UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeito trófico dos carboidratos não-disponíveis de
banana/plátano verde sobre o intestino grosso de ratos
adultos

MILANA CARA TANASOV DAN

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes

São Paulo

2007

MILANA CARA TANASOV DAN

Efeito trófico dos carboidratos não-disponíveis de banana/plátano
verde sobre o intestino grosso de ratos adultos

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciência dos
Alimentos

Orientadora:

Prof^a Dr^a Elizabete Wenzel de
Menezes

São Paulo

2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012726

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Dan, Milana Cara Tanasov

D167e Efeito trófico dos carboidratos não-disponíveis de banana/
plátano verde sobre o intestino grosso de ratos adultos / Milana
Cara Tanasov Dan. -- São Paulo, 2007.
87p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Menezes, Elizabete Wenzel de

I. Nutrição experimental : Ciências dos alimentos 2. Carboidratos :
Ciência dos alimentos I. T. II. Menezes, Elizabete Wenzel de,
orientador.

641.1 CDD

MILANA CARA TANASOV DAN

Efeito trófico dos carboidratos não-disponíveis de banana/plátano
verde sobre o intestino grosso de ratos adultos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dr^a Elizabete Wenzel de Menezes
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 21 de maio 2007.

AGRADECIMENTOS

À minha família e ao Fê, pelo amor, força e paciência.

À Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes, minha orientadora, pelos ensinamentos, apoio e carinho.

A todos do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, em especial às minhas queridas “irmãs” Giselli Cardenette, Eliana Giuntini, Grazielli Benedetti e Juliana Ferreira, pela amizade e ajuda em todas as horas.

Às minhas queridas amigas Aderuza, Adriana, Amanda, Ana Cris, Fernanda e Janaína, pela amizade e cumplicidade. Obrigada por tornarem nosso ambiente de trabalho mais gostoso!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos funcionários do Biotério da FCF-IQ/USP, por todo apoio e colaboração constantes durante os experimentos.

À Profa. Dra. Eliana Parisi Álvares e à Profa. Dra. Patrícia Gama, do Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do Departamento de Histologia e Embriologia (ICB/USP), pela orientação e por disponibilizarem a estrutura de seu laboratório e pessoal. Obrigada, Júnior, pela confecção das lâminas.

RESUMO

Vem crescendo a cada dia o interesse pelo aproveitamento biológico dos carboidratos não-disponíveis no que se refere ao amido resistente (AR) e à fibra alimentar (FA) e seus efeitos sobre a fisiologia do intestino grosso. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito trófico, decorrente da fermentação de carboidratos não-disponíveis da banana verde, no intestino grosso de ratos adultos. As amostras estudadas foram: ABV (amido isolado de plátano verde – *Musa paradisiaca* L.) e MBV (banana nanicão – *Musa acuminata*, variedade Nanicão – verde cozida com casca, descascada e seca). Foi realizado estudo de média duração (28 dias) com ratos *Wistar* adultos, divididos em três grupos: grupo Controle (G-C), que recebeu ração padrão (R-C), e dois grupos experimentais, que receberam rações com concentrações crescentes de AR, ou seja, G-MBV recebeu ração R-MBV, com 5% de AR, e G-ABV recebeu ração R-ABV, com 10% de AR. Foram avaliados consumo e fermentabilidade *in vitro* das rações; peso corpóreo; peso e umidade das fezes; pH e histologia cecais. Não foi observada diferença no consumo médio diário de ração entre os grupos. O consumo de R-ABV proporcionou menor crescimento dos animais. No G-ABV, além da queda do pH cecal, houve aumento do peso seco das fezes e do conteúdo cecal, possivelmente devido ao aumento da microbiota intestinal. Ainda nesse grupo, houve aumento do peso total do ceco, evidenciando não somente ganho de umidade (aumento do peso do conteúdo cecal) como também possível proliferação celular (aumento do peso da parede do ceco). No G-MBV, houve queda do pH cecal, devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta pela fermentação, e ganho de umidade no conteúdo cecal, resultado coerente com a maior presença de FA solúvel nesta ração. Porém, não houve aumento do peso seco das fezes nesse grupo. Pela análise histológica do tecido cecal, foi possível evidenciar que tanto a fermentação da R-ABV como a da R-MBV exerceram efeito trófico no intestino grosso desses animais ($p < 0,01$). Os resultados obtidos indicam que os carboidratos não-disponíveis presentes na banana verde exercem efeitos positivos sobre a fisiologia dos animais, apontando a possibilidade de utilização dessa matéria-prima na elaboração de alimentos voltados para a prevenção de determinadas doenças crônicas não-transmissíveis.

Palavras-chave: fermentação colônica, amido resistente, histologia do ceco, banana verde, carboidratos não-disponíveis.

ABSTRACT

The interest in unavailable carbohydrates, mainly in the possible effects of resistant starch (RS) and dietary fiber (DF) on the physiology of the large bowel, has recently increased. The present work aimed to evaluate the trophic effect, caused by the fermentation of unavailable carbohydrates from banana, on the large bowel of adult rats. Two samples were studied: ABV (starch isolated from unripe plantain – *Musa paradisiaca* L.) and MBV (unripe banana – *Musa acuminata*, variety Nanicão – cooked with peel, peeled and dried). An assay was carried during 28 days, with adult Wistar rats, divided into three groups: Control group (G-C), fed standard diet (R-C), and two experimental groups fed crescent RS concentrations (G-MBV, fed R-MBV with 5% RS, and G-ABV, fed R-ABV with 10% RS). Consumption and *in vitro* fermentation of the diets; body weight; feces weight and moisture; cecum pH and histology were evaluated. No difference was observed in the average daily consumption among the groups. Rats fed R-ABV presented decreased growth. On G-ABV, besides cecum pH decrease, there was an increase in feces and cecum content dry weight, possibly due to the increase in intestinal microbiota. There was an increase in cecum total weight, evidencing not only moisture gain (increase in cecum content weight) but also possible cellular proliferation (increase in the cecum wall weight). On G-MBV, there was a decrease in the cecum pH, due to the production of short-chain fatty acids by the fermentation, and moisture gain in the cecum content, which is coherent with the greater concentration of soluble DF in this diet. However, an increase in feces dry weight was not observed in this group. Considering the histology of the cecum tissue, it was possible to evidence that the fermentation of both R-ABV and R-MBV exerted trophic effect in the large bowel of the animals ($p < 0,01$). The results obtained indicate that unavailable carbohydrates from unripe banana exert positive effects on the physiology of the animals, pointing to the possibility of using this product on the elaboration of foods aimed to preventing certain non-transmissible chronic diseases.

Keywords: colonic fermentation, resistant starch, cecum histology, unripe banana, unavailable carbohydrates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte histológico de tecido de cólon de rato destacando as camadas. Adaptado de Junqueira; Carneiro (2004)	14
Figura 2 – Criptas intestinais. Adaptado de Johnson (2002)	15
Figura 3 – Regiões da cripta colônica (Adaptado de Goñi; López-Oliva, 2006)	25
Figura 4 – Corte histológico da região do ceco de ratos do Grupo Controle, alimentados por 28 dias com ração AIN-93G. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H;E. Ampliação original de 40x	67
Figura 5 – Corte histológico da região do ceco de ratos do Grupo MBV, alimentados por 28 dias com ração com massa de banana verde. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H;E. Ampliação original de 40x	67
Figura 6 – Corte histológico da região do ceco de ratos do Grupo ABV, alimentados por 28 dias com ração com amido isolado de plátano verde. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H;E. Ampliação original de 40x	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso médio de fezes secas diárias em cada semana. G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; * $p < 0,05$ mostra diferença significativa em relação ao grupo controle (G-Controle) (ANOVA/Tukey) 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação das rações	35
Tabela 2 – Quantificação de frações de amido e fibra alimentar (FA) de massa de banana verde (MBV) e amido isolado de banana verde (ABV)	50
Tabela 3 – Composição centesimal das rações	52
Tabela 4 - Concentração das frações de amido e fibra alimentar (FA) das rações	53
Tabela 5 - Fermentabilidade <i>in vitro</i> das rações	54
Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação <i>in vitro</i> das rações	55
Tabela 7 – Peso médio dos ratos	57
Tabela 8 - Umidade (%) de <i>pool</i> de fezes dos primeiros quatro dias de cada semana experimental	58
Tabela 9 - Peso de diferentes partes do ceco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações	61
Tabela 10 - pH e umidade do conteúdo cecal e peso do conteúdo cecal seco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações	62
Tabela 11 - Número de células por hemi-cripta de tecido de ceco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações experimentais	64
Tabela 12 - Porcentagem de criptas bifurcadas de ceco de ratos adultos alimentados por 28 dias com rações experimentais	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ABV	Amido isolado de banana verde (plátano)
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AR	Amido resistente
AR1	Amido resistente tipo 1: amido fisicamente inacessível
AR2	Amido resistente tipo 2: grânulos de amido resistentes
AR3	Amido resistente tipo 3: amido retrogradado
AR4	Amido resistente tipo 4: amido quimicamente modificado
AT	Amido total
bi	Base integral
DP	Desvio padrão
FA	Fibra alimentar
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FI	Fração indigerível
G-ABV	Grupo de ratos alimentados com R-ABV
G-Controle	Grupo de ratos alimentados com R-Controle
G-MBV	Grupo de ratos alimentados com R-MBV
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
MBV	Massa de banana nanica verde
R-ABV	Ração com amido isolado de banana verde
R-Controle	Ração controle
R-MBV	Ração com massa de banana verde

TAG	Triacilgliceróis
UFC	Unidades formadoras de colônias
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Fisiologia do intestino grosso	13
1.2. Fermentação colônica	17
1.3. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e seus efeitos fisiológicos no trato gastrintestinal	21
1.4. Amido resistente (AR)	26
1.5. Banana Plátano	29
2. Objetivo	32
3. Material e Métodos	33
3.1. Amostras	33
3.2. Produtos utilizados no ensaio biológico	33
3.2.1. Massa de banana verde (MBV)	33
3.2.2. Amido isolado de banana verde (ABV)	33
3.3. Animais	34
3.4. Rações	34
3.4.1. Ração comercial do biotério da FCF/IQ-USP	34
3.4.2. Ração controle (R-Controle)	34
3.4.3. Ração experimental MBV (R-MBV)	34
3.4.4. Ração experimental ABV (R-ABV)	35
3.5. Análises químicas	36
3.5.1. Quantificação de amido resistente (AR)	36
3.5.2. Amido disponível (AD)	37
3.5.3. Amido total (AT)	38
3.5.4. Quantificação de fibra alimentar (FA)	38
3.5.5. Quantificação de fração indigerível (FI)	38
3.5.6. Isolamento de fração indigerível (FI)	40
3.5.7. Fermentação <i>in vitro</i>	41
3.5.8. Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	42
3.6. Histologia do ceco	43
3.6.1. Preparação dos tecidos	43
3.6.2. Análise morfométrica dos tecidos	44
3.7. Análise estatística	45
4. Ensaio biológico	47
4.1. Animais e grupos experimentais	47
4.2. Coleta do ceco e determinação do pH cecal	49
5. Resultados e discussão	50
5.1. Caracterização química dos produtos de banana e das rações experimentais ...	50
5.1.1. Análise de carboidratos dos produtos de banana verde	50
5.1.2. Análise química das rações	51
5.2. Perfil da fermentação <i>in vitro</i> das rações	53
5.3. Ensaio biológico	56
5.3.1. Peso dos ratos	57
5.3.2. Consumo de ração	58
5.3.3. Fezes: peso e umidade	58
5.3.4. Características cecais	60
5.3.5. Análise histológica	63

6. Considerações finais	70
7. Conclusão	72
8. Referências bibliográficas	73
9. Anexos	84

1. INTRODUÇÃO

A principal fonte de energia na dieta humana são os carboidratos, que fornecem aproximadamente 40 a 80% do valor energético total ingerido diariamente (FAO/WHO, 1998).

Há algum tempo vêm sendo estudados os possíveis efeitos benéficos causados pelo consumo de carboidratos não-disponíveis sobre, em particular, o intestino grosso. Estudos observacionais realizados há algumas décadas demonstraram que populações nativas do leste africano, que consumiam dietas ricas em cereais integrais, apresentavam menores riscos de câncer de cólon e reto, diverticulite e constipação do que populações européias que consumiam dietas com reduzidas quantidades desses alimentos (BURKITT, 1970; BURKITT, 1973).

Desde então, diversos estudos têm relacionado o consumo de carboidratos com doenças crônicas não-transmissíveis, tais como obesidade, diabetes *mellitus* e doenças cardiovasculares (FAO/WHO, 1998; WHO/FAO, 2003), porém a velocidade de digestão e absorção dos carboidratos pode ser determinante para o controle de tais doenças. Por esse motivo, vem crescendo a cada dia o interesse pelo aproveitamento biológico dos carboidratos, principalmente no que se refere ao amido e à fibra alimentar e seus efeitos sobre a fisiologia do intestino grosso (CUMMINGS; ENGLYST, 1995; HYLLA *et al.*, 1998; MORRIS; ZEMEL, 1999).

1.1. Fisiologia do intestino grosso

Anatomicamente, o intestino grosso é dividido em ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, sigmóide e reto (GUYTON; HALL, 1998).

A porção proximal, ou seja, o lado direito (ceco, cólon ascendente e cólon transverso) e a porção distal, ou seja, o lado esquerdo (cólon descendente e sigmóide) do intestino grosso possuem diferenças no que se refere ao tipo de substrato biodisponível, concentração dos metabólitos gerados na fermentação, umidade, pH e crescimento bacteriano (CUMMINGS, 1997; WONG *et al.*, 2006).

O lado direito do intestino grosso recebe diretamente todos os nutrientes não-absorvidos pelo intestino delgado, juntamente com grande quantidade de água e eletrólitos, o que resulta em intensa atividade fermentativa nesta porção. O lado esquerdo, por sua vez, é deficiente em carboidratos, sendo as proteínas utilizadas como substrato fermentativo dominante (CUMMINGS, 1997).

Histologicamente, a parede do intestino grosso é composta pelas seguintes camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A camada mucosa é constituída por um revestimento epitelial, uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo e uma camada muscular (chamada “muscular da mucosa”), que separa a camada mucosa da submucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A camada submucosa é composta por tecido conjuntivo repleto de vasos sanguíneos e linfáticos e um plexo nervoso submucoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A camada muscular contém células musculares lisas orientadas em espiral, divididas em duas subcamadas: uma mais interna, próxima ao lúmen, orientada circularmente, e outra, mais externa, orientada em sua maior parte longitudinalmente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Finalmente, a camada serosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo, rica em vasos sangüíneos e linfáticos e tecido adiposo, revestida por um epitélio pavimentoso simples, o mesotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 1 – Corte histológico de tecido de cólon de rato destacando as camadas. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2004).

