

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Dissertação

**CHÁ VERDE *VERSUS* KOMBUCHA: POTENCIAL BIOATIVO E EFEITOS NO
TRATAMENTO DA COLITE ULCERATIVA EM CAMUNDONGOS**

JORDAN TEIXEIRA OLIVEIRA

Pelotas – RS

2022

JORDAN TEIXEIRA OLIVEIRA

**CHÁ VERDE *VERSUS* KOMBUCHA: POTENCIAL BIOATIVO E EFEITOS NO
TRATAMENTO DA COLITE ULCERATIVA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito à obtenção do título de Mestre em
Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Pieniz

Co-Orientador: Prof.^o Dr.^o Paulo Cavalheiro Schenkel

Pelotas-RS

2022

CATALOGAÇÃO

Jordan Teixeira Oliveira

**Chá Verde *versus* Kombucha: Potencial Bioativo e Efeitos no Tratamento da Colite
Ulcerativa em Camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Defesa da dissertação: 03/03/2022

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz (Orientador)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^o. Dr^o. Paulo Cavalheiro Schenkel (Co-orientador)

Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Pathise Souto Oliveira

Doutora em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Janice Luehring Giongo

Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Pamela Silva Vitória Salerno

Doutora em Saúde e Comportamento pela Universidade de Pelotas

Prof^o. Dr^o. Robson Andreazza (Suplente)

Doutor em Ciências do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

Oliveira, Jordan Teixeira. **Chá verde versus Kombucha: potencial bioativo e efeitos no tratamento da colite ulcerativa em camundongos**. 2022. 111f. Dissertação. (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal caracterizada pela inflamação espontânea e recorrente do cólon. O chá verde e a kombucha são bebidas com alto potencial terapêutico, devido a sua alta concentração de compostos bioativos, que conferem as bebidas elevado potencial antioxidante e anti-inflamatória. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização físico-química, antioxidante e enzimática do chá verde e da kombucha por meio de análises de pH, acidez, teor de sólidos, determinação de compostos fenólicos, potencial antioxidante por meio dos métodos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e pela reação as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e ação enzimática (alfa-glicosidase), assim como avaliar seu potencial anti-inflamatório frente ao modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético (4%) em camundongos C57BL6 (n=72). Os animais foram divididos randomicamente em seis grupos: controle (n=12), controle + chá verde (n=12), controle + kombucha (n=12), ácido acético (n=12), ácido acético + chá verde (n=12) ou ácido acético + kombucha (n=12). Os tratamentos com chá verde ou kombucha foram administrados por gavagem ao longo de 7 dias, sendo monitorado o consumo alimentar (CA) e o índice de atividade da doença (IAD). No 8º dia, os animais foram eutanasiados e realizou-se a determinação dos níveis plasmáticos da proteína C reativa (PCR) e análises macroscópicas e microscópicas do cólon. Como resultados, observou-se que a kombucha apresentou menor pH, maior teor de acidez e de sólidos comparada ao chá verde. Quanto a concentração de compostos fenólicos totais pelo método Folin Ciocalteu, não houve diferença significativa entre as bebidas ($p>0,05$). Na análise antioxidante pelo ensaio de DPPH observou-se que tanto o chá verde quanto a kombucha apresentaram capacidade antioxidante significativa em remover o radical DPPH, quando comparados ao controle; porém, quando analisada a inibição da peroxidação lipídica por meio do método de TBARS, observou-se que o chá verde apresentou capacidade antioxidante, já a kombucha exibiu capacidade pró-oxidante por este método. Ambas as bebidas apresentaram atividade inibitória significativa da enzima α -glicosidase, entretanto, o chá verde apresentou maior percentual de inibição. Os tratamentos com chá verde e kombucha apresentaram efeito anti-inflamatório intestinal nos camundongos, reduzindo de forma significativa o escore histológico e macroscópico de inflamação. Os tratamentos também reduziram os níveis plasmáticos da PCR dos animais colíticos a níveis similares aos dos grupos controle. Com base nas análises histológicas do cólon, o tratamento com kombucha se mostrou o mais eficaz, apresentando redução significativa no dano as criptas intestinais, além de atenuar a perda das células caliciformes. Nenhum dos grupos apresentou alterações significativas quanto ao CA e IAD. Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que tanto o chá verde quanto a kombucha apresentam elevado potencial antioxidante e de inibição enzimática, assim como efeito terapêutico anti-inflamatório na colite ulcerativa induzida em camundongos.

Palavras chave: doença inflamatória intestinal; *Camellia sinensis*; polifenóis; ácido acético; chá fermentado.

ABSTRACT

Oliveira, Jordan Teixeira. **Green tea versus Kombucha: bioactive potential and its effects in the treatment of ulcerative colitis in mice.** 2022. 111f. Dissertation. (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease characterized by spontaneous and relapsing inflammation of the colon. Green tea and kombucha are beverages with high therapeutic potential, due to their high concentration of bioactive compounds, which gives its high antioxidant and anti-inflammatory potential. Thus, the present study aimed to carry out the physical-chemical, antioxidant and enzymatic characterization of green tea and kombucha through analyzes of pH, acidity, total solids content, determination of phenolic compounds, antioxidant potential through the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and by the reaction to thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, and enzymatic action (alpha-glucosidase), as well as to evaluate its anti-inflammatory potential against the model of induced ulcerative colitis by acetic acid (4%) in C57BL6 mice (n=72). The animals were randomly divided into six groups: control (n=12), control + green tea (n=12), control + kombucha (n=12), acetic acid (n=12), acetic acid + green tea (n=12) or acetic acid + kombucha (n=12). Treatments with green tea or kombucha were administered by gavage over 7 days, with food intake (FI) and disease activity index (DAI) being monitored. On the 8th day, the animals were euthanized and the determination of plasma levels of C-reactive protein (CRP) and macroscopic and microscopic analysis of the colon were performed. As a result, it was observed that kombucha had lower pH, higher acidity and total solids content compared to green tea. As for the concentration of total phenolic compounds by the Folin Ciocalteu method, there was no significant difference between the beverages ($p>0.05$). In the antioxidant analysis by the DPPH assay, it was observed that both green tea and kombucha showed significant antioxidant capacity in removing the DPPH radical, when compared to the control; however, when analyzing the inhibition of lipid peroxidation using the TBARS method, it was observed that green tea showed significant antioxidant capacity, whereas kombucha showed pro-oxidant capacity by this method. Both beverages showed significant inhibitory activity of the α -glucosidase enzyme, however, green tea showed a higher percentage of inhibition. Green tea and kombucha treatments showed intestinal anti-inflammatory effect in mice, significantly reducing the histological and macroscopic inflammation score. The treatments also reduced the plasma CRP levels of the colitic animals to levels similar to those of the control groups. Based on histological analysis of the colon, kombucha treatment proved to be the most effective, showing a significant reduction in intestinal crypt damage, in addition to attenuating the loss of goblet cells. None of the groups showed significant alterations in terms of FI and DAI. Based on the results presented, it can be concluded that both green tea and kombucha have high antioxidant and enzyme inhibition potential, as well as an anti-inflammatory therapeutic effect in induced ulcerative colitis in mice.

Key words: *Camellia sinensis*; inflammatory bowel disease; polyphenols; Acetic Acid; fermented tea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Compostos benéficos presentes na kombucha.....	31
Figura 2 -	Intestino saudável em eubiose (A) e o intestino com doença inflamatória intestinal com disbiose (B).....	35

ARTIGO 1

Figura 1 -	Compostos fenólicos totais presentes no chá verde e na kombucha.....	100
Figura 2 -	Capacidade antioxidante do chá verde e da kombucha pelo método DPPH.....	101
Figura 3 -	Capacidade de inibição da peroxidação lipídica do chá verde e da kombucha pelo método de TBARS.....	102
Figura 4 -	Atividade inibitória do chá verde e da kombucha frente a enzima α -glicosidase.....	103

ARTIGO 2

Figura 1 -	Ganho de peso corporal ao longo dos oito dias de experimento.....	120
Figura 2 -	Consumo alimentar ao longo dos oito dias de experimento.....	121
Figura 3 -	Cortes histológicos representativos de todos os grupos.....	123
Figura 4 -	Níveis plasmáticos da proteína C reativa por grupo.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ingredientes funcionais, fontes e benefícios.....	20
Tabela 2 -	Benefícios dos probióticos e seus possíveis mecanismos de ação.....	21
Tabela 3 -	Delineamento experimental, com divisão de grupos.....	43
Tabela 4 -	Critérios para pontuação de parâmetros de avaliação da evolução da doença inflamatória intestinal induzida por ácido acético.....	45
Tabela 5 -	Escala da gravidade da inflamação na avaliação macroscópica.....	46
Tabela 6	Critérios para avaliação microscópica.....	47
Tabela 7 -	Protocolo de oxidação do ensaio de Reação ao Ácido Tiobarbitúrico..	47
Tabela 8 -	Oligonucleotídeos utilizados para expressão gênica de citocinas no tecido cólon.....	40

ARTIGO 1

Tabela 1 -	Níveis de pH, acidez titulável (% de ácido lático), e teor (%) de sólidos solúveis totais (°Brix).....	99
-------------------	--	----

ARTIGO 2

Tabela 1 -	Delineamento experimental do ensaio <i>in vivo</i> , com divisão dos grupos.....	116
Tabela 2 -	Critérios para pontuação de parâmetros de avaliação da evolução da doença inflamatória intestinal induzida por ácido acético.....	117
Tabela 3 -	Escala da gravidade da inflamação na avaliação macroscópica.....	117
Tabela 4 -	Critérios para avaliação microscópica.....	118
Tabela 5 -	Escore de consistência das fezes (0: bem formada, 2: pastosas, 4: aquosas) e sangramento anal (0: nenhum, 2: local, 4: severa), referentes ao IAD.....	120
Tabela 6 -	Escala de gravidade da inflamação na avaliação macroscópica do cólon.....	122
Tabela 7 -	Escala de gravidade da inflamação na avaliação microscópica do cólon.....	123

SUMÁRIO

PROJETO DE MESTRADO.....	11
1 IDENTIFICAÇÃO.....	15
2 INTRODUÇÃO.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 HIPÓTESES.....	18
5 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
5.1 Alimentos Funcionais.....	19
5.2 Probióticos.....	20
5.3 Prebióticos.....	22
5.4 Simbióticos.....	23
5.5 Compostos Fenólicos e Antioxidantes.....	23
5.6 Chá Verde.....	25
5.7 Kombucha.....	28
5.8 Colite ulcerativa.....	33
5.9 Modelos experimentais.....	35
6 MATERIAS E MÉTODOS.....	38
6.1 Preparo do chá verde.....	38
6.2 Preparo da kombucha.....	38
6.3 Caracterização fitoquímica da kombucha e do chá verde.....	38
6.3.1 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais pelo método de Folin Ciocalteu.....	39
6.3.2 Determinação de Compostos Fenólicos Individuais por HPLC.....	39
6.4 Capacidade antioxidante da kombucha e do chá verde.....	39
6.4.1 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil 1-picril-hidrazil).....	39
6.4.2 Reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS): Kombucha e Chá Verde.....	41
6.4.3 Poder antioxidante redutor do íon ferro III (FRAP).....	41
6.5 Avaliação da capacidade de inibição enzimática do chá verde e da kombucha.....	42
6.5.1 Ensaio de inibição da alfa-glicosidase.....	42
6.6 Determinação do pH do chá verde e da kombucha.....	41
6.7 Determinação de acidez do chá verde e da kombucha.....	41
6.8 Determinação do ácido acético da kombucha.....	41
6.9 Aspecto de segurança.....	42
6.9.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	42
7 Avaliação <i>in vivo</i>	42
7.1 Animais.....	42
7.2 Colite experimental induzida por Ácido Acético (AA).....	43
8 Delineamento estatístico e experimental.....	43
8.1 Delineamento experimental.....	43
9 Avaliação <i>in vivo</i> do cólon.....	44
9.1 Avaliação da Atividade da Doença (IAD).....	44
9.2 Avaliação macroscópica do cólon.....	46
9.3 Avaliação microscópica do cólon.....	46
9.4 Avaliação do Estresse Oxidativo.....	47
9.4.1 Determinação de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	47

9.4.2 Determinação da atividade da Catalase (CAT).....	47
9.4.3 Determinação da atividade da enzima Superoxido Dismutase (SOD).....	48
9.4.4 Determinação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPX).....	48
9.5 Determinação da expressão gênica das citocinas relacionadas a resposta inflamatória.....	48
9.6 Mieloperoxidase colônica (MPO).....	49
10 ANÁLISE DE DADOS.....	50
11 ASPECTOS ÉTICOS.....	50
12 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	51
13 ORÇAMENTO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
 NOTA DE ESCLARECIMENTO.....	 89
 ARTIGOS	
14 ARTIGO 1 (<i>in vitro</i>).....	91
15 ARTIGO 2 (<i>in vivo</i>).....	109

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



Projeto de Mestrado

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KOMBUCHA VERSUS CHÁ VERDE NO
TRATAMENTO DA COLITE ULCERATIVA EM CAMUNDONGOS**

JORDAN TEIXEIRA OLIVEIRA

Pelotas – RS

2020

JORDAN TEIXEIRA OLIVEIRA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KOMBUCHA VERSUS CHÁ VERDE NO
TRATAMENTO DA COLITE ULCERATIVA EM CAMUNDONGOS**

Projeto de Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e
Alimentos da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Pieniz

Co-Orientador: Prof.^o Dr.^o Paulo Cavalheiro Schenkel

Pelotas-RS

2020

Jordan Teixeira Oliveira

**Efeitos da administração de kombucha versus chá verde no tratamento da colite
ulcerativa em camundongos**

Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Data da Defesa do Projeto de Qualificação: 14/12/2020

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz (Orientador)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^o. Dr^o. Paulo Cavalheiro Schenkel (Co-orientador)

Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^o. Dr^o. Carlos Castilho de Barros

Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes

Prof^o. Dr^a. Angela Maria Fiorentini

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal caracterizada por inflamação recorrente e crônica que afeta a qualidade de vida dos pacientes. O tratamento atual envolve a utilização de aminossalicilatos, antibióticos, corticosteróides, imunossupressores e anticorpos de antifator de necrose tumoral, os quais apresentam diversos efeitos colaterais. Acredita-se que a ruptura da barreira intestinal e o desequilíbrio da microbiota tenha como consequência o desencadeamento do processo inflamatório. A kombucha é uma bebida resultante da fermentação do chá verde ou chá preto (*Camellia sinensis*) adoçado, contendo um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras como inóculo, também conhecido como SCOBY. Estudos demonstram as diversas propriedades benéficas de seus componentes para a saúde, como ação antimicrobiana, antioxidante, anti-hiperglicêmica, anti-hiperlipêmica e anti-inflamatória. Sendo assim, este estudo tem como objetivo identificar e quantificar os compostos bioativos presentes na kombucha, avaliando seu efeito no combate do processo inflamatório e estresse oxidativo frente ao modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético (AA), bem como a determinação dos parâmetros bioquímicos e histológicos *in vivo*. A kombucha e o chá verde serão caracterizados quimicamente por meio da análise de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), capacidade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinação do pH, da acidez e do conteúdo de ácido acético, avaliação da inibição da atividade da enzima alfa glicosidase, além de ensaio de citotoxicidade da kombucha. No estudo *in vivo*, camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 serão divididos entre os grupos controle positivo (animais que receberão indução de colite com AA)), controle negativo (animais que não receberão indução de colite aguda e sem tratamento), tratamento 1 (animais colíticos que receberão kombucha) e tratamento 2 (animais colíticos que receberão chá verde). Nos grupos controle positivo, tratamento 1 e tratamento 2 a indução da colite ulcerativa será induzida por AA durante sete dias na água de beber dos animais. Nos grupos tratamento, os animais receberão kombucha ou chá verde por gavagem entre o 1º e 7º dia. Será verificado o Índice de Atividade da Doença (IAD) diariamente, a fim de verificar a evolução da doença. Após a eutanásia dos animais, que ocorrerá no 8º dia, serão analisados os parâmetros macroscópicos e microscópicos da mucosa colônica. Na avaliação do estresse oxidativo, serão dosadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), expressão gênica das citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e atividade da enzima mieloperoxidase. Espera-se encontrar maior quantidade de compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante e antiinflamatória com o tratamento com kombucha em relação ao tratamento com chá verde. Portanto, este estudo é de grande importância, devido a escassez de estudos que avaliem os efeitos da administração de kombucha no tratamento da colite ulcerativa, além da necessidade de terapias alternativas que não apresentem tantos efeitos colaterais adversos.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, colite ulcerativa, compostos bioativos, doença inflamatória intestinal.

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Efeitos da administração de kombucha versus chá verde no tratamento da colite ulcerativa em camundongos.

1.2 Designação do Mestrando: Jordan Teixeira Oliveira.

1.3 Orientador: Simone Pieniz/ **Co-Orientador:** Paulo Cavalheiro Schenckel.

1.4 Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

1.5 Curso: Mestrado em Nutrição e Alimentos (PPGNA).

1.6 Linha de pesquisa: Nutrição Experimental.

1.7 Data: 14/12/2020

2 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) caracterizam-se por alterações inflamatórias crônicas envolvendo o trato gastrointestinal. Embora os dois principais subtipos de DII, doença de Crohn e colite ulcerativa compartilhem características semelhantes, a doença de Crohn se diferencia da colite ulcerativa pela localização das lesões, alterações histológicas e comportamento da doença (Lemberg e Day, 2015).

A doença de Crohn pode ocorrer desde a boca até o ânus e é uma doença transmural, ou seja, acomete todas as camadas teciduais do trato digestivo. Já a colite ulcerativa é mais prevalente que a doença de Crohn, e é caracterizada por inflamação espontânea e recorrente no cólon apenas, estando associada a alterações funcionais, como na motilidade e trânsito intestinal, que podem contribuir para dor abdominal e diarreia relatada pelos pacientes. Além disso, a inflamação afeta as camadas superficiais da parede intestinal (mucosa e submucosa), com consequente infiltração de células polimorfonucleares e plasmócitos com posterior edema, hemorragia e necrose epitelial (Deroche et al., 2014).

O tratamento da DII inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossuppressores, além da terapia biológica (Morrison et al., 2009; Sandborn et al., 2014). Considerando que os pacientes precisam de tratamento ao longo da vida e muitas das terapias disponíveis possuem diversos efeitos colaterais secundários, a busca de novas abordagens é crescente e necessária (Del Carmen et al., 2017). Tratamentos que alteram a composição e/ou atividade de microbiota intestinal, como intervenções com probióticos e prebióticos, podem constituir como uma opção terapêutica alternativa (Hooper et al., 2012; Ambalam et al., 2016).

