílio de um catéter de 2 mm de diâmetro, a solução foi introduzida pelo ânus do animal a uma distância de aproximadamente 8 cm. Os animais do grupo saudável foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Todos os animais foram mortos no 7º dia após a indução do processo inflamatório por deslocamento cervical e tiveram seus cólons retirados para posteriores análises macroscópicas, microscópicas e bioquímicas.

### **3.6. Avaliação macroscópica do processo inflamatório intestinal**

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral, tais como consumo de alimento e peso corporal. Na análise macroscópica, após a morte dos animais e retirada dos cólons, foram avaliados o peso e o comprimento do cólon, e a gravidade e extensão do dano intestinal de acordo com uma escala previamente descrita por Bell et al. (1995) (Tabela 02).

**Tabela 02:** Critérios de avaliação da severidade e extensão da lesão cólica, segundo Bell et al (1995)

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

### **3.7. Avaliação microscópica do processo inflamatório intestinal**

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório cólico, amostras de tecido de aproximadamente 0,5 mm adjacentes à área da lesão foram coletadas para processamento histológico. As amostras foram armazenadas em uma solução (ALFAC) de álcool 80%, formaldeído 40% e ácido acético por 48h e depois apenas em álcool 80% até o momento de serem processadas.

Para a análise microscópica as amostras foram fixadas em formalina 4% por 24 horas, lavadas em água corrente também por 24 horas, desidratadas em álcool etílico crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609) e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6 micrómetros de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando série alcoólica etílica decrescente. As amostras foram então coradas em eosina-hematoxilina (HE) para a análise morfológica das lesões e determinação do índice de lesão microscópica de acordo com método descrito por Stucchi et al., (2000) (Tabela 03). As lâminas histológicas foram observadas e microfotografadas no microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.3 e 3.40 no aumento de 5x.

A presença de muco no cólon dos animais também foi analisada. Para isso foi realizado o método de PAS/Alcian Blue, segundo o protocolo de Linden, Florin e McGuckin (2008). As amostras desparafinizadas foram reidratadas utilizando etanol absoluto e água por 10 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram imersas em ácido acético 3% por 2 minutos e coradas em solução de Alcian Blue 8GX 1% e ácido acético 3% (pH 2,5) durante 2,5 h. A coloração inespecífica foi removida com ácido acético 3% e lavada em água durante 10 minutos. As lâminas foram então oxidadas em ácido periódico 1% em água à temperatura ambiente durante 10 minutos, lavadas em água durante 5 minutos, imersas no reagente de Schiff durante 10 minutos, novamente lavadas em água durante 5 minutos e posteriormente lavadas três vezes em meta bissulfeto de sódio 0,5% antes da lavagem final feita em água. Para revelar as seções de oligossacarídeos O-acetilados as amostras foram primeiro tratadas com hidróxido de potássio (KOH 0,1 M) durante 30 minutos e depois com ácido periódico 1 mM, antes do reagente de Schiff. Após coloração, as lâminas foram observadas e microfotografadas no microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.3 e 3.40 no aumento de 5x.

**Tabela 03:** Critério de avaliação microscópica de lesão cólica segundo Stucchi et al., (2000)

<b>Parâmetro</b>	<b>Critérios para avaliação</b>
<b>Mucosa</b>	Infiltração de neutrófilos Infiltração de linfócitos
<b>Criptas</b>	Atividade mitótica Infiltração de neutrófilos Depleção de muco
<b>Submucosa</b>	Infiltração de plasmócitos Infiltração de neutrófilos Vascularização
<b>Ulceração</b>	Ulceração Deposição de fibrina Neutrófilos na submucosa Edema na submucosa

(0) Nenhum (1) Leve (2) Moderado (3) Severo. Escore Máximo: 36

### **3.8. Análises bioquímicas**

Após a análise macroscópica, o cólon de cada animal foi dividido em 7 fragmentos longitudinais (tiras) e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação de parâmetros bioquímicos.

Nas análises bioquímicas foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Atividade da enzima mieloperoxidase - MPO (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984);
- Atividade da enzima fosfatase alcalina - FA (BESSEY; LOWRY; BROCK, 1946);
- Conteúdo de glutathione total - GSH (ANDERSON, 1985);

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogenatos de cólon, sendo a homogeneização realizada a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático provido de um pistilo de teflón e um recipiente de vidro de 10 ml de capacidade.

### **3.8.1. Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)**

A determinação da atividade da enzima MPO foi realizada segundo método descrito por Krawisz, Sharon e Stenson (1984). As tiras dos cólons foram homogeneizadas em tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (1:20), levadas ao banho com ultrassom por 10 segundos e posteriormente submetidas a triplo ciclo de congelamento e descongelamento. Uma vez descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 8300 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a placa foi montada e a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm.

Os resultados foram expressos em unidades de MPO por grama de tecido (U/g de tecido), sendo que a atividade desta enzima é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa intestinal.

### **3.8.2. Determinação do conteúdo de Glutathiona total (GSH)**

A quantificação de glutathiona total foi realizada através do método descrito por Anderson (1985). A metodologia é baseada na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) presente na amostra para a sua forma oxidada (GSSG), através da incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase (GSR) na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando assim, um ciclo, no qual a velocidade de redução do DTNB é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH + GSSG).

As tiras do cólon foram homogeneizadas em TCA 5% (1:20), o qual inibe a degradação da GSH pela enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidase presente no tecido, e congeladas a -80°C. Após seu descongelamento, as amostras foram centrifugadas duas vezes. A primeira centrifugação foi realizada a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e a segunda durante 5 minutos a 10 rpm também a 4°C. Após a montagem da placa, a leitura

da absorbância foi realizada a 412 nm e os resultados expressos em nmol de GSH total por grama de tecido (nmol/g de tecido).

### **3.8.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da Fosfatase Alcalina (FA)**

A determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada segundo metodologias de Smith et al. (1985) e Bessey, Lowry e Brock (1946), respectivamente. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão glicina na proporção de 1:10. O homogenato foi então centrifugado a 300 rpm durante 5 min a 4°C. Para determinar as proteínas totais foi utilizada uma curva padrão de albumina e a leitura espectrofotométrica das proteínas totais, assim como da FA, foi realizada a 450 nm. Os resultados foram expressos como unidades de FA por mg de proteína (U/mg de proteína).

## **4. Análises estatísticas**

Dados paramétricos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett e expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido por teste *a posteriori* de Dunn e expressos na forma de mediana. Dados de frequência foram analisados pelo teste exato de Fisher e expressos em porcentagem. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .



*RESULTADOS*

## 1. Caracterização fitoquímica da farinha de *Musa* sp AAB

Após o preparo do extrato etanólico 70% algumas análises fitoquímicas qualitativas foram realizadas a fim de identificar classes de compostos secundários presentes na farinha de banana prata verde. Uma vez realizadas as análises, foi possível identificar a presença de taninos, saponinas e fenóis (Tabela 04).