Especializada na absorção de nutrientes e no intercâmbio de grandes volumes de água e eletrólitos, a mucosa intestinal é uma grande barreira hidrofóbica, superior a 300m^2 , e é o principal local de interação do hospedeiro com substâncias estranhas e microrganismos do ambiente externo. Sua função protetora depende, em grande parte, de sua integridade (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; LUGEA *et al.*, 2000).

Estruturalmente, a mucosa intestinal é constituída por uma parede superficial de muco, produzido pelas células caliciformes, e diversos outros componentes que participam do processo de defesa do hospedeiro (BOURLIOUX *et al.*, 2003).

A camada mucosa do cólon é composta pelas criptas intestinais (Figuras 1 e 2), que têm como principal função a renovação celular. A mucosa intestinal dos mamíferos se renova a cada dois ou três dias (JOHNSON, 2002). Cada cripta é, por si só, uma unidade proliferativa (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

As criptas intestinais podem ser compartimentadas em três zonas, como pode ser observado na Figura 2: na região basal da cripta encontra-se a zona das células tronco (*stem cells*), logo a seguir encontra-se a zona de proliferação e, na região apical da cripta, a zona de diferenciação e maturação celular (JOHNSON, 2002). O processo de proliferação celular normal inicia-se na região basal da cripta e termina com a diferenciação e maturação celular na região apical.

Figura 2 – Criptas intestinais. Adaptado de Johnson (2002)

O aumento, em massa, do tecido epitelial intestinal pode ser devido a três mecanismos principais: produção celular elevada pelas criptas intestinais; número aumentado de criptas devido a elevado índice de bifurcação e, finalmente, apoptose alterada (MANDIR; FITZGERALD e GOODLAD, 2005).

O balanço entre os mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose das células epiteliais é responsável pela manutenção e regulação da estrutura da mucosa colônica (CLATWORTHY; SUBRAMANIAN, 2001).

A proliferação normal dos colonócitos acontece na base das criptas, seguida por posterior diferenciação e aparição das células maduras: os colonócitos, com função absorptiva, as células caliciformes, formadoras de mucina, e as células endócrinas, que ascendem à superfície, onde células envelhecidas dão lugar às novas, em um processo contínuo de renovação celular, a apoptose. A apoptose, ou seja, a morte celular programada, é um mecanismo considerado protetor, fundamental na manutenção da homeostase celular (BRITTAN; WRIGHT, 2002).

Entretanto, pode ocorrer a expansão da zona proliferativa, atingindo a região apical da cripta. Este fenômeno é conhecido como hiperproliferação e é um indício pré-neoplásico. Geralmente, quando isto acontece, iniciam-se crescimentos malignos/pré-malignos (SCHEPPACH; BARTRAM e RICHTER, 1995).

Existe uma relação direta entre os carboidratos da dieta e a proliferação celular da mucosa do cólon. Diversos estudos, com animais alimentados com dietas de baixo conteúdo de carboidratos não-disponíveis ou mantidos com nutrição parenteral, relataram atrofia da mucosa colônica, caracterizada pela perda de massa total, conteúdo de DNA, RNA e proteína, assim como pela diminuição do tamanho das criptas e do

índice mitótico (KORUDA *et al.*, 1990; VELÁSQUEZ *et al.*, 1997; ANDOH; TSUJIKAWA e FUJIYAMA, 2003).

O efeito proliferativo da mucosa colônica parece ser um resultado da ação dos produtos da fermentação, em especial do ácido graxo de cadeia curta butirato, sobre o epitélio intestinal (McCULLOUGH *et al.*, 1999).

1.2. Fermentação colônica

O maior componente do conteúdo intestinal é a microbiota, que alcança, no cólon ascendente, concentrações de aproximadamente 10^{12} unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de conteúdo luminal e é responsável pela fermentação dos diferentes substratos que chegam ao cólon (CUMMINGS, 1997; SALMINEN *et al.*, 1998; WONG *et al.*, 2006). A microbiota colônica habitual permanece sempre na entrada das vilosidades, nunca no interior das criptas.

Os componentes da dieta não digeridos por enzimas intestinais nem absorvidos no intestino delgado chegam ao intestino grosso, onde podem ser degradados pelas bactérias ali presentes. Este processo denomina-se fermentação colônica e consiste na degradação anaeróbia de substratos, principalmente carboidratos, pela microbiota intestinal (GOÑI; MARTÍN-CARRÓN, 2001).

São substratos utilizados pelas bactérias colônicas humanas na fermentação a fração indigerível (FI) da dieta, além de uma porção considerável de mucina, células epiteliais, enzimas e outros produtos de origem endógena (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991). A FI é composta, em sua maior parte, de amido resistente, fibra alimentar, proteína resistente, oligossacarídeos, lipídios, polifenóis e outros

componentes associados (SAURA-CALIXTO *et al.*, 2000; GOÑI; MARTIN-CARRÓN, 2001).

O conceito de prebióticos está relacionado à fração indigerível ou carboidratos não-disponíveis. Em 1995, os prebióticos foram definidos como ingredientes não-disponíveis de alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro por estimulação seletiva de crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando a saúde do hóspede (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Gibson *et al.* (2004), um dos autores da primeira definição de prebióticos, propôs uma nova definição para a completa caracterização de ingredientes ou componentes alimentares como prebiótico. Segundo proposto, para ser considerado prebiótico, deve haver demonstração científica de que o componente ou ingrediente alimentar resiste aos processos de digestão e absorção no hospedeiro, deve ser fermentado pela microbiota, colonizando o trato gastrointestinal, e deve também estimular o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias dentro do trato gastrointestinal. Além disso, as demonstrações finais devem ser realizadas *in vivo*, seja em animais ou humanos.

Entretanto, nem todos os carboidratos não-disponíveis e fermentáveis podem ser considerados prebióticos (GIBSON *et al.*, 2004). A polidextrose e o amido resistente, por exemplo, estão sendo estudados para verificar seu possível efeito prebiótico, principalmente no que se refere aos seus efeitos benéficos no intestino grosso (GIBSON *et al.*, 2004; JIE *et al.*, 2000; LEAL, 2005).

A microbiota colônica pode variar de acordo com diversas condições do hospedeiro, desde o nascimento. No adulto, a microbiota é influenciada pela alimentação, pelo código genético, pelo meio ambiente em que a pessoa vive, pelo uso

de antibióticos, por estresse, por infecções, pela idade, clima, trânsito intestinal e por doenças em outros órgãos, como o fígado ou o rim. O microssistema da biota intestinal é composto de microrganismos benéficos, patogênicos e neutros. A microbiota intestinal é formada por 90% de microrganismos anaeróbicos, bacteróides e bifidobactérias. As bifidobactérias produzem vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido nicotínico, ácido fólico e biotina. Além disso, têm efeito protetor sobre o fígado, ao evitar o predomínio de organismos patogênicos produtores de substâncias tóxicas. Com isso, diminuem o trabalho do fígado de purificar as substâncias absorvidas pelo intestino delgado. No intestino grosso, as bifidobactérias fermentam os carboidratos que não foram digeridos no intestino delgado, formando gases (hidrogênio, dióxido de carbono, oxigênio, amônia, metano) e produzindo ácido láctico e ácidos graxos de cadeias curta (AGCC) (GUYTON; HALL, 1998; GOÑI; MARTIN-CARRÓN, 2001; TOPPING; CLIFTON, 2001).

Os principais fatores determinantes da fermentação são a quantidade, a estrutura físico-química e o grau de fermentabilidade dos substratos; o número de bactérias presentes no cólon e o tempo de contato entre a microbiota e os substratos fermentativos (GOÑI; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003).

A fermentação colônica resulta em um aumento da massa bacteriana e, principalmente, na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (acetato, propionato e butirato), gases (hidrogênio, metano e dióxido de carbono) e ATP (GOÑI; MARTÍN-CARRÓN, 2001). Aproximadamente 20 a 80g de carboidratos não-disponíveis alcançam o intestino grosso por dia, dos quais 8 a 40g são constituídos pelo amido resistente, 8 a 18g pelos polissacarídeos não-amido (fibras alimentares), 2 a 10g pelos açúcares não-absorvidos e 2 a 8g por outros oligossacarídeos (CUMMINGS;

MACFARLANE, 1991; HENNINGSSON; BJÖRK e NYMAN, 2002). De acordo com a estequiometria da fermentação, 10g de carboidratos fermentáveis fornecem, aproximadamente, 100 mmol de AGCC, 3g de biomassa e 50 a 100 mL de hidrogênio (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; GIBSON *et al.*, 1999; GOÑI; MARTÍN-CARRÓN, 2001).

Outros produtos também são gerados com a fermentação, tais como lactato, piruvato, etanol e succinato, e estas substâncias são formadas para manter o balanço das reações de óxido-redução durante o processo fermentativo. Além disso, estes produtos atuam como metabólitos intermediários, pois são metabolizadas a AGCC por outras espécies (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; GIBSON *et al.*, 1999; GOÑI; MARTÍN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; WONG *et al.*, 2006).

A fermentação colônica possui importantes repercussões sobre a saúde do hospedeiro. Alguns metabólitos bacterianos são *per se* substâncias tóxicas para o organismo (amoníaco, aminas e nitrosaminas carcinógenas); outros podem reduzir a biodisponibilidade de vitaminas e minerais. Entretanto, o aumento da massa bacteriana e os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (acetato, propionato e butirato) trazem benefícios para o organismo e se relacionam com a etiologia e prevenção de diferentes doenças crônicas não-transmissíveis de grande incidência na atualidade, como é o caso do câncer de cólon e doenças cardiovasculares (VELÁZQUEZ; LEDERER e ROMBEAU, 1996).

Uma vez que a quantificação da fermentação colônica *in vivo* em humanos é difícil, diversos modelos em animais têm sido utilizados. A fisiologia e trânsito gastrintestinais mais próximos dos humanos fazem do porco um animal mais

recomendado para tais estudos (TOPPING; CLIFTON, 2001; TOPPING; ILLMAN e TAYLOR, 1985; VAREL, 1987). Porém, a microbiota de porcos parece ter menor disposição à produção de butirato, comparado à de humanos (TOPPING; ILLMAN e TAYLOR, 1985), e a quantidade de bactérias no intestino grosso de porcos pode ser aumentada diversas vezes por fatores que incluem idade, dieta e diferenças genéticas (VAREL, 1987). Portanto, porcos são bons modelos animais para investigação do destino dos AGCC, mas não para sua quantificação.

Diversas peculiaridades fisiológicas e metabólicas dos ratos têm sido criticadas para utilização dos mesmos em estudos de fermentação colônica (TOPPING; ILLMAN e TAYLOR, 1985; TOPPING *et al.*, 1993). Ainda assim, a fermentação *in vivo* é bastante avaliada em ratos (MARTIN; DUMON e CHAMP, 1998) devido a menores limitações de espaço necessário para a pesquisa, pequeno porte dos animais, baixo custo relativo e ampla disponibilidade (TOPPING; CLIFTON, 2001).

A fermentação *in vitro* é um modelo amplamente utilizado para estudar o comportamento dos carboidratos não-disponíveis e os possíveis efeitos fisiológicos que os produtos de fermentação desempenham, reproduzindo o processo fermentativo nas condições *in vivo* e permitindo o conhecimento prévio do perfil de AGCC produzidos por um determinado substrato (GOÑI; MARTIN-CARRÓN, 2001).

1.3. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e seus efeitos fisiológicos no trato gastrintestinal

Os AGCC são ácidos carboxílicos saturados contendo de 1 a 6 átomos de carbono e são constituídos, principalmente, pelo ácido acético (acetato), o ácido propiônico (propionato) e o ácido butírico (butirato), totalizando 90 a 95% dos ácidos

orgânicos totais produzidos no intestino, sendo o restante correspondente aos ácidos graxos de cadeia ramificada.

A maior produção de AGCC encontra-se nas partes mais proximais do intestino grosso (ceco e cólon ascendente) e, em indivíduos saudáveis, estima-se uma produção diária que varia de 100 a 720 mM. A proporção na qual estes ácidos são produzidos varia de acordo com o substrato fermentativo mas, em geral, esta proporção molar é de 60:25:15, para o ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente (COOK; SELLIN, 1998; GOÑI; MARTÍN-CARRÓN, 2001; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002). Estes três últimos correspondem a 83 - 95% do total de AGCC no intestino grosso.

A produção de AGCC, por si só, causa uma diminuição no pH colônico, o que favorece a diminuição da concentração de amônia (NH_3) e a elevação do íon amônio (NH_4^+), excretado pelas fezes. A amônia é precursora da uréia e sua diminuição na circulação entero-hepática e no fígado pode ter efeito positivo na terapêutica da encefalopatia (YOUNES *et al.*, 1997; ROBERFROID; DELZENNE, 1998). Além disso, ocorre insolubilização dos ácidos biliares e inibição da 7- α -desidroxilase, enzima bacteriana responsável pela conversão desses ácidos primários em secundários, os quais são compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos para o intestino grosso (LUPTON, 2000; WONG *et al.*, 2006).

Os AGCC são rapidamente absorvidos pelas células epiteliais que margeiam o lúmen colônico e, então, metabolizados pelo organismo, estimulando o fluxo sanguíneo colônico, bem como a utilização de fluidos e eletrólitos (SCHEPPACH; BARTRAM e RICHTER, 1995).

O acetato é absorvido e rapidamente transportado para a veia porta, chegando a valores de 50 mmol/L durante o jejum e variando de 100 a 300 mmol/L depois de uma

dieta contendo carboidratos fermentáveis, o que demonstra, portanto, que é pouco utilizado pelos colonócitos (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997).

No hepatócito, o acetato é um substrato lipogênico, ou seja, fornece carbono para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). Os AGCL são esterificados a triacilgliceróis e, então, incorporados às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O restante do *pool* de acetato não metabolizado pelo fígado chega ao plasma, onde sua meia-vida é de poucos minutos, pois é altamente utilizado como combustível energético principalmente pelos músculos esquelético e cardíaco e cérebro (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997).

O propionato é rapidamente absorvido e a maior parte entra na circulação portal. Quantidades mínimas são metabolizadas no colonócito (CUMMINGS, 1997).

Diversos trabalhos têm mostrado a ação do propionato no metabolismo lipídico no fígado. Há evidências de que ele promove um decréscimo na concentração de triacilgliceróis (VLDL-TAG) e colesterol (LDL-C) plasmáticos sendo, portanto, um agente anti-lipogênico (DEMINGNÉ *et al.*, 1995; WILLIAMS; JACKSON, 2002; DELZENNE *et al.*, 2002).