Os alimentos contêm diversas substâncias que exercem efeitos benéficos a saúde, com grande potencial terapêutico para melhorar a saúde pública e o bem-estar da população. Seus benefícios medicinais têm sido explorados há séculos, e estudos epidemiológicos mostram uma ligação entre o consumo de alimentos derivados de plantas e uma série de benefícios para a saúde (Gul et al., 2015).

Entre os derivados das plantas, destaca-se o chá verde, uma bebida milenar muito consumida ao redor do mundo, produzida a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis*, apresentando diversos benefícios à saúde. Por ser rico em compostos bioativos, possui alto poder antioxidante e antiinflamatório, apresentando efeito protetor em várias doenças crônicas, como nas cardiovasculares, respiratórias, câncer, diabetes e hipertensão arterial sistêmica. Também há evidências de que o chá possa apresentar benefícios como atividade

antibacteriana e antiviral, nas doenças inflamatórias intestinais, doenças cognitivas, doenças periodontais, entre outras (Cabrera et al., 2006; Barbalho et al., 2019).

Já a kombucha, é uma bebida fermentada obtida por meio da fermentação do chá verde ou chá preto adoçado com bactérias simbióticas e leveduras osmofílicas (Amarasinghe et al., 2018). A bebida adquiriu grande popularidade devido às suas várias alegações e alguns efeitos farmacológicos estabelecidos. Acredita-se que a maioria dessas propriedades benéficas possa ser atribuída aos polifenóis, ácidos orgânicos e uma série de outros ingredientes que são inerentes às matérias-primas ou são produzidos como resultado da fermentação microbiana (Bhattacharya et al., 2016).

Com base na necessidade de pesquisas sobre métodos alternativos que apresentem menores efeitos colaterais no tratamento da colite ulcerativa, assim como a escassez de estudos que avaliem o efeito da kombucha como fonte terapêutica para a doença, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial efeito anti-inflamatório intestinal e antioxidante da kombucha e do chá verde no modelo de colite ulcerativa induzida com ácido acético em camundongos, assim como quantificar os compostos bioativos presentes em ambas bebidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

3.1.1 Estudo 1 (*in vitro*):

Avaliar a capacidade antioxidante e identificar e quantificar os compostos bioativos presentes na kombucha e no chá verde.

3.1.2 Estudo 2 (*in vivo*):

Avaliar o efeito intestinal da kombucha e do chá verde, no sentido de minimizar o processo inflamatório e estresse oxidativo frente ao modelo de colite ulcerativa induzida por Ácido Acético (AA) em modelo animal, bem como a determinação dos parâmetros bioquímicos e histológicos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudo 1 (*in vitro*):

a) Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais e individuais da kombucha e do chá verde.

- b) Avaliar a atividade antioxidante da kombucha e do chá verde.
- c) Avaliar o potencial citotóxico da kombucha e do chá verde.

3.2.2 Estudo 2 (*in vivo*):

- a) Avaliar a inflamação colônica nos animais tratados com kombucha e chá verde por intermédio da histologia.
- b) Determinar os níveis de malonaldeído nos animais tratados com kombucha e chá verde.
- c) Determinar a atividade das enzimas antioxidantes intestinais CAT, SOD e GPx no tratamento com kombucha e chá verde.
- d) Verificar a expressão das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α no cólon dos animais tratados com kombucha e chá verde.
- e) Avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase no cólon dos animais tratados com kombucha e chá verde.

4 HIPÓTESES

4.1 Estudo 1 (*in vitro*):

Será observada maior quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante na kombucha em relação ao extrato de chá verde.

4.2 Estudo 2 (*in vivo*):

Será observada maior diminuição da inflamação do cólon, da atividade da enzima mieloperoxidase, dos níveis de Malonaldeído (MDA), e menor expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos animais tratados com kombucha em relação ao tratamento com o extrato de chá verde.

Será observado maior atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx) nos animais tratados com kombucha em relação ao extrato de chá verde.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Alimentos funcionais

A definição de alimento funcional é originária do Japão, datada em 1984, quando foi utilizado pela indústria para descrever alimentos fortificados com ingredientes específicos, inferindo-lhes efeitos benéficos à saúde. Portanto, eles exercem efeitos que vão além de nutrir, sendo utilizados na prevenção e tratamento de doenças (Bianco, 2008).

Segundo Castro (2003) há três critérios para que um alimento seja classificado como funcional, conforme definição proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA):

- a) Não ser apresentado em cápsulas, comprimidos ou suplementos, portanto, de ocorrência natural;
- b) Ser consumido como parte da dieta diária;
- c) Regular um processo metabólico específico, como aumento dos mecanismos de defesa biológica, aumento da resistência, prevenção de doenças, controle das condições físicas naturais ou envelhecimento e outros.

Para que esses alimentos sejam eficazes é necessário consumi-los regularmente e associados a uma alimentação balanceada, que forneça todos os nutrientes essenciais ao organismo. Embora os alimentos funcionais tenham sido usados como medicamentos tradicionais no tratamento de doenças crônicas por vários séculos, são descobertas científicas modernas que estão estabelecendo os benefícios dos alimentos funcionais e dos compostos bioativos para a saúde, e que fornecem os mecanismos subjacentes de suas ações, conforme demonstrado na Tabela 1 (Hur et al., 2012; Larussa et al., 2017).

Tabela 1 – Ingredientes funcionais, fontes e benefícios.

Ingrediente Funcional	Fonte	Benefícios
Antocianinas, catequinas, cianidinas, flavonóis, miricetina e quercetina	Chá; vinho, semente e suco de uva; bagas; berinjela	Atividade antioxidante, inibição da oxidação do LDL, sequestradores de superóxido
Flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis e flavan-3-ols)	Chá, aipo, salsa, cítricos, cebola, vagem, alguns feijões, cacau, chocolate, tomate, maçã e bagas	Antioxidante, antiproliferativo, anti-hipertensivo, anticarcinogênico, antitrombótico, parada do ciclo celular, indução de enzimas da fase 2, inibição das enzimas da fase 1, inibição da oxidação do LDL, melhora do tônus vascular
Ácidos fenólicos	Chá, café, frutas, azeite de oliva extra virgem	Antiinflamatório
Epigallocatequina galato	Chá	Anticarcinogênico, antioxidante
Probióticos	Alimentos fermentados	Saúde do trato intestinal, modulação da imunidade

Fonte: Mukhtar e Ahmad (2000); Ferrari (2007); Gry et al. (2007); Patil (2009); Shahidi (2009); Kaur e Das (2011).

5.2 Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, são capazes de produzir efeitos benéficos ao hospedeiro (Giorgetty et al., 2015; Shadnough et al., 2015). Estes benefícios podem ser adquiridos sob diferentes formas:

a) Alguns probióticos, como os lactobacilos e bifidobacterias, induzem a produção e secreção de diferentes substâncias com propriedades bactericidas. O ácido láctico produzido pelos lactobacilos diminui o pH luminal, o que resulta na inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas. O mesmo ocorre quando os probióticos aumentam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (Giorgetty et al., 2015; Shadnough et al., 2015);

b) Deslocamento de micro-organismos nocivos da interface lumén-mucosa ao competir pelos locais de ligação na superfície epitelial e camada mucosa, o que pode ser atingido através da β -defensina produzidas por alguns probióticos (Sougioultzis et al., 2006; Shadnough et al., 2015);

c) Modulação da imunidade da mucosa intestinal ao promover o desenvolvimento de células T reguladoras e, conseqüentemente, da produção de citocinas antiinflamatórias IL-10 e TGF- β (Giorgetty et al., 2015; Shadnough et al., 2015).

d) Melhora da função da barreira intestinal por meio da regulação da homeostasia do epitélio, além de diminuir a permeabilidade intestinal a microorganismos e outros antígenos, atuando sobre as *tight junctions* (Giorgetty et al., 2015; Shadnough et al., 2015).

Pesquisas com probióticos buscando avaliar seu efeito antioxidante estão sendo realizadas, visando proteção contra os radicais livres e retardo do aparecimento e evolução de doenças, por meio de formas naturais e seguras para administração em humanos (Wang et al., 2017). Estudos indicam que o consumo de probióticos de forma isolada ou de alimentos adicionados podem exercer efeito na redução do dano oxidativo, na taxa de eliminação de radicais livres e na modificação/modulação da atividade de enzimas antioxidantes (Mishra et al., 2015; Wang et al., 2017). Na Tabela 2 estão dispostos alguns benefícios exercidos pelos probióticos e seus respectivos mecanismos e causas.

Tabela 2 – Benefícios dos probióticos e seus possíveis mecanismos de ação.

Benefícios	Possíveis mecanismos de ação
Melhor digestibilidade	Degradação parcial das proteínas, lipídios e carboidratos.
Melhor valor nutritivo	Aumento dos níveis de vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos essenciais, como metionina, lisina e triptofano.
Melhor digestão/utilização da lactose	Redução de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase.
Ação antagonista contra agentes patogênicos entéricos	Distúrbios tais como diarreia, colites da mucosa e ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica controlados pela acidez; Inibidores microbianos e inibição da adesão e ativação de patógenos.
Colonização do intestino	Sobrevivência ao ácido gástrico, resistência a lisozima e à tensão superficial do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrointestinal, modulação imunitária.
Ação anticarcinogênica	Conversão de potenciais pré-carcinogênicos em compostos menos perniciosos; Estimulação do sistema imunitário.
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese do colesterol; Utilização do colesterol por assimilação e precipitação como sais biliares desconjugados.
Modulação imunitária	Melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras.

Fonte: Kalantzopoulos (1997); Holzapfel e Schillinger (2002); Kaur et al. (2002); Moraes e Colla (2006).

A quantidade e frequência do consumo de probióticos necessários para fornecer os benefícios funcionais a estes atribuídos dependerão da linhagem do microrganismo em questão e do efeito biológico desejado (Champagne et al., 2005). No Brasil, a legislação estabelece a quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Tal valor equivale a 8-9 log UFC por porção do produto (Anvisa, 2008). Os probióticos estão disponíveis nas formas naturais (leite fermentado, iogurte, queijos, kefir, kombucha, chucrute, tempeh, natto, missô, kimchi, sucos fortificados e outros alimentos de

origem vegetal fermentados) e preparações farmacêuticas, podendo ser constituído de um único ou de um conjunto de micro-organismos (Stefe et al., 2008; Dimidi et al., 2019).

5.3 Prebióticos

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que promovem alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal por meio do metabolismo de bactérias no intestino, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (Bindels et al., 2015). Rodríguez et al. (2003) citam alguns requisitos para incluir um alimento como prebiótico: ser de origem vegetal, ser parcialmente fermentável por bactérias, não ser hidrolisado por enzimas digestivas, ser parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas, não ser absorvido na parte superior do trato gastrointestinal e ser osmoticamente ativo.

Os carboidratos não-digeríveis como a lactulose, a inulina e diversos oligossacarídeos são exemplos de substâncias prebióticas fermentáveis pelas bactérias do cólon (Cummingns e Macfarlane, 2002). Foi confirmado que o consumo de fruto-oligossacarídeos não digeríveis exercem impacto positivo sobre bifidobactérias, além disso, compostos fenólicos nos chás podem afetar a composição de bactérias intestinais, incluindo a repressão de potenciais patógenos, enquanto promove o crescimento seletivo de bactérias benéficas (Kemperman et al., 2010; Tuohy et al., 2012). Para garantir o estímulo da multiplicação de bifidobactérias de forma relevante no cólon, recomenda-se doses diárias a partir de 4 a 5 g, chegando até 20g, que são eficientes quando administradas durante pelo menos 15 dias (Komatsu et al., 2008).

Diferentes grupos de micro-organismos são necessários para a fermentação de polímeros complexos, tais como polissacarídeos e proteínas no colón. Os principais produtos de fermentação bacteriana no cólon são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que exercem efeitos benéficos como alívio da constipação, melhora da absorção de minerais, redução do nível de glicose no sangue, nutrição do enterócito, regulação do metabolismo dos lipídios, diminuição da incidência de câncer do cólon e a modulação do sistema imunológico. Outros efeitos incluem a inibição de bactérias patogênicas e o "efeito barreira", que limita o número de locais de adesão disponíveis no intestino (Roberfroid et al., 2010; Gullón et al., 2014).

5.4 Simbióticos

Os simbióticos são formados pela associação de um ou mais probióticos com um ou mais prebióticos. Os prebióticos e probióticos têm ações sinérgicas, e acredita-se que associados tenham um efeito potencializado sobre a saúde do hospedeiro (Bengmark e Urbina, 2005).

O uso de simbióticos favorece o equilíbrio da microbiota e otimiza o sistema imunológico intestinal, diminuindo a incidência de infecções, devido aos probióticos aumentarem os linfócitos circulantes e citocinas, que estimulam a fagocitose. Os prebióticos por sua vez, aumentam a liberação de altos níveis de ácido láctico, através da fermentação, promovendo consequente redução do pH do cólon (Saavedra, 2001; Fooks e Gibson, 2002).

Moroti et al. (2012) verificaram que a suplementação com simbióticos em idosos com diabetes tipo 2 resultou na redução da glicemia e no aumento dos níveis de HDL de forma significativa. Já em um estudo realizado por Steed et al. (2008), verificou-se que os simbióticos foram capazes de reduzir processos inflamatórios na mucosa intestinal, possuindo potencial para induzir a remissão da DII.

5.5 Compostos Fenólicos e Antioxidantes

Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais encontrados nas plantas, sendo originados ao longo de todo o processo metabólico. Essas substâncias fenólicas ou polifenóis, contêm inúmeras variedades de compostos: flavonóides simples, ácidos fenólicos, flavonóides complexos e antocianinas (Babbar et al., 2014). Geralmente estão relacionados às respostas de defesa na planta. No entanto, os metabólitos fenólicos desempenham um papel importante em outros processos, por exemplo, incorporando substâncias atraentes para acelerar a polinização, coloração para camuflagem e defesa contra herbívoros, bem como atividade antibacteriana e antifúngica (Alasalvar et al., 2001; Edreva et al., 2008). Os compostos fenólicos possuem importantes propriedades biológicas e farmacológicas. A bioatividade destes compostos pode estar relacionada à sua capacidade de quelar metais, inibir lipoxigenase, sequestrar radicais livres e assim inibir os processos da oxidação em certos sistemas, entre outras (Decker, 1997).

Os radicais livres são classificados como grupos de átomos ou moléculas altamente reativas contendo um ou mais elétrons não pareados. Possuem a capacidade de doar ou ganhar elétrons de outras moléculas na tentativa de emparelhar seus elétrons, gerando uma espécie mais estável, sendo normalmente produzidos em organismos vivos. Estudos em

animais comprovaram que quando produzidos em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) se comportam como importantes mediadores de quase todas as funções celulares (Sari et al., 2012). Os radicais livres e oxidantes podem ser prejudiciais ou úteis para o corpo, pois desempenham um papel duplo como compostos tóxicos e benéficos. São produzidos a partir de metabolismos celulares normais ou de fontes externas (poluição, fumaça de cigarro, radiação, medicamentos, entre outros). Quando ocorre uma sobrecarga, não podendo ser gradualmente destruídos, o acúmulo desses radicais livres gera um fenômeno chamado estresse oxidativo (Pham-Huy et al., 2008).

A geração de radicais livres, fisiológica ou não, é normalmente equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos e exógenos (Ou et al., 2002). As principais defesas enzimáticas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Damiani, 2006). Também fazem parte dessas substâncias as vitaminas C e E, os carotenóides, enzimas, além dos compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes não-enzimáticos (Jacques e Zambiasi, 2011). O acúmulo desses radicais livres têm sido indicados como um dos responsáveis pelo envelhecimento, desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares e disfunções cerebrais (Pereira e Cardoso, 2012).

Vários estudos apontam que os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante como resultado da sua capacidade de resgate dos radicais livres. Também melhoram os sistemas antioxidantes endógenos, pela sua ação quelante de íons metálicos, evitando assim a formação dos radicais. Estes compostos também são conhecidos não só pela capacidade de ceder hidrogênio ou elétrons às espécies reativas, reduzindo deste modo a reatividade das EROs pelo emparelhamento dos seus elétrons, mas também por serem radicais intermediários estáveis das reações (Lucas-Abellán et al., 2011).

Além dos polifenóis, os probióticos do grupo das bactérias ácido lácticas também são candidatos com capacidade para a produção de alimentos funcionais ou suplementos antioxidantes naturais (Kim et al, 2006; Liu et al., 2010). Tem sido relatado que alguns probióticos podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes ou modular o estresse oxidativo circulatório que protege as células contra danos induzidos por carcinógenos (Kumar et al., 2010). Alguns autores consideram que os probióticos exercem seus efeitos de proteção contra o estresse oxidativo pelo restabelecimento da microbiota intestinal. A maioria das bactérias ácido lácticas têm sistemas de eliminação de radicais livres de oxigênio. Alguns lactobacilos possuem atividade antioxidante e são capazes de diminuir o risco de acúmulo de EROs durante a ingestão de alimentos (Forsyth et al., 2009; Nardone et

al., 2010).

5.6 Chá Verde

O chá verde é uma bebida de origem chinesa que ganhou muita popularidade ao redor do mundo nos últimos 2000 anos. Preparado a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis*, planta que também dá origem ao chá preto, branco, amarelo, pu-erh e oolong, é hoje a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água. Diferentemente do chá preto, o chá verde não sofre processo de fermentação de suas folhas, passando apenas pelo processo de desidratação, para então ser preparado por infusão em água quente, possuindo maior teor de catequinas que os demais chás (Cabrera et al., 2006; Sharangi, 2009; Liu et al., 2020). Cerca de 70% dos polifenóis presentes no chá verde são catequinas (no chá preto essa concentração é de cerca de 30%), sendo a mais abundante a epigallocatequina galato (EGCG), responsável por 32% do seu poder antioxidante e pela maioria de seus benefícios, sendo que em uma xícara de chá verde contém cerca de 20-200mg de EGCG. O chá também é rico em catequinas como a catequina, epicatequina, epicatequina galato, galocatequina e epigallocatequina, além de compostos como o ácido cafeico, cafeína, ácido cumárico, ácido gálico, kampeferol, miricetina, rutina, quercetina e ácido quínico (Moore et al., 2009; Luk et al., 2020), que conferem ao chá muitos benefícios à saúde, como alto poder antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano, antiviral, efeito protetor nas doenças intestinais, cardiovasculares, cognitivas, respiratórias, periodontais, no câncer, no diabetes, na hipertensão arterial sistêmica, na densidade óssea, além de efeito protetor contra cáries dentárias, raios ultravioleta, na litíase renal, entre outras enfermidades (Cabrera et al., 2006; Barbalho et al., 2019).