**Tabela 04:** Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico 70% de *Musa* sp AAB.

Classe de compostos	Ensaio	Tipo de observação	Extrato
<b>Fenóis</b>	FeCl <sub>3</sub>	Coloração variável entre azul e vermelho	+
<b>Flavonóis</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 1N	Coloração amarela	-
<b>Flavononas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH	Coloração vermelho-laranja	-
<b>Xantonas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 1N	Coloração amarela	-
<b>Chalconas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 1N	Coloração vermelha-púrpura	-
<b>Auronas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	NaOH 1N	Coloração vermelha-púrpura	-
<b>Flavonas</b>	NaOH 1N	Coloração amarela	-
<b>Leucoantocianidinas</b>	HCl	Coloração vermelha	-
	HCl	Coloração vermelha	-
<b>Antocianinas</b>	NaOH 0,2 %	Coloração lilás	-
	NaOH 1N	Coloração azul púrpura	-
	HCl	Coloração vermelha	-
<b>Antocianidinas</b>	NaOH 0,2 %	Coloração lilás	-
	NaOH 1N	Coloração azul púrpura	-
<b>Catequinas</b>	HCl	Coloração pardo-amarelada	-

<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>	Precitado escuro de tonalidade azul (taninos pirrogálicos)	+
		Precipitado verde (taninos flobatênicos)	-
	Albumina	Formação de precipitado	+
<b>Cumarinas</b>	KOH N	Fluorescência azulada em exposição à luz UV (360 nm)	-
<b>Terpenoides</b>	Liebermann-Buchard	Coloração azul evanescente seguida de verde permanente (esteroides)	-
		Coloração entre pardo e vermelho (triterpenoides)	-
<b>Saponinas</b>	Agitação	Espuma persistente e abundante	+
<b>Alcaloides</b>	Hager	Precipitado característico	-
	Mayer	Precipitado característico	-
	Dragendorff	Precipitado característico	-
<b>Bases quaternárias</b>	Hager	Precipitado flaculoso	-
	Mayer	Precipitado flaculoso	-
	Dragendorff	Precipitado flaculoso	-

\*Os sinais (+) e (-) indicam detectados e não detectados, respectivamente.

O teor de fenóis totais presente no extrato etanólico da farinha de *Musa* sp AAB também foi quantificado, sendo obtido o valor de 44,24 mg EAG/g de extrato.

## 2. Atividade antioxidante do extrato etanólico da farinha de *Musa* sp AAB

A atividade antioxidante do extrato etanólico da farinha dos frutos verdes de *Musa* sp AAB foi avaliada pelo método DPPH e pelo ensaio de peroxidação lipídica e os resultados estão apresentados na Tabela 05.

**Tabela 05:** Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico 70% de *Musa* sp AAB pelo método DPPH e pelo ensaio de peroxidação lipídica em membrana de cérebro de ratos

Amostra	Ensaio	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrato	DPPH	1135,62
Ácido gálico (padrão)		1,89
Extrato	Peroxidação lipídica	457,7
Quercetina (padrão)		0,71

### 3. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal

#### 3.1. Avaliações Macroscópicas

Durante todo o experimento foram avaliados parâmetros como consumo de alimento e peso corporal dos animais. Como esperado, os animais de todos os grupos ganharam peso gradativamente durante a realização do experimento, mesmo após a administração do TNBS. Os animais que receberam a dieta enriquecida com 5% se diferenciaram estatisticamente do grupo controle-TNBS nos quesitos consumo de alimento e ganho de peso corporal (Tabela 06).

**Tabela 06:** Consumo de alimento, peso corpóreo inicial, peso corpóreo final e ganho de peso de ratos saudáveis, com inflamação intestinal induzida e com inflamação induzida que receberam dietas enriquecidas com farinha de banana prata verde a 5% ou 10% por 35 dias

	Saudáveis	Controle –TNBS	Dieta 5%	Dieta 10%
Consumo de alimento (g/dia/rato)	21.81 ± 0.42*	19.64 ± 0.07	17.69 ± 0.29*	17.99 ± 0.82
Peso corpóreo inicial (g)	115.5 ± 6.55	130.5 ± 3.88	107.9 ± 8.56	97.7 ± 3.08
Peso corpóreo final (g)	305.8 ± 11.15	280.1 ± 14.19	294.2 ± 10.19	272.9 ± 7.64
Ganho de peso corpóreo (g)	190.3 ± 7.11*	149.6 ± 10.81	186.3 ± 8.38*	175.2 ± 7.61

Dados expressos em média ± E.P.M. \* diferem significativamente em relação ao grupo controle-TNBS (p < 0.05).

Após a morte dos animais os cólons foram retirados e imediatamente avaliados macroscopicamente em relação ao tamanho da lesão (cm), à relação peso/comprimento (mg/cm) e à gravidade e extensão do dano intestinal (escore). A administração intracólica do TNBS nos animais do grupo controle resultou em uma inflamação da mucosa evidenciada por uma lesão que se estendeu de 1,9 a 4,6 cm ao longo do epitélio intestinal e pela ocorrência de aderência entre o cólon e os órgãos adjacentes em todos os animais do grupo controle-TNBS. A lesão promoveu um espessamento da parede intestinal e hiperemia, o que resultou em um encurtamento do cólon e aumento do peso cólico, observados pela relação peso/comprimento. As dietas enriquecidas com farinha de banana prata verde nas proporções de 5 e 10% foram capazes de afetar positivamente a extensão da lesão e de reduzir a ocorrência de aderência, sendo esta observada em apenas 18,18% dos animais que receberam a dieta enriquecida com 5% e em 30% dos que receberam a dieta enriquecida com 10% (Tabela 07).

**Tabela 07:** Efeito da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa sp* AAB) nas proporções de 5 e 10% no escore macroscópico, extensão da lesão e relação peso/comprimento no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.

Grupo experimental	Escore macroscópico (0-10)	Extensão da Lesão (cm)	Relação Peso/Comprimento (mg/cm)	Aderência (%)
Saudáveis	0 **	0 **	100.19 ± 6.31 *	0 **
Controle-TNBS	7.5 (6-9)	3.5 ± 0.30	204.39 ± 13.05	100
Dieta 5%	6 (1-8)	2.4 ± 0.34 *	141.09 ± 38.59	18,18 **
Dieta 10%	6 (1-8)	2.3 ± 0.32 *	145.72 ± 6.14	30 **

Escore macroscópico expresso em mediana (intervalo); extensão da lesão e relação peso/comprimento expressos em média ± E.P.M; aderência expressa em porcentagem analisada pelo teste exato de Fisher.

\* diferem estatisticamente em relação ao grupo Controle - TNBS ( $p < 0.05$ ).

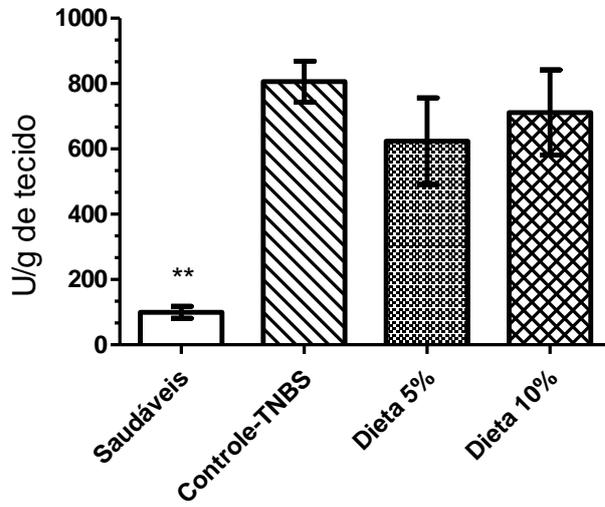
\*\* diferem estatisticamente em relação ao grupo Controle - TNBS ( $p < 0.01$ ).