O butirato é a principal fonte energética para os colonócitos, fornecendo mais de 70% do total de energia consumida por estas células (MORITA *et al.*, 1998; SMITH; YOKOYAMA e GERMAN, 1998; GIBSON *et al.*, 1999; PRYDE *et al.*, 2002) e afeta diversas funções celulares, como a proliferação celular e a absorção de sódio, e parece promover um fenótipo normal nestas células (SHEPPACH *et al.*, 1995). A fermentação de alguns tipos de amido resistente (AR) favorece ainda mais a produção de butirato (ANNISON; TOPPING, 1994; BERGGREN *et al.*, 1995; WONG; WRIGHT, 1999). Alguns estudos demonstraram que o butirato produzido a partir da fermentação de AR

pode apresentar efeito protetor contra câncer de cólon e reto, possivelmente por promover apoptose em células tumorais (TOPPING; CLIFTON, 2001).

A maior parte do butirato presente no lúmen é utilizada como substrato para a produção de ATP (JACOBASCH *et al.*, 1999). É sabido que baixos níveis de butirato são típicos de pacientes com colites ulcerativas e câncer de cólon (JACOBASCH *et al.*, 1999). Uma das teorias para a etiologia das colites ulcerativas (doença de Crohn e retocolite ulcerativa) é a incapacidade de metabolizar o butirato, o que implica em uma deficiência no suprimento de energia, podendo levar a uma atrofia da mucosa colônica (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; SMITH; YOKOYAMA e GERMAN, 1998; MORITA *et al.*, 1998; PRYDE *et al.*, 2002). Entretanto, outros AGCC também são utilizados como fonte energética. Pela ordem, o intestino grosso utiliza, preferencialmente, o butirato, seguido pelo propionato e, por último, o acetato (SMITH; YOKOYAMA e GERMAN, 1998).

A produção de butirato provém da fermentação bacteriana e os substratos clássicos considerados butirogênicos são o amido resistente e os frutanos, principalmente os frutooligossacarídeos (CAMPBELL; FAHEY e WOLF, 1997; PRYDE *et al.*, 2002). Aproximadamente 95% do butirato produzido pela fermentação bacteriana é absorvido pela mucosa do cólon. Na veia porta, está presente em concentrações baixas, quase indetectáveis, evidenciando, dessa forma, a sua ação predominantemente local (SMITH; YOKOYAMA e GERMAN, 1998).

Os efeitos do butirato no epitélio colônico são complexos, especialmente devido à sua ação paradoxal em células normais e neoplásicas, fenômeno designado como “efeito paradoxo do butirato”. Por um lado, exerce um estímulo proliferativo nos colonócitos normais e, por outro, inibe a proliferação celular, interrompendo o ciclo

celular, induz a diferenciação celular e estimula a apoptose em células neoplásicas do cólon (SENGUPTA; MUIR e GIBSON, 2006; SCHEPPACH; BARTRAM e RICHTER, 1995; GIBSON *et al.*, 1999; PRYDE *et al.*, 2002).

A proliferação normal dos colonócitos ocorre na parte basal das criptas, porção que corresponde a 60% da mesma (Figura 3). Os 40% restantes da cripta correspondem à zona apical, região bastante próxima ao lúmen colônico, onde se encontram células diferenciadas, esfoliadas e onde acontece, geralmente, o crescimento maligno/pré-maligno (SCHEPPACH; BARTRAM e RICHTER, 1995). Neste compartimento da cripta e também nesta linhagem celular pré ou neoplásica, o butirato promove a apoptose (SCHEPPACH; BARTRAM e RICHTER, 1995). O butirato desempenha funções tróficas no intestino grosso, pois estimula a hiperplasia e a hipertrofia de células normais colônicas, evidenciadas pelo aumento da profundidade/altura das criptas e pelo aumento da densidade das células, respectivamente (CAMPBELL; FAHEY e WOLF, 1997).

Figura 3 - Regiões da cripta colônica (Adaptado de Goñi; López-Oliva, 2006).

O butirato é um dos principais agentes tróficos do intestino grosso, promovendo a proliferação celular dos colonócitos normais, que pode ser evidenciada

macroscopicamente pelo aumento na espessura da parede do ceco e do cólon e, microscopicamente, pelo aumento da profundidade da cripta, aumento do volume celular e número de células caliciformes produtoras de muco (KLEESSEN; HARTMANN e BLAUT, 2003). Em células neoplásicas, o butirato estimula a diferenciação e a apoptose. Estes achados evidenciam a propriedade que este AGCC possui na manutenção da mucosa e na prevenção do câncer de cólon.

1.4. Amido Resistente (AR)

O amido resistente (AR) é definido como amido e produtos da hidrólise do amido que não são absorvidos no intestino delgado (ASP *et al.*, 1994). O AR tem sido identificado como o principal substrato para a microbiota intestinal humana e parece ter uma participação no organismo humano semelhante à da fibra alimentar.

Embora a atual ingestão de amido resistente na Europa e América Latina seja reduzida (ao redor de 3-6g/dia) se comparada ao consumo de outros continentes como a Ásia (8-19g/dia) (MENEZES; GIUNTINI; LAJOLO, 2001; GOÑI; MARTÍN-CARRÓN, 2001), existe considerável potencial para o aumento da ingestão deste nutriente através de alimentos e produtos alimentícios com elevado teor de amido resistente (MENEZES; LAJOLO, 2000).

Segundo Champ *et al.* (2003), o termo “amido resistente” engloba basicamente quatros tipos de amido:

- Amido fisiologicamente inacessível (AR tipo 1), encontrado em grãos e sementes parcialmente triturados, devido à presença de paredes celulares rígidas;
- Grânulos de amido resistente à hidrólise enzimática (AR tipo 2), presente na batata crua e banana verde;

- Amido retrogradado (AR tipo 3), ou seja, com cadeias de amido recristalinizadas após gelatinização sem secagem posterior imediata; formado em alimentos processados (pão e *corn flakes*) e em alimentos cozidos e resfriados (batata cozida) (CUMMINGS; ENGLYST, 1995; BJÖRCK, 1996; ROSIN; LAJOLO e MENEZES, 2002). A fração linear do amido, a amilose, é facilmente retrogradada, enquanto a amilopectina requer um tempo muito mais longo para que o processo ocorra;

- Amido quimicamente modificado (AR tipo 4), incluindo éteres e ésteres de amido bem como “amidos de ligação cruzada”.

Dependendo da quantidade de cada um destes tipos de AR no alimento, os carboidratos serão aproveitados de forma diferenciada.

Embora o AR seja analiticamente quantificado na fração fibra insolúvel, este composto se comporta fisiologicamente como fibra solúvel (HARALAMPU, 2000), representando uma fonte de carboidratos para a microbiota colônica. Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos na fermentação dos carboidratos não disponíveis estão relacionados com inúmeros efeitos benéficos sobre o metabolismo e manutenção da saúde (BJÖRCK, 1996).

O conteúdo de AR na dieta influencia o aproveitamento energético do alimento, sendo observada perda de parte da energia no intestino delgado, uma vez que o AR não é digerido nesta porção do trato digestório (LIVESEY, 1990). Entretanto, a atividade da microbiota colônica e a produção de AGCC no intestino grosso são capazes de minimizar as perdas de energia (CUMMINGS *et al.*, 1992). Outras possíveis consequências do AR atingir o intestino grosso como fração indigerível são o aumento do bolo fecal (CUMMINGS *et al.*, 1992; SHETTY *et al.*, 1986) e mudanças no pH fecal (FLOURIE *et al.*, 1986). Tais efeitos possuem grandes implicações sobre disfunções

como obstipação, diverticulites, hemorróidas e câncer de cólon (CUMMINGS *et al.*, 1992; MUIR *et al.*, 1995).

As bactérias colônicas humanas fermentam o amido resistente (AR) e os polissacarídeos não-amido, produzindo principalmente ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (acetato, propionato e butirato). A fermentação de alguns tipos específicos de AR favorece ainda mais alguns de seus efeitos no cólon (ANNISON; TOPPING, 1994; BERGGREN *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1999; WEAVER *et al.*, 1992).

A fermentação *in vitro* do AR tem mostrado que este causa aumento na proporção de butirato em relação aos outros AGCC (ENGLYST; MACFARLANE, 1986; MACFARLANE; ENGLYST, 1986; WEAVER *et al.*, 1992) e diminuição da excreção fecal de ácidos biliares secundários, *in vivo* (VAN MUNSTER; NAGENGAST, 1993).

O amido resistente tipo 2, presente na banana verde, apresenta uma reduzida susceptibilidade à amilase tanto *in vitro* quanto *in vivo* em ratos e humanos (ASP *et al.*, 1994; FAISANT *et al.*, 1995). Faisant *et al.* (1995) verificaram, por técnica de intubação em indivíduos saudáveis, que o amido da banana verde é pouco digerido no intestino delgado. Resultados semelhantes foram observados por Englyst *et al.* (1996), empregando técnicas *in vitro* e *in vivo* com indivíduos ileostomizados.

A velocidade de fermentação do AR é variável de acordo com o tipo de AR (1, 2, 3 ou 4). Alguns tipos desaparecem em um total de 24h de fermentação *in vitro*. Outros são mais resistentes à fermentação bacteriana não chegando à fermentação total em até 24h (MARTIN; DUMON e CHAMP, 1998). Topping *et al.* (1997) sugerem que o AR tipo 2 é mais rapidamente fermentado quando comparado com outros tipos de AR.

O AR faz parte da fração indigerível (FI) ou carboidratos não-disponíveis, que são os principais substratos de fermentação para a microflora colônica. Outros componentes resistentes à ação de enzimas digestivas, como polifenóis e outros componentes associados, estão incluídos na composição da FI (MENEZES *et al.*, 2004).

1.5. Banana/Plátano

O Brasil responde por cerca de 10% da produção mundial de banana e é o segundo produtor mundial após a Índia, porém tem uma participação de apenas 0,5% no comércio internacional da fruta (EMBRAPA, 2005), devido, principalmente, à defasagem nas normas de qualidade e a falta de compatibilidade com os padrões básicos vigentes nos mercados compradores da fruta *in natura*.

O setor de bananicultura gera hoje mais de 500 mil empregos diretos no país. Muito apreciada no Brasil e no mundo, a banana é a quarta cultura agrícola mais importante do planeta, atrás apenas do arroz, do trigo e do milho. Além disso, tem ainda enorme importância social, pois é uma fonte barata de energia, vitaminas e minerais.

Apesar da produção brasileira de banana ser de aproximadamente 6,5 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2005), 60% da colheita nacional se perde antes de chegar ao consumidor final, pois a fruta apresenta uma vida útil muito curta e precisa ser consumida rapidamente, o que representa um significativo desperdício.

O mesmo acontece com o plátano, subgrupo de bananas correspondente à banana “terra” no Brasil, que é cultivado em diversos países da América Latina. Sua utilização e consumo não seguem a mesma proporção de sua produção, uma vez que há grande perda desde a plantação e armazenamento até a comercialização. No Equador, a produção de plátano é bastante significativa tanto para consumo como para exportação.

Em Cuba, o plátano é bastante consumido pela população em geral, na forma natural ou processada.

Por outro lado, a banana verde, assim como o plátano verde, possui uma vida útil muito mais longa, é mais fácil de ser transportada e seu armazenamento pode ser feito por mais tempo do que o da banana já madura. Por estes motivos, a banana verde vem sendo considerada um produto ideal para ser industrializado, além de apresentar elevado teor de AR e reduzida concentração de açúcares solúveis.

O amido é o principal componente de banana/plátano verde, correspondendo a 60-80% (base seca) da composição do fruto, o que pode ser comparado à porcentagem encontrada no milho ou na batata (ZHANG *et al.*, 2005).

Cordenunsi *et al.* (2000) verificaram que as farinhas de banana verde de 8 cultivares apresentam consideráveis teores de amido resistente, variando entre 25 e 33%. Estes teores mostram que a banana verde é uma fonte alternativa nacional para a ingestão de AR, bem como uma matéria-prima potencial para a elaboração de produtos alimentícios com amido de reduzida digestibilidade.

A aplicação de AR na elaboração de produtos é de interesse tanto para a indústria de alimentos como para o consumidor (WARING, 1998; LAJOLO *et al.*, 2001). O AR pode ser utilizado como fonte de fibra alimentar, uma vez que apresenta efeitos fisiológicos semelhantes aos da fibra e, devido ao seu reduzido conteúdo energético, pode ser empregado como complemento na formulação de produtos com reduzido teor de lipídios e/ou açúcares.

Uma de suas propriedades físico-químicas, sua reduzida capacidade de absorver água (ao contrário da fibra alimentar), permite que o AR seja empregado sem grandes modificações e ajustes na formulação de produtos e, além disso, sua coloração branca,

tamanho pequeno de partículas e *flavor* brando possibilitam a formulação de produtos com maior palatabilidade que os elaborados com fibra alimentar.

Apesar da elevada produção de banana no Brasil, ou de plátano nos demais países da América Latina, há significativa perda e desperdício e poucos estudos sobre estes alimentos têm sido realizados.

O Projeto de Cooperação Internacional CYTED XI.18/CNPq “Composição, estrutura, propriedades biológicas de carboidratos e sua utilização em alimentos” (2001-2005) deu início ao estudo dos carboidratos de lenta digestão de diferentes alimentos Ibero-Americanos, sendo avaliados aspectos físico-químicos, tecnológicos e parte dos nutricionais. Posteriormente, foi criado o Projeto de Cooperação Internacional CYTED 106PI0297 “Bases científicas e tecnológicas para produção de alimentos funcionais a partir de plátano/banana verde” (2006-2008), cuja meta principal é o estudo nutricional das farinhas de banana verde.

O presente trabalho faz parte desse segundo projeto de cooperação internacional e visa avaliar, sob o aspecto histológico do ceco, o efeito do consumo dos carboidratos não-disponíveis presentes na banana verde.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito trófico, decorrente da fermentação de carboidratos não-disponíveis da banana verde, no intestino grosso de ratos adultos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras foram compostas por banana verde (*Musa acuminata* – variedade Nanicão), estágio de maturação I, totalmente verde, fornecidas pela Associação de Bananicultores do Vale do Ribeira, e plátano verde (*Musa paradisiaca* L.), proveniente do México.

3.2. Produtos utilizados no ensaio biológico

3.2.1. Massa de banana verde (MBV)

Bananas nanicão (*Musa acuminata* – variedade Nanicão) verdes foram lavadas com água, sabão e hipoclorito em tanques industriais. Em seguida, foram cozidas com casca, imersas em água (100°C), em autoclave sem pressão, por aproximadamente 8 minutos; descascadas manualmente; trituradas em moinho industrial e secas em estufa ventilada a 60°C. Após a secagem, a MBV foi novamente triturada em moinho com peneira de baixa granulometria.

Todo o processo de produção de MBV foi otimizado e elaborado em parceria com o Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Carmen Tadini.