As catequinas do chá verde são absorvidas principalmente no jejuno e íleo, sobretudo por difusão paracelular, atingindo o pico absorptivo entre 1,5-2,5h após a administração oral, passando diretamente para o fígado através da veia porta, onde são metabolizadas por enzimas de fase II, resultando em conjugados metilados, glicuronizados e sulfatados, para então entrarem na circulação sistêmica ou serem eliminados através da bile de volta para o trato intestinal. Entretanto, a biodisponibilidade das catequinas é bem baixa, chegando ao plasma apenas cerca de 5% após a ingestão, variando para cada catequina, devido à sua instabilidade sob o processo digestivo, má absorção, rápido metabolismo e excreção. As catequinas que chegam ao cólon sofrem degradação pela microbiota, formando compostos

como valerolactonas e ácidos fenólicos e benzóicos, que podem ser absorvidos ou eliminados nas fezes (Moore et al., 2009; Liu et al., 2018; Monagas et al., 2010).

Além de sofrer biotransformação pela microbiota, esses compostos fenólicos do chá verde que chegam ao intestino grosso possuem efeito modulador da qualidade e diversidade da microbiota intestinal, promovendo a proliferação de bactérias como *Akkermansia* (Liu et al., 2016; Axling et al., 2012), *Alistipes* (Liu et al., 2016), *Bifidobacterium spp.* (Zhang et al., 2013; Tzounis et al., 2008; Jin et al., 2012; Liu et al., 2020), *Lachnospiraceae* (Liu et al., 2016, Liu et al., 2020), *Lactobacillus* (Axling et al., 2012; Ishihara et al., 2001), *Lactobacillus–Enterococcus* (Zhang et al., 2013), *Odoribacter* (Liu et al., 2020), *Oscillospira* (Wang et al., 2018), *Rikenella* (Liu et al., 2016), *Ruminococcaceae_UCG-014* (Liu et al., 2020) e *Staphylococcus saprophyticus* (Wang et al., 2016), que podem levar a produção de ácidos carboxílicos de cadeia curta, aumentar a imunidade gastrointestinal, melhorar a função barreira intestinal, prevenir o desenvolvimento de inflamação crônica e/ou inibir infecção por patógenos (Liu et al., 2018; Liu et al., 2016). Os compostos fenólicos do chá também possuem efeito inibidor de espécies como *Aerococcus urinaeequi* (Wang et al., 2016), *Allobaculum* (Liu et al., 2016), *Bacillus weihenstephanensis* (Wang et al., 2016), *Bacteroides* (Lee et al., 2006; Liu et al., 2020), *Bacteroides–Prevotella* (Zhang et al., 2013), *Brachyspira* (Liu et al., 2020), *Clostridium spp.* (Zhang et al., 2013; Tzounis et al., 2008; Lee et al., 2006; Unno et al., 2014; Ishihara et al., 2001), *Eubacterium–Clostridium* (Zhang et al., 2013), *Helicobacter* (Liu et al., 2020), *Mucispirillum* (Liu et al., 2020), *Oscillibacter* (Liu et al., 2020), *Parabacteroides* (Liu et al., 2016; Liu et al., 2020) e *Peptostreptococcaceae* (Wang et al., 2018) no cólon (Liu et al., 2018).

Para avaliar os efeitos do chá verde como forma de tratamento na colite ulcerativa, Mazzon et al. (2005) induziram a colite crônica em ratos Sprague-Dawley machos através da injeção de ácido dinitrobenzenossulfônico (DNBS). O tratamento foi realizado com extrato de chá verde (50 mg/kg) rico em polifenóis e livre de cafeína, ou placebo, sendo administrados diariamente por injeção intraperitoneal 24h após a administração de DNBS, por 4 dias. Verificou-se que os animais que receberam o tratamento com o extrato de chá verde tiveram redução significativa da diarreia e da perda de peso, associados a reverção da disrupção da integridade do cólon, a redução significativa da mieloperoxidase colônica, a redução da produção de TNF- α , além da redução do estímulo de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e da imunorreatividade a nitrotirosina no cólon, que também são marcadores associados a doenças inflamatórias intestinais.

Em outro estudo, Liu et al. (2020) induziram a colite ulcerativa em camundongos Kunming fêmeas com DSS, diluído na água de beber dos animais na concentração de 3%. Os animais receberam 200µL de extratos de chás derivados da *Camellia sinensis* (extrato de chá verde, preto, branco, amarelo, oolong ou escuro/*dark*) ou extrato de chá de *hawk* (*Litsea coreana*) como tratamento, administrados via gavagem (0,5mg/ml), sendo que um grupo não recebeu tratamento. Verificou-se que todos os grupos tratados com extratos de chás tiveram melhora do quadro de colite ulcerativa, com redução da atividade enzimática pró-oxidativa e da inflamação do colón, observado pela redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12 e TNF- α , supressão da ativação de Nf- κ B e aumento da citocina antiinflamatória IL-10. Também observou-se melhora da integridade do cólon e efeito protetor contra a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade exercidas pela indução de colite por DSS. A administração dos extratos exerceram efeito prebiótico na microbiota intestinal dos camundongos, aumentando a abundância de bactérias potencialmente benéficas, como *Faecalibaculum* e *Bifidobacterium*, e diminuindo a abundância de bactérias potencialmente patogênicas, como *Bacteroides* e *Mucispirillum*, além de terem restaurado a produção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes dos animais colíticos, que havia sido suprimida. O extrato de chá verde se mostrou o mais eficaz em atenuar a supressão da riqueza e da diversidade da microbiota intestinal dos camundongos com colite induzida, além de ser o chá mais rico em catequinas e aminoácidos, em especial a teanina.

Uma revisão da literatura realizada por Barbalho et al. (2019) analisou 10 artigos publicados entre 2009 e 2018 que avaliaram os efeitos da suplementação de chá verde e/ou de seus polifenóis nas doenças inflamatórias intestinais, colite ulcerativa e doença de crohn, tanto em humanos quanto em animais. Verificou-se que o chá teve efeito significativo em reduzir o processo inflamatório e oxidativo, com redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-17, inibição da transcrição de NF- κ B e redução dos níveis séricos de amiloide A e da peroxidação lipídica, observado pela redução da atividade da MPO, além de melhora da sintomatologia e de parâmetros histológicos. A administração de polifenóis isolados do chá, como o EGCG, também se mostraram efetivos em reduzir a permeabilidade intestinal, minimizar o aumento do baço e o encurtamento do cólon, atenuar o índice de atividade da doença, restaurar os níveis de antioxidantes (como SOD e GPx), estabilizar os mastócitos, entre outros efeitos benéficos.

Os dados apresentados sugerem que o chá verde possui grande capacidade em reduzir processos inflamatórios e oxidativos no intestino, devido a sua alta concentração de

compostos fenólicos, como a EGCG. Portanto, o chá é um potencial candidato terapêutico nas doenças inflamatórias intestinais, como na colite ulcerativa, sendo necessária a realização de mais estudos que comprovem estes efeitos.

5.7 Kombucha

A kombucha é uma bebida tradicional, geralmente consumida na Ásia (Sreeramulu et al., 2000), e de acordo com sua etimologia é derivada de duas palavras japonesas, “kombu”, para algas e “cha”, para o chá. A origem do chá kombucha é incerta, mas acredita-se que tenha surgido na Manchúria (nordeste da China), na qual foi procurado por suas propriedades “mágicas” suspeitas (Jarrel, 2000). No início do século XX, com a expansão das rotas comerciais, a kombucha veio para o Ocidente pela Mongólia e foi introduzida na Rússia, onde depois seguiu para a Polônia durante a Primeira Guerra Mundial (Greenwalt, 2000; Santos, 2016). Em meados da Segunda Guerra Mundial, esta bebida já era conhecida na Itália, França e Espanha, mas, devido ao racionamento de provisões, como de chá e açúcar neste período de guerra, a kombucha deixou de ser consumida, pois não era possível a sua preparação (Kaufmann, 2013; Jayabalan et al., 2014). Mais tarde, em 1960, investigadores suíços relataram que o consumo de kombucha era tão benéfico quanto o de iogurte e, a partir deste período, a popularidade desta bebida aumentou (Jayabalan et al., 2014).

A bebida é preparada por fermentação de chá adoçado, utilizando bactérias e leveduras como inóculo, também conhecido como fungo do chá ou SCOBY ("Colônia Simbiótica de Bactérias e Leveduras") (Sreeramulu et al., 2000). Segundo Jayabalan et al. (2010), o SCOBY é constituído majoritariamente por proteína e fibras, sendo que após 21 dias de fermentação na kombucha, verificou-se que sua composição seca era de aproximadamente 23% proteína bruta, 14% fibra bruta, 5% lipídio bruto e 4% cinzas. A cada nova fermentação, forma-se um novo SCOBY na superfície do recipiente, o qual deve-se armazenar uma parte para utilizar na próxima produção, e assim sucessivamente. A cultura utilizada para fermentação da kombucha possui variação na composição microbiológica de acordo com sua origem, localização geográfica, clima e meio empregado para o processo de fermentação (Watawana et al., 2015; Leal et al., 2018). Geralmente é utilizada a infusão de chá preto, porém, outros tipos de chás também podem ser utilizados como base, como por exemplo, o chá verde, branco, dentre outros (Fu et al., 2014). A kombucha preparada a partir de chá verde possui atividade antibacteriana superior e contra um maior número de patógenos do que kombucha preparada a partir de chá preto, possivelmente devido a sua

maior acidez e maior quantidade de catequinas, que são conhecidas por sua atividade antibacteriana, além da presença de verbascosídeo, um polifenól com atividade antibacteriana contra diversas bactérias patogênicas, presente exclusivamente na kombucha de chá verde. Já a kombucha preparada a partir de chá preto possui maior quantidade de compostos fenólicos do que a bebida preparada a partir de chá verde (Cardoso et al., 2020).

A kombucha é uma combinação de três fermentações: alcoólica, láctica e acética, devido à presença de várias leveduras e bactérias, principalmente ácido lácticas e acéticas coexistentes no meio, sendo iniciada por micro-organismos osmotolerantes e, finalmente, dominado por espécies tolerantes ao ácido. As principais bactérias acéticas encontradas são: *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xilinoide*s, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*; e leveduras identificadas são: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Candida estrelado* (Battikh, 2012). Também foram detectadas bactérias ácido lácticas *Lactobacillus* e *Lactococcus*, sendo os *Lactobacillus* mais comuns os *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (Marsh, 2014).

O consumo de kombucha tornou-se bastante popular em todo o mundo devido às suas várias alegações e alguns efeitos farmacológicos estabelecidos que incluem anti-diabético, hepatoprotetor, antioxidante, nos distúrbios metabólicos, na aterosclerose, nos distúrbios inflamatórios, na colite ulcerativa, na artrite e até no câncer (Bhattacharya et al., 2011; Bhattacharya et al., 2013; Pakravan et al., 2019; Jayabalan et al., 2014). A kombucha também é conhecida por sua atividade antimicrobiana contra diferentes organismos patogênicos (Greenwalt et al., 1998; Sreeramulu et al., 2000; Battikh et al., 2012; Jayabalan et al., 2014). A combinação entre kombucha e quitosana apresentou efeito antimicrobiano principalmente para *E. coli* em filmes para embalagens ativas de carne, prolongando sua vida útil (Ashraf et al., 2018). A kombucha também mostrou atividade antimicrobiana contra o enteropatógeno *Vibrio cholerae*, permeabilizando suas membranas bacterianas (Amarasinghe et al., 2018). Bhattacharya et al. (2016) encontraram excelente potencial antimicrobiano frente a bactérias enteropatógenas *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Salmonella Typhimurium*, devido à interação combinada de seu conteúdo fenólico. Entretanto, medidas devem ser tomadas para prevenir a contaminação cruzada e o crescimento de organismos patogênicos, que oferecem potenciais riscos à saúde dos

consumidores. Os utensílios precisam estar limpos e sanitizados, o pH precisa estar abaixo de 4,2, o SCOBY precisa ser obtido comercialmente sem uso prévio, a água utilizada para o preparo do chá precisa estar $\geq 165^{\circ}\text{F}$, e qualquer sinal de contaminação por fungos, a kombucha deve ser totalmente descartada (Nummer, 2013).

A bebida é composta de duas fases: um biofilme flutuante e uma fase líquida ácida. Os principais componentes do líquido (e do biofilme, devido à sua grande capacidade de absorção de água) são o ácido acético, ácido glucônico e etanol (Czaja et al., 2006). As leveduras fazem hidrólise da sacarose em glicose e frutose através da ação da invertase, e através da glicolise geram etanol, utilizando principalmente a frutose como substrato. As bactérias ácido acéticas utilizam o etanol para produzir ácido acético e sintetizar cadeias de celulose, formando as redes de fibrila do SCOBY (Morales, 2020). Sob condições aeróbicas e associação simbiótica de bactérias e leveduras, ocorre a transformação de açúcar e chá no período de 7 a 10 dias em uma bebida ácida (pH abaixo de 4), moderadamente gaseificada e refrescante, composta de vários compostos benéficos à saúde, como pode ser visto na Figura 1 (Malbaša et al., 2011; Jayabalan et al., 2008). Verificou-se a presença de ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido glicurônico, ácido glucônico, ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL), vitaminas B1, B2 e B6, vitamina C, aminoácidos, enzimas hidrolíticas, etanol e minerais, além do potencial aumento da atividade antioxidante e do conteúdo de compostos fenólicos totais com o aumento do tempo de fermentação (Srihari e Satyanarayana, 2012; Jakubczyk et al., 2020; Jayabalan et al., 2014, Jayabalan et al. 2010). Segundo Ettayebbi et al. (2003), este aumento no conteúdo total de polifenóis na kombucha pode ser devido à degradação de polifenóis complexos em moléculas menores por algumas enzimas liberadas pela associação de micro-organismos presentes na bebida, como *Candida tropicalis*, que são conhecidos por serem capazes de degradar vários polifenóis.

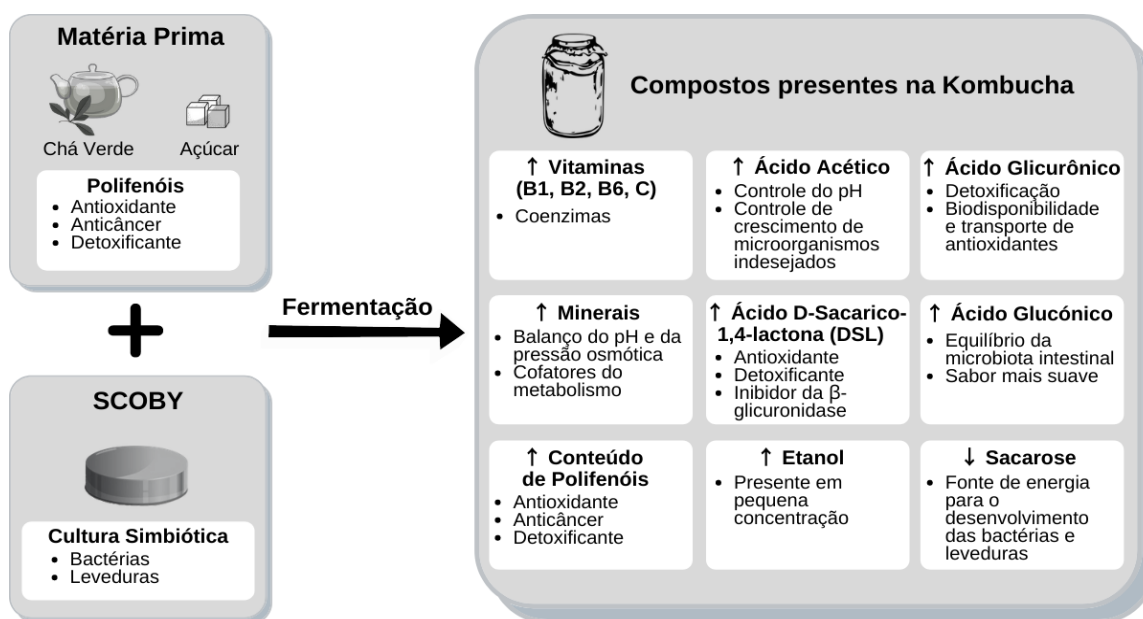


Figura 1. Compostos benéficos presentes na Kombucha.

Fonte: Adaptado de Leal et al. (2018); Asano et al. (1994).

Os componentes fenólicos incluem catequina, epicatequina, epicatequina galato, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina galato e quercetina (Cardoso et al., 2020), possuindo a capacidade de eliminar radicais livres, em particular espécies reativas de oxigênio (ROS), apresentando alto nível antioxidante de amplo alcance (Srihari e Satyanarayana, 2012). A presença de polifenóis do chá é conhecido por transmitir a kombucha a atividade antioxidante (Jayabalan et al., 2014). Estudos que examinam a kombucha preparado usando substratos como chá verde e/ou chá preto mostraram alto potencial de remoção de radicais livres (Jayabalan et al., 2008; Cardoso et al., 2020). Bhattacharya et al. (2011) observaram um aumento progressivo e linear na concentração de compostos fenólicos e flavonóides até o 14º dia de fermentação da kombucha produzida a partir de chá preto. Já Chakravorty et al. (2016) observaram um aumento da atividade antioxidante da kombucha feita com chá preto do 14º ao 21º dia de fermentação.

Salafzoon et al. (2017) verificaram que kombucha feita a partir de chá de gengibre apresentou efeitos antioxidantes em modelos animais com câncer de mama, verificados por meio da notável diminuição da SOD nefrótica, hepática e dos tecidos tumorais. Além disso, houve redução nos níveis de malonaldeído (MDA) em ambos os órgãos testados, com atenuação da peroxidação lipídica e dano celular, e evitou a depleção hepática de glutathione redutase (GSH), que pode resultar em carcinogênese. Em ratos hipercolesterolêmicos, kombucha preparada a partir de chá verde reduziu o processo de peroxidação lipídica e

aumentou o sistema de defesa antioxidante, quando comparada ao tratamento controle, que utilizou chá verde de forma isolada (Bellassoued, 2015).

Em estudo semelhante, com modelos animais diabéticos e dislipidêmicos, a kombucha produzida a partir de chá preto inibiu as atividades de α -amilase e lipase no plasma e pâncreas e foi supressor do aumento dos níveis de glicose no sangue. Curiosamente, observou-se que a kombucha induziu um atraso acentuado na absorção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e triglicerídeos, e um aumento significativo de lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol). As análises histológicas mostraram também que exerceu uma ação de melhoria sobre o pâncreas e eficientemente protegeu as funções do fígado e rim de ratos diabéticos, evidenciada pela redução significativa da transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e atividade transpeptidase gamaglutamil (GGT) no plasma, bem como nos conteúdos de creatinina e ureia (Aloulou, 2012). O efeito hepatoprotetor foi atribuído ao micro-organismo *Gluconacetobacter sp.* A4, que é um produtor primário de ácido D-Sacarico-1,4-lactona, presente no processamento da kombucha (Wang et al., 2013).