### 3.2. Avaliações bioquímicas

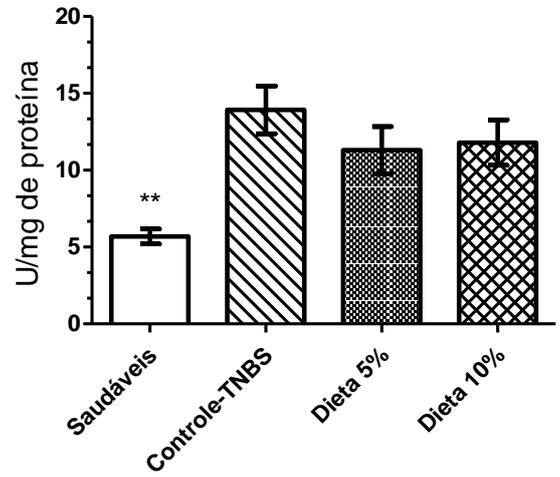
A administração de TNBS altera diversos parâmetros bioquímicos no cólon. A inflamação desencadeada na mucosa intestinal resultou na depleção do conteúdo de

glutathione e no aumento de mieloperoxidase e fosfatase alcalina (Figura 03). As dietas enriquecidas nas proporções de 5 e 10% com farinha de banana prata verde foram capazes de evitar a depleção do conteúdo de glutathione quando comparados ao grupo controle – TNBS, contudo não apresentaram efeito nas atividades das duas enzimas analisadas.

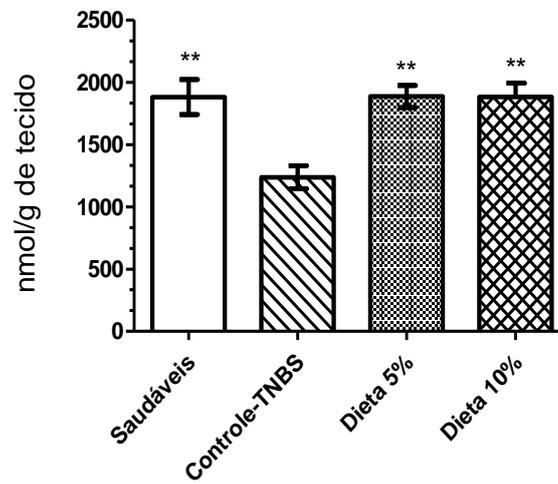
### Atividade da Mieloperoxidase (MPO)



### Atividade da Fosfatase Alcalina (FA)



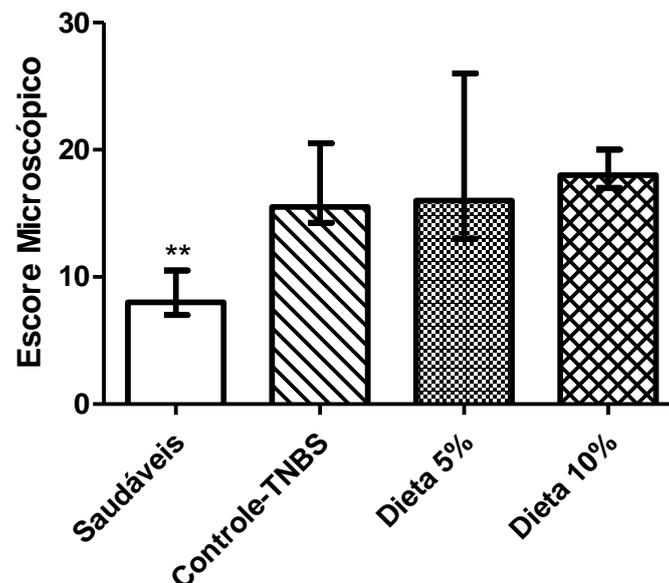
### Conteúdo de Glutathiona (GSH)



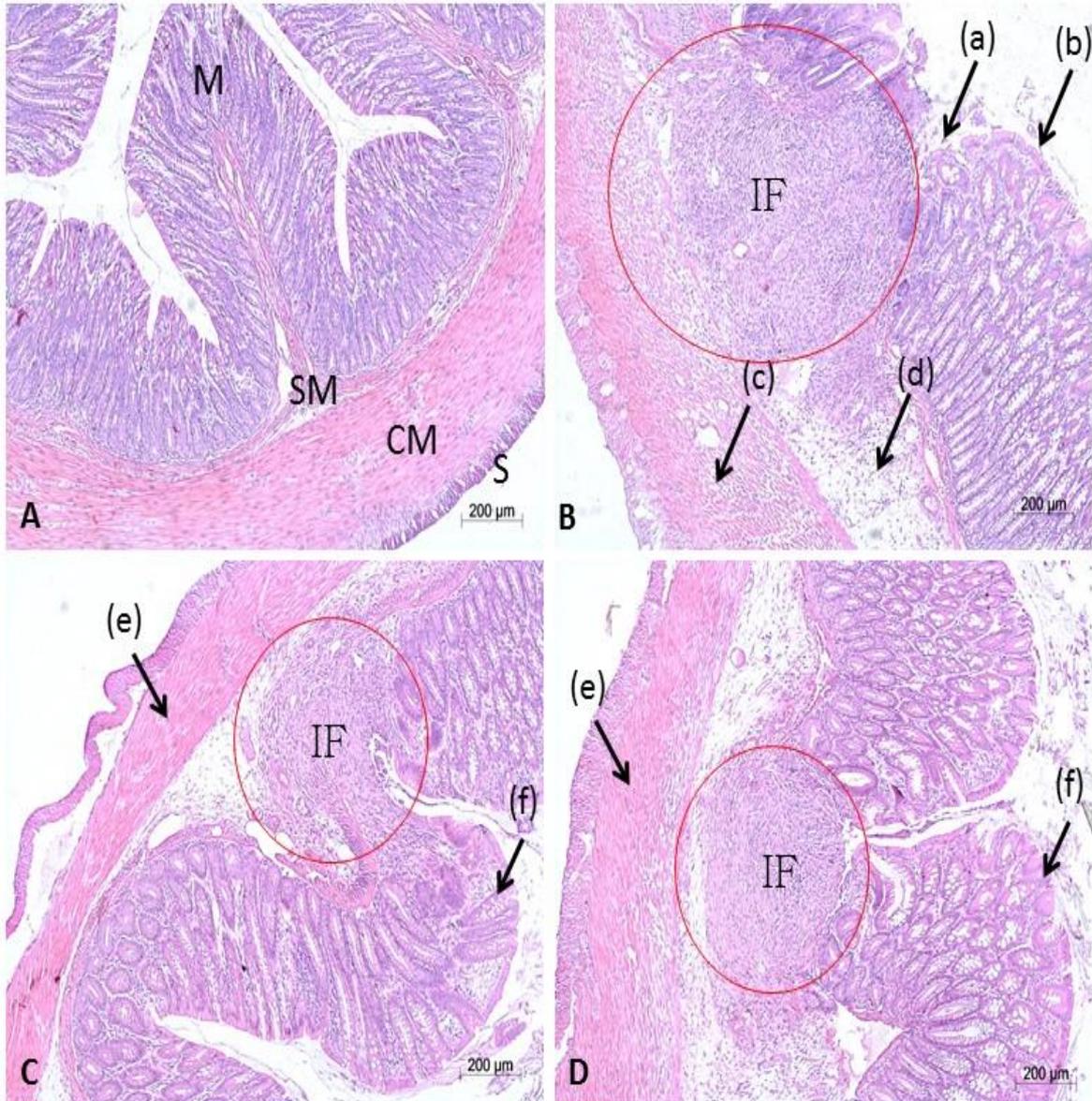
**Figura 03: Avaliação de parâmetros bioquímicos em animais submetidos à inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*difere estatisticamente em relação ao controle - TNBS ( $p < 0.01$ ).**

### 3.3. Avaliações microscópicas

A análise histológica nas lâminas coradas com eosina-hematoxilina (HE) demonstrou que os animais do grupo controle -TNBS, quando comparados aos animais saudáveis, apresentaram um intenso infiltrado de células imunes na camada mucosa (Figura 05), corroborando com o escore microscópico (Figura 04). Ainda na região do infiltrado é possível observar a ocorrência de ulceração, desestruturação da citoarquitetura e depleção de muco, sendo esse último também evidenciado nas lâminas coradas com PAS/Alcian Blue (Figura 06). Embora não tenha sido observada diferença estatística no escore microscópico entre os grupos que receberam as dietas enriquecidas com 5% ou 10% e o grupo controle-TNBS, é evidente nas fotomicrografias referentes a esses dois grupos (Figura 5C e Figura 5D) a melhora de certos parâmetros histológicos como a diminuição do infiltrado celular e do edema na submucosa, além de uma reestruturação da citoarquitetura do epitélio intestinal.