3.2.2. Amido isolado de banana verde (ABV)

O isolamento do amido de plátano (*Musa paradisiaca* L.) verde foi realizado em escala piloto, no Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México, segundo a técnica descrita por Flores-Gorosquieta *et al.* (2004).

As bananas utilizadas para o isolamento do amido no México foram obtidas no comércio local de tal país. Nesta região, o subgrupo plátano é o mesmo denominado “terra” no Brasil (PACHECO-DELAHAYE; TESTA, 2005).

3.3. Animais

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar Hannover* obtidos a partir de colônias mantidas no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP).

O experimento com ratos foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) (Anexo).

3.4. Rações

3.4.1. Ração comercial do biotério da FCF/IQ-USP

Ração comercial Nuvital[®] descontaminada por irradiação gama.

3.4.2. Ração controle (R-Controle)

Ração elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. segundo as recomendações *do American Institute of Nutrition* para dietas AIN- 93 G (REEVES; NIELSEN e FAHEY, 1993) (Tabela 1).

3.4.3. Ração experimental MBV (R-MBV)

Ração elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. segundo as recomendações *do American Institute of Nutrition* para dietas AIN-93G (REEVES;

NIELSEN e FAHEY, 1993), com o amido de milho substituído por massa de banana verde (MBV) (item 3.2.1) (Tabela 1).

3.4.4. Ração experimental ABV (R-ABV)

Ração elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para dietas AIN-93G (REEVES; NIELSEN e FAHEY, 1993), com parte do amido de milho substituído por amido de banana verde (ABV) (item 3.2.2) (Tabela 1).

As rações foram preparadas e utilizadas dentro do prazo de validade.

Tabela 1 - Formulação das rações

Ingredientes (g/kg ração)	R-Controle	R-MBV	R-ABV
Caseína ¹	200,0	200,0	200,0
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0
L-cisteína	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina ²	2,5	2,5	2,5
Mistura vitamínica ³	10,0	10,0	10,0
Mistura mineral ⁴	35,0	35,0	35,0
<i>Carboidratos</i>			
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Amido de milho	529,5	-	362,8
MBV (para AR = 5% da ração)	-	579,5	-
ABV (para AR = 10% da ração)	-	-	166,7
<i>Fibra alimentar</i>			
Celulose microcristalina ⁵	50,0	-	50,0
Fibra inerente à MBV	-	100,0	-

¹ Contendo no mínimo 85% de proteína; ² 41,1% de colina; ³ AIN-93-VX; ⁴ AIN-93G-MX; ⁵ Solka-Floc, 200 FCC, FS;D, St. Louis, MO (90 a 95% de celulose, 5 a 10% de hemicelulose e 5% de umidade). R-Controle = ração controle AIN93-G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido isolado de banana verde.

3.5. Análises químicas

3.5.1. Quantificação de amido resistente (AR)

O amido resistente foi quantificado utilizando-se o método A.O.A.C. 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLEARY; McNALLY e ROSSITER, 2002), com adaptações. Todas as amostras analisadas foram secas e tamisadas (60 mesh).

Foram analisadas triplicatas de 100mg de amostra, em tubos de plástico (50mL) graduados, de fundo cônico, com tampa. As amostras foram pré-lavadas duas vezes com 8mL de etanol 80% (v/v), centrifugadas (3000rpm) por 10 minutos e os sobrenadantes foram reservados em balões volumétricos de 50mL fechados e refrigerados a 4°C para posterior quantificação de amido disponível. Aos resíduos foram adicionados 4mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1M (pH = 6) contendo CaCl₂ 1mM, azida sódica 0,02%, amiloglicosidase (4U/mL, Sigma A-7255), α -amilase (300U/mL, Sigma A-3176) e pepsina (500U/mL, Sigma P-7012). Os tubos contendo os resíduos em solução foram agitados, tampados e incubados a 37°C por 16h sob agitação.

Após a incubação, foram adicionados 8mL de etanol 99% e os tubos foram agitados e centrifugados (3000rpm) por 10 minutos, sem tampa. A lavagem com etanol 99% foi realizada mais uma vez e então os sobrenadantes foram combinados com os já reservados em balões refrigerados a 4°C para quantificação de amido disponível.

Com os tubos contendo resíduos parcialmente submersos em banho de gelo, com barras de agitação e sob agitação magnética, foram adicionados 3mL de KOH 2M e deixados sob agitação. Após 20 minutos, foram adicionados 10mL de tampão NaAc/HAc 1,2M (pH = 3,8), as barras de agitação foram removidas e a agitação magnética cessada. O pH foi verificado e, se necessário, ajustado com solução de NaOH ou HCl para pH = 4,75. Imediatamente foram adicionados 0,1mL de amiloglicosidase

(3200U/mL de tampão NaAc/HAc, pH = 4,75), os tubos foram agitados, tampados e incubados em banho sob agitação a 50°C por 30 minutos.

Após a incubação, os tubos tiveram o volume de solução completado a 20mL com água Milli-Q e então foram centrifugados (3000rpm) por 10 minutos. No sobrenadante, foi determinado o teor de glicose livre pelo método enzimático glicoseoxidase/peroxidase/ABTS (BERGMEYER; BERNET, 1974). Para amostras contendo teor de AR superior a 10%, após a incubação a 50°C, a solução contendo resíduo foi diluída a 100mL com água Milli-Q e 20mL desta solução diluída foram então centrifugados e analisados como descrito para as outras amostras.

O feijão carioca (marca Camil) foi utilizado como parâmetro comparativo das análises. O feijão foi cozido sem pressão, em água, por tempo suficiente para consumo, isto é, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foi seco em estufa ventilada (60°C), triturado e tamizado (60 mesh).

3.5.2. Amido disponível (AD)

O amido disponível foi quantificado baseado no método A.O.A.C. 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLEARY; McNALLY e ROSSITER, 2002), com adaptações.

Os balões contendo sobrenadantes reservados a 4°C, obtidos como mencionado no item 3.5.1, tiveram seu volume completado a 50mL com água Milli-Q. No sobrenadante foi determinado o teor de glicose livre pelo método enzimático glicoseoxidase/peroxidase/ABTS (BERGMEYER; BERNET, 1974). Para amostras contendo teor de AD superior a 20%, o volume do balão foi completado a 100mL com

água Milli-Q e o restante da determinação de glicose foi seguido como descrito anteriormente. O feijão carioca foi utilizado como padrão interno das análises.

3.5.3. Amido total (AT)

O conteúdo de amido total foi determinado a partir da soma dos teores de AR e AD de cada réplica, quantificados com base no método A.O.A.C. 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLEARY; McNALLY e ROSSITER, 2002) (itens 3.5.1 e 3.5.2).

3.5.4. Quantificação de fibra alimentar (FA)

As amostras a serem analisadas foram previamente secas, tamisadas (60 mesh) e desengorduradas. Os conteúdos de fibra solúvel, insolúvel e total foram determinados pelo método enzimico-gravimétrico A.O.A.C. 991.43 (LEE; PROSKY e DEVRIES, 1992) com modificações propostas por McCleary e Rossiter (2004).

O método é baseado na determinação do resíduo resultante da eliminação do amido e da proteína de amostras previamente desengorduradas, através de hidrólise alcalina, hidrólise enzimática e posterior precipitação das fibras solúveis na presença de etanol 78%. As modificações no método se referem a um pré-tratamento das amostras com DMSO em banho a 100°C por 30 minutos para eliminar interferências do conteúdo de amido resistente possivelmente envolvido na matriz da fibra.

3.5.5. Quantificação de fração indigerível (FI)

A fração indigerível das amostras foi quantificada com base nos métodos propostos por Saura-Calixto *et al.* (2000) e Serrano; Goñi e Saura-Calixto (2005), com modificações. As amostras utilizadas foram previamente secas, tamisadas (60 mesh) e desengorduradas.

Em tubos de ensaio de 30mL, previamente secos e tarados, foram pesados 300mg de amostra, em triplicatas. Foram adicionados 8mL de tampão KCl/HCl 0,1M (pH = 1,5) para homogeneização das amostras em homogeneizador (Brinkmann, Polytron) e em seguida 0,2mL de pepsina (65000U/mL tampão KCl/HCl 0,1M, pH = 1,5). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho-agitação a 40°C por 60 minutos.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 4M (aproximadamente 150μL). Em seguida, foram adicionados 8mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1M (pH = 7,0) contendo 5mg de pancreatina (Sigma P-1750), 14mg de lipase (Sigma L-3126), 35mg de extrato de bile de porco (Sigma B-8631) e 120mg de α-amilase (Sigma A-3176). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 37°C por 16 horas.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas (3000rpm) por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de plástico de 50mL com tampa. Os resíduos foram lavados com 10mL de água Milli-Q e centrifugados novamente, sendo este ciclo repetido duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e os resíduos reservados.

Fração indigerível insolúvel – para a quantificação da FI insolúvel, os tubos de vidro identificados contendo os resíduos foram colocados em estufa a 105°C por 18h. Quando retirados, foram reservados em dessecadores e pesados assim que atingiram a temperatura ambiente. Os teores de FI insolúvel foram calculados gravimetricamente.

Fração indigerível solúvel – para a quantificação da FI solúvel, o pH dos sobrenadantes foi ajustado para 4,75 com HCl 1M. Em seguida, foi adicionado 1mL de amiloglicosidase (12mg/mL tampão NaAc/HAc 1,2M, pH = 4,75), os tubos foram

tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 60°C por 45 minutos. Após a incubação, as soluções foram dialisadas em membranas de diálise de 12000-14000 MWCO por 48h, a 37°C, em baldes com água sob agitação magnética. A água da diálise foi trocada aproximadamente 10 vezes em intervalos mínimos de 3 horas, durante o período de 48h de diálise. Os dialisados foram então transferidos para frascos de vidro de boca larga de 50mL previamente secos e tarados. Os frascos contendo os dialisados foram colocados em estufa a 105°C por 36h. Quando retirados, foram reservados em dessecadores e pesados assim que atingiram a temperatura ambiente. Os teores de FI solúvel foram calculados gravimetricamente.

Fração indigerível total – a FI total foi calculada pela soma de FI insolúvel e FI solúvel de cada réplica.

3.5.6. Isolamento de fração indigerível (FI)

A fração indigerível foi isolada baseada no método de quantificação da FI descrita no item 3.5.5, com modificações. A quantidade de amostra inicial a ser isolada foi equivalente à necessária para obtenção de 0,8g de FI e as soluções e enzimas adicionadas foram aumentadas proporcionalmente. A FI foi obtida de forma total, combinando-se os resíduos finais de FI insolúvel e os dialisados com FI solúvel, antes de serem secos em estufa. A secagem foi feita a vácuo em *speedvac*. A FI seca foi então congelada a - 20°C até sua utilização.

3.5.7. Fermentação *in vitro*

Para avaliar o processo de fermentação *in vitro*, o método foi baseado nas propostas de Goñi e Martín-Carrón (2001) e Serrano; Goñi e Saura-Calixto (2005), com modificações. As amostras utilizadas foram sempre frações indigeríveis isoladas, segundo descrito no item 3.5.6.

Foram preparadas seis réplicas de 100mg de fração indigerível de cada amostra em frascos de vidro de 50mL secos e tarados. Uma triplicata das amostras foi preparada para ser indicativa de 0h de fermentação e a outra triplicata para indicar 24h de fermentação. Brancos de fermentação (frascos sem amostra) e padrão (Lactulose – Sigma L-7877) também foram incluídos. As frações indigeríveis contidas nos frascos de fermentação foram hidratadas com 8mL de meio de fermentação (MF) ativado e anaeróbio. O MF foi preparado conforme o método adaptado de Goering e van Soest (1979), com triptona, água Milli-Q, solução micromineral, tampão bicarbonato, solução macromineral e solução de rezasurina. Os frascos foram tampados com ceptos de borracha, agulhas de entrada e saída de gás foram pinçadas nos ceptos, com válvulas de três vias nas pontas, e CO₂ foi borbulhado por 1 minuto em cada frasco para certificação de que o meio estivesse anaeróbio. As válvulas foram fechadas e os frascos armazenados a 4°C por 16h.

No dia seguinte, os frascos de fermentação foram retirados da geladeira até que estivessem em temperatura ambiente. Foi preparado um inóculo com o conteúdo cecal de ratos *Wistar* machos, com aproximadamente 300g de peso corpóreo, diluído (100g/L) em MF ativado e anaeróbio. O inóculo foi misturado em um homogeneizador de amostras Tipo Stomacher (Logen Scientific) e filtrado (1mm mesh) antes de sua utilização. Foram adicionados 2,5mL de inóculo em cada frasco de fermentação e

novamente foi borbulhado CO₂ por aproximadamente 1 minuto em cada frasco, para garantir meio anaeróbio. Os frascos 24h tiveram as agulhas removidas dos ceptos, que foram então revestidos com Parafilm[®], para evitar vazamentos de gases formados, e foram incubados a 37°C sob leve agitação por 24h.

Frascos 0h – os frascos foram destampados, foram adicionados 5mL de água Milli-Q, o pH foi verificado e em seguida foram adicionados mais 3mL de água, para lavar o eletrodo, e 3mL de NaOH 1M, para parar a fermentação. Os frascos foram então centrifugados (3500rpm) a 4°C por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para balões volumétricos de 25mL. Os resíduos foram colocados em estufa a 105°C para quantificação do resíduo não fermentado (RNF) por gravimetria. Os sobrenadantes foram completados a 25mL com água Milli-Q e congelados para futura análise de AGCC.

Frascos 24h – após 24h, os frascos foram retirados da incubação e resfriados até temperatura ambiente. A pressão interna de cada frasco foi medida com manômetro com detecção de 0 a 15psi. Os frascos foram então destampados e o mesmo procedimento efetuado com os frascos 0h foi aplicado.

Os parâmetros determinados na fermentação *in vitro* foram: pH; pressão interna dos frascos, proporções molares de ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, propiônico e butírico) e fermentabilidade dos substratos (quantificação do RNF).

3.5.8. Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC provenientes da fermentação *in vitro* foram quantificados por cromatógrafo a gás (CG) HP 6890 Plus, com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar CP7747 de sílica fundida (WCTO), Varian. A temperatura do injetor e do

detector foi 270°C, a corrida foi em rampa de 115°C a 270°C sob pressão constante (tempo de corrida = 13min). As amostras foram injetadas em volume de 3µL, com *split* 1:30, por injetor HP 7683.

A curva padrão foi obtida com soluções de AGCC (Volatile Acid Standard Mix, Supelco) e ácido 2-metil-valérico (Aldrich 10987-8) como padrão interno (PI), em concentrações de 0,05 a 5,00 mM.

Em *eppendorfs*, foram preparados 0,5mL de solução contendo AGCC, 0,4mL de solução de PI e 0,1mL de HClO₄ em concentração tal que mantivesse o pH de todas as amostras ácido e semelhante. Os *eppendorfs* foram centrifugados (12.000rpm) a 4°C por 15 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para *vials* adaptáveis em bandeja de injeção automática.