Em modelo animal de colite ulcerativa induzida por DSS, Pakravan et al. (2019) avaliaram o efeito da administração de kombucha filtrada, feita a partir de chá preto, na permeabilidade intestinal de camundongos jovens e velhos. Observou-se que os animais que receberam kombucha tiveram maior taxa de sobrevivência e menor perda de peso, além de melhora de distúrbios digestivos, como sangramento e diarreia, quando comparados a animais com a mesma idade que não receberam tratamento. Após a avaliação histológica e molecular, verificou-se melhora significativa da expressão das proteínas zonula occludens (ZO-1 e ZO-2), que são proteínas associadas a integridade das *tigh junctions*, nos animais tratados com a kombucha, resultando na diminuição da permeabilidade intestinal. Os animais mais jovens foram os mais afetados pela colite induzida por DSS, quando comparados aos camundongos mais velhos, entretanto, também foram os que melhor responderam ao tratamento com a kombucha filtrada.

Em estudo semelhante, Mahmoudi et al. (2020) avaliaram o efeito da administração de kombucha filtrada, produzida a partir de chá preto, na expressão colônica do mRNA dos receptores toll-like (TLR2 e TLR4) e dectin-1, que são proteínas de reconhecimento de padrões do sistema imunológico inato, que detectam antígenos no epitélio intestinal, e na expressão colônica do mRNA de MYD88, que é uma molécula de sinalização de TLR2 e TLR4, em camundongos jovens e velhos com colite induzida por DSS. A administração de

DSS inibiu a expressão do mRNA do TLR2, TLR4 e MYD88, tanto em camundongos jovens quanto nos velhos, além de aumentar a expressão do mRNA de dectin-1 apenas nos camundongos jovens, em comparação com os animais saudáveis de mesma idade. Todavia, o tratamento com kombucha filtrada elevou de forma significativa a expressão do mRNA do TLR2, TLR4 e MYD88 nos animais jovens e velhos, ao mesmo tempo que inibiu a expressão do mRNA de dectin-1 nos camundongos jovens, quando comparado aos animais colíticos que não receberam tratamento, exercendo um efeito normalizador da expressão gênica. Esses resultados são extremamente promissores, devido a crescente utilização de medicamentos inibidores de TLR2/TLR4 como estratégia terapêutica na prevenção da inflamação nas DII, visto que o desequilíbrio de sua função e expressão intestinal pode contribuir para o desenvolvimento da *leaky gut syndrome* (síndrome da hiperpermeabilidade intestinal) e manutenção da colite ulcerativa.

Com base nos dados apresentados, acredita-se que a kombucha possua maior potencial terapêutico nas DII, como na colite ulcerativa, que o chá verde, devido a sua maior capacidade antioxidante, maior teor de polifenóis, presença de probióticos e ácidos orgânicos, além de seu efeito antimicrobiano contra bactérias patogênicas. Portanto, este estudo mostra-se de extrema importância, visto o número externamente limitado de estudos utilizando kombucha/chá verde como forma terapêutica nas DII.

5.8 Colite Ulcerativa

A colite ulcerativa é uma subcategoria de DII caracterizada por inflamação contínua na mucosa intestinal ou na lâmina própria. Na maioria dos pacientes, a doença inicia no reto e pode envolver um segmento ou todo o comprimento do cólon, enquanto em outros, a origem pode ser inconsistente, afetando qualquer parte do cólon (Kornbluth e Sachar, 2010). Desse modo, a colite ulcerativa pode ser classificada como proctite, envolvendo apenas o reto, proctossigmoidite, quando afeta o reto e o cólon sigmóide; colite esquerda, quando afeta o lado esquerdo do intestino grosso e pancolite, quando há inflamação generalizada do cólon (Kumar, 2008).

A doença pode progredir de leve a severa com muitas características, como dor abdominal, diarreia, fadiga, perda de peso, sangramento retal e fezes com sangue. Em casos graves, sangue e muco nas fezes, fístula, hemorroidas de fissura e anemia são observados (Head, 2003). Em animais estas características estão bem estabelecidas, incluindo a perda

de peso, formação de úlcera, diarreia com sangue, perda de epitélio celular e infiltrações com neutrófilos (Xavier e Podolsky, 2007).

Em humanos, a subdivisão por categorias é baseada nos sintomas clínicos (Conrad et al., 2014):

a) Leve: frequência de fezes menor do que 4 vezes por dia com ou sem presença de sangue nas fezes, sem distúrbios sistêmicos.

b) Moderado: frequência de fezes 4 vezes por dia ou mais com ou sem sangue e algumas alterações sistêmicos.

c) Grave: frequência de fezes mais do que 6 vezes por dia com presença de sangue, febre acima de 37,5 °C, dor abdominal e anemia.

d) Fulminante: frequência de fezes maior do que 10 vezes por dia com hemorragia contínua, dilatação de cólon e abdominal (duro à palpação).

Além da classificação por categorias, existe também um sistema de avaliação inicial e monitorização da resposta à terapia (*The Mayo Clinic Index or Disease Activity Index*). Neste sistema a classificação é feita de 0 a 12 pontos, tendo em conta a frequência das fezes, hemorragia retal, resultados de endoscopia e estado físico geral do doente (Conrad et al., 2014; Marchioni Beery, 2014).

Os dados epidemiológicos atualmente disponíveis mostram que essas doenças são mais frequentes em países industrializados (Victoria et al., 2009), com maior incidência e prevalência na Europa e na América. Um estilo de vida e ambiente ocidentalizados, que estão associados com alto nível socioeconômico, uso de medicamentos, dietas baseadas em alimentos ultraprocessados, ricos em açúcar e gorduras trans e saturadas, poluição e estresse, estão relacionados ao aparecimento da doença (Shouval et al., 2017). Embora a etiologia da colite ulcerativa ainda não seja clara, é geralmente hipotetizada como sendo uma condição multifatorial que vai levar a alta produção de mediadores pró-inflamatórios na mucosa luminal, aumentando o estresse oxidativo no intestino (El-Abhar et al., 2008). A severidade da doença inclui os fatores genéticos e também bactérias comensais entéricas que são requeridas para iniciar e manter a inflamação intestinal ou colônica (Ostanin et al., 2009). A inflamação tem um papel muito importante na patogênese da colite ulcerativa, pois o processo inflamatório resulta no aumento do estresse oxidativo, causando dano tecidual (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A barreira intestinal é formada por uma monocamada de células epiteliais colunares polarizadas, unidas por junções intercelulares (*tight junctions*) que mantêm as ligações das

células e a separação do conteúdo luminal do intestino com o meio intracelular, conforme mostra a Figura 2. A análise de biópsias do cólon sigmóide de pacientes com DII revelou que há uma diminuição no número de junções, assim como diminuição da sua capacidade estrutural. As citocinas pró-inflamatórias presentes na DII, dentre outros fatores, podem induzir este tipo de disfunção na barreira intestinal, assim como regular a expressão gênica e os processos de redistribuição das junções intercelulares (Hering et al., 2012; Neurath, 2014).

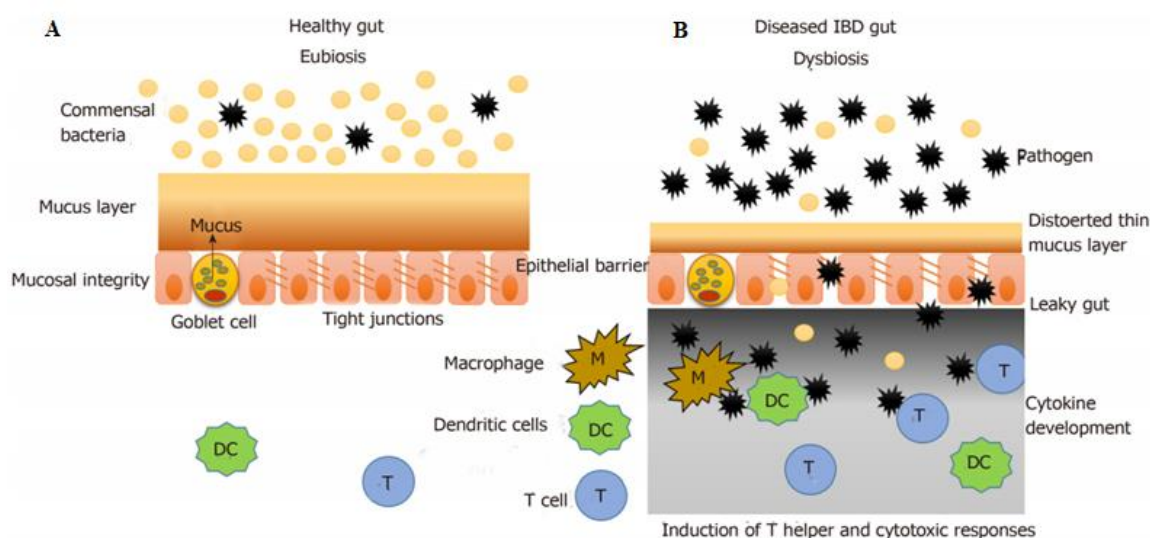


Figura 2. Intestino saudável em eubiose (A) e intestino com doença inflamatória intestinal com disbiose (B), onde ocorre a redução da camada de muco, perda da integridade da barreira intestinal, distribuição irregular e perda de função das *tigh junctions*, levando à geração de uma resposta imunológica exacerbada e inflamação.

Fonte: Chandra et al. (2019).

A perda da integridade desta barreira física pode levar a alterações na resposta imune, observada na DII, favorecendo um elevado influxo de substâncias presentes no lúmen, como por exemplo, bactérias entéricas e antígenos. Este influxo de substâncias ‘estranhas’ irá promover a sobrecarga do sistema imunológico, induzindo a resposta inflamatória, conforme mostrado na Figura 2 (Silva et al., 2008).

A desregulação no sistema imunológico intestinal apresenta um importante papel na patogênese dessas doenças. Pacientes com DII têm presença de extensivo infiltrado inflamatório, edema, perda de células caliciformes, diminuição na produção de muco, hiperplasia de células crípticas e ulceração, observados em cortes histológicos (Ostanin et

al., 2009). A inflamação na mucosa intestinal, além do desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6 e IL-12, citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10, IL-11 e de expressão de proteínas inflamatórias que incluem ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), desempenham papel importante na inflamação patológica (Sakthivel e Guruvayoorappan, 2013).

O tratamento é sintomático e tem como alvo o controle e prevenção de recidivas dos processos inflamatórios, podendo ser utilizadas abordagens terapêuticas de uso oral ou retal, como os enemas e supositórios (Ali et al., 2017). As terapias na colite ulcerativa que envolvem agentes anti-inflamatórios e imunossupressores apenas reduzem os sintomas e prolongam o tempo de alívio, além de produzirem efeitos colaterais que limitam seu valor terapêutico (Head e Jurenka, 2003; Mowat et al., 2011).

A cirurgia é necessária em pacientes com doença ativa crônica ou grave refratária. Terapias farmacêuticas não foram bem-sucedidas; entretanto, a cirurgia é tipicamente vista como um último recurso e nem sempre é curativa (Hancock, 2008; Crohns and Colitis Foundation, 2014). Em pacientes com colite ulcerativa leve a moderada, as diretrizes atuais dos Estados Unidos da América (EUA) recomendam o tratamento inicial com aminosalicilato (5-ASA) ou indução sequencial com corticosteróides, seguido de terapia de manutenção com 5-ASA (Kornblut e Sachar, 2010).

Em pacientes com colite ulcerativa moderada a grave, um imunossupressor (IMS), como azatioprina ou 6-mercaptopurina, pode ser prescrito como terapia de manutenção após a indução da remissão com corticosteróides. Alternativamente, um anticorpo biológico, tipicamente anti-fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como infliximabe ou adalimumabe, pode ser prescrito com ou sem imunossupressor simultâneo para promover e manter a cura da mucosa e a remissão clínica (Kornblut e Sachar, 2010; Kopylov et al., 2016).

O uso de probióticos, prebióticos, simbióticos e, possivelmente de kombucha, que é um produto com efeito simbiótico, são uma promissora alternativa terapêutica para a colite ulcerativa, auxiliando em diversos processos do organismo, dentre eles, a modulação da microbiota intestinal, inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estimulação da imunidade intestinal e o aumento da produção de butirato, um ácido graxo de cadeia curta que atua como agente anti-inflamatório (Ghoury, 2014; Ganji-Arjenaki e Rafieian-Kopaei, 2018; Shide et al., 2019).

5.9 Modelos experimentais

Modelos animais têm sido estudados de modo a esclarecer o desenvolvimento da colite ulcerativa por meio de alterações nas características histopatológicas, imunológicas e morfológicas no trato intestinal. Esses modelos são divididos em categorias definidas como colite espontânea, colite quimicamente induzida, modelos de transferência adotados e geneticamente modificados (Wirtz, 2007; Randhawa, 2014). A simplicidade, o início, a duração e a gravidade rápida e controlável, fazem a indução por agentes químicos o modelo mais utilizado (Perše e Cerar, 2012).

Os modelos de colite por ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), DSS, oxazolona e ácido acético são os modelos mais empregados. O TNBS, dissolvido em etanol, é administrado via intra-retal, em ratos ou camundongos. O etanol ocasiona desorganização da barreira intestinal, enquanto o TNBS age como hapteno, levando a uma resposta Th1, com densa infiltração celular, que atinge todas as camadas do cólon, como na doença de Chron. Oxazolona é um agente administrado via intra-retal em camundongos ou ratos, geralmente após pré-sensibilização subcutânea (abdômen), que induz aumento de produção de citocinas Th₂ e inflamação no cólon distal com similaridades à colite ulcerativa. O ácido acético também é administrado de forma intra-retal, causando inflamação não transmural, além de infiltração por neutrófilos e dano tecidual, semelhantes a DII humana (Randhawa et al., 2014). O modelo de colite induzido por DSS é adicionado na água dos bebedouros de ratos ou camundongos (solução de 2 – 5 %), por períodos variados (frequentemente 5 – 7 dias) (Wirtz et al., 2007; Randhawa et al., 2014). Ele provoca lesão química no epitélio intestinal, resultando na exposição da lâmina própria e do compartimento da submucosa a antígenos luminais e bactérias entéricas, desencadeando inflamação (Kitajima et al., 1999). O DSS é um polissacarídeo sulfatado, carregado negativamente, solúvel em água, com propriedades anticoagulantes, produzindo modelos de colite aguda ou crônica em camundongos com peso molecular que varia de 40 a 50 kDa (Chassaing et al., 2014; Eichele e Kharbanda, 2017).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Preparo do chá verde

As folhas de chá verde serão adquiridas comercialmente da marca Yamamotoyama. Os recipientes serão esterelizados a 121 °C por 20 min. O chá será preparado utilizando 1 L de água e 10 g L⁻¹ de folhas secas, que ficarão em infusão por 7 min na água a 85 °C (Komes et al., 2010). O chá será preparado diariamente e administrado fresco, tanto para o tratamento quanto para o preparo da kombucha.

6.2 Preparo da kombucha

O biofilme de micro-organismos (SCOBY) será adquirido comercialmente da marca Viva Mais, sendo adquirido acondicionado em embalagem plástica com seu líquido de partida. Os recipientes de fermentação serão esterilizados a 121 °C por 20 min. O SCOBY será inoculado com seu líquido de partida (100 mL) no chá verde previamente preparado, e será adicionado sacarose (60 g L⁻¹). O recipiente será recoberto com tecido poroso para evitar contaminação. Serão realizadas três fermentações com a finalidade de padronizar a kombucha para o estudo. Na primeira fermentação será utilizado o SCOBY inteiro e para segunda fermentação será dividido em quatro partes. Na terceira e última fermentação os SCOBYs serão transferidos para o novo recipiente com seu líquido de partida. As fermentações serão realizadas por 7 dias cada (Chakravorty et al., 2016; Kallel et al., 2012). Amostras do líquido de todos os recipientes da terceira fermentação serão coletadas após os 7 dias de fermentação, formando um *pool* para uso nas análises do presente estudo, sendo armazenadas a 5 °C (Kallel et al., 2012). Após decorrido os 7 dias, será interrompida a fermentação e os SCOBYs serão coletados e armazenados em 300 mL de chá verde e 100 mL de kombucha em recipiente fechado a 5 °C.

6.3 Caracterização fitoquímica da kombucha e do chá verde

As análises de caracterização química da kombucha e do chá verde serão realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), bem como no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) da UFPEL.

6.3.1 Quantificação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

A quantificação de compostos fenólicos totais será determinada por meio de técnica espectrométrica, adaptado de Swain e Hillis (1959). Serão homogeneizadas 0,5 mL de kombucha e de chá verde e adicionados 20 mL de metanol (Synth®). As amostras serão centrifugadas a 10000 rpm por 15 min. Serão coletados 250 µL do sobrenadante e adicionados às amostras 4 mL de água destilada e 250 µL de Folin-Ciocalteu (Merck®) (1:1). Os tubos serão agitados e após 5 min serão adicionados 0,5 mL de Na₂CO₃ (Sigma®) (7%). Após 2 h, a absorbância será medida a 725 nm. A quantidade de fenóis totais nas amostras serão quantificadas por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico entre as concentrações de 10 a 100 µg mL⁻¹. A quantificação dos compostos fenólicos totais será realizada em triplicata e os resultados expressos em µg de ácido gálico por g de amostra (µg g⁻¹).

6.3.2 Determinação de compostos fenólicos individuais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a quantificação de compostos fenólicos individuais, todos os reagentes utilizados serão de grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico serão adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina, rutina, luteolina, cumarina e campferol serão adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Será utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Japão) com amostrador automático, equipado com bombas alternadas, sistema de desgaseificação, integrador e detector com arranjo de diodos. Todos os comandos serão realizados pelo software LC solution 1.22 SP1.

As análises cromatográficas com fase reversa serão feitas por gradiente, com coluna C18 (4.6 mm x 250 mm) empacotada com partículas de 5 µm de diâmetro; a fase móvel será composta por água contendo 1% de ácido acético (A) e metanol (B) e o programa de eluição será: 5% de B por 2 min; 20% de B até 10 min; 40, 50, 60, 70 e 80% de B a cada 10 min (Barbosa Filho et al., 2014). A kombucha e o chá verde serão filtrados em filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e desgaseificados em banho de ultrassom antes do uso. Soluções de estoque de referência serão preparadas na fase móvel, nas concentrações de 0,020 a 0,200 mg mL⁻¹ para quercetina, rutina, luteolina, cumarina e campferol, e nas concentrações de 0,035 a 0,250 mg mL⁻¹ para os ácidos gálico, clorogênico e caféico. A quantificação será feita a partir da integração dos picos utilizando o método de calibração externa, em 254 nm

para ácido gálico, 280 nm para cumarina, 327 nm para os ácidos clorogênico e caféico, e 365 nm para quercetina, rutina, luteolina e campferol. Os picos cromatográficos serão confirmados pela comparação dos tempos de retenção com aqueles dos padrões de referência e pelo espectro. Todos os procedimentos cromatográficos serão realizados em temperatura ambiente.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) serão calculados com base no desvio-padrão das respostas e o coeficiente angular, usando três curvas de calibração independentes, conforme definido por Boligon et al. (2012). As análises serão realizadas em triplicata.