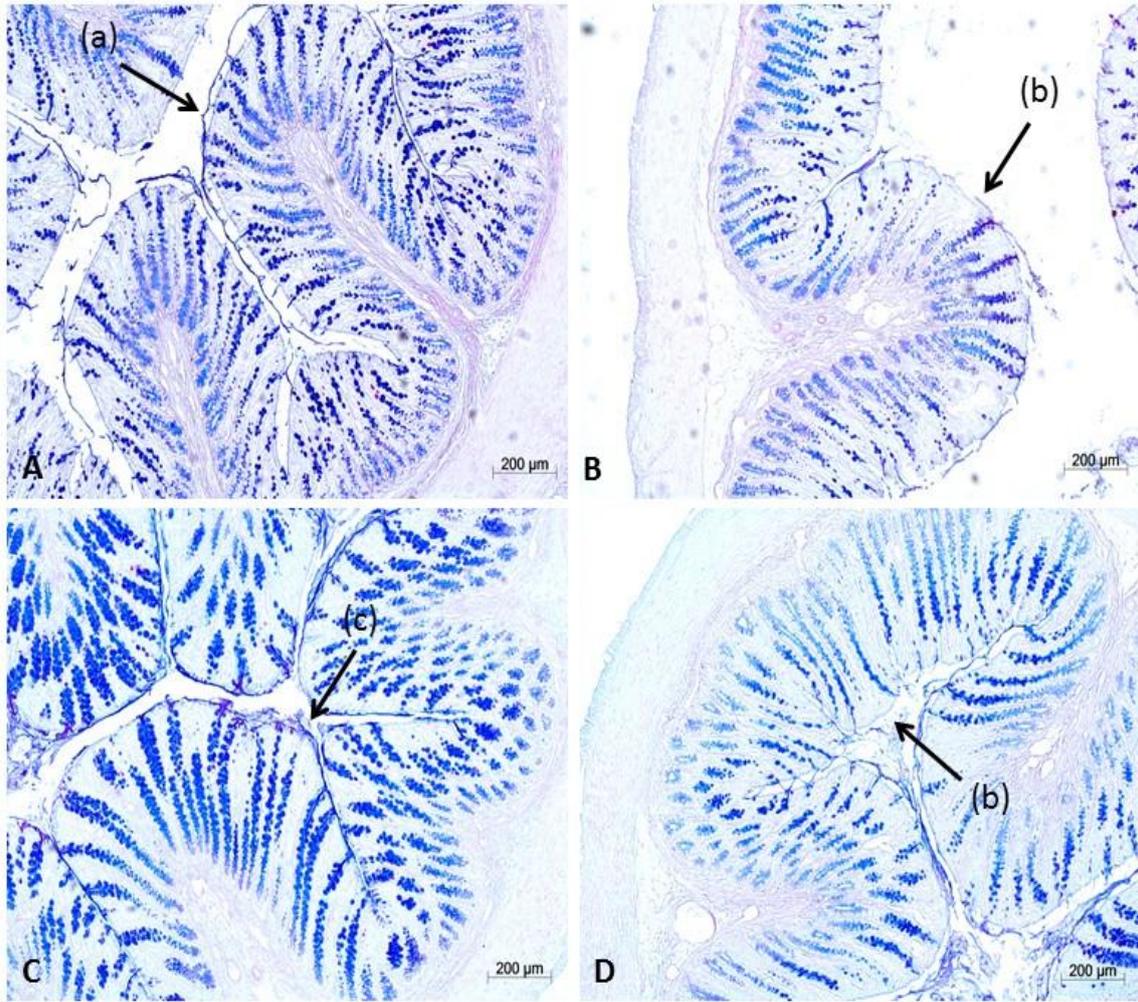


**Figura 04:** Efeito da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa sp AAB*) nas proporções de 5 e 10% no escore microscópico, segundo Stucchi et al. (2000). Dados expressos em mediana (intervalo). \*\* diferem estatisticamente em relação ao grupo Controle - TNBS ( $p < 0.01$ ).



**Figura 05: Fotomicrografias do epitélio intestinal de ratos dos diferentes grupos experimentais sete dias após a indução do processo inflamatório por TNBS.** Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento de 5X. **A:** Grupo Saudável; **B:** Grupo Controle-TNBS; **C:** Grupo Dieta 5%; **D:** Grupo Dieta 10%. **(a)** ulceração; **(b)** dano na citoarquitetura e depleção de células caliciformes; **(c)** edema na muscular **(d)** edema na submucosa; **(e)** redução do edema na muscular; **(f)** reestruturação da citoarquitetura epitelial. **M:** mucosa; **SM:** submucosa; **CM:** muscular; **S:** serosa; **IF:** infiltrado.

Outro parâmetro analisado nas análises microscópicas foi a presença de muco nos grânulos distribuídos no epitélio intestinal (Figura 06). Os animais saudáveis apresentaram grande quantidade de muco no epitélio intestinal (Figura 6A), inclusive próximo à membrana. Essa condição não é observada no grupo controle – TNBS (Figura 6B), que apresentou uma depleção de muco no epitélio e próximo à membrana epitelial. Diante das lâminas coradas com PAS/Alcian Blue foi possível observar que as dietas enriquecidas com 5 ou 10% de farinha de *Musa* sp AAB evitaram a depleção de muco no epitélio intestinal dos animais, especialmente no grupo que recebeu a ração enriquecida com 5% de farinha de banana prata verde (Figura 6C).



**Figura 06: Fotomicrografias do epitélio intestinal de ratos dos diferentes grupos experimentais sete dias após a administração de TNBS, indicando a presença de muco. Cortes corados com PAS/Alcian blue. Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento de 5X. **A:** Grupo Saudável; **B:** Grupo Controle-TNBS; **C:** Grupo Dieta 5%; **D:** Grupo Dieta 10%. **(a)** muco próximo a membrana epitelial; **(b)** depleção de muco; **(c)** redução da depleção de muco.**



DISCUSSÃO

Diante dos dados apresentados demonstramos que as dietas enriquecidas com farinha de banana prata verde nas proporções de 5% e 10% diminuíram a extensão da lesão causada pela inflamação induzida, promovendo efeitos protetor e anti-inflamatório nos animais. O efeito protetor também pode estar associado ao fato das dietas enriquecidas terem evitado a depleção dos níveis de glutathiona cólica e de muco no epitélio intestinal. Desse modo, embora a farinha de banana prata verde tenha demonstrado um discreto potencial antioxidante nos testes *in vitro*, os efeitos fisiológicos promovidos nos animais demonstraram sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo desencadeado durante o processo inflamatório.

O estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROS e o sistema de defesa antioxidante, é um potencial mecanismo de lesão tecidual que contribui para a patogênese de diversas doenças, dentre elas a DII. Em tecido cólico de pacientes acometidos pela DII o estresse oxidativo se encontra aumentado, enquanto os níveis de defesa antioxidante se encontram diminuídos (LIH-BRODY et al., 1996). Entre os antioxidantes intracelulares, a glutathiona (GSH) é o mais importante, sendo essencial para a integridade funcional e estrutural do intestino (SIDO et al., 1998). A GSH é um tripeptídeo com distribuição abundante em todos os compartimentos celulares que desempenha diversas funções essenciais no meio intracelular. Sob condições fisiológicas normais, a enzima glutathiona redutase (GSR) reduz rapidamente a glutathiona oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (GSH), sendo esta última correspondente a mais de 98% da glutathiona intracelular (BIRBEN et al., 2012; DELEVE; KAPLOWITZ, 1991; MASELLA et al., 2005). A razão GSH/GSSG é o maior determinante do estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2012). O estresse oxidativo associado ao quadro inflamatório é caracterizado por uma redução significativa do conteúdo de glutathiona cólica, como foi evidenciado no nosso estudo. Embora o extrato da farinha de banana prata verde tenha

apresentado um discreto potencial antioxidante *in vitro*, quando adicionada a dieta oferecida aos animais nas proporções de 5% e 10%, a farinha foi capaz de evitar significativamente a depleção do conteúdo de glutatona, atenuando o estresse oxidativo associado ao quadro inflamatório. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a variedade AAA (banana nanica verde), quando incorporada à dieta dos animais, também foi capaz de evitar a depleção de GSH em ratos com cólon inflamado, mantendo os níveis antioxidantes semelhantes aos animais saudáveis (SCARMINIO et al., 2012). No presente trabalho, sugerimos que a capacidade da dieta enriquecida em evitar a depleção de GSH cólica pode estar associada aos diferentes compostos antioxidantes presentes no fruto.

A composição química da banana é fortemente influenciada pelo estágio de maturação do fruto (HAPPI EMAGA et al., 2007, 2008, 2011). A variedade AAB, em seu primeiro estágio de maturação (verde), é rica em amido resistente, fibras insolúveis, principalmente lignina e celulose e em fenóis, como taninos, ácido gálico, catequinas, antocianinas (HAPPI EMAGA et al., 2008, 2011; SINGH et al., 2016). Outros compostos presentes na composição da banana também podem estar associados a sua atividade antioxidante, como vitaminas e carotenoides (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). Após a caracterização fitoquímica do extrato etanólico da farinha de frutos verdes de *Musa* sp AAB realizada no presente trabalho, detectamos a presença de fenóis totais, taninos e saponinas. Taninos e outros compostos, como esteróis, ácidos graxos e flavonoides também foram identificados por outros autores no extrato de frutos de *Musa* sp (PASSO TSAMO et al., 2015; UCLÉS SANTOS; BAKRY; BRILLOUET, 2010; VILELA et al., 2014).

Em nosso estudo, a atividade antioxidante do extrato da farinha de banana prata verde foi avaliada *in vitro* por dois diferentes métodos. Pelo método DPPH, onde é

avaliada a capacidade do antioxidante presente no extrato em sequestrar o radical livre DPPH, a IC<sub>50</sub> foi de 1135,62 µg/mL, valor 600 vezes menor do apresentado pelo ácido gálico puro (1.89 µg/mL), utilizado como substância referência. Já no ensaio de peroxidação lipídica, o extrato da farinha de banana prata verde apresentou IC<sub>50</sub> de 457,7 µg/mL, valor 644 vezes inferior ao apresentado pelo flavonoide quercetina (0,71 µg/mL) utilizado como referência, e 6 vezes menor à IC<sub>50</sub> do extrato da farinha de banana nanica verde, que em experimentos anteriores apresentou IC<sub>50</sub> de 67,61 µg/mL (SCARMINIO et al., 2012). Esses resultados nos mostram que *in vitro* a farinha de *Musa* sp AAB apresenta discreto potencial antioxidante.

O efeito anti-inflamatório da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde foi avaliado bioquimicamente sobre a capacidade desta em reduzir a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA). A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos de células imunes polimorfonucleares, chamadas neutrófilos, e sua atividade têm sido largamente utilizadas como um marcador de inflamação (MORRIS et al., 1989). Durante o processo inflamatório cólico ocorre uma intensa migração de neutrófilos na área lesionada, sendo os níveis de atividade dessa enzima diretamente proporcionais ao número de neutrófilos presentes (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984). A capacidade de reduzir a atividade dessa enzima pode ser interpretada como uma propriedade anti-inflamatória de um determinado composto (OCETE et al., 1998). Nossos resultados mostraram um aumento significativo desse biomarcador nos animais do grupo controle-TNBS em relação aos animais saudáveis, contudo nenhuma das dietas enriquecidas foi capaz de reduzir a atividade dessa enzima. Nos estudos conduzidos com a banana nanica verde, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a atividade desta enzima foi reduzida nos grupos experimentais que receberam as dietas enriquecidas nas concentrações de 5, 10 e 20% (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017;

SCARMINIO et al., 2012), dados que sugerem uma melhor atividade anti-inflamatória da variedade AAA (banana nanica verde).

A FA é uma glicoproteína pertencente à família das fosfatases alcalinas, que em pH alcalino separam as porções de fosfato. A FA apresenta distribuição ubíqua entre os tipos celulares e tecidos, e embora suas funções fisiológicas sejam pouco elucidadas, sabe-se que essa enzima se encontra aumentada em processos inflamatórios, sendo indicada como um biomarcador de inflamação em diferentes estudos (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; DISTASI et al., 2004; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004; WITAICENIS et al., 2012). De fato, no nosso trabalho foi possível observar um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina nos animais com inflamação intestinal induzida, mas as dietas enriquecidas não foram capazes de alterar esse parâmetro. Nos estudos conduzidos com a banana nanica verde, a redução dessa enzima foi observada somente nos grupos que receberam a dieta enriquecida a 20% (SCARMINIO et al., 2012).

No modelo experimental utilizado, a inflamação intestinal é induzida nos animais por meio da instilação intracólica de uma solução contendo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) diluído em álcool 50%. O álcool é responsável por romper a barreira epitelial e o TNBS, por ser um hapteno, se liga a proteínas cólicas e atua como um antígeno, induzindo uma resposta imune e desencadeando uma inflamação transmural (GOYAL et al., 2014; RIEDER et al., 2012). De fato, nossos resultados demonstraram que a instilação do TNBS nos animais desencadeou um processo inflamatório que foi evidenciado macroscopicamente pela formação de uma lesão que se estendeu ao longo do epitélio cólico, acompanhada de um espessamento da parede intestinal e hiperemia. A existência de aderência entre o cólon e os órgãos adjacentes, observada em todos os animais do grupo controle-TNBS, também pode ser considerada um indicativo de inflamação transmural (LEVINE, 1994). A relação peso/comprimento

do cólon também é utilizada como um parâmetro macroscópico de ocorrência da inflamação, já que é um marcador de edema tecidual (NISHIMURA et al., 2010). No nosso estudo, a relação peso/comprimento do cólon foi significativamente mais alta no grupo que teve a inflamação intestinal induzida por TNBS quando comparada ao grupo saudável, no entanto nenhuma das dietas enriquecidas com farinha de banana prata verde foi capaz de alterar esse parâmetro, tendo o mesmo acontecido com o escore macroscópico. De fato, esses são parâmetros difíceis de serem revertidos, uma vez que nosso modelo experimental provoca uma lesão extensa e severa (VELJACA et al., 1995). Nos estudos conduzidos com a banana nanica verde, por exemplo, a alteração da relação peso/comprimento foi observada somente na dieta enriquecida a 20%, assim como a melhora do escore macroscópico (SCARMINIO et al., 2012). Por outro lado, a extensão da lesão causada pelo processo inflamatório foi reduzida nos dois grupos alimentados com as dietas enriquecidas com a farinha de banana prata verde a 5 e 10%. A melhora do dano tecidual pode estar relacionada a determinados compostos presentes na constituição química da banana.