3.6. Histologia do ceco

As técnicas histológicas utilizadas para estudar parâmetros do intestino grosso foram padronizadas no Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A aplicação dessas técnicas foi supervisionada pela Prof^a Dr^a Eliana Parisi Álvares.

3.6.1. Preparação dos tecidos

Após a retirada do conteúdo cecal, as paredes cecais foram lavadas com solução salina (NaCl 0,09%) e presas em pedaços de cortiça com alfinetes, de forma que a mucosa estivesse posicionada para cima.

As etapas pelas quais passaram os tecidos até inclusão em parafina foram: fixação; desidratação; diafanização; infiltração; inclusão e coloração.

Fixação – A fixação foi realizada com formoldeído a 10%, que permaneceu em contato com os tecidos por 20 horas.

Desidratação – A água residual do tecido foi extraída pela passagem do tecido em banhos de concentrações crescentes de álcool (etanol), iniciando-se com 70%, até etanol puro. A duração da ação dos desidratantes em cada tecido durou 1 hora.

Diafanização – A diafanização consistiu da passagem do tecido em banhos de xilol, com um tempo de duração de 1 hora para cada tecido.

Inclusão em parafina – Os tecidos foram mergulhados em parafina fundida em um recipiente retangular e, devido à temperatura do meio de inclusão, o xilol evaporou-se e os espaços, primeiramente ocupados por ele, foram preenchidos pela parafina. Em seguida, com o resfriamento da parafina, foram formados blocos contendo o complexo parafina-tecido. Estes blocos de parafina contendo os tecidos foram seccionados por uma navalha de aço do micrótomo. Foram realizados cortes semi-seriados de 6 µm de espessura. Estes cortes foram esticados em água quente e, em seguida, colocados em lâminas histológicas.

Coloração – Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

3.6.2. Análise morfométrica dos tecidos

Para realização da análise morfométrica dos tecidos foram feitas contagens do número total de criptas longitudinais, porcentagem de criptas bifurcadas e altura/profundidade das criptas.

Para a estimativa da altura/profundidade das criptas, foi contado o número de células contidas em um lado da cripta (hemi-cripta), desde a base até o ápice. Tanto para a estimativa da altura das criptas como para a contagem de criptas bifurcadas e número total de criptas longitudinais por corte, foram selecionadas as criptas dispostas longitudinalmente no corte histológico ou perpendicular à lâmina própria e à musculatura (CUMMINGS *et al.*, 2006).

A análise das lâminas histológicas foi realizada através de microscopia de luz (Carl Zeiss, Alemanha), utilizando-se uma ocular integradora e objetiva projetando um aumento de 100 vezes o tamanho do material analisado, para a contagem do número total de células contidas em cada hemi-cripta, ou um aumento de 40 vezes, para a estimativa do número total de criptas por corte. Foram capturadas imagens dos cortes da mucosa intestinal com auxílio do software Image Pro Plus (versão 6.0) adaptado ao microscópio óptico Olympus BX51.

Foram analisadas 15 lâminas, sendo 5 lâminas de cada um dos grupos experimentais (G-Controle, G-MBV e G-ABV). Cada lâmina contém de 6 a 12 cortes histológicos.

Os resultados do número total de criptas longitudinais por animal e profundidade das criptas foram obtidos através do cálculo da média de todos os cortes e todas as lâminas de cada grupo. O número total de criptas bifurcadas foi obtido através do cálculo da porcentagem de criptas bifurcadas presentes no corte histológico.

3.7. Análise Estatística

Para comparações de dois grupos experimentais foi utilizado o teste “t” de Student não pareado. Para comparações entre três grupos foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA). Como testes *post-hoc* foram utilizados os testes Tukey.

Para serem comparados estatisticamente, os dados de porcentagem de criptas bifurcadas, obtidos por animal, foram previamente submetidos à transformação arcosseno (SOKAL; ROHLF, 1995).

As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ e muito significantes quando $p < 0,01$.

Como recurso para as análises foram utilizados os programa Statistica 5.0, StatSoft® e Minitab for Windows (Versão 14.1).

4. ENSAIO BIOLÓGICO

O ensaio biológico foi realizado juntamente ao ensaio de média duração do projeto de doutorado do curso de pós-graduação em Ciências dos Alimentos “Produtos derivados de banana verde (*Musa spp.*) e sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica”, da aluna Giselli Helena Lima Cardenette. (CARDENETTE, 2006).

A utilização do mesmo ensaio biológico nos dois projetos foi possível uma vez que se trata das mesmas amostras de estudo (MBV e ABV), com avaliação de parâmetros complementares. O presente projeto estudou a parte histológica, e o projeto de doutorado, os parâmetros metabólicos relacionados com a tolerância à glicose.

O experimento com ratos foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) (Anexo).

4.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar Hannover*, obtidos a partir de colônias mantidas no Biotério da FCF/IQ - USP.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) e com ciclo de luz claro:escuro de 12h por 6 semanas, contando com o período de adaptação (1 semana). Foram utilizados 96 animais (32 animais para cada tipo de ração), inicialmente com 5 semanas de vida. O ensaio foi dividido em duas etapas, cada uma com 48 animais, por limitações de espaço e viabilização da análise de diversos parâmetros estudados.

Em cada etapa, os 48 animais foram submetidos a uma semana de adaptação ao ambiente, onde foram separados em gaiolas metabólicas. Os ratos iniciaram o período de adaptação com peso ao redor de 100g e foram alimentados com ração comercial do Biotério da FCF/IQ-USP (item 3.4.1). Após uma semana, os animais foram pesados e divididos em três grupos de 16 ratos de forma que o peso médio dos grupos se mantivesse semelhante.

Cada grupo, contendo 16 animais em cada etapa, passou a receber, por 28 dias, um tipo diferente de ração (item 3.2). O grupo controle (G-Controle) recebeu ração AIN-93G (R-Controle) (item 3.2.2); o grupo MBV (G-MBV) recebeu ração AIN-93G com o amido de milho substituído por massa de banana verde (R-MBV) (item 3.2.3) e o grupo ABV (G-ABV) recebeu ração AIN-93G com parte do amido de milho substituído por amido de banana verde (R-ABV) (item 3.2.4). Foram utilizados 32 animais por grupo no ensaio como um todo.

Entretanto, para as análises histológicas foram utilizados apenas 5 animais de cada grupo, totalizando 15 animais, número suficiente para avaliação dos parâmetros histológicos. Na primeira etapa, foram escolhidos 2 animais de cada grupo e, na segunda etapa, foram escolhidos 3 animais de cada grupo. Os demais animais foram utilizados para avaliação dos parâmetros fisiológicos.

A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*.

O consumo da ração foi avaliado diariamente.

A fim de avaliar o crescimento, o controle de peso dos animais foi realizado a cada 2 dias, desde a chegada dos animais à sala de experimentação.

As fezes foram coletadas em *pool* nos quatro primeiros dias de cada semana para avaliação da umidade e peso seco ao longo do experimento.

Todo contato com os animais (alimentação, pesagem, limpeza) foi feito no mesmo horário de cada dia.

4.2. Coleta do ceco e determinação do pH cecal

Após 28 dias consumindo os três diferentes tipos de ração (R-Controle, R-MBV e R-ABV), os animais foram colocados em jejum de 8 horas para posterior coleta do ceco.

Os animais foram anestesiados com 75uL/100g de rato de uma solução contendo xilazina (Coopazine®) e cloridrato de cetamina (Vetaset®), na proporção de 1:2 (v/v), via intraperitoneal. Em seguida, o ceco dos animais foi delimitado, removido e imediatamente pesado.

Logo após a remoção e pesagem do ceco, o pH do conteúdo cecal foi medido com um pHmetro portátil (Denver Instrument Company®) acoplado a um eletrodo de calibre de 5 mm de diâmetro (Denver Instrument Company® n.º 3007361). Após medir o pH, o conteúdo cecal foi removido para que a parede cecal fosse pesada.

Nas paredes do ceco foram realizadas análises histológicas para avaliar as possíveis alterações da mucosa após 28 dias de ingestão de dietas com carboidratos de diferentes digestibilidades. Para que isto fosse possível, os tecidos tiveram que passar por uma sequência de tratamentos até que fossem feitas as lâminas histológicas, conforme descrito no item 3.6.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química dos produtos de banana e das rações experimentais

5.1.1. Análise de carboidratos dos produtos de banana verde

A Tabela 2 apresenta a concentração de carboidratos nos dois produtos de banana verde: ABV (amido isolado de banana verde) e MBV (massa de banana verde).

Tanto o ABV como o MBV são considerados produtos fontes de amido resistente (AR), apesar da MBV apresentar menor teor de AR (8% b.i.) do que o ABV (60% b.i.). Por outro lado, a MBV também é um produto fonte de fibra alimentar (FA), com teor de FA total igual a 10% b.i., assim como o ABV, que contém menor teor desse componente (1,4% b.i.) (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantificação de frações de amido e fibra alimentar (FA) de massa de banana verde (MBV) e amido isolado de banana verde (ABV)

	AR	AD	AT	FA insolúvel	FA solúvel	FA total
	(% b.i.)					
MBV	7,9 ± 0,2 ^a	51,1 ± 1,2 ^a	59,1 ± 1,3 ^a	5,6 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,2 ^a	9,9 ± 0,2 ^a
ABV	60,3 ± 2,3 ^b	15,2 ± 0,9 ^b	75,4 ± 2,5 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	1,2 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0,2 ^b

AR = amido resistente; AD = amido disponível; AT = amido total. Resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre valores da mesma coluna, analisada por teste “t” de Student, considerando $p < 0,05$.

Em populações nas quais o consumo de amido resistente e fibra alimentar é considerado pouco adequado, como é o caso da população brasileira (MENEZES; GIUNTINI e LAJOLO, 2001), produtos como estes são muito importantes para garantir

a ingestão diária de fibra alimentar. Além de fontes de AR e FA, os produtos de banana verde ABV e MBV contêm, respectivamente, 70 e 21% (b.i.) de fração indigerível total.

Para caracterizar o perfil de fermentação *in vitro* de ABV e MBV, no estudo realizado por Cardenette (2006), suas frações indigeríveis (FI) foram isoladas e fermentadas. Os produtos de banana verde apresentaram alta fermentabilidade *in vitro*, o que justificou sua utilização no presente estudo, para que o efeito trófico decorrente da fermentação desses produtos pudesse ser avaliado. De acordo com Cardenette (2006), a FI do ABV mostrou-se mais fermentável do que a da MBV, considerando-se diversos parâmetros de fermentabilidade.

5.1.2. Análise química das rações

A ração controle (R-Controle) foi elaborada de acordo com as determinações da AIN-93G. As rações experimentais foram elaboradas com parte dos carboidratos da AIN-93G substituídos por massa de banana verde (R-MBV) ou amido isolado de banana verde (R-ABV), ambos produtos fontes de fibra alimentar (FA) e amido resistente (AR). As rações foram congeladas (-20°C) para que antes de sua utilização tivessem sua composição centesimal analisada e para evitar a proliferação de microrganismos.

A ração experimental R-MBV teve o amido de milho e a celulose substituídos por massa de banana verde (MBV), produto fonte de FA e AR, resultando em uma ração contendo 5% de AR e 5% de FA total (ambos provenientes da MBV), o que totaliza 10% de carboidratos não-disponíveis em sua formulação.

A ração experimental R-ABV teve parte do amido de milho substituído por amido isolado de banana verde (ABV), que consiste em amido de plátano verde isolado,

com alto teor de amido resistente, resultando em uma ração contendo 10% de AR (provenientes do ABV) e 5% de FA total (provenientes de celulose), o que totaliza 15% de carboidratos não-disponíveis em sua formulação.

As rações experimentais foram elaboradas objetivando uma ração controle (R-Controle), sem adição de AR, e duas rações experimentais com concentrações crescentes de AR (R-MBV=5% e R-ABV=10% de AR), provenientes de produtos de banana verde.

A Tabela 3 apresenta os resultados das análises de composição centesimal das rações.

Tabela 3 - Composição centesimal das rações

	Umidade (%)	Cinzas	Lipídios (%b.i.)	Proteína	CHO Totais
R-Controle	6,8 ± 0,3	3,0 ± 0,1	7,0 ± 0,0	17,8 ± 0,2	65,5
R-MBV	7,5 ± 0,4	2,9 ± 0,1	6,8 ± 0,1	19,1 ± 0,4	63,7
R-ABV	5,9 ± 0,3	4,6 ± 0,1	7,0 ± 0,1	17,8 ± 0,3	64,8
AIN-93G (referência)	6,6	4,2	7,0	18,0	64,0

R-Controle = ração controle AIN-93G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde; CHO Totais = carboidratos totais calculados por diferença. Resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP.

Como pode-se observar na Tabela 3, as rações são isoproteicas e os demais componentes estão presentes em quantidades semelhantes. Apesar das três rações conterem a mesma concentração de carboidratos totais, é importante saber quais carboidratos estão presentes.

A Tabela 4 apresenta as concentrações das diferentes frações de amido e de fibra alimentar das rações analisadas após sua elaboração.

Tabela 4 - Concentração das frações de amido e fibra alimentar (FA) das rações

	Amido			FA		
	Resistente	Disponível	Total	Insolúvel	Solúvel	Total
	(%b.i.)					
R-Controle	1,9 ± 0,1	41,44 ± 1,8	43,3 ± 1,7	5,73 ± 0,25	0,11 ± 0,07	5,85 ± 0,30
R-MBV	5,5 ± 0,2	36,5 ± 1,7	42,0 ± 1,6	3,32 ± 0,25	3,30 ± 0,15	6,61 ± 0,32
R-ABV	10,6 ± 0,1	32,3 ± 1,2	42,8 ± 1,2	5,66 ± 0,20	0,04 ± 0,01	5,70 ± 0,19

R-Controle = ração controle AIN93-G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde; AR = amido resistente; AD = amido disponível; AT = amido total; resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP.

De acordo com a Tabela 4, pode-se notar uma concentração crescente de amido resistente entre as rações R-Controle (2%), R-MBV (5,5%) e R-ABV (10,6%), respectivamente. Estes resultados indicam que uma fermentabilidade *in vivo* crescente nessa mesma ordem entre essas rações seja esperada e, por sua vez, provoque maior crescimento no intestino grosso dos animais devido principalmente à ação de específicos AGCC produzidos na fermentação.

5.2. Perfil da fermentação *in vitro* das rações

A fermentação *in vitro* das rações experimentais visou estimar seu possível perfil fermentativo *in vivo*. Para isto, as rações foram desengorduradas, tiveram suas frações indigeríveis (FI) isoladas e estas foram fermentadas *in vitro*, com inóculo de conteúdo cecal de ratos e incubadas a 37°C por 24h, em meio anaeróbico.