6.4 Capacidade antioxidante da kombucha e do chá verde

6.4.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A avaliação da atividade biológica dos compostos fenólicos será realizada por meio da identificação das propriedades antioxidantes, com a utilização de métodos espectroscópicos de avaliação da capacidade de captar radicais livres e do seu poder redutor. O método DPPH utilizado será o descrito por Brand-Williams et al. (1995), baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH (Sigma®) será utilizado na concentração de 0,06 mM, dissolvido em álcool metílico (Synth®). A solução será homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar. Em ambiente escuro, será transferida uma alíquota de 0,1 mL de amostra para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (item solução de DPPH 0,06 mM) e homogeneizada. Após o preparo, as soluções serão armazenadas em ambiente escuro por 45 min. Será utilizado 0,1 mL de uma solução controle (solução controle de álcool metílico 50% (40 mL), acetona 70% (Merck®) (40 mL) e água (20 mL) com 3,9 mL do radical DPPH, para então ser homogeneizado e armazenado no escuro por 45 min. Será utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) serão monitoradas a cada minuto, onde será observada a redução da absorbância até sua estabilização. A curva padrão será realizada a partir da solução inicial de DPPH (60 µM), variando a concentração de 10 µM a 50 µM. Cada uma destas soluções de DPPH (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM) será armazenada em ambiente escuro por 45 min, sendo então transferidas para cubetas de vidro, onde será realizada a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados

serão expressos em EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$). O experimento será realizado em triplicata com três repetições independentes.

6.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS): Kombucha e Chá Verde

A Reação ao Ácido Tiobarbitúrico foi determinada de acordo com a metodologia de Ohkawa et al. (1979). Primeiramente foi incubado em banho maria a 80 °C, tubos de ensaio contendo água Mili Q, Azeite de Oliva Extra Virgem submetidos à oxidação por 100 μM de sulfato ferroso, por 10 min. Posteriormente, foi adicionado em cada tubo a amostra, Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%, Tampão de Ácido Acético pH 3,44 e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. Em seguida, incubado novamente em banho maria a 100 °C por 1 hora. Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532 nm, em espectrofotômetro. A concentração de TBARS foi calculada por meio de uma curva padrão, concentrações conhecidas de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano, e os resultados foram expressos em nm de Malonaldeído (MDA)/mL de amostra. A curva padrão é composta por concentrações de água destilada, MDA 0,03 mM, SDS 8,1%, Tampão de ácido acético pH 3,44 e TBA 0,6% e incubados em banho maria à 100 °C, por 1 h. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições independentes.

6.4.3 Poder antioxidante redutor do íon ferro III (FRAP)

O método de FRAP será realizado de acordo com o descrito por Pulido et al. (2000), método este que avalia a capacidade da amostra em reduzir o íon Fe^{3+} a íon Fe^{2+} . Seram utilizadas amostras de kombucha e de chá verde. No momento da análise, será preparada uma solução reagente FRAP, formado pela adição de solução de TPTZ 10 mmol L em HCl 40 mmol L com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol L e tampão acetato 300 mmol L, para manter o pH em 3,6, na proporção 1:1:10. Será adicionado 3 mL do reagente FRAP, recém-preparado, a 0,1 mL da triplicata de cada espécie, observando uma mudança de coloração imediata de verde para azul, dependendo da atividade. Quanto mais escuro o azul, maior a absorbância e a atividade antioxidante. Após 5 minutos, a leitura será realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 593 nm. O ácido gálico será utilizado como padrão na concentração 0,55 mM. Como branco, será utilizado 0,1 mL de água destilada e 3mL do reagente FRAP. A partir das leituras de absorbância do ácido ascórbico nas concentrações de 0,1 a 0,6 mM, será construído um gráfico concentração (mM) x absorbância, com auxílio do Microsoft

Excel 2003, originando uma equação da reta a qual será utilizada para determinar a concentração equivalente em ácido ascórbico e consequentemente a atividade em equivalente de ácido ascórbico (EAA) em mmol g⁻¹.

6.5 Avaliação da capacidade de inibição enzimática do chá verde e da kombucha

6.5.1 Ensaio de inibição da alfa-glicosidase

Será avaliado utilizando o procedimento descrito por Vinholes et al. (2011). Serão adicionados 10 µL da amostra em 50 µL de substrato nitrophenyl α-D-glucopiranosidase (3,25 mM) em tampão fosfato (pH 7,0). A reação iniciará pela adição de 50 µL da enzima (9,37 U/mL de tampão de fosfato, pH 7,0) e posteriormente serão incubados a 37 °C durante 10 minutos. Será realizada leitura em espectrofotômetro após a adição de 15 µL de HCl para parada da reação, em uma absorbância de 405 nm. Os resultados são expressos em percentual de inibição, seguindo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

6.6 Determinação do pH do chá verde e da kombucha

A determinação do valor do pH será realizada em pHmetro digital QUIMIS e em tiras de teste de pH. As análises serão realizadas em triplicata.

6.7 Determinação de acidez do chá verde e da kombucha

A partir de uma solução alcalina de concentração conhecida, será realizada uma titulometria para determinar a acidez do produto, utilizando-se NaOH 0,1 N e fenoftaleína como indicador de viragem. Os resultados serão expressos em percentual de ácido láctico presente na amostra. As análises serão realizadas em triplicata.

6.8 Determinação do ácido acético da kombucha

Amostras de kombucha serão filtradas em filtros de náilon (0,45 m, diam. 25 mm, Sigma-Aldrich, Poznań, Polônia). O ácido acético será analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um HPLC série 1200 conectado a um detector de índice de refração, série 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), com coluna Rezex ROA-Organic Acid H + (8%) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A coluna será eluída com uma fase móvel desgaseificada contendo 5 mM de H₂SO₄, pH 2,25 a 60°C com uma taxa

de fluxo de 0,5 mL/min durante 30 min por amostra. Os resultados serão apresentados em mg de ácido acético/L (Jakubczyk et al., 2020).

6.9 Aspecto de segurança

6.9.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O ensaio de MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) será realizado de acordo com o método de Mossmann (1983). Resumidamente, culturas de células CACO-2 e células saudáveis (3×10^5 células mL⁻¹) serão preparadas em placas contendo 96 poços, às quais serão adicionadas diluições seriadas (0,02 a 2,5 mg.mL⁻¹) de 200 mL da suspensão bacteriana contida na kombucha, ou 20 mg.mL⁻¹ Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (controle positivo). O meio essencial mínimo Eagle (E-MEM) fresco será usado como controle negativo. As placas serão incubadas por 24 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio será removido por sucção de todos os poços e 50 mL de solução MTT 1 mg.mL⁻¹ (USB Corporation) preparada em meio E-MEM será adicionada em cada poço, e as placas incubadas por 4 h a 37 °C. A solução de MTT será removida cuidadosamente e 100 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) serão adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan. Depois de agitar suavemente as placas durante 5 min manualmente, para dissolução por completo dos cristais, a absorvância será lida num leitor de absorvância de microplacas 680 (Bio-Rad Laboratories) a 540 nm. A viabilidade celular será obtida por meio do seguinte cálculo: média da absorvância dos tratados/ média dos controles x100.

7 Avaliação do experimento *in vivo*

7.1 Animais

Serão utilizados modelos biológicos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da UFPEL. Serão utilizados 72 animais, divididos em 6 grupos compostos 12 animais cada, com 60 dias de idade, mantidos em gaiolas, em ambiente com controle de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (12:12 horas ciclo escuro/claro). O experimento será conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental, da Faculdade de Nutrição (UFPEL), onde os animais permanecerão em adaptação ao ambiente do laboratório e ao controle do consumo da dieta padrão (Nuvilab®) e água *ad libitum* por uma semana. Todos os procedimentos serão realizados de acordo com o “Guia para cuidados e uso de animais de laboratório” do *National Research Council* (NRC, 2011).

7.2 Colite experimental induzida por Ácido Acético (AA)

Após lavagem colônica com água destilada autoclavada, os camundongos serão tratados com enema contendo 0,1ml de ácido acético a 4%, através de uma cânula de polipropileno que será inserida no cólon pelo ânus. Os animais foram mantidos em posição pronada por 15 segundos com ácido acético, depois lavados água autoclavada (Sanei et al., 2014). Ao longo do protocolo será avaliado o índice de atividade da doença (IAD), onde os animais serão monitorados em relação a mudanças de peso corporal, presença de sangue nas fezes e consistência das mesmas. Ao final de sete dias, os animais serão eutanasiados, os cólons coletados, lavados com solução salina a 0,9%, pesados e seus comprimentos mensurados. Após esse procedimento será feita a análise macroscópica e microscópica do cólon.

8 Delineamento estatístico e experimental

8.1 Delineamento experimental

Foi realizado cálculo amostral com nível de confiança de 95%, distribuídos em 6 grupos com 12 animais cada. Um grupo como controle positivo, um controle negativo e quatro grupos tratamento, com 6 animais machos e 6 fêmeas em cada, conforme demonstrado a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 – Ensaio *in vivo* com administração de extrato de chá verde e de kombucha. Serão 6 grupos compostos por 12 animais cada (n=12).

Grupos		Variáveis independentes	Variáveis dependentes
Animais saudáveis	1-Dieta padrão + água		
	2-Dieta padrão + chá verde		
	3-Dieta padrão + kombucha		
Animais que receberão indução de colite aguda com AA (4%)	4-Dieta padrão + água		Inflamação colônica (histologia)
	5-Dieta padrão + chá verde		Níveis de malonaldeído
	6-Dieta padrão + kombucha		Atividade da CAT, SOD e GPx
	Obs.: Todos os animais terão acesso a água <i>ad libitum</i>		Níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α Atividade da mieloperoxidase

Serão utilizados modelos biológicos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas provenientes do Biotério Central da UFPEL. Serão utilizados 72 animais ($n = 72$), divididos em 6 grupos, com 12 animais cada, sendo que para cada tratamento/controle terá 6 machos e 6 fêmeas. Nos grupos tratamento, os animais receberão kombucha ou chá verde por gavagem de 1 mL 100g^{-1} de peso corporal, com início no 1º dia (após a semana de adaptação), mantendo-se até o 7º dia. No 8º dia de experimento os animais serão submetidos a um jejum de 3 horas e, posteriormente, sedados com isoflurano e eutanasiados por punção cardíaca, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea, 2004). O trato gastrointestinal será dessecado e armazenado em 10% de formalina tamponada. As amostras de sangue serão coletadas em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os demais órgãos: fígado, coração e rim serão excisados e pesados individualmente para serem utilizados em análises complementares e/ou projetos futuros. Estes procedimentos serão realizados com auxílio de uma Médica Veterinária com conhecimento específico sobre as técnicas.

9 Avaliação *in vivo* do cólon

9.1 Avaliação da atividade da doença (IAD)

A gravidade da colite será monitorada diariamente por um Índice de Atividade da Doença (IAD) (Larner et al., 2019), a qual inclui análise de perda de peso, consistência das fezes e sangramento (Tabela 4), e serão somados os escores dos três parâmetros. Os animais com escores maiores que 9 serão eutanasiados.

Tabela 4 – Critérios para pontuação de parâmetros de avaliação da evolução da doença inflamatória intestinal induzida por ácido acético.

Escore	Perda de peso corporal (%)	Consistência das fezes	Sangramento anal
0	Nenhum	Bem formada	Nenhum
1	1-5	-	-
2	5-10	Pastosas	Local
3	10-20	-	-
4	≥ 20	Aquosas	Severa

Fonte: Larner et al. (2019).

9.2 Avaliação macroscópica do cólon

O cólon será aberto longitudinalmente sobre a margem mesentérica e lavado em solução salina para análise. As alterações macroscópicas na mucosa colônica serão avaliadas usando-se uma escala de dano macroscópico, conforme demonstrado na Tabela 5 (Topal et al., 2014).

Tabela 5 – Escala da gravidade da inflamação na avaliação macroscópica.

Escore	Gravidade da inflamação
0	Mucosa com aparência preservada
1	Edema e congestão
2	Ulceração e hemorragia
3	Múltiplas úlceras e parede intestinal diluída

9.3 Avaliação microscópica do cólon

A terceira parte distal do cólon será cortada longitudinalmente e fixada em paraformaldeído tamponado a 4%. As secções embebidas em parafina, cortadas em seções de 5 µm serão coradas com hematoxilina-eosina e as imagens serão analisadas em microscópio. Nas secções colônicas serão avaliados três parâmetros (Tabela 6), segundo Gil-Martinez et al. (2019).

Tabela 6 – Critérios para avaliação microscópica.

Escore	Gravidade da inflamação	Dano na cripta	Ulceração
0	Ausência de inflamação nas células da lâmina própria	Criptas intactas	Ausência
1	Granulócitos nas células da lâmina própria	Perda de um terço basal	Um ou dois pontos de ulceração
2	Células inflamatórias que se estendem na submucosa	Perda de dois terços basais	Três ou quatro pontos de ulceração
3	Infiltrado inflamatório	Perda da cripta inteira	Ulceração confluenta ou extensa
4	—	Mudança da superfície epitelial com erosão	—
5	—	Erosão confluenta	—

Os parâmetros serão somados, sendo que o máximo escore histológico para colite grave é igual a 11 (Laroui et al., 2012).

9.4 Avaliação do estresse oxidativo

Após a eutanásia dos animais serão retiradas amostras do cólon que serão armazenados a -80 °C até a realização das análises. Todas as determinações bioquímicas serão realizadas nos fragmentos homogeneizados do cólon. Para o cálculo das análises de CAT, SOD e GPx, a proteína tecidual será quantificada utilizando o método de Lowry (Lowry et al., 1951).

9.4.1 Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A Reação ao Ácido Tiobarbitúrico será determinada de acordo com a metodologia de Ohkawa et al. (1979) com ligeiras modificações. Será adicionado em cada tubo uma alíquota de Água Mili Q; amostra do cólon; Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%; Tampão de Ácido Acético pH 3,44, e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6% (pH 4,0), como demonstrado na Tabela 7. Em seguida, os tubos serão incubados em banho-maria a 100°C por 1 hora.

Tabela 7 - Protocolo de oxidação do ensaio de Reação ao Ácido Tiobarbitúrico.

TUBOS	H ₂ O Mili Q	Amostra	SDS (8,1%)	TAMPÃO (pH 3,44)	TBA (0,6%)
Branco	1300 µL	500 µL	200 µL	500 µL	—
Amostra	800 µL	500 µL	200 µL	500 µL	500 µL

Fonte: Adaptado de Ohkawa et al. (1979).

Os produtos da reação serão determinados por medida de absorbância em 532nm, em espectrofotômetro. A concentração de TBARS será calculada por meio de uma curva padrão, concentrações conhecidas de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano, e os resultados serão expressos em nm de Malonaldeído (MDA)/g de amostra.

9.4.2 Determinação da atividade da enzima Catalase (CAT)

A amostra (60 µg) será homogeneizada e misturada com 150 µl de tampão fosfato (125 mM, pH 7,4). A reação será iniciada pela adição de 10 mL de H₂O₂ (0,5 mM). O branco será preparado com 190 mL de tampão fosfato e 10 mL de H₂O₂ (0,5 mM). A taxa de

diminuição da densidade óptica será medida a 240 nm após 1 min em relação ao branco. Uma unidade de atividade de CAT será definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mM de H_2O_2 por min a 37 °C. A atividade específica será expressa em unidades/mg de proteína (Aebi, 1984).

9.4.3 Determinação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para determinar a atividade da SOD, a amostra (40 µg) será homogeneizada, a seguir será adicionado 150 µL de tampão glicina 50 mM, pH 10,2 e 10 µl de catalase 10 µM. Como controle, será utilizado 180 µl de tampão de glicina 50 mM, pH 10,2 e 10 µl de catalase 10 µM. A reação será iniciada pela adição de 10 mL de adrenalina a 60 mM. A absorbância a 480 nm será medida no tempo zero e novamente após 10 minutos a 32°C. Uma unidade de atividade da SOD será definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir a formação de superóxido em 50%. A atividade específica será expressa em unidades/mg de proteína (Boveris, 1984).

9.4.4 Determinação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx será mensurada usando hidroperóxido de terc-butil como substrato. O desaparecimento do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) será monitorado espectrofotometricamente a 340 nm em meio contendo glutathione 2 mM, glutathione redutase 0,15 U/mL, azida 0,4 mM, hidroperóxido de terc-butil 0,5 mM e NADPH 0,1 mM. Uma unidade GPx é definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto, e a atividade específica é representada como unidades/mg de proteína (Wendel, 1981).

9.5 Determinação da expressão gênica de enzimas relacionadas a resposta inflamatória

Para determinação da expressão gênica, as amostras de cólon serão coletadas imediatamente após a decapitação e armazenadas a -80°C. As amostras serão homogeneizadas com 1 mL Qiazol (Qiagen, Valencia, EUA). O RNA total será isolado e purificado seguindo o protocolo do Qiazol. As reações de transcrição reversa serão realizadas utilizando 1 µg de RNA por meio de kit transcrição reversa com inibidor de RNase (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um volume de 10 µL. Será realizada a Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (PCR-RT) para avaliar a expressão dos genes alvo descritos na tabela 8.

Tabela 8 – Oligonucleotídeos utilizados para expressão gênica de citocinas no tecido cólon.

Gene	Sequência
Interleucina 6 (IL-6)	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3' e 5'- TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3'
Interleucina 1beta (IL-1 β)	5'-TTGACGGACCCCAAAAGATG-3' e 5'-TCTCACTGAAACTCAGCCGT-3'
Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3' e 5'- GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'

As reações de PCR serão realizadas em triplicata em um volume de 12 μ L utilizando SYBR Green Master mix (Roche) e a fluorescência será quantificada Eco Real Time (Illumina). Para cada ensaio serão realizados 40 ciclos de PCR e uma curva de dissociação será incluída no final da reação a fim de verificar a amplificação de um único produto de PCR. Os dados serão reportados como folds over the minimum. Cada placa de ensaio incluirá um controle negativo.

9.8 Mieloperoxidase colônica (MPO)

O MPO colônico é um marcador de neutrófilos, e sua concentração no tecido se correlaciona com a extensão da infiltração de neutrófilos. O tecido colônico será pesado (50-100 mg) e lavado cuidadosamente em PBS até livre de matéria fecal e armazenado a -80°C até serem analisados. A seguir será homogeneizado com brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (Sigma®) em PBS 50 mM, pH 6,0. O tecido será congelado-descongelado 3 vezes, submetido à sonicação por 10 s para obter uma suspensão homogênea do tecido e centrifugado em alta velocidade a 4 °C. A MPO será testada no sobrenadante em uma placa de 96 poços, adicionando 1 mg mL⁻¹ de dicloridrato de dianisidina (Sigma®) e

$0,5 \times 10^{-4}\%$ de H_2O_2 , medindo a densidade óptica a 450 nm. A MPO de neutrófilos humanos (Sigma®) pode ser usado como padrão (Faixa: 0,5-0,015 U ml^{-1}). Uma unidade de atividade MPO é definida como a quantidade necessária para degradar 1,0 μmol de peróxido / min a 25 °C. O resultado será expresso como U/mg de proteína ou U g^{-1} de tecido (Chassaing et al., 2014).