Como já mencionado, a banana verde é rica em amido resistente e em fibras solúveis e insolúveis, que diminuem com o amadurecimento do fruto (ADÃO; GLÓRIA, 2005; HAPPI EMAGA et al., 2008, 2011; REDDY; VIDYA; HARIPRIYA, 2015). Estudos demonstraram que em seu estágio verde, as bananas apresentam maiores quantidades de fibras insolúveis, principalmente lignina, seguida de celulose e hemicelulose (HAPPI EMAGA et al., 2008). A melhora do dano tecidual pode ser justificada pela atividade antioxidante desses compostos, já comprovada em diversos trabalhos (AZADFAR; GAO; CHEN, 2015; DIZHBITE et al., 2004; SUN et al., 2014). Além disso, as fibras insolúveis, assim como as solúveis e o amido resistente, são utilizados como substratos pela microbiota intestinal comensal para a produção de ácidos

graxos de cadeia curta (AGCCs), principalmente acetato, propionato e butirato (FLINT et al., 2008; MORTENSEN; CLAUSEN, 1996; RICHARDS et al., 2016). Inúmeros estudos comprovaram que a ingestão desses compostos favorece o aumento da produção de AGCCs (HEDEMANN; THEIL; BACH KNUDSEN, 2009; RABBANI et al., 2009). Os AGCCs por sua vez podem promover uma série de efeitos benéficos ao organismo, atuando como anti-inflamatórios, antioxidantes e imunomoduladores (RICHARDS et al., 2016). O butirato, por exemplo, é utilizado como fonte energética pelas células epiteliais intestinais (colonócitos) (LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; MACFARLANE; MACFARLANE, 2011), de modo que o aumento da produção desse AGCC pode afetar positivamente o funcionamento dessas células e contribuir para a regeneração tecidual. Embora a quantificação da produção de AGCCs ainda está sendo realizadas, em estudos anteriores realizados com a farinha de banana nanica verde foi demonstrado que houve um aumento na produção desses compostos nos animais que receberam as dietas enriquecidas nas concentrações de 5% e 10% (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017). A ingestão de banana verde (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) também favoreceu o aumento da produção de AGCCs, principalmente do butirato, em pacientes acometidos por uma infecção intestinal aguda (RABBANI et al., 2009). O mesmo foi observado em animais alimentados com uma dieta enriquecida com amido resistente (HEDEMANN; THEIL; BACH KNUDSEN, 2009).

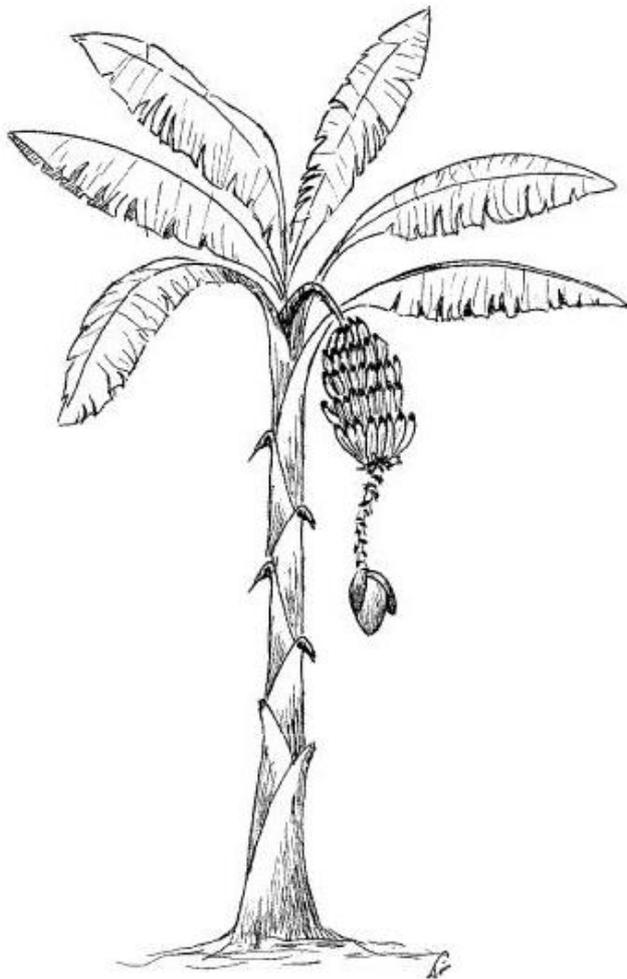
O estresse oxidativo pode ter sido modulado positivamente não somente pelos compostos presentes na composição química da banana, mas também pelo fato das dietas enriquecidas terem evitado a depleção de muco no cólon dos animais. O muco é uma secreção aderente viscoelástica complexa produzida por células especializadas do epitélio intestinal, chamadas células caliciformes. O muco é formado por água, sais, proteínas e em sua maioria por glicoproteínas pertencentes a classe das mucinas (BROWNLEE et al.,

2007; DHANISHA et al., 2018). As mucinas são compostas por carboidratos (85%) e proteínas (15%), representando aproximadamente 4% do peso do muco-gel (BROWNLEE et al., 2007; HARRIS et al., 1992). A camada de muco reveste todo o epitélio intestinal e além de apresentar função lubrificante, atua como uma barreira física entre o epitélio e os antígenos presentes no lúmen intestinal, sendo considerada a primeira linha de defesa contra patógenos (BUISINE et al., 1999). Portanto, a manutenção dessa barreira, que conseqüentemente resulta na manutenção da integridade do epitélio intestinal, é um importante fator protetor contra o desenvolvimento da DII. Sabe-se que a ingestão de fibras pode promover inúmeros efeitos benéficos ao indivíduo, influenciando inclusive a produção de muco cólico (BROWNLEE, 2011). Morita et al (2004) demonstraram que nos animais alimentados com dieta enriquecida com amido de milho (fonte de amido resistente) foi observado um maior conteúdo de mucinas em relação aos demais animais. Hedemann et al. (2009) também observaram que a dieta enriquecida com amido resistente, assim como com pectina e celulose, promoveu o espessamento da camada de muco nos animais. No presente trabalho nossos resultados evidenciaram que as dietas enriquecidas com farinha de banana prata verde, especialmente na proporção de 5%, evitaram a depleção de muco no cólon. Considerando isso, sugerimos que a preservação da camada de muco cólico observada nos animais que receberam as dietas enriquecidas pode ter contribuído para o efeito protetor promovido pela farinha de banana prata verde nesses animais. Uma vez que o estresse oxidativo foi atenuado, o que foi corroborado pela manutenção dos níveis de glutathione cólica e diminuição da extensão da lesão, consideramos que a camada de muco pode ter protegido o epitélio intestinal contra as EROS produzidas. Essa proteção pode estar associada ao aumento da distância de difusão entre o lúmen e a mucosa, ocasionada pela presença da camada de muco, bem como pela eliminação das EROS, promovida pelas mucinas

(BROWNLEE et al., 2007). As mucinas contêm altas concentrações de açúcares como N-acetil-glucosamina, galactose e fucose, que podem atuar como sequestradores de radicais livres. Portanto, uma vez que o muco, formado em sua maioria por mucinas, recobre o epitélio intestinal, essa barreira pode proteger o epitélio contra um ataque oxidativo (GRISHAM et al., 1987). De fato, a resistência do muco-gel ao ataque das EROS já foi evidenciada em alguns estudos (BROWNLEE et al., 2007).