O principal parâmetro avaliado na fermentação *in vitro* foi a produção de AGCC, porém outros parâmetros foram utilizados para complementar a avaliação da eficiência do processo fermentativo. Foram medidas a variação de pH das amostras antes e depois do período de incubação (Δ pH), a pressão interna dos frascos contendo as

amostras após incubação e, além disso, foi determinado o resíduo não fermentado (RNF), ou seja, foi calculada a porcentagem de substrato que não foi fermentado mesmo após 24h de incubação anaeróbia.

As Tabelas 5 e 6 mostram resultados dos diversos parâmetros indicativos da fermentação *in vitro* das rações. A Tabela 5 apresenta resultados de porcentagem de fermentabilidade tendo como referência lactulose = 100%, ou seja, os dados foram calculados como sendo porcentagem da variação de pH, porcentagem da pressão formada em 24 horas, porcentagem de resíduo não fermentado (RNF) após incubação anaeróbia e, finalmente, porcentagem de AGCC totais produzidos após o processo de fermentação.

Tabela 5 - Fermentabilidade *in vitro* das rações

	Fermentabilidade ¹ (%)									
	ΔpH^2	Pressão ³			RNF ⁴			AGCC totais ⁵		
R-Controle	12,4	26,5	±	4,0	20,0	±	3,1	44,7	±	5,9
R-MBV	19,1	47,1	±	0,1	58,9	±	11,0	63,3	±	4,1
R-ABV	38,2	76,5	±	7,3	59,3	±	3,9	98,4	±	13,9

¹sendo lactulose = 100% (referência); ² (média de pH 24h) - (média de pH 0h); ³pressão formada em 24h; ⁴porcentagem de resíduo não fermentado = $100 \times (\text{massa seca final de resíduo após a fermentação}) / (\text{massa seca inicial de amostra})$; ⁵ soma da produção de acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato e valerato (C2-C5). Resultados expressos como média ± DP.

A Tabela 6 apresenta a proporção molar dos diferentes AGCC e a concentração total dos AGCC produzidos.

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação *in vitro* das rações

	Proporção molar ¹			AGCC Totais ²
	Acetato	Propionato	Butirato	(mmol/g substrato)
R-Controle	70,1 ± 0,1	17,5 ± 0,8	12,3 ± 0,9	1,7 ± 0,2
R-MBV	62,3 ± 4,1*	22,2 ± 1,1*	15,5 ± 3,0*	2,4 ± 0,1*
R-ABV	71,5 ± 1,4	15,7 ± 0,7*	12,8 ± 0,9	4,1 ± 0,6*

¹ porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato; ²soma da produção de acetato, propionato e butirato. Resultados expressos como média ± DP. Valores a mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes. Diferença, entre valores da mesma coluna, analisada por ANOVA/Tukey, considerando *p<0,05 em relação à R-Controle.

Na literatura, alta fermentabilidade refere-se à grande produção de AGCC *in vitro* (TOPPING; CLIFTON, 2001). No presente estudo, as rações mostraram-se fermentáveis e todos os parâmetros de fermentabilidade demonstraram fermentação crescente entre R-Controle, R-MBV e R-ABV, respectivamente (Tabelas 5 e 6). Esse resultado era esperado, em função da crescente concentração de amido resistente observada na análise das rações (Tabela 4).

Segundo Muir *et al.* (2004), embora a quantidade total de butirato produzida seja elevada nas fermentações de AR, nem sempre é notada diferença significativa na proporção molar dos AGCC totais produzidos. Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* apontam o AR como melhor substrato para a produção de butirato do que outras fontes de polissacarídeos não-amido (TOPPING; CLIFTON, 2001; NOAKES *et al.*, 1996; MUIR *et al.*, 2004), enquanto outros trabalhos questionam o efeito butiragênico da fermentação do AR (CUMMINGS *et al.*, 1996; WACKER *et al.*, 2002).

A produção total de AGCC em fermentações *in vitro* varia, de acordo com o substrato, entre 0,4-14,2mmol de AGCC por grama de substrato. A proporção do butirato em relação aos outros dois principais AGCC produzidos na fermentação

geralmente de 12-36%, em substratos que consistem basicamente de AR, e 1-20%, em substratos contendo essencialmente FA (GOÑI; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Apesar da fermentação *in vitro* da R-ABV produzir maior concentração de AGCC totais em relação à fermentação da R-Controle e R-MBV (Tabela 5), sua fermentação não apresentou maior proporção molar de butirato (Tabela 6). Por outro lado, a R-MBV, que apresentou maior concentração de FA solúvel em comparação à R-ABV (Tabela 4), apresentou significativo aumento nas proporções molares tanto de butirato como de propionato, indicando possível efeito trófico no intestino grosso (GIBSON *et al.*, 1999; PRYDE *et al.*, 2002) e também no controle do metabolismo lipídico (WILLIAMS; JACKSON, 2002).

5.3. Ensaio biológico

O ensaio de média duração foi realizado com ratos adultos tratados com rações contendo diferentes quantidades de amido resistente (AR). A ração controle (R-Controle) foi preparada para não conter quantidade significativa de AR, enquanto as rações experimentais R-MBV e R-ABV foram elaboradas de forma que contivessem concentração de AR igual a 5% e 10% e de carboidratos não-disponíveis igual a 10% e 15%, respectivamente.

Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (G-Controle), alimentado com R-Controle; grupo MBV (G-MBV), alimentado com R-MBV e grupo ABV, alimentado com R-ABV.

Os animais foram tratados por 28 dias com essas rações para avaliação do efeito da ingestão de diferentes quantidades de AR de banana verde sobre parâmetros

histológicos do ceco. Paralelamente, foram avaliados o consumo de ração, o perfil de crescimento e o peso das fezes dos animais, bem como peso e umidade do ceco.

5.3.1. Peso dos ratos

O peso dos animais foi verificado a cada 2 ou 3 dias. Os dados de pesagem dos ratos podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 - Peso médio dos ratos

Dia	Peso médio (g)		
	G-Controle	G-MBV	G-ABV
1	157 ± 18	160 ± 15	156 ± 17
4	167 ± 12	172 ± 13	163 ± 13
7	183 ± 13	183 ± 16	176 ± 17
9	199 ± 13	204 ± 18	187 ± 19*
12	213 ± 13	220 ± 17	198 ± 20*
15	226 ± 15	234 ± 21	213 ± 22*
18	234 ± 15	242 ± 19	221 ± 23*
20	244 ± 16	254 ± 19	228 ± 22*
22	254 ± 15	262 ± 19	240 ± 22*
24	262 ± 17	270 ± 21	247 ± 22*
26	271 ± 17	278 ± 22	255 ± 25*
28	277 ± 18	286 ± 22	260 ± 28*

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo. *p<0,05 mostra diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA Tukey).

De acordo com a Tabela 7, os animais do G-ABV tiveram seu peso diminuído de forma significativa a partir do 9º dia de experimento, enquanto o G-MBV não mostrou diferença em relação ao G-Controle. Isto indica que o consumo da R-MBV

(ração com 5% de AR) não influenciou o crescimento dos animais, enquanto o consumo da R-ABV (ração com 10% de AR) influenciou o aporte energético para os animais.

5.3.2. Consumo de ração

A ração foi oferecida *ad libitum* e seu consumo calculado diariamente, em g/animal, durante os 28 dias de ensaio.

Não houve diferença significativa entre o consumo médio diário de ração pelos diferentes grupos. Na primeira semana experimental, o consumo médio diário de ração entre os três grupos foi de $16 \pm 0,5$ g/ rato. Na quarta e última semana experimental o consumo médio entre os grupos foi de $18,8 \pm 0,4$ g/ rato.

5.3.3. Fezes: peso e umidade

As fezes foram coletadas em *pool*, nos quatro primeiros dias de cada semana, para avaliação das alterações de umidade e peso seco das fezes dos diferentes grupos ao longo do experimento (Tabela 8).

Tabela 8 - Umidade (%) de *pool* de fezes dos primeiros quatro dias de cada semana experimental

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
	(%)			
G-Controle	34 ± 2	29 ± 2	31 ± 2	33 ± 2
G-MBV	$44 \pm 2^{**}$	$39 \pm 2^{**}$	$41 \pm 2^{**}$	$40 \pm 2^{**}$
G-ABV	$44 \pm 2^{**}$	$39 \pm 2^{**}$	$40 \pm 2^{**}$	$40 \pm 2^{**}$

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; $^{**}p < 0,01$ mostra diferença muito significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

De acordo com a Tabela 8, nota-se que as fezes dos animais G-MBV e G-ABV, alimentados com R-MBV e R-ABV, respectivamente, apresentaram teor de umidade muito superior às do G-Controle. Isto pode ser devido à capacidade dos carboidratos não-disponíveis de proporcionar maior retenção de água no intestino grosso e conseqüentemente aumentar o peso úmido das fezes. Paralelamente, pode-se observar no Gráfico 1 um aumento no peso seco das fezes do G-ABV, decorrente, possivelmente, do aumento da microbiota intestinal e da presença de resíduo não fermentado nesse grupo.

Gráfico 1 - Peso médio de fezes secas diárias em cada semana.

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; * $p < 0,05$ mostra diferença significativa em relação ao grupo controle (G-Controle) (ANOVA/Tukey).

Conforme pode ser observado na Tabela 8 e, indiretamente, no Gráfico 1, a R-ABV (AR=10%) proporcionou aumento tanto na umidade como na massa bacteriana, enquanto a R-MBV (AR=5%) proporcionou somente aumento na retenção de água nas fezes, uma vez que o peso seco das fezes do G-MBV foi semelhante ao do G-Controle.

De acordo com estes resultados, é possível supor que a R-ABV tenha maior fermentabilidade do que a R-MBV, uma vez que um dos resultados da fermentação colônica pode ser expresso pelo aumento da massa bacteriana.

Resultados semelhantes foram encontrados por Hylla *et al.* (1998), que observaram aumento significativo de 49% no peso úmido e 56% no peso seco das fezes de indivíduos saudáveis que ingeriram dietas com alto teor de AR por quatro semanas.

Paralelamente, diversos estudos mostram associação positiva entre aumento dos pesos úmido e seco de fezes e redução do risco de câncer de cólon (FAIVRE; BOUTRON e QUIPOURT, 1993; CASSIDY; BINGHAM e CUMMINGS, 1994).

5.3.4. Características cecais

Uma vez que o principal local de fermentação em espécies não-ruminantes é o ceco (LE BLAY *et al.*, 1999), este compartimento do intestino grosso foi o local da maior parte dos estudos para a avaliação dos parâmetros fermentativos e histológicos, após o consumo das rações experimentais.

Ao final do ensaio de 28 dias, após ser removido, o ceco dos animais foi imediatamente pesado, o pH do conteúdo cecal foi quantificado, o conteúdo cecal foi removido e a parede cecal foi pesada.

O peso do ceco ainda fechado (com conteúdo), o peso somente da parede cecal e o peso do conteúdo cecal (por diferença) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Peso de diferentes partes do ceco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações

	Conteúdo cecal	Parede cecal	Ceco completo
	(g/100g rato)		
G-Controle	0,70 ± 0,08	0,21 ± 0,02	0,91 ± 0,08
G-MBV	1,06 ± 0,06	0,24 ± 0,02	1,30 ± 0,07*
G-ABV	1,98 ± 0,26**	0,39 ± 0,03**	2,37 ± 0,28**

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV). **p<0,01 e *p<0,05 mostram diferenças muito significante e significante, respectivamente, em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

As Tabelas 9 e 10 apresentam características cecais, as quais são importantes para prever ou confirmar a intensidade da fermentação colônica cecal. O aumento da parede cecal em massa pode mostrar o efeito trófico na mucosa intestinal decorrente da maior disponibilidade de AGCC, em especial de butirato, que é a principal fonte de energia para os colonócitos (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; TOPPING; CLIFTON, 2001). Estudos mostram que os AGCC estimulam o crescimento das células mucosas quando administrados intraperitonalmente ou direto no cólon (TOPPING; CLIFTON, 2001; KRIPKE *et al.*, 1989; SAKATA; YAJIMA, 1984).

O pH do conteúdo cecal indica a maior ou menor quantidade de AGCC. No caso do presente estudo, como pode ser verificado na Tabela 10, houve diminuição muito significativa do pH cecal nos grupos G-MBV e G-ABV com relação ao grupo controle (G-Controle). Este resultado indica maior fermentabilidade das rações experimentais R-

MBV e R-ABV com relação à ração controle (R-Controle) e conseqüentemente maior produção de AGCC, responsáveis pela diminuição de pH.

Tabela 10 - pH e umidade do conteúdo cecal e peso do conteúdo cecal seco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações

	pH cecal	Umidade (%)	Conteúdo cecal seco (g)
G-Controle	7,02	67,1	0,23
G-MBV	6,41**	82,1**	0,19
G-ABV	5,91**	65,7	0,63**

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G (R-Controle); G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV). **p<0,01 mostra diferença muito significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

Como pode ser observado na Tabela 10, o pH variou em aproximadamente 0,5 no G-MBV e 1,0 unidade no G-ABV, ambos em relação ao G-Controle. Segundo a literatura, o pH cecal de ratos costuma variar de 6,1 a 8,2 de acordo com a dieta administrada, ou seja, ratos alimentados com carboidratos fermentáveis chegam a ter o pH cecal reduzido em até 2 unidades (CHENG *et al.*, 1987; CHOCT *et al.*, 1998; ILLMAN; STORER e TOPPING, 1993; TOPPING; CLIFTON, 2001).

Parte do conteúdo cecal removido foi utilizada para a determinação de sua umidade. Comparando-se os resultados de umidade do conteúdo cecal (Tabela 10) com a umidade das fezes (Tabela 8), pode-se notar que o G-MBV apresenta o conteúdo cecal com maior concentração de umidade, apesar de ambos os grupos experimentais apresentarem maior umidade nas fezes se comparados ao G-Controle. Para avaliação do efeito de diluição da massa colônica, a umidade do conteúdo cecal é mais relevante. Além disto, a umidade das fezes é um parâmetro mais suscetível a erros, pois as fezes

dos animais ficaram expostas ao ambiente externo por diferentes períodos de tempo até que fossem colhidas e analisadas.

A maior umidade do conteúdo cecal do G-MBV é coerente com a maior presença de FA solúvel na ração deste grupo (Tabela 4), uma vez que a FA solúvel tem como uma de suas propriedades a capacidade de formar sistemas viscosos no intestino, como consequência da adsorção das moléculas de água (PACHECO; SGARBIERI, 2001).