10 Análise dos dados

Para análise estatística será utilizada a análise de variância (two-way ANOVA) com auxílio do Software GraphPad Prism 6 para Windows para comparação entre os diversos parâmetros avaliados no experimento. Considerando-se diferença significativa para ANOVA, será utilizado o Teste Tukey. Todos os testes serão realizados com significância estatística em nível de 5% ($p < 0,05$) (GraphPad Software, San Diego, USA).

11 Aspectos éticos

Serão usadas todas as estratégias que visam minimizar o número de animais usados no experimento. O tamanho do grupo foi planejado segundo o relato da literatura e cálculo amostral para cada um dos modelos e/ou ensaios.

Os ensaios experimentais serão escolhidos visando induzir o mínimo de desconforto possível. Em muitos casos a metodologia descrita na literatura é adaptada, abdicando-se de medidas que tragam mais danos aos animais e ou introduzindo alternativas que levem ao menor desconforto. Todos os procedimentos operacionais realizados estarão embasados no *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – ILAR/EUA e no Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA, 2004).

Os animais serão eutanasiados isoladamente dos demais para que não haja estresse. Em relação ao descarte do material biológico, o mesmo será acondicionado em sacos plásticos e colocado sob refrigeração, utilizando freezer destinado apenas para este fim. O descarte final do material será feito pelo Biotério Central da UFPEL.

12 Cronograma de atividades

		2020		2021		2022
Atividades		1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre
Fase I	Seleção do tema					
	Revisão de literatura					
	Elaboração do projeto de pesquisa					
	Qualificação					
Fase II	Execução dos procedimentos experimentais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>					
Fase III	Elaboração dos artigos					
	Defesa da Dissertação					

13 Orçamento

Descrição	Valor unitário	Subtotal
Material de consumo	R\$ 600,00	R\$ 600,00
Reagentes diversos	R\$ 2.000,00	R\$ 2.000,00
<i>Kits para análises diversas</i>	R\$ 400,00	R\$ 3.000,00
TOTAL		R\$ 5.600,00

Referências

AEBI, H. **Catalase *in vitro***. Methods in Enzymology, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALASALVAR, C.; GRIGOR, J.M.; ZHANG, D.L.; QUANTICK, P.C.; SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, fenólicos, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1410–1416, 2001.

ALI, A. A.; ABD AL HALEEM, E. N.; KHALEEL, S. A.-H.; SALLAM, A. S. Protective effect of cardamom against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 268–275, 2017.

ALOULO, A.; HAMDEN, K.; ELLOUMI, D.; BOU ALI, M.; HARGAFI, K.; JAOUADI, B.; AYADI, F.; ELFEKI, A.; EMNA AMMAR, E. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 63, p. 1-9, 2012.

AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. aY. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.

AMBALAM, P. et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119–131, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 06 out. 2019.

ASANO, T.; YUASA, K.; KUNUGITA, K.; TERAJI, T.; MITSUOKA, T. Effects of Gluconic Acid on Human Faecal Bacteria. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, p. 247-256, 1994.

ASHRAFI, A.; JOKAR, M.; MOHAMMADI NAFCH, A. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 444-454, 2018.

AXLING, U.; OLSSON, C.; XU, J.; FERNANDEZ, C.; LARSSON, S.; STRÖM, K.; AHRNE, S.; HOLM, C.; MOLIN, G.; BERGER, K. Green tea powder and Lactobacillus plantarum affect gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 9, p. 105-122, 2012.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K.; BHARGAV, V. K. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants, **Journal of Food and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2568-2575, 2014.

BARBALHO S.; BOSSO, H.; SALZEDAS-PESCININI, L.; GOULART, R. Green tea: A possibility in the therapeutic approach of inflammatory bowel diseases?: Green tea and

inflammatory bowel diseases. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 43, p. 148-153, 2019.

BARBOSA FILHO, V. M. et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280-288, 2014.

BATTIKH, H.; BAKHROUFA, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 71-77, 2012.

BATTIKH, H.; CHAIEB, K.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.

BELLASSOUED, K.; GHRAB, F.; MAKNI-AYADI, F.; VAN PELT, J.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, 2015.

BENGMARK, S.; URBINA, J. J. Simbióticos: una nueva estrategia en el tratamiento de pacientes críticos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 2, p. 147-156, 2005.

BHATTACHARYA, D.; BHATTACHARYA, S.; PATRA, M. M.; CHAKRAVORTY, S.; SARKAR, S.; CHAKRABORTY, W.; HEMANTA, K.; GACHHUI, R. Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 885–896, 2016.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328-340, 2013.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. **Pathophysiology**, v. 18, p. 221–234, 2011.

BHATTACHARYA, S.; MANNA, P.; GACHHUI, R.; SIL, P.C. Protective effect of kombucha tea against tertiary butylhydroperoxide-induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 7, p. 511-524, 2011.

BIANCO, A. L. A construção das alegações de saúde para alimentos funcionais. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 28, p. 113, 2008.

BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015.

BOLIGON, A. A. et al. Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. **Molecules**, v.17, p. 5757-5769, 2012.

BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 429-35, 1984.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CABRERA, C.; ARTACHO, R., GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.

CARDOSO, R.; NETO, R.; D'ALMEIDA, C.; PIMENTA DO NASCIMENTO, T.; PRESSETE, C.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H.; CAMERON, L.; FERREIRA, M.; BARROS, F. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food research international**, v. 128, p. 108782, 2020.

CASTRO, I. A. Desenvolvimento de alimentos funcionais. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8., 2003. Curitiba. Alimentos, tecnologia e cidadania. Curitiba, PR: SBCTA/PPGTA/UFPR/PUCPR, 2003. Disponível em: <<http://people.ufpr.br>> . Acesso em: 17 jul. 2019.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, n. 2, p. 63-72, 2016.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n. 1, p.61-84, 2005.

CHANDRA, N.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, S. Bacterial biofilms in human gastrointestinal tract: An intricate balance between health and inflammatory bowel diseases. **World Journal of Pharmacology**, v. 8, p. 26-40, 2019.

CHASSAING, B.; AITKEN, J. D.; MALLESHAPPA, M.; VIJAI-KUMAR, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **Currents Protocols in Immunology**, 2014.

CHEN, L.; ZOU, Y.; PENG, J.; LU, F.; YIN, Y.; LI, F.; YANG, J. *Lactobacillus acidophilus* Suppresses Colitis-Associated Activation of the IL-23/Th17 Axis. **Journal of Immunology Research**, 2015.

COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. 2004. [Acesso 2017 dez 29]. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M. W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n.4, p. 463-466, 2014.

CROHN'S & COLITIS. THE FACTS ABOUT. **Inflammatory Bowel Diseases**. 2014. Disponível: <<https://www.crohnscolitisfoundation.org/sites/default/files/201902/Updated%20IBD%20Factbook.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2019.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **The British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p. 145-151, 2002.

CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M.; Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

DAMIANI, C. R. **Estresse oxidativo e metabolismo em modelo animal de colite induzida por dextran sulfato de sódio**. 2006. 77p. Dissertação - Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 25 de maio de 2006.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, n.11, p. 396-407, 1997.

DEL CARMEN, S. et al. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 122-129, 2017.

DEROCHE, T. C.; XIAO, S.; LIU, X. Histological evaluation in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 2, n. 3, p. 178-192, 2014.

DIMIDI, E.; COX, S.R.; ROSSI, M.; WHELAN, K. Fermented foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 1806, p. 1-26, 2019. Doi: 10.3390/nu11081806.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T.; DAGNON, S.; GÜREL, A.L.; AKTAS, L. Stress-protective role of secondary metabolites: Diversity of function and mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**, v. 34, n. 1-2, p. 67-78, 2008.

EICHELE, D. D.; KHARBANDA, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 33, p. 6016-6029, 2017.

EL-ABHAR, H. S.; HAMMAD, L.; GAWAD, H. S. A. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 367-72, 2008.

ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; JAMAI, L.; TAHRI-JOUTI, M. A.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI M. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 2, p. 215-219, 2003.

FERRARI, C. Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. **Maturitas**, v. 58, p. 327-339, 2007.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **The British**

Journal of Nutrition, v. 88, Suppl 1, p. S39-49, 2002.

FORSYTH, C. B.; FARHADI, A.; JAKATE, S. M.; TANG, Y.; SHAIKH, M.; KESHAVARZIAN, A. Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol- induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. **Alcohol**, v. 43, n. 2, p. 163–172, 2009.

FU, C.; YAN, F.; CAO, Z.; XIE, F.; LIN, J. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Science Technology**, v. 34, n. 1, p. 123-126, 2014.

GANJI-ARJENAKI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. **Journal of cellular physiology**, v. 233, p. 2091–2103, 2018.

GHOURI, Y. A.; RICHARDS, D. M.; RAHIMI, E. F.; KRILL, J. T.; JELINEK, K. A.; DUPONT, A. W. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 7, p. 473-487, 2014.

GIL-MARTÍNEZ, A. L.; ESTRADA, C.; CUENCA, L.; CANO, J. A.; VALIENTE, M.; MARTÍNEZ-CÁCERES, C. M.; FERNÁNDEZ-VILLALBA, E.; HERRERO, M. T. Local Gastrointestinal Injury Exacerbates Inflammation and Dopaminergic Cell Death in Parkinsonian Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 4, p. 418-930, 2019.

GIORGETTI, G.; BRANDIMARTE, G.; FABIOCCHI, F.; RICCI, S.; FLAMINI, P.; SANDRI, G.; TROTTA, M. C.; ELISEI, W.; PENNA, A.; LECCA, P. G.; PICCHIO, M.; TURSI, A. Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. **Journal of Immunology Research**, p. 501361, 2015.

GREENWALT, C. J.; LEDFORD, R. A.; STEINKRAUS, K. H. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 31, n. 3, p. 291-296, 1998.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; R. A.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 976-981, 2000.

GRY, J.; BLACK, L.; ERIKSEN, F.; PILEGAARD, K.; PLUMB, J.; RHODES, M. EuroFIR-BASIS a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 434-444, 2007.

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, 2617–2627, 2015.

GULLÓN, B; GULLÓN, P; TAVARIA, F; PINTADO, M; GOMES, A. M; ALONSO, J. L; PARAJO, J. C. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined

arabinoxyloligosaccharides from wheat bran. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 438-449, 2014.

ISHIHARA, N.; CHU, D.-C.; AKACHI, S.; JUNEJA, L. Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. **Livestock Production Science**, v. 68, p. 217–229, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J., 2007. **Free radicals in biology and medicine**. 4th Edition, Oxford University Press: New York.

HANCOCK, L., BECKLY, J., GEREMIA, A., COONEY, R., et al. Clinical and molecular characteristics of isolated colonic Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1667–1677, 2008.

HEAD, K. A.; JURENKA, J. S. Inflammatory bowel disease part I: ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 247–83, 2003.

HERING, N. A.; M. FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 5, p. 1035-44, 2012.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p.109-116, 2002.

HUR, S. J.; KANG, S. H.; JUNG, H. S.; KIM, S. C.; JEON, H. S.; KIM, I. H.; LEE, J. D. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research**, v. 32, n. 11, p. 801-816, 2012.

JACQUES, A.C.; ZAMBIAZI, R.C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 245-260, 2011.

JAKUBCZYK, K.; KALDUŃSKA, J.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. **Antioxidants**, v. 9, p. 447-461, 2020.

JARREL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Mycologist**, v. 14, n. 4, p. 166-170, 2000.

JAYABALAN, R., MALBASA, R.V., LONCAR, E.S., VITAS, J.S., & SATHISHKUMAR, M. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014.

JAYABALAN, R.; MALINI, K.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K.; YUN, S. E. Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 843–847, 2010.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008.

JIN, J.; TOUYAMA, M.; HISADA, T.; BENNO, Y. Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to Bifidobacterium species. **Microbiology and Immunology**, v. 56, p. 729-739, 2012.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**, v. 3, p. 185-190, 1997.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

KAUFMANN, K. **Kombucha Rediscovered**. Revised Edition. Books Alive. 2013. 120p.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1-9, 2002.

KEMPERMAN, R. A.; BOLCA, S.; ROGER, L. C.; VAUGHAN, E. E. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. **Microbiology**, v. 156, p. 3224-3231, 2010.

KIM, H. S.; JEONG, S. G.; HAM, J. S.; CHAE, H. S.; LEE, J. M.; AHN, C. N. Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v.19, n. 9, p. 1335-1341, 2006.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Experimental Animals**, v. 48, n. 3, p. 137-143, 1999.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329- 347, 2008.

KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds, **Food Research International**, v. 43, p. 167-176, 2010.

KOPYLOV, U.; KLANG, E.; YABLECOVITCH, D., et al. Magnetic resonance enterography versus capsule endoscopy activity indices for quantification of small bowel inflammation in Crohn's disease. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 9, n. 5, p. 655-663, 2016.

KORNBLUTH, A. e SACHAR, D. B. Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 3, p. 501-523, 2010.

KUMAR V, A. A. K; FAUSTO N.; MITCHELL, R. N. **Patología Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier. 8ª Ed. p. 728, 2008.

KUMAR, M.; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; MOHANIA, D.; BEHARE, P.; VERMA, V.; KUMAR, P.; PODDAR, D.; AGGARWAL, P. K.; HENRY, C. J.; JAIN, S.; YADAV, H. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. **International Journal Food Science Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 473-496, 2010.

LARNER, D. P.; JENKINSON, C.; CHUN, R. F.; WESTGATE, C. S. J.; ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Free versus total serum 25-hydroxyvitamin D in a murine model of colitis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 189, p. 204-209, 2019.

LAROUI, H.; INGERSOLL, S. A.; LIU, H. C. et al. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-12, 2012.

LARUSSA, T.; IMENEO, M.; LUZZA, F. Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 14, p. 2483-2492, 2017.

LEAL, J.; SYÁREZ, L.; JAYABALAN, R.; OROS, J.; ESCALANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

LEE, H.; JENNER, A.; LOW, C.; LEE, Y. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, v. 157, p. 876–884, 2006.

LEMBERG, D. A.; DAY, A. S. Crohn disease and colitis in children: An update for 2014. **Journal of Paediatrics Child Health**, v. 51, n. 3, p. 266–270, 2015.

LIU, J.; HUANG, S. S.; ZHAO, Z. Research on antioxidative capacity of lactic acid bacteria. **China Dairy Industry**, v. 38, n. 5, p. 38-41, 2010.

LIU, Y.; WANG, X.; CHEN, Q.; LUO, L.; MA, M.; XIAO, B.; ZENG, L. *Camellia sinensis* and *Litsea coreana* Ameliorate Intestinal Inflammation and Modulate Gut Microbiota in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64 (6), p. 17-27, 2020.

LIU, Z.; BRUINS, M.; NI, L.; VINCKEN, JP. Green and Black Tea Phenolics: Bioavailability, Transformation by Colonic Microbiota, and Modulation of Colonic Microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8469-8477, 2018.

LIU, Z.; CHEN, Z.; GUO, H.; HE, D.; ZHAO, H.; WANG, Z.; ZHANG, W.; LIAO, L.; ZHANG, C.; NI, L. The modulatory effect of infusions of green tea, oolong tea, and black tea on gut microbiota in high-fat-induced obese mice. **Food & Functional**, v. 7, p. 4869–4879, 2016.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LUCAS-ABELLÁN, C.; M.T. MERCADER-ROS, M. T.; ZAFRILLA, M. P.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1255-1260, 2011.

LUK, HY.; APPELL, C.; CHRYU, MC.; CHEN, CH.; WANG, CY.; YANG, RS.; SHEN, CL. Impacts of Green Tea on Joint and Skeletal Muscle Health: Prospects of Translational Nutrition. **Antioxidants**, v. 9, p. 1050-1078, 2020.

MAHMOUDI, E.; YAZDKHASTI, M.; GHARANFOLI, A. Filtered Kombucha Tea Rings the Bell for TLR2, TLR4, MYD88, and Dectin-1 in Mice Model of Colitis. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 7, p. 1-4, 2020.

MALBAŠA, R. V.; LONCAR, E. S.; VITAS, J. S.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727-1731, 2011.

MARCHIONI BEERY, R.; KANE, S. Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 9, n. 7, p. 111-132, 2014.

MARSH, A. J.; O' SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014.

MAZZON, E.; MUIÀ, C.; PAOLA, R.D.; GENOVESE, T.; MENEGAZZI. M.; DE SARRO, A.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. **Free Radical Research**, v. 39, p. 1017-25, 2005.

MISHRA, V.; SHAH, C., MOKASHE, N., CHAVAN, R., YADAV, H., PRAJAPATI, J. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 3615-3626, 2015.

MONAGAS, M.; URPI-SARDA, M.; SÁNCHEZ-PATÁ, F.; LLORACH, R.; GARRIDO, I.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ANDRES-LACUEVA, C.; BARTOLOMÉ, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food & Function**, v. 1, p. 233–253, 2010.

MOORE, R.; JACKSON, K; MINIHANE, A. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1790-1802, 2009.

MORAES, F.; COLLA, L. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical. **Trends**

in **Food Science & Technology**, v. 105, p. 323-333, 2020.

MOROTI, C.; MAGRI, L.; COSTA, M.; CAVALLINI, D., SIVIERI, K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. **Lipids in Health and Disease**, p. 1-8, 2012.

MORRISON, G.; HEADON, B.; GIBSON, P. Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**, v. 38, n. 12, p. 956-961, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOWAT, C., COLE, A., WINDSOR, A., et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 60, n. 5, p. 571-607, 2011.

MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1698–1702, 2000.

NARDONE, G.; COMPARE, D.; LIGUORI, E.; DI MAURO, V.; ROCCO, A.; BARONE, M.; NAPOLI, A.; LAPI, D.; IOVENE, M. R.; COLANTUONI, A. Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v.299, n. 3, p. G669–G676, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for care and use of laboratory animals**. 8^a ed.. Washington: The National Academies Press, 2011.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014.

NUMMER, B. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: risk analysis and processing guidance. **Journal of environmental health**, v. 76, p. 8-11, 2013.