Portanto, considerando todos os resultados apresentados e com base nos dados referentes ao consumo de alimento e ganho de peso corporal dos animais que demonstraram que os ratos que receberam as rações enriquecidas com a farinha de banana prata verde se adaptaram bem a dieta e apresentaram consumo semelhante aos grupos que receberam a ração padrão, este produto pode ser considerado uma potencial terapia complementar para a DII. Essa aceitação dos animais à nova dieta é um fator relevante a ser considerado quando se busca produtos naturais que possam ser utilizados como uma alternativa complementar no tratamento de doenças crônicas, pois reflete a viabilidade de se aplicar de fato o estudo em pacientes acometidos pela doença. Além disso, o fato da banana ser um dos frutos mais consumidos no mundo também reforça a possibilidade desse alimento ser incorporado como uma potencial terapia complementar para a DII.

Por outro lado, o presente estudo mostra a necessidade de estudos detalhados, especialmente na avaliação da produção de AGCCs e conseqüentemente no perfil de citocinas, assim como da interferência da dieta enriquecida com farinha de banana prata verde na expressão gênica de mucinas.



CONCLUSÃO

Diante do objetivo e resultados apresentados, podemos concluir que:

- A dieta enriquecida com farinha de banana prata verde (*Musa* sp AAB) nas concentrações de 5 e 10% melhora o processo inflamatório intestinal devido sua capacidade de modular o estresse oxidativo relacionado ao processo inflamatório.
- A melhora do estresse oxidativo também pode estar relacionada a influência da farinha de banana prata verde na produção de muco cólico.
- A farinha de banana prata verde pode ser uma alternativa de tratamento complementar para pacientes acometidos pela DII, desde que novos estudos que caracterizem seus efeitos sejam realizados e confirmem o efeito protetor aqui observado.



REFERÊNCIAS

ADÃO, R. C.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of “Prata” banana (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 705–711, 2005.

ALMEIDA-JUNIOR, L. D. et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp. AAA) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 497–504, 2017.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 4, p. 205–217, 2015.

ANDERSON, M. E. Determination of Glutathione and Glutathione Disulphide in Biological Samples. **Annual review of biochemistry**, v. 113, n. 1983, p. 548–555, 1985.

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 78–91, 2009.

AZADFAR, M.; GAO, A. H.; CHEN, S. Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 58–66, 2015.

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

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

BINDER, H. J. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 297–313, 2010.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 118, p. 1199–1200, 1958.

BOLTIN, D. et al. Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 2, p. 106–111, 2013.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 521–533, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 28, p. 25–30, 1995.

BROWNLEE, I. A. et al. Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. **Free radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 800-808, 2007.

BROWNLEE, I. A. The physiological roles of dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 238-250, 2011.

BUISINE, M.-P. et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 5, n. 1, p. 24-32, 1999.

CAMUESCO, D. et al. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 11, n. 3, p. 265-71, 2005.

CHANG, C.; LIN, H.; MEDICINE, C. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Dysbiosis in gastrointestinal disorders. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 3-15, 2016.

CONTE, M. et al. Adherent-invasive Escherichia coli (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 748, 2014.

COSTA, C. A. R. A. et al. Anti-inflammatory effects of Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-induced intestinal inflammation: Experimental evidence. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 459-469, 2015.

CUFFARI, C.; HUNT, S.; BAYLESS, T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, p. 642-646, 2001.

DAGLI, U. et al. The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 3, n. 4, p. 260-4, 1997.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G. Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 3, p. 281-291, 2009.

DELEVE, L. D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 287-305, 1991.

DEMIGNE, C.; REMESY, C.; MORAND, C. Short Chain Fatty Acids. **Nutrition and Health**, p. 55-69, 1999.

DHANISHA, S. S. et al. Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. **Critical reviews in Oncology/Hematology**, v. 122, p. 98-122, 2018.

DI STASI, L. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 315-320, 2004.

- DIZHBITE, T. et al. Characterization of the radical scavenging activity of lignins - Natural antioxidants. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 3, p. 309–317, 2004.
- FIOCCHI, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, p. 182–205, 1998.
- FLINT, H. J. et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 121–131, 2008.
- FRUET, A. C. et al. Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia* L.) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1136, 2012.
- GALVEZ, J. P.; CRUZ, A.; ZARZUELO, F.; SANCHES DE LA CUESTA. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differ from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v. 51, p.127-133, 1995.
- GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota : updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, n. 17, p. 259–275, 2004.
- GONZÁLEZ, F. G.; DI STASI, L. C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *ilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 125-134, 2002.
- GOYAL, N. et al. Animal models of inflammatory bowel disease: A review. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 4, p. 219–233, 2014.
- GRISHAM, M. B.,et al. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. **American Physiological Society**, p. G93-G96, 1987.
- GRISHAM, M. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **The Lancet**, v. 344, n. 8926, p. 859–861, 1994.
- HAMER, H. M. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104–119, 2008.
- HAPPIEMAGA, T. et al. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 590–600, 2007.
- HAPPIEMAGA, T. et al. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4346–4354, 2008.
- HAPPIEMAGA, T. et al. Ripening influences banana and plantain peels composition and energy content. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p. 171–177, 2011.
- HARRIS, M. L. et al. Fredd Radicals and other reactive oxygen metabolites in Inflammatory Bowel Disease: cause, consequence or epiphenomenon?. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 53, p. 375-408, 1992.

HEDEMANN, M. S.; THEIL, P. K.; BACH KNUDSEN, K. E. The thickness of the intestinal mucous layer in the colon of rats fed various sources of non-digestible carbohydrates is positively correlated with the pool of SCFA but negatively correlated with the proportion of butyric acid in digesta. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 117–125, 2009.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1073–1084, 2007.

IMAM, M. Z.; AKTER, S. Musa paradisiaca l. and musa sapientum l. : A phytochemical and pharmacological review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 14–20, 2011.

JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, M. C. et al. Effect of high hydrostatic pressure on the polyphenols and antioxidant activity of plantain pulp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.

KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J.; GEVERS, D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1489–1499, 2014.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344–1350, 1984.

LEVINE, R. J. Monitoring for Adherence: Ethical Considerations. *American Journal of respiratory and critical care medicine*, v. 149, p. 287-288, 1994.

LIH-BRODY, L. et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of Inflammatory Bowel Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, n. 10, p. 2078-2086, 1996.

LINDEN, S. K.; FLORIN, T. H. J.; MCGUCKIN, M. A. Mucin Dynamics in Intestinal Bacterial Infection. **Plos One**, v. 3, n. 12, p. e3952, 2008.

LIU, X. et al. ScienceDirect Dietary fiber intake reduces risk of inflammatory bowel disease : result from a meta-analysis. **Nutrition Research**, v. 35, n. 9, p. 753–758, 2015.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 661–672, 2014.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Fermentation in the Human Large Intestine. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. December, p. S120–S127, 2011.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.