Os ratos alimentados com R-MBV apresentaram a umidade do conteúdo cecal muito mais elevada do que o grupo controle (Tabela 10), o que pode causar aumento da velocidade do trânsito intestinal. Além disto, a queda de pH cecal, também observada na Tabela 10, pode favorecer a eliminação de metabólitos nocivos à saúde intestinal (LUPTON, 2000; WONG *et al.*, 2006), prevenir a colonização por bactérias patogênicas (BOUHNİK *et al.*, 2004) e aumentar a absorção de minerais, como cálcio e magnésio (OHTA *et al.*, 1994).

Ao interpretar os resultados de peso médio de fezes secas (Gráfico 1) e do conteúdo cecal seco (Tabela 10), é possível observar que, em ambos os casos, o G-ABV é o grupo que apresenta maior peso seco tanto de fezes como de conteúdo cecal, o que possivelmente indica aumento da microbiota intestinal, em massa.

5.3.5. Análise histológica

Os carboidratos não-disponíveis e fermentáveis aplicam seus efeitos fisiológicos no intestino grosso através de diversos mecanismos, exercendo um papel importante no desenvolvimento da mucosa, característica que tem sido atribuída aos AGCC produzidos a partir da sua fermentação (SAKATA, 1995).

A análise morfométrica de tecido do intestino grosso é um parâmetro que indica se há efeito trófico, o qual pode ser confirmado pelo tamanho das criptas e número de criptas bifurcadas (McCULLOUGH *et al.*, 1998).

No presente trabalho, o efeito trófico no ceco foi avaliado através dos parâmetros de altura/profundidade das criptas (Tabela 11) e porcentagem de criptas bifurcadas (Tabela 12).

Para a comparação estatística da porcentagem de criptas bifurcadas entre os grupos experimentais e o G-Controle, esses valores obtidos por animal foram previamente submetidos à transformação arcoseno (SOKAL; ROHLF, 1995).

A altura/profundidade das criptas foi determinada a partir da contagem de células por hemi-crypta, que indiretamente reflete o tamanho da mesma, como pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11 - Número de células por hemi-crypta de tecido de ceco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações experimentais

	Número de células/hemi-crypta
G-Controle	21,9 ± 0,9
G-MBV	30,3 ± 1,1**
G-ABV	39,8 ± 2,2**

Resultados expressos como média ± DP. G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G (R-Controle); G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV); n = 5 ratos/grupo; 21 hemi-cryptas/corte. **p<0,01 mostra diferença muito significativa em relação ao G-Controle (ANOVA Tukey).

Tabela 12 - Porcentagem de criptas bifurcadas de ceco de ratos adultos alimentados por 28 dias com diferentes rações experimentais

	Criptas bifurcadas (%)
G-Controle	2,3 ± 0,5
G-MBV	3,1 ± 1,0
G-ABV	8,4 ± 1,8**

Resultados expressos em porcentagem de criptas bifurcadas por corte histológico ± DP. G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G (R-Controle); G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV). **p<0,01.

Pode-se observar um número total crescente de células por hemi-crypta entre G-MBV e G-ABV em relação ao G-Controle, respectivamente (Tabela 11), mostrando que o consumo de rações à base de produtos de banana verde causou aumento muito significativo ($p < 0,01$) na altura/profundidade das criptas cecais. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram alteração no comprimento e na densidade das criptas após o consumo de carboidratos não-disponíveis (JOHNSON; GEE, 1986; HOWARD *et al.*, 1995a; HOWARD *et al.*, 1995b; McCULLOUGH *et al.*, 1998).

Como pode-se observar na Tabela 12, somente o G-ABV apresentou aumento muito significativo ($p < 0,01$) na porcentagem de criptas bifurcadas se comparado ao G-Controle. Isso pode ser explicado pela maior concentração de AR presente na R-ABV, ração rica em FA insolúvel, que contém 10% de AR e 5% de FA total (Tabela 4) e, conseqüentemente, a maior quantidade de substrato presente em sua composição para ser fermentado (Tabela 5). Por outro lado, a R-MBV, apesar de conter somente 5% de AR e 5% de FA total (Tabela 4), apresentou, *in vitro*, significativa fermentação, com

elevada produção de butirato, o que pode explicar o efeito trófico observado no intestino grosso dos animais deste grupo.

Esses tipos de mudanças microscópicas, indicadas indiretamente pela formação de AGCC, são documentadas em estudos *in vivo*, que mostram o efeito trófico exercido pelos AGCC no epitélio colônico (FRANKEL *et al.*, 1994; KORUDA *et al.*, 1990; KRIPKE *et al.*, 1989; FOLINO; MCINTYRE e YOUNG, 1995; LE LEU *et al.*, 2005).

Em estudo *in vivo* com ratos, realizado por Lupton e Kurtz (1993), verificando a relação entre a produção de AGCC, pH e morfometria celular, foi utilizada a pectina como fonte de carboidrato não-disponível e fermentável. A dieta suplementada com pectina provocou aumento significativo na altura das criptas do ceco, passando de 24,7 (no grupo controle) para 28,6 células por hemi-cripta (no grupo suplementado com pectina), demonstrando a correlação existente entre ácidos graxos de cadeia curta, especificamente o butirato, e a proliferação celular.

Em estudo realizado por McCullough *et al.* (1998), ratos alimentados com dieta suplementada com fibras apresentaram aumento no número de criptas por campo e também no número de criptas bifurcadas no cólon proximal, se comparados aos animais que receberam dieta sem fibras.

As Figuras 4, 5 e 6 ilustram as modificações morfométricas no ceco dos animais alimentados com R-Controle, R-MBV e R-ABV, respectivamente.

Figura 4 – Corte histológico da região do ceco de ratos do Grupo Controle, alimentados por 28 dias com ração AIN-93G. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H:E. Ampliação original de 40x.

Figura 5 – Corte histológico da região do ceco de ratos do Grupo MBV, alimentados por 28 dias com ração com massa de banana verde. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H;E. Ampliação original de 40x.

Figura 6 – Corte histológico da região do ceco de ratos do Grupo ABV, alimentados com ração com amido isolado de plátano verde. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H;E. Ampliação original de 40x.

A hipótese de que o aumento no consumo de fibras diminui o risco de desenvolver câncer no intestino grosso é bem documentada na literatura, porém diversos estudos não encontram tal correlação (BARON, 2005). Alguns trabalhos epidemiológicos não foram capazes de concluir que a ingestão de carboidratos não-disponíveis diminui o risco de desenvolvimento de câncer de cólon (BEYER-SEHLMAYER, 2003; FUCHS *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2005; BARON, 2005), enquanto outros encontraram significativa correlação (BEYER-SEHLMAYER, 2003; BINGHAM *et al.*, 2003).

Bingham *et al.* (2003) realizaram estudo observacional e prospectivo, mostrando que o aumento no consumo de fibras está associado à redução de 25% do risco de neoplasias de cólon.

O aumento significativo do peso da parede cecal do G-ABV, como pode ser visto na Tabela 9, também é um indício da maior proliferação celular. Apesar desse aumento significativo de peso não ter sido observado na parede cecal dos animais do G-MBV, deve-se levar em consideração o efeito trófico exercido no ceco dos animais deste grupo, que pôde ser observado pela análise histológica dos tecidos (Tabela 11). Dessa forma, somente após a análise microscópica, foi possível evidenciar o crescimento do ceco no G-MBV.

Estudar a fermentação e seus metabólitos finais é de grande valia para tentar correlacioná-los com os efeitos fisiológicos que os carboidratos não-disponíveis exercem no intestino grosso, no que se refere à morfometria e ao crescimento dos epitélios cecal e colônico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No ensaio de média duração realizado com ratos machos, três grupos de animais foram tratados por 28 dias com rações controle (R-Controle) ou experimentais elaboradas com produtos de banana verde: R-ABV, com 10% de AR, 5% de FA proveniente da celulose e um total de 15% de carboidratos não-disponíveis, elaborada com amido isolado de plátano verde ou R-MBV, com 5% de AR, 5% de FA proveniente da MBV e um total de 10% de carboidratos não-disponíveis, elaborada com massa de banana nanica verde.

- De acordo com os diversos parâmetros analisados na fermentação *in vitro* (pH, pressão, RNF e AGCC), tanto a R-ABV como a R-MBV foram mais fermentáveis do que a R-Controle.

- Apesar da fermentação da R-ABV ter produzido maior concentração de AGCC totais em relação à fermentação da R-Controle e R-MBV, a R-MBV apresentou melhor perfil fermentativo, com aumento significativo na proporção molar de butirato.

- Nos ratos alimentados com R-ABV, além da queda do pH cecal, houve aumento do peso seco das fezes e do conteúdo cecal, possivelmente devido ao aumento da microbiota intestinal. Ainda no G-ABV, houve aumento do peso total do ceco, evidenciando não somente ganho de umidade (aumento do peso do conteúdo cecal) como também possível proliferação celular (aumento do peso da parede do ceco).

- Já nos animais alimentados com R-MBV, houve queda do pH cecal, devido à produção de AGCC pela fermentação colônica, e ganho de umidade no conteúdo cecal, resultado coerente com a maior presença de FA solúvel nesta ração. Porém, não foi

possível identificar alteração na microbiota intestinal no G-MBV, uma vez que não houve aumento significativo do peso seco das fezes e da parede cecal nesse grupo.

- Pela análise histológica do tecido cecal, foi possível evidenciar que a R-ABV proporcionou aumento significativo na altura/profundidade e número das criptas do ceco e a R-MBV proporcionou aumento significativo na altura/profundidade das criptas, demonstrando, dessa forma, que a fermentação de ambas as rações experimentais exerceram efeito trófico no intestino grosso dos animais.

- Esses efeitos positivos são, possivelmente, decorrentes da maior disponibilidade de AGCC no intestino grosso, resultado que pôde ser evidenciado na fermentação *in vitro*. É importante ressaltar que seria de grande interesse avaliar a fermentabilidade *in vivo* dessas fontes de carboidratos não-disponíveis.

- Os resultados obtidos com a R-MBV sinalizam para uma matéria-prima mais indicada para a elaboração de produtos fontes de carboidratos não-disponíveis. A fermentação *in vitro* do AR e de outros carboidratos não-disponíveis próprios da banana verde produziu altas concentrações de AGCC totais e principalmente butirato, o qual possivelmente exerceu, *in vivo*, efeito trófico no ceco dos animais, observado pelas análises histológicas.

7. CONCLUSÃO

Pelos parâmetros macroscópicos, como peso e umidade de fezes, peso e umidade de conteúdo cecal e peso da parede cecal, foi possível evidenciar que somente a R-ABV exerceu efeito trófico no intestino grosso dos animais.

Pela análise histológica do tecido cecal, foi possível evidenciar que tanto a fermentação da R-ABV como a da R-MBV exerceu efeito trófico no intestino grosso dos animais.

Os resultados obtidos indicam que os produtos da fermentação de carboidratos não-disponíveis presentes na banana verde exercem efeitos positivos sobre a fisiologia de animais, apontando a possibilidade de utilização dessa matéria-prima na elaboração de alimentos voltados para a prevenção de determinadas doenças crônicas não-transmissíveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOH A, TSUJIKAWA T, FUJIYAMA Y. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* 2003;9:347-58.

ANNISON G, TOPPING DL. Nutritional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. *Annu Rev Nutr* 1994;14:297-320.

ASP N-G, VAN AMELSVOORT JMM, HAUTUAST JGA. EURESTA physiological implication of consumption of resistant starch in man. (European FLAIR - concerted action n.11 - COST 911). Flair [Proceedings of the concluding, plenary meeting of EURESTA];1994. 204 p.

BARON JA. Dietary fiber and colorectal cancer: an ongoing saga. *JAMA* 2005;294: 2904-6.

BERGGREN AM, BJORCK IM, NYMAN EM, EGGUN BO. Short-chain fatty acid content and pH in ceacum of rats fed various sources of starch. *J Sci Food Agric* 1995;68:241-8.

BERGMEYER HU, BERNET E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press; 1974. p. 1205-15.

BEYER-SEHLMAYER G, GLEI M, HARTMANN E, HUGHES R, PERSIN C, BÖHM V *et al*. Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br J Nutr* 2003;90:1057-70.

BINGHAM SA, DAY NE, LUBEN R, FERRARI P, SLIMANI N, NORAT T, *et al*. Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003;361:1496-1501.

BJÖRCK I. Starch: nutritional aspects. In: ELIASSON A-C. *Carbohydrates in food*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 505-53.

BOUHNİK Y, RASKINE L, SIMONEAU G, VICAUT E, NEUT C, FLOURIÉ B, *et al*. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1658-64.

BOURLIOUX P, KOLETZKO B, GUARNER F, BRAESCO V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. *Am J Clin Nutr* 2003;78: 675-83.

BRITTAN M, WRIGHT NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002;197: 492-509.

BURKITT DP. Relationship as a clue to causation. *Lancet* 1970;2:1237-40.

BURKITT DP. Some diseases characteristic of western civilisation. *Br Med J* 1973;2:274-6.

CAMPBELL JM, FAHEY GC Jr, WOLF BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 1997;127:130-6.

CARDENETTE GHL. Produtos derivados de banana verde (*Musa ssp*) e sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2006.

CASSIDY A, BINGHAM SA, CUMMINGS JH. Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer* 1994;69: 937-42.

CHAMP M, LANGKILDE A, BROUNS F, KETTLITZ B, BAIL-COLLET YL. Advances in dietary fibre characterization: consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labeling. *Nutr Research Rev* 2003;16:143-61.

CHENG BQ, TRIMBLE RP, ILLMAN RJ, STONE BA, TOPPING DL. Comparative effects of dietary wheat bran and its morphological components (aleurone and pericarp-seed coat) on volatile fatty acid concentrations in the rat. *Br J Nutr* 1987;57:69-76.

CHOCT M, ILLMAN RJ, BIEBRICK DA, TOPPING DL. White and whole meal flours from wheats of low and higher apparent metabolisable energy differ in their nutritional effects in rats. *J Nutr* 1998;128:234-8.

CLATWORTHY JP, SUBRAMANIAN V. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 2001;101:3-9.

COOK SI, SELLIN JH. Short chain fatty acids in health and disease. *Al Pharm Therap* 1998;12:499-507.

CORDENUNSI BR, MENEZES EW, MOTA RV, LAJOLO FM. Composição de carboidratos em banana verde e madura de diferentes cultivares. Seminario del Proyecto de Investigación Precompetitiva CYTED XI.8. [Anais da Conferência realizada em Baños, Ecuador. September 2-4, 1998]. Quito; 2000. p. 15-22.

CUMMINGS JH. The large intestine in nutrition and disease. Edited by the Institut Danone; 1997. Disponível em [http:// www.danonevitapole.com](http://www.danonevitapole.com).

CUMMINGS JH, BEATTY ER, KINGMAN S, BINGHAM SA, ENGLYST HN. Digestion and physical properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J Nutr* 1996;75:733-47.