OSTANIN, D. V.; BAO, J.; KOBOZIEV, I.; GRAY, L.; ROBINSON-JACKSON, S. A.; KOSLOSKI-DAVIDSON, M.; PRICE, V. H.; GRISHAM, M. B. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. **American Journal of Physiology**, v. 296, n. 2, p. 135-146, 2009.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122 – 3128, 2002.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PAKRAVAN, N.; KERMANIAN, F.; MAHMOUDI, E. Filtered Kombucha tea ameliorates the leaky gut syndrome in young and old mice model of colitis. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 22, p. 1158–1165, 2019.

PATIL, B.; JAYAPRAKASHA, G.; MURTHY, K.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8142-8160, 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERŠE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedicals Science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RANDHAWA, P. K.; SINGH, K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean Journal of Physiology Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279-88, 2014.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

RODRÍGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Alimentos funcionales y nutrición óptima. **Revista da Espanha de Salud Pública**, v. 77, p. 317-31, 2003.

SAAVEDRA, J. M. Clinical applications of probiotic agents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 3, p. 1147S–1151S, 2001.

SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C. Amentoflavone inhibits inos, cox-2 expression and modulates cytokine profile, nf- κ b signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 907-916, 2013.

SALAFZON, S.; HOSSEINI, H. M.; HALABIAN, R. Evaluation of the antioxidant impact of ginger-based kombucha on the murine breast cancer model. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 15, n. 1, 2017.

SANDBORN, W. J. Crohn's disease evaluation and treatment: clinical decision tool. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 702-705, 2014.

SANEI, M. H.; HADIZADEH, F.; ADIBI, P.; ALAVI, S. A. Inflammatory cells' role in acetic acid-induced colitis. **Advanced biomedical research**, v. 3, 193, 2014.

SANTOS, M. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. 2016. 119p. Dissertação - Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

SARI, A. Phenolic compounds from *Scorzonera latifolia* (Fisch & Mey) DC. **Natural Product Research**, v. 26, n. 1, p. 50–55, 2012.

SHADNOUSH, M.; HOSSEINI, R. S.; KHALILNEZHAD, A.; NAVAI, L.; GOUDARZI, H.; VAEZJALALI, M. Effects of Probiotics on Gut Microbiota in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial. **The Korean Journal of Gastroenterology**, v. 65, n. 4, p. 215-21, 2015.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 376-387, 2009.

SHARANGI, A. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**, v. 42, p. 529-535, 2009.

SHOUVAL, D. S.; RUFO, P. A. The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 10, p. 999-1005, 2017.

SILVA, M. A.; JURY, M.; PORRAS, M.; VERGARA, P.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial barrier dysfunction and dendritic cell redistribution during early stages of inflammation in the rat: role for TLR-2 and -4 blockage. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 5, p. 632-44, 2008.

SOUGIOULTZIS, S.; SIMEONIDIS, S.; BHASKAR, K. R.; CHEN, X.; ANTON, P. M.; KEATES, S.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C. P. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n.1, p. 69-76, 2006.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589-2594, 2000.

SRIHARI, T.; SATYANARAYANA, U. Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1978-1981, 2012.

SHINDE, T.; PERERA, A.; VEMURI, R.; GONDALIA, S.; KARPE, A.; BEALE, D.; SHASTRI, S.; SOUTHAM, B.; ERI, R.; STANLEY, R. Synbiotic Supplementation Containing Whole Plant Sugar Cane Fibre and Probiotic Spores Potentiates Protective Synergistic Effects in Mouse Model of IBD. **Nutrients**, v. 11, p. 818-842, 2019.

STEED, H.; MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Prebiotics, symbiotics and inflammatory bowel disease. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 52, n. 8, p. 898 – 905, 2008.

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos –

Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

SWAIN, T. AND HILLIS, W.E. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*. I.—The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TOPAL, F.; YONEM, O.; TUZCU, N.; TUZCU, M.; ATASEVEN, H.; AKYOL, M. (2014). Strontium Chloride: Can It Be a New Treatment Option for Ulcerative Colitis? **BioMed Research International**, p. 1–5, 2014.

TUOHY, K. M.; CONTERNO, L.; GASPEROTTI, M.; VIOLA, R. Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8776–8782, 2012.

TZOUNIS, X.; VULEVIC, J.; KUHNLE, G.; GEORGE, T.; LEONCZAK, J.; GIBSON, G.; KWIK-URIBE, C.; SPENCER, J. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 782–792, 2008.

UNNO, T.; SAKUMA, M.; MITSUHASHI, S. Effect of dietary supplementation of (–)-epigallocatechin gallate on gut microbiota and biomarkers of colonic fermentation in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 60, p. 213-219, 2014.

VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, P.B.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; PINHO, P.G.; FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chem**, v. 129, p. 454-462, 2011.

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

WANG, J.; TANG, L.; ZHOU, H.; ZHOU, J.; GLENN, T.; SHEN, C.-L.; WANG, J.-S. Long-Term Treatment with Green Tea Polyphenols Modifies the Gut Microbiome of Female Sprague-Dawley Rats. **J. Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 55–64, 2018.

WANG, L.; ZENG, B.; ZHANG, X.; LIAO, Z.; GU, L.; LIU, Z.; ZHONG, Q.; WEI, H.; FANG, X. The effect of green tea polyphenols on gut microbial diversity and fat deposition in C57BL/6J HFA mice. **Food & Function**, v. 7, p. 4956–4966, 2016.

WANG, Y.; JI, B.; WU, W.; WANG, R.; YANG, Z.; ZHANG, D.; TIAN, W. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 265-272, 2013.

WANG, Y.; WU, Y.; WANG, Y.; XU, H.; MEI, X.; YU, D.; WANG, Y.; LI, W. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. **Nutrients**, v. 9, p. 521-536, 2017.

WATAWANA, M.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C.; WAISUNDARA, V. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 1, p. 1–11, 2015.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-33, 1981.

WIRTZ, S.; NEURATH, M. F. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1073-1083, 2007.

WIRTZ, S.; POPP, V.; KINDERMANN, M.; GERLACH, K.; WEIGMANN, B.; FICHTNER-FEIGL, S.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1295–1309, 2017.

XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, p. 427-434, 2007.

ZHANG, X.; ZHU, X.; SUN, Y.; HU, B.; SUN, Y.; JABBAR, S.; ZENG, X. Fermentation in vitro of EGCG, GCG and EGCG3"Me isolated from Oolong tea by human intestinal microbiota. **Food Research International**, v. 54, p. 1589–1595, 2013.

NOTA DE ESCLARECIMENTO

Alguns dos testes propostos inicialmente no Projeto de Pesquisa, não puderam ser realizados em tempo hábil para a Defesa, devido aos atrasos na entrega dos animais e de reagentes químicos a serem utilizados nesta pesquisa, em decorrência da pandemia de Covid-19. Ressalta-se que algumas das análises ainda estão em andamento, como identificação de compostos bioativos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), análise do poder antioxidante redutor do íon ferro III (FRAP), análise de citotoxicidade (MTT), mieloperoxidase colônica (MPO), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressão gênica de citocinas inflamatórias. Entretanto, as análises mencionadas serão realizadas e inclusas nos artigos oriundos desta Dissertação, para conseguinte publicação.

ARTIGOS CIENTÍFICOS
(In vitro e In vivo)

ARTIGO 1: *In vitro***Caracterização do Chá Verde e da Kombucha: composição fenólica, capacidade antioxidante e inibição enzimática**

Jordan Teixeira Oliveira; Fernanda Machado da Costa; Taiciane Gonçalves; Elisa dos Santos Pereira; Paola Quevedo da Costa; Paulo Cavalheiro Schenkel; Simone Pieniz

RESUMO

O chá verde é uma bebida preparada a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis*, apresentando alta concentração de compostos fenólicos e bioativos. Já a kombucha, é uma bebida obtida por meio da fermentação do chá com uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). Além dos compostos fenólicos presentes no chá, a kombucha também apresenta alta concentração de ácidos orgânicos, que conferem a bebida sabor e propriedades característicos. O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização físico-química, antioxidante e enzimática do chá verde e da kombucha. Para isso, realizou-se análises de pH, acidez, teor de sólidos, determinação de compostos fenólicos, potencial antioxidante por meio dos métodos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e pela reação as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e ação enzimática (alfa-glicosidase). Como resultados, observou-se que a kombucha apresentou menor pH, maior teor de acidez e de sólidos comparada ao chá verde. Quanto a concentração de compostos fenólicos totais pelo método Folin Ciocalteu, não houve diferença significativa entre as bebidas ($p>0,05$). Na análise antioxidante pelo ensaio de DPPH, observou-se que tanto o chá verde quanto a kombucha apresentaram capacidade antioxidante significativa em remover o radical DPPH, quando comparados ao controle; porém, quando analisada a inibição da peroxidação lipídica por meio do método de TBARS, observou-se que o chá verde apresentou capacidade antioxidante, já a kombucha exibiu capacidade pró-oxidante por este método. Ambas as bebidas apresentaram atividade inibitória significativa da enzima α -glicosidase, entretanto, o chá verde apresentou maior percentual de inibição. Pode-se concluir que ambos, chá verde e kombucha, são bebidas ricas em compostos fenólicos, as quais apresentam alta capacidade antioxidante e potencial de inibição da enzima digestiva α -glicosidase, conferindo possível potencial terapêutico frente a processos oxidativos.

Palavras chave: polifenóis; *Camellia sinensis*; chá fermentado; glicosidase.

ABSTRACT

Green tea is a beverage prepared from the leaves and buds of *Camellia sinensis*, with a high concentration of phenolic and bioactive compounds. Kombucha, on the other hand, is a beverage produced by tea fermentation with a symbiotic colony of bacteria and yeasts (SCOBY). In addition to the phenolic compounds present in the tea, kombucha also has a high concentration of organic acids, which gives the drink its characteristic flavor and properties. The present study aimed to carry out the physical-chemical, antioxidant and enzymatic characterization of green tea and kombucha. For this, analyzes of pH, acidity, total solids content, determination of phenolic compounds, antioxidant potential by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) method and by the reaction of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), and enzymatic action (α -glucosidase). As a result, it was observed that kombucha had lower pH, higher acidity and solids content compared to green tea. As for the concentration of total phenolic compounds by the Folin Ciocalteu method, there was no significant difference between the beverages ($p>0.05$). In the antioxidant analysis by the DPPH and TBARS assay, it was observed that both green tea and kombucha showed significant antioxidant capacity in removing the DPPH radical, when compared to the control; however, when analyzing the inhibition of lipid peroxidation through the TBARS method, it was observed that green tea showed antioxidant capacity, whereas kombucha showed pro-oxidant capacity by this method. Both beverages showed significant inhibitory activity of the α -glucosidase enzyme, however, green tea showed a higher percentage of inhibition. It can be concluded that both green tea and kombucha are beverages very rich in phenolic compounds, which have a high antioxidant capacity and a potential to inhibit the digestive enzyme α -glucosidase, providing possible therapeutic potential against oxidative processes.

Key words: polyphenols; *Camellia sinensis*; fermented tea; glucosidase.

1 INTRODUÇÃO

O chá verde é uma bebida de origem chinesa preparada a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis*, planta que também dá origem ao chá preto, e possui alta concentração de compostos fenólicos (Sharangi, 2009; Liu et al., 2020). Estes compostos fenólicos, ou polifenóis, são os metabólitos secundários mais encontrados nas plantas, sendo originados ao longo do seu processo metabólico, e subdividem-se em diversas classes de compostos, como flavonóides simples, ácidos fenólicos, flavonóides complexos e antocianinas, que exercem alto potencial antioxidante, combatendo o estresse oxidativo (Babbar et al., 2014). Cerca de 70% dos polifenóis presentes no chá verde são catequinas (no chá preto essa concentração é de cerca de 30%), sendo a mais abundante a epigallocatequina galato (EGCG), responsável por 32% do seu poder antioxidante e pela maioria de seus benefícios, sendo que em 200 mL de chá verde contém cerca de 20-200 mg de EGCG. O chá também é rico em catequinas como a epicatequina, epicatequina galato, galocatequina e epigallocatequina, além de compostos como o ácido cafeico, cafeína, ácido cumárico, ácido gálico, kampeferol, miricetina, rutina, quercetina e ácido quínico (Moore et al., 2009; Luk et al., 2020), que conferem a este muitos benefícios, como elevado potencial antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano, antiviral, efeito protetor nas doenças intestinais, cardiovasculares, cognitivas, respiratórias, periodontais, câncer, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, densidade óssea, além de efeito protetor contra cáries dentárias, raios ultravioleta, litíase renal, entre outras enfermidades (Cabrera et al., 2006; Barbalho et al., 2019).

Já a kombucha, é uma bebida obtida por meio da fermentação do chá verde ou chá preto, utilizando bactérias e leveduras como inóculo, conhecido como fungo do chá ou SCOBY (Colônia Simbiótica de Bactérias e Leveduras) e açúcar, que serve como substrato para a fermentação microbiana (Al-Mohammadi et al., 2021). A bebida é composta de duas fases: um biofilme flutuante e uma fase líquida, levemente ácida. Além da água utilizada no preparo do chá, os principais componentes do líquido (e do biofilme, devido à sua grande capacidade de absorção de água) são o ácido glucônico, ácido glicurônico, ácido acético e etanol (Kaewkod et al., 2019; Antolak et al., 2021). Sob condições aeróbicas, a combinação de chá, açúcar e SCOBY são transformadas no período de 7 a 10 dias em uma bebida ácida (pH abaixo de 4), moderadamente gaseificada e refrescante, a qual possui diversos compostos benéficos à saúde (Malbaša et al., 2011). Jayabalan et al. (2008); Kaewkod et al. (2019) e Jakubczyk et al. (2020) verificaram a presença de ácido acético, ácido málico, ácido

ascórbico, ácido tartárico, ácido glicurônico, ácido glucônico, ácido D-sacárico-1,4-lactona, ácido cítrico, vitaminas, minerais, aminoácidos, enzimas hidrolíticas e etanol, que são produzidos ao longo do processo de fermentação, além do potencial aumento do conteúdo de compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante.

A alta concentração de compostos fenólicos do chá verde e da kombucha conferem as bebidas alto potencial antioxidante, participando da neutralização dos radicais livres em nosso organismo, que em excesso geram um fenômeno chamado estresse oxidativo, causando potencial dano as estruturas celulares, além de ter um papel importante no desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, como câncer, artrite, doenças autoimunes, cardiovasculares e neurodegenerativas (Pham-Huy et al., 2008). Os compostos bioativos presentes nestas bebidas também apresentam potencial inibitório de algumas enzimas, como a α -amilase e α -glicosidase, que participam da digestão de carboidratos, proporcionando potencial benefício para indivíduos com diabetes (Gao et al., 2013; Permatasari et al., 2021). Entretanto, o método de preparo e a origem das matérias primas podem exercer grande influência quanto aos compostos fenólicos presentes nas bebidas, assim como em seu potencial antioxidante e bioativo (Chu & Chen, 2005; Malbaša et al., 2011; Watawana et al., 2015). A kombucha passa por um alto potencial de contaminação durante seu processo de fermentação, portanto, medidas devem ser tomadas para prevenir a contaminação cruzada e o crescimento de organismos patogênicos, que oferecem potenciais riscos à saúde dos consumidores. Os utensílios precisam estar limpos e sanitizados, o pH precisa estar abaixo de 4,2, o SCOBY precisa ser obtido comercialmente sem uso prévio, a água utilizada para o preparo do chá precisa estar $\geq 165^{\circ}\text{F}$, e qualquer sinal de contaminação por fungos, a kombucha deve ser totalmente descartada (Nummer, 2013).

Estudos que comparam a composição bioativa e a capacidade antioxidante entre chá verde e kombucha preparada a partir de chá verde são escassos, além de apresentarem resultados conflitantes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar a caracterização físico-química, antioxidante e enzimática do chá verde e da kombucha.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do chá verde

As folhas de chá verde foram adquiridas comercialmente da marca Yamamotoyama® (China). Todos os recipientes utilizados no preparo foram previamente esterilizados a 121°C por 15 min. O chá foi preparado utilizando 1 L de água e 10 g L^{-1} de

folhas secas, as quais permaneceram em infusão por 7 min em água a 85 °C, e então, coadas em filtro de náilon. O chá foi preparado no momento de uso, tanto para as análises quanto para o preparo da kombucha (Komes et al., 2010).

2.2 Preparo da kombucha

A kombucha foi adquirida comercialmente da marca Viva Mais®, acondicionada em embalagens plásticas lacradas. Todos os recipientes utilizados no preparo foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. O SCOBY, da mesma marca, foi inoculado com seu líquido de partida (100 mL) em chá verde previamente preparado, conforme descrito no item anterior, e adicionado sacarose (60 g L⁻¹). O recipiente foi recoberto com tecido poroso para evitar contaminação, e deixado em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante 7 dias (Kallel et al., 2012; Chakravorty et al., 2016). Após decorrido os 7 dias, a fermentação foi interrompida, e a kombucha foi envazada em embalagens estéreis e mantidas sob refrigeração a 5 °C. As amostras foram coletadas para formação do *pool* que foi utilizado nas análises do presente estudo. O SCOBY foi coletado e armazenado em 300 mL de chá verde e 100 mL de kombucha em recipiente fechado a 5 °C, para futuras análises (Kallel et al., 2012).

2.3 Determinação do pH do chá verde e da kombucha

A determinação do valor do pH foi realizada em pHmetro digital QUIMIS e em tiras de teste de pH. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Determinação de acidez do chá verde e da kombucha

A partir de uma solução alcalina de concentração conhecida, foi realizada uma titulometria para determinar a acidez do produto, utilizando-se NaOH 0,1 N e fenoftaleína como indicador de viragem. Os resultados foram expressos em percentual de ácido láctico presente na amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Teor de sólidos totais (°Brix)

O teor de sólidos totais do chá verde e da kombucha foram medidos pelo refratômetro digital (ATAGO), e os resultados foram expressos em % de sólidos solúveis. As análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Caracterização fitoquímica da kombucha e do chá verde

As análises de caracterização química da kombucha e do chá verde foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

2.6.1 Quantificação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada por meio de técnica espectrométrica, adaptada de Swain e Hillis (1959). Foram homogeneizadas 0,5 mL de kombucha e de chá verde e adicionados 20 mL de metanol (Synth®). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 min. Foram coletados 250 µL do sobrenadante e adicionados às amostras 4 mL de água destilada e 250 µL de Folin-Ciocalteu (Merck®) (1:1). Os tubos foram agitados e após 5 min foram adicionados 0,5 mL de Na₂CO₃ (Sigma®) (7%). Após 2 h, a absorbância foi medida a 725 nm. As quantidades de fenóis totais nas amostras foram quantificadas por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico entre as concentrações de 10 a 100 µg mL⁻¹. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em triplicata e os resultados expressos em µg de ácido gálico por mL de amostra (µg mL⁻¹).