MATOS F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Ceará: Ed. Universidade do

Ceará, p. 37-65, 1998.

MIYOSHI, J.; CHANG, E. B. SC. The Gut Microbiota and Inflammatory Bowel Disease. **Translational Research**, 2016.

MORITA, T. et al. Dietary Resistant Starch Alters the Characteristics of Colonic Mucosa and Exerts a Protective Effect on Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Colitis in Rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 10, p. 2155-2164, 2004.

MORRIS, G. P. et al. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 2, p. 795–803, 1989.

MORTENSEN, P. B.; CLAUSEN, M. R. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement**, v. 31, n. 216, 1996.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617–639, 2015.

NI, J. et al. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573–584, 2017.

NISHIMURA, T. et al. Cellobiose Prevents the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 105–110, 2010.

OCETE, M. A. et al. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. **Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 261–270, 1998.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 380–385, 2014.

OSHIMA, T.; MIWA, H.; JOH, T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, p. S146–S150, 2008.

PASSO TSAMO, C. V. et al. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.). **Food Chemistry**, v. 167, p. 197–204, 2015.

PEREIRA, A.; MARASCHIN, M. Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 149–163, 2015.

PRESENT, D. H. et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 1398-1405, 1999.

PRYDE, S. E. et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon - 133.full.pdf. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 133–139, 2002.

RABBANI, G. H. et al. Green banana reduces clinical severity of childhood shigellosis: A double-blind, randomized, controlled clinical trial. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 5, p. 420–425, 2009.

REDDY, C. K.; VIDYA, P. V; HARIPRIYA, S. International Journal of Biological Macromolecules Effect of chemical modification on molecular structure and functional properties of *Musa* AAB starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 1039–1045, 2015.

RICHARDS, L. B. et al. The effects of short-chain fatty acids on the cardiovascular system. **PharmaNutrition**, v. 4, n. 2, p. 68–111, 2016.

RIEDER, F. et al. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 7, p. G786–G801, 2012.

ROBERFROID, M. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1682–1687, 2000.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl, n. November, p. S1-63, 2010.

SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 4, p. 673–692, 2017.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 2317–2326, 2004.

SANDS, B. E. et al. Infliximab Maintenance Therapy for Fistulizing Crohn's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 9, p. 876–885, 2004.

SCARMINIO, V. et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Nutrition Research**, v. 32, n. 3, p. 202–209, 2012.

SHANAHAN, F. Probiotics in inflammatory bowel disease - Therapeutic rationale and role. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 6, p. 809–818, 2004.

SHEEHAN, D.; SHANAHAN, F. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Clinics of NA**, 2016.

SIDO, B. et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with Inflammatory Bowel Disease. **Gut**, v. 42, p. 485-492, 1998.

SIMMONDS, R. Inflammatory Bowel Disease – a radical view. **Gut**, v. 34, p. 865–868,

1993.

SINGH, B. et al. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits - A review. **Food Chemistry**, v. 206, p. 1–11, 2016.

SINGLETON, V. L.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzimology**, v.299, p. 152-178, 1999.

SIVAPRAKASAM, S.; PRASAD, P. D.; SINGH, N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 164, p. 144–151, 2016.

SMITH, P. K. et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

STUCCHI, A F. et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 6, p. G1298–306, 2000.

SUN, S. L. et al. Structural features and antioxidant activities of degraded lignins from steam exploded bamboo stem. **Industrial Crops and Products**, v. 56, p. 128–136, 2014.

TAN, H.; O'TOOLE, P. W. Impact of diet on the human intestinal microbiota. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 71–77, 2015.

TRAVIS, S. P. L. et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. **Gut**, v. 55, n. suppl\_1, p. i16–i35, 2005.

UCLÉS SANTOS, J. R.; BAKRY, F.; BRILLOUET, J. M. A preliminary chemotaxonomic study on the condensed tannins of green banana flesh in the *Musa* genus. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1010-1017, 2010.

UMA MAHADEVAN, M. D. Medical treatment in ulcerative colitis. **Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 1, p. 7–19, 2004.

VELJACA, M. et al. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, p. 417–422, 1995.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. DE C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009.

VILELA, C. et al. Lipophilic phytochemicals from banana fruits of several *Musa* species. **Food Chemistry**, v. 162, p. 247–252, 2014.

WITACENIS, A. et al. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6,

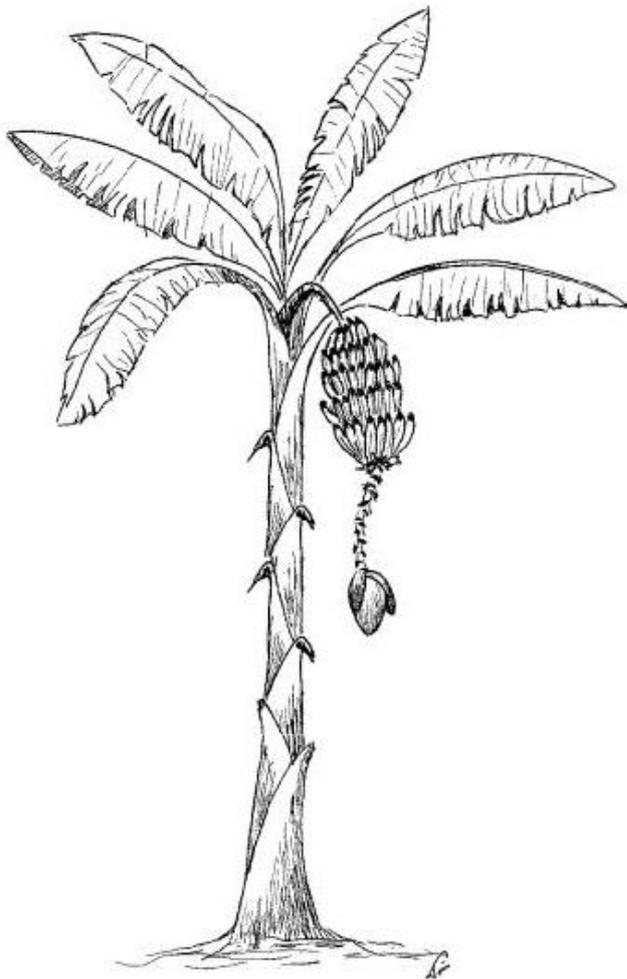
p. 1391–6, 2010.

WITAICENIS, A. et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 1, p. 76–85, 2012.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; STASI, L. C. DI. Chemico-Biological Interactions Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 2, p. 211–218, 2010.

YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 13, p. 1893–1896, 2007.

ZHANG, P.; HAMAKER, B. R. Banana starch structure and digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1552-1558, 2012.



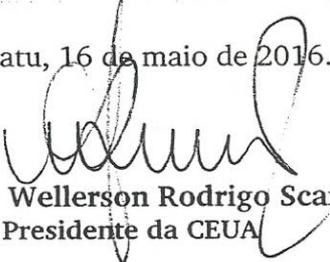
ANEXO

## Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com Musa SP AAB no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos", Protocolo nº 847-CEUA, sob a responsabilidade de **Luiz Claudio Di Stasi**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, em 8 de abril de 2016.

Finalidade:	( ) Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 02/05/2016	Término: 14/06/2016
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	42	
Peso:	180-250g	Idade: 40 dias
Sexo:	Macho	
Origem	Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. CNPJ: 65.440.612/0001-40	

Botucatu, 16 de maio de 2016.

  
Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano  
Presidente da CEUA