CUMMINGS JH, BINGHAM SA, HEATON KW, EASTWOOD MA. Fecal weight, colon cancer risk and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 1992;103:1783-9.

CUMMINGS JH, ENGLYST HN. Gastrointestinal effects of food carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 1995;61(S):938S-45S.

CUMMINGS JH, MACFARLANE GT. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* 1997;13(5):476-8.

CUMMINGS JH, MACFARLANE GT. The control of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991;70(6):443-59.

DELZENNE NM, DAUBIOUL C, NEYRINCK A, LASA M, TAPER HS. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br J Nutr* 2002;87(S2):255S-9S.

DEMINGNÉ C, MORAND C, LEVRAT MA, BESSON C, MOUNDRAS C, RÉMESY C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 1995;74:209-19.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargenda Online - Ano I nº 31 - Semana de 8 a 14 de agosto de 2005.

ENGLYST HN, KINGMAN SM, HUDSON GJ, CUMMINGS JH. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *Brit J Nutr* 1996;75:749-55.

ENGLYST HN, MACFARLANE GT. Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria. *J Sci Food Agric* 1986;37:699-706.

FAISANT N, BULEÓN A, COLONNA P, MOLIS C, LARTIGUE S, GALMICHE JP, *et al.* Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. *Brit J Nutr* 1995;73:111-23.

FAIVRE J, BOUTRON MC, QUIPOURT V. Diet and large bowel cancer. In: ZAPPIA V. *Advances in nutrition and cancer*. New York: Plenum Press; 1993. p. 107-18.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION). Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 1997. Proceedings. Rome: FAO; 1998. 140 p.

FLORES-GOROSQUERA E, GARCÍA-SUÁREZ FJ, FLORES-HUICOCHEA E, NUÑEZ-SANTIAGO MC, GONZÁLEZ-SOTO RA, BELLO-PÉREZ LA. Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de platano (*Musa paradisiaca*): estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana* 2004;55:86-90.

FLOURIE B, FLORENTE C, JOUANY JP, THIVEND P, ETANCHAUD F, RAMBAUD JC. Colonic metabolism of wheat starch in healthy humans. *Gastroenterology* 1986;90:111-9.

FOLINO M, MCINTYRE A, YOUNG GP. Dietary fibers differ in their effects on large bowel epithelial proliferation and fecal fermentation-dependent events in rats. *J. Nutr* 1995;125:1521-8.

FUCHS CS, GIOVANNUCCI E, COLDITZ GA, HUNTER DJ, STAMPFER MJ, ROSNER B, *et al.* Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Eng J Med* 1999;340:169-76.

GIBSON GR, BEATTY ER, WANG X, CUMMINGS JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 1995;108(4):975-82.

GIBSON GR, PROBERT HM, LOO JV, RASTALL RA, ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004;17:259-75.

GIBSON GR, ROBERFROID M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12.

GIBSON PR, ROSELLA O, WILSON AJ, MARIADASON JM, RICKARD K, BYRON K, *et al.* Colonic epithelial cell activation and the paradoxal effects of butyrate. *Carcinogenesis* 1999;20(4):539-44.

GOÑI I, LÓPEZ-OLIVA E. Carbohidratos y salud gastrointestinal. In: LAJOLO FM, MENEZES EW. Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos. Sao Paulo: EDUSP; 2006. p. 289-308.

GOÑI I, MARTÍN-CARRÓN N. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. LAJOLO FM, SAURA-CALIXTO F, PENNA EW, MENEZES EW. Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud. São Paulo: Varela; 2001. p. 311-38.

GUYTON AC, HALL JE. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 639p.

HARALAMPU SG. Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS₃. *Carbohydr Polym* 2000;41:285-92.

HENNINGSSON AM, BJÖRCH IME, NYMAN EMG. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. *J Nutr* 2002;132:3098-104.

HOWARD MD, GORDON DT, GARLAB KA, KERLEY MS. Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J Nutr* 1995a;125:2604-9.

HOWARD MD, GORDON DT, PACE LW, GARLEB KA, KERLEY MS. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *J Ped Gastroenterol Nutr* 1995b;21:297-303.

HYLLA S, GOSTNER A, DUSEL G, ANGER H, BARTRAM HP, SCHRISTL SU, *et al.* Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 1998;67:136-42.

ILLMAN R, STORER GB, TOPPING DL. White wheat flour lowers plasma cholesterol and increases cecal steroids relative to whole wheat flour, wheat bran and wheat pollard in rats. *J Nutr* 1993;123:1094-100.

JACOBASCH G, SCHMIEDL D, KRUSCHEWSKI M, SCHMEHL K. Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 1999;14:201-11.

JIE Z, BANG-YAO L, MING-JIE X, HAI-WEI L, ZU-KANG Z, TING-SONG W, *et al.* Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1503-9.

JOHNSON IT. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1171-8.

JOHNSON IT, GEE JM. Gastrointestinal adaptation in response to soluble non-available polysaccharides in the rat. *Br J Nutr* 1986;55:497-505.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

KLEESSEN B, HARTMANN L, BLAUT M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *Br J Nutr* 2003;89:597-606.

KORUDA MJ, ROLANDELLI RH, BLISS DZ, HASTINGS J, ROMBEAU JL, SETTLE RG. Parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids: effect on the small-bowel mucosa in normal rats. *Am J Clin Nutr* 1990;51:685-9.

KRIPKE SA, FOX AD, BERMAN JM, SETTLE RG, ROMBEAU JL. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *J Parenter Enteral Nutr* 1989;13(2):109-16.

LAJOLO FM, SAURA-CALIXTO F, PENNA EW, MENEZES EW. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Proyecto CYTED XI.6 "Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales"/ CNPq.* Sao Paulo: Varela; 2001.

LE BLAY G, MICHEL C, BLOTTIERE HM, CHERBUT C. Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr* 1999;82:419-26.

LE LEU RK, BROWN IL, HU Y, BIRD AR, JACKSON M. A symbiotic combination of resistant starch and *bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr* 2005;135:996-1001.

LEAL K. Polidextrose: um novo conceito em fibras solúveis prebióticas. In: ILSI BRASIL – International Life Sciences Institute do Brasil. Fibras, prebióticos e probióticos. São Paulo: ILSI BRASIL; 2005. p.59-66.

LEE SC, PROSKY L, DEVRIES JW. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, Mes-TRIS Buffer: collaborative study. J AOAC Int 1992;75:395-416.

LIVESEY G. Energy values of unavailable carbohydrates and diets: An inquiry and analysis. Am J Clin Nutr 1990;51:617-37.

LUGEA A, SALAS A, SASALOT J, GUARNER F, MALAGELADE JR. Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. Gut 2000;46:515-21.

LUPTON JR. Is fiber protective against colon cancer? Where the research is leading us. Nutrition 2000;16:7-8.

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

MACFARLANE GT, ENGLYST HN. Starch utilization by human large intestinal flora. J Appl Bacteriol 1986;60:195-201.

MACFARLANE S, MACFARLANE T. Regulation of short-chain fatty acid production. Proc Nutr Soc 2003;62:67-72.

MANDIR N, FITZGERALD AJ, GOODLAD RA. Differences in the effects of age on intestinal proliferation, crypt fission and apoptosis on the small intestine and the colon of the rat. Int J Exp Path 2005;86:125-30.

MARTIN LJM, DUMON HJW, CHAMP MMJ. Production of short-chain fatty acids from resistant starch in a pig model. J Sci Food Agric 1998;77:71-80.

McCLEARY BV, McNALLY M, ROSSITER P. Measurement of resistant starch by enzymatic digestion in starch selected plant materials: collaborative study. J AOAC Int 2002;85(5):1103-11.

McCLEARY BV, MONAGHAN DA. Measurement of resistant starch. J AOAC Int 2002;85(3):665-76.

McCLEARY BV, ROSSITER P. Measurement of novel dietary fibres. J AOAC Int 2004;87:707-11.

McCULLOUGH JS, RATCLIFFE B, MANDIR N, CARR KE, GOODLAD RA. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut* 1998;42:799-806.

MENEZES EW, GIUNTINI EB, LAJOLO FM. Perfil de ingestão de fibra alimentar e amido resistente pela população brasileira nas últimas três décadas. In LAJOLO FM, SAURA-CALIXTO F, PENNA EW, MENEZES EW. *Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud*. São Paulo: Varela, 2001. p. 433-44.

MENEZES EW, LAJOLO FM. Contenido en fibra dietética y almidón resistente en alimentos y productos iberoamericanos. Proyecto CYTED XI.6 “Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales”. CYTED/CNPq. São Paulo: Docuprint; 2000.

MENEZES EW, MELO AT, LIMA GH, LAJOLO FM. Measurement of carbohydrate components and their impact on energy value of foods. *J Food Comp Anal* 2004;17:331-8.

MORITA T, KASAOKA S, OH-HASHI A, IKAI M, NUMASAKI Y, KIRIYAMA S. Resistant proteins alter cecal short-chain-fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J Nutr* 1998;128:1156-64.

MORRIS KL, ZEMEL MB. Glycemic index, cardiovascular disease, and obesity. *Nutr Rev* 1999;57(1):273-6.

MUIR JG, BIRKETT A, BROWN I, JONES G, O’DEA K. Food processing and maize variety affects amounts of starch escaping digestion in the small intestine. *Am J Clin Nutr* 1995;61:82-9.

MUIR JG, YEOW EG, KEOGH J, PIZZEY C, BIRD AR, SHARPE K, *et al.* Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *Am J Clin Nutr* 2004;79(6):1020-8.

NOAKES M, CLIFTON PM, NESTEL PJ, LEU R, McINTOSH G. Effect of high amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 1996;64:944-51.

OHTA A, OHTUKI M, TAKIZAWA T, INABA H, ADACHI T, KIMURA S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of Magnesium and calcium by cecectomized rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64(4):316-23.

OLIVEIRA HR, GAZZOLA J. Absorção dos ácidos graxos. In: CURI R, POMPELA C, MIYASAKA CK, PROCOPIO J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manole; 2002.

PACHECO-DELAHAYE E, TESTA G. Evaluación nutricional, física y sensorial de panes de trigo y plátano verde. INCI 2005;30(5):300-4.

PARK Y, HUNTER DJ, SPIEGELMAN D, BERGKVIST L, BERRINO F, BRANDT PAVD, *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer. A pooled analysis of prospective cohort studies. JAMA 2005;294:2849-57.

PRYDE SE, DUNCAN SH, HOLD GL, STEWART CS, FLINT HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. FEMS Microbiology Letters 2002;217:133-9.

REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993;123(11):1939-51.

ROSIN PM, LAJOLO FM, MENEZES EW. Measurement and characterization of dietary starches. J Food Compos Anal 2002;15:367-77.

SAKATA T. Effects of short-chain fatty acids on the proliferation of gut epithelial cells in vivo. In: CUMMINGS JH, ROMBEAU JL, SAKATA T. Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 289-305.

SAKATA T, YAJIMA T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. Q J Exp Physiol 1984;69:639-48.

SALMINEN S, BOULEY C, BOUTRON-RUAULT MC, CUMMINGS JH, FRANCK A, GIBSON GR, *et al.* Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr 1998;80:147S-71S.

SAURA-CALIXTO F, GARCIA-ALONSO A, GOÑI I, BRAVO L. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. J Agric Food Chem 2000;48(8):3342-7.

SCHEPPACH W, BARTRAM HP, RICHTER F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 1995;31A(7/8):1077-80.

SENGUPTA S, MUIR JG, GIBSON PR. Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006;21:209-18.

SERRANO J, GOÑI I, SAURA-CALIXTO F. Determination of B-carotene and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. *J Agric Food Chem* 2005;53(8):2936-40.

SHETTY PS, KURPAD AV. Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulking. *Am J Clin Nutr* 1986;43:210-12.

SMITH JG, YOKOYAMA WH, GERMAN B. Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1998;38(4):259-97.

SOKAL RR, ROHLF FJ. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: WH Freeman and Co; 1995. p. 419-22.

TOPPING DL, CLIFTON PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001;81(3):1031-60.

TOPPING DL, GOODEN JM, BROWN IL, BIEBRICK DA, MCGRATH L, TRIMBLE RP, *et al*. A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. *J Nutr* 1997;127:615-22.

TOPPING DL, ILLMAN RJ, CLARKE JM, TRIMBLE RP, MARSONO Y. Human foods and large bowel volatile fatty acids in a suitable animal: the pig. *Nutrition in a Sustainable Environment. Proceeding of the XV International Congress of Nutrition*. Adelaide: IUNS; 26 September-1 October, 1993. p. 760-4.

TOPPING DL, ILLMAN RJ, TAYLOR MN. Effects of wheat bran and porridge oats on hepatic portal venous volatile fatty acids in pig. *Ann Nutr Metab* 1985;29(6):325-31.

VAN MUNSTER IP, NAGENGAST FM. The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1993;200:80-6.

VAREL VH. Activity of fiber-degrading microorganisms in the pig large intestine. *J Anim Sci* 1987;65(2):488-96.

VELÁZQUEZ OC, SATE RW, BRAIN AM, FISHER J, ROMBEAU JL. Deoxycholate inhibits in vivo butyrate-mediated BrDU labeling of the colonic crypt. *J Surg Res* 1997;69:344-58.

VELÁZQUEZ OC, LEDERER HM, ROMBEAU JL. Butyrate and the colonocyte, implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 1996;41:727-39.

WACKER M, WANER P, EDER E, HYLLA S, GOSTNER A, SCHEPPACH W. Effect of enzyme-resistant starch on formation of 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal and cell proliferation in the colonic mucosa of healthy volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(9):915-20.

WANG X, CONWAY PL, BROWN IL, EVANS AJ. In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (Ammylomaize) starch granules by human colonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(11):4848-54.

WARING S. Functionality of resistant starch in food applications. *Cereal Foods World*; 1998. [Retrieved January 4, 2002]. Disponível em <http://www.foodstarch.com>.

WEAVER GA, KRAUSE JA, MILLER TL, WOLIN MJ. Cornstarch fermentation by the colonic microbial community yields more butyrate than does cabbage fiber fermentation: cornstarch fermentation rates correlate negatively with methanogenesis. *Am J Clin Nutr* 1992;67:136-42.

WHO/FAO (WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Geneva: WHO Technical Report Series; 2003. 149p.

WILLIAMS CM, JACKSON KG. Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. *The British Journal of Nutrition* 2002;87(Suppl.2):261S-4S.

WONG WM, WRIGHT NA. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *Journal of Clinical Pathology* 1999;52:321-33.

WONG JMW, SOUZA R, KENDALL CWC, EMAM A, JENKINS DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:235-43.

ZHANG P, WHISTLER R, BEMILLER J, HAMAKER B. Banana starch: production, physicochemical properties and digestibility – a review. *Carbohydrates Polymers* 2005;59:443-58.