2.7 Capacidade antioxidante da kombucha e do chá verde

2.7.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A avaliação da atividade biológica dos compostos bioativos foi realizada por meio da identificação das propriedades antioxidantes, com a utilização de métodos espectrofotométricos de avaliação da capacidade de captar radicais livres e do seu poder redutor. O método DPPH utilizado foi o descrito por Brand-Williams et al. (1995), baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH (Sigma®) foi utilizado na concentração de 0,06 mM, dissolvido em álcool metílico (Synth®). A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de amostra para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (item solução de DPPH 0,06 mM) e homogeneizada. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em ambiente escuro por 45 min. Foi utilizado 0,1 mL de uma solução controle (solução controle de álcool metílico 50% (40 mL), acetona 70% (Merck®) (40 mL) e água (20 mL) com 3,9 mL do radical DPPH, para então

ser homogeneizado e armazenado no escuro por 45 min. Foi utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. A curva padrão foi realizada a partir da solução inicial de DPPH (60 μM), variando a concentração de 10 μM a 50 μM . Cada uma destas soluções de DPPH (10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM e 60 μM) foi armazenada em ambiente escuro por 45 min, sendo então transferidas para cubetas de vidro, onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados foram expressos em EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$). O experimento foi realizado em triplicata com três repetições independentes.

2.7.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada de acordo com a metodologia de Ohkawa et al. (1979). Primeiramente foi incubado em banho maria a 80 °C, tubos de ensaio contendo água Mili Q, Azeite de Oliva Extra Virgem submetidos à oxidação por 100 μM de sulfato ferroso, por 10 min. Posteriormente, foi adicionado em cada tubo a amostra de chá verde ou kombucha, Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%, Tampão de Ácido Acético pH 3,44 e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. Em seguida, incubado novamente em banho maria a 100 °C por 1 hora. Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532 nm, em espectrofotômetro. A concentração de TBARS foi calculada por meio de uma curva padrão, concentrações conhecidas de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano, e os resultados foram expressos em nm de Malonaldeído (MDA)/mL de amostra. A curva padrão é composta por concentrações de água destilada, MDA 0,03 mM, SDS 8,1%, Tampão de ácido acético pH 3,44 e TBA 0,6% e incubados em banho maria à 100 °C, por 1 h. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições independentes.

2.8 Avaliação da capacidade de inibição enzimática do chá verde e da kombucha

2.8.1 Ensaio de inibição da alfa-glicosidase

Foi avaliado utilizando o procedimento descrito por Vinholes et al. (2011). Foram adicionados 10 μL de chá verde ou kombucha em 50 μL de substrato nitrophenyl α -D-glucopiranosidase (3,25 mM) em tampão fosfato (pH 7,0). A reação foi iniciada pela adição de 50 μL da enzima (9,37 U/mL de tampão de fosfato, pH 7,0), e posteriormente foram incubados a 37 °C durante 10 min. Foi realizada leitura em espectrofotômetro após a adição

de 15 µL de HCl para parada da reação, em uma absorbância de 405 nm. Os resultados foram expressos em percentual de inibição, seguindo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \text{Abs controle} - \text{Abs amostra} / \text{Abs controle} \times 100$$

As análises foram realizadas em triplicata.

2.9 Análise dos dados

Para análise estatística, foi utilizada a análise de variância (two-way ANOVA), com auxílio do Software GraphPad Prism 6 para Windows para comparação entre os diversos parâmetros avaliados no experimento. Considerando-se diferença significativa para ANOVA, utilizou-se o Teste Tukey. Todos os testes foram realizados com significância estatística em nível de 5% ($p < 0,05$) (GraphPad Software, San Diego, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A kombucha é obtida pela ação dos micro-organismos presentes na membrana celulósica (SCOBY) utilizada para a elaboração da mesma, resultando na alteração da composição e da concentração dos constituintes do chá. Ensaios físico-químicos, bioativos, antioxidantes e enzimáticos foram realizados no presente estudo com a finalidade de caracterizar o chá verde e a kombucha utilizada. Para todas as análises utilizou-se amostras de chá verde frescas, preparadas no momento de uso, e de kombucha produzida com chá verde fermentado por 7 dias.

3.1 pH, acidez e teor de sólidos do chá verde e da kombucha

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, verificou-se que o pH da kombucha apresentou redução significativa ($p < 0,05$) durante os 7 dias de fermentação, quando comparada ao chá verde não fermentado. Quanto a acidez, os resultados foram expressos em percentual (v/m) de ácido láctico presente nas amostras, e observou-se que chá verde e a kombucha exibiram concentração de 0,35% e 0,59% de ácido láctico, respectivamente, demonstrando diferença significativa entre ambas as amostras ($p < 0,05$). Da mesma forma, na análise de sólidos solúveis totais (°Brix), que quantifica os carboidratos e ácidos orgânicos presentes na amostra, observou-se diferença significativa entre ambas amostras ($p < 0,05$), as quais apresentaram concentrações de 0,6% e 9,5%, no chá verde e na kombucha, respectivamente.

Tabela 1 – Níveis de pH, acidez titulável (% de ácido láctico), e teor (%) de sólidos solúveis totais (°Brix), no chá verde e na kombucha fermentada por 7 dias.

	pH	Acidez (% ácido láctico)	Teor de sólidos (%)
Chá Verde	*5,65 ± 0,048 ^a	0,35 ± 0,000 ^b	0,6% ± 0,000 ^b
Kombucha	2,15 ± 0,031 ^b	0,59 ± 0,014 ^a	9,5% ± 0,191 ^a

*Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=3). ^{a-b}Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (p < 0,05).

A queda do pH e o aumento no percentual de acidez ao longo do processo de fermentação da kombucha é algo amplamente estabelecido na literatura (Chakravorty et al., 2016; Jakubczuk et al., 2020). O teor de pH, de acidez e de sólidos encontrados na kombucha foram similares aos encontrados por Kaewkof et al. (2019), aos 7 dias de fermentação. Devido à grande diversidade de leveduras e bactérias (principalmente bactérias ácido lácticas e bactérias ácido acéticas) presentes no SCOBY, ocorrem diversas modificações físico-químicas e biológicas na kombucha ao longo do processo de fermentação. As leveduras hidrolisam a sacarose adicionada à kombucha por meio das enzimas invertases, liberando glicose e frutose, que então servem de substrato para a produção de etanol, via glicólise. Já as bactérias ácido acéticas utilizam o etanol para a produção de ácido acético, e para a síntese das redes de fibrila do SCOBY, ao mesmo tempo que convertem glicose em ácido glucônico e ácido glicurônico (Morales, 2020; Al-Mohammadi et al., 2021). A formação de diversos ácidos orgânicos durante o processo de fermentação são os responsáveis pela redução dos níveis de pH e pelo aumento do teor de acidez observados na bebida (Jakubczuk et al., 2020).

3.2 Compostos fenólicos totais do chá verde e da kombucha

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu. O chá verde apresentou concentração total de compostos fenólicos de 0,569 µg mL⁻¹ de ácido gálico; já a kombucha apresentou concentração total de 0,535 µg mL⁻¹ de ácido gálico (Figura 1), não havendo diferença significativa entre as amostras (p > 0,05).

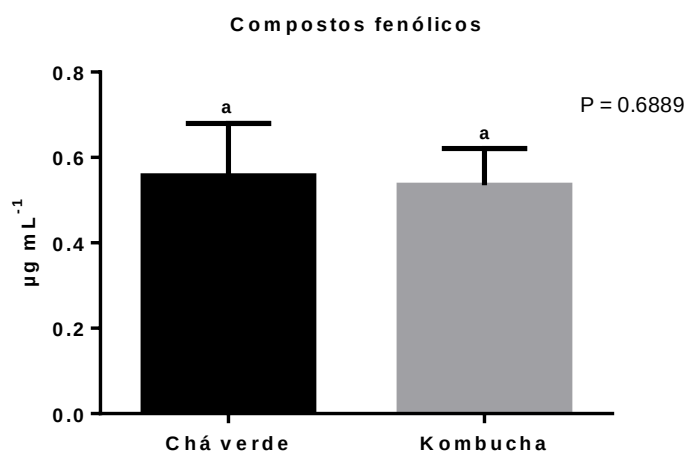


Figura 1. Compostos fenólicos totais presentes no chá verde e na kombucha. Os dados foram expressos em μg de ácido gálico por mL de amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ desvio padrão. ^aLetras iguais indicam que haver diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Similar aos resultados encontrados no presente estudo, Kaewkod et al. (2019) observaram um aumento na concentração total de compostos fenólicos da kombucha preparada a partir de chá verde com pico no 3º dia de fermentação, com posterior redução gradual até o 9º dia de fermentação, onde se manteve com níveis semelhantes ao do chá não fermentado ($p > 0,05$), e relativamente estáveis até o 15º dia. Entretanto, alguns estudos verificaram aumento no teor total de compostos fenólicos totais ao longo do processo fermentativo (Chakravorty et al., 2016; Jakubczyk et al., 2020), enquanto Pure & Pure (2016) observaram redução significativa.

3.3 Capacidade antioxidante do chá verde e da kombucha

Os resultados da análise antioxidante pelo ensaio de DPPH podem ser observados na Figura 2. Os resultados foram expressos em EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$), que corresponde a concentração da bebida necessária para inibir o radical DPPH em 50%. Portanto, quanto menor o EC_{50} , maior é a capacidade antioxidante da amostra. Tanto o chá verde quanto a kombucha apresentaram capacidade antioxidante significativas (EC_{50} 0,051 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e EC_{50} 0,178 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), quando comparados ao controle (EC_{50} 0,808 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Entretanto, o chá verde apresentou maior capacidade inibitória do radical DPPH que a kombucha ($p < 0,05$).

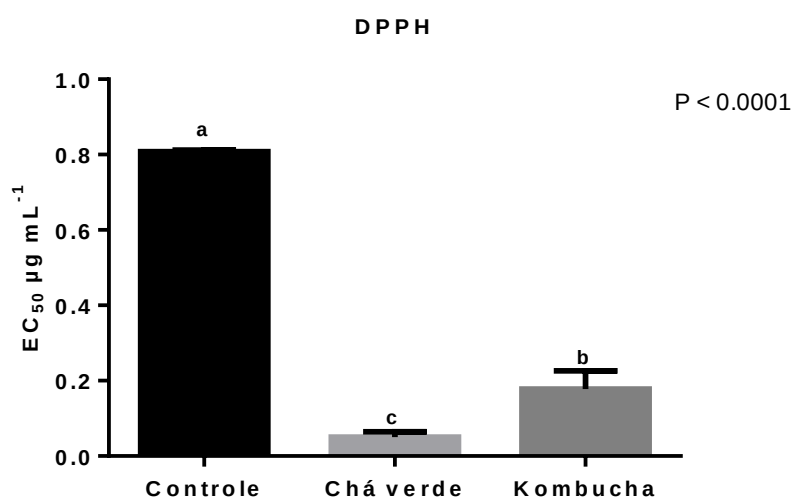


Figura 2. Capacidade antioxidante do chá verde e da kombucha pelo método DPPH. Os dados foram expressos em EC₅₀ (µg mL⁻¹) ± desvio padrão. ^{a-b-c}Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (p < 0,05).

Jayabalan et al. (2008) obtiveram resultados similares aos encontrados em nosso estudo, com kombucha fermentada por 7 dias, onde observaram um aumento da capacidade antioxidante da kombucha pelo método DPPH até o 3º dia de fermentação, no qual atingiu seu pico, seguido de uma redução significativa até o 6º dia de fermentação, chegando a níveis de inibição inferiores ao do chá não fermentado. Após o 6º dia de fermentação, a capacidade de inibição do radical DPPH aumentou novamente de forma moderada e gradual até o 18º dia. Em estudos similares, Kaewkod et al. (2019) e Pure & Pure (2016), verificaram que apesar da manutenção, ou até mesmo redução na concentração de compostos fenólicos totais durante o processo de fermentação, houve um aumento da capacidade antioxidante da kombucha pelo método DPPH, quando comparada ao chá verde não fermentado.

A cultura utilizada para fermentação da kombucha pode apresentar variação na composição microbiológica de acordo com sua origem, localização geográfica, clima e meio empregado para o processo de fermentação, o que pode explicar a variação de compostos bioativos e da capacidade antioxidante do produto final, assim como o tempo de fermentação empregado (Chu & Chen, 2005; Malbaša et al., 2011; Watawana et al., 2015). Os complexos fenólicos presentes no chá passam por biotransformação durante o processo fermentativo, devido a exposição ao ambiente ácido e a ação de enzimas liberadas pelas bactérias e leveduras presentes no SCOBY, e isso pode resultar na alteração da capacidade antioxidante do produto fermentado. Compostos com alto potencial antioxidante podem ser convertidos

em compostos com menor capacidade de neutralização de radicais livres, devido às modificações estruturais causadas pela ação enzimática microbiológica. Fatores estruturais, como o número de grupos hidroxila ou metoxila fenólica, hidroxila flavona, grupos ceto, grupos carboxílicos livres, entre outras características, podem afetar de forma significativa a capacidade antioxidante de compostos fenólicos individuais (Jayabalan et al., 2008). Entretanto, essas modificações estruturais também podem resultar no aumento da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, ou alterar sua atividade frente a diferentes radicais livres (nitrogênio/superóxido/hidroxila) (Jayabalan et al., 2008; Jakubczyk et al., 2020).

Na Figura 3, pode-se observar os resultados da análise da reação as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que avalia a capacidade da amostra em inibir a peroxidação lipídica, onde o subproduto avaliado é o MDA. Assim, quanto maior a capacidade antioxidante da bebida, menor a concentração de MDA na amostra. O chá verde apresentou capacidade inibitória da peroxidação lipídica significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle, demonstrando capacidade antioxidante. Já a kombucha exibiu capacidade pró-oxidante por este método.

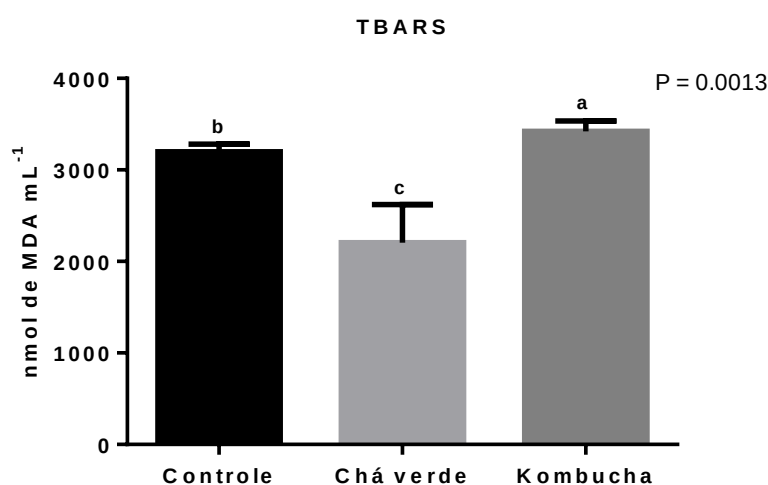


Figura 3. Capacidade de inibição da peroxidação lipídica do chá verde e da kombucha pelo método de TBARS. Os dados foram expressos em nm de MDA mL⁻¹ de amostra. ^{a-b-c}Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

A ausência de atividade inibitória da peroxidação lipídica exercida pela kombucha no presente estudo pode ser explicada pelo seu baixo pH. Amorati et al. (2006) verificaram que os ácidos fenólicos e ésteres, em meio ácido (pH 4), apresentaram baixa capacidade de inibição da peroxidação lipídica, enquanto a elevação do pH aumentou de forma expressiva

sua capacidade antioxidante. Jayabalan et al. (2008) verificaram grande variação no potencial da kombucha preparada a partir de chá verde contra a peroxidação lipídica durante o processo de fermentação, com redução nos primeiros seis dias, seguido de um pico na capacidade antioxidante no 9º dia, com posterior redução expressiva. Além do pH, a polaridade do composto e o estado físico do sistema lipídico também são fatores que podem afetar o comportamento antioxidante (Jayabalan et al., 2008). Entretanto, quando avaliada em estudos *in vivo*, a kombucha apresenta atividade inibitória da peroxidação lipídica significativa, reduzindo os níveis de TBARS tanto em modelo animal de ulceração gástrica quanto em dieta rica em colesterol, com efeito superior ao do chá não fermentado, o qual também apresenta atividade antioxidante significativa (Banerjee et al., 2010; Bellassoued, 2015). Isso pode ocorrer pelo fato de que, ao passar pelo processo digestivo, o pH da kombucha sofre alterações significativas, alterando sua capacidade antioxidante frente a peroxidação lipídica.

3.4 Avaliação da capacidade de inibição enzimática do chá verde e da kombucha

Os resultados do ensaio de inibição da enzima α -glicosidase, que avalia a capacidade inibitória da amostra frente a enzima, estão apresentados na Figura 4, sendo expressos em percentual de inibição da amostra. Pode-se observar que tanto o chá verde quanto a kombucha apresentaram significativa ação inibitória contra a enzima α -glicosidase, entretanto, o chá verde apresentou poder inibitório superior ao da kombucha (78,17% e 73,64%, respectivamente).

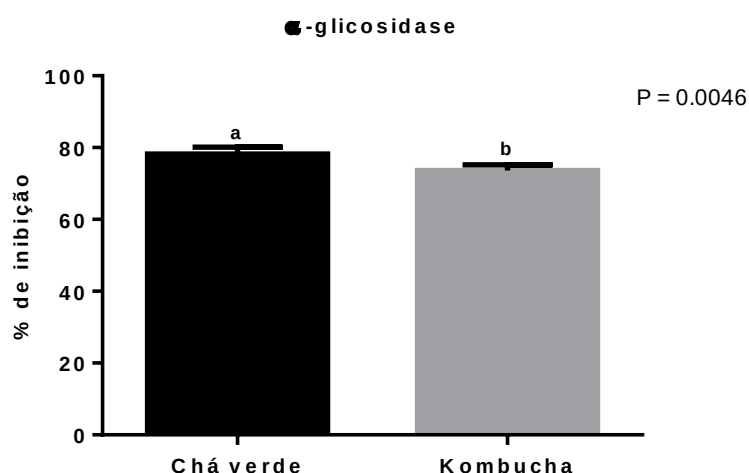


Figura 4. Atividade inibitória do chá verde e da kombucha frente a enzima α -glicosidase. Os dados

foram expressos em % de inibição da amostra $\pm$ desvio padrão. ^{a-b}Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

A enzima α -glicosidase participa da digestão de carboidratos, principalmente de maltose, maltotriose e α -dextrinas no intestino delgado, sendo a glicose o produto final desta digestão. A inibição de sua ação enzimática é alvo de medicamentos contra o diabetes tipo 2, como a Acarbose, que reduz e retarda a capacidade digestiva de carboidratos, atenuando a elevação dos níveis de glicose sanguíneos, o que resulta no melhor metabolismo da mesma, favorecendo o controle glicêmico e a melhora da sensibilidade a insulina (Koh et al., 2010). Estudos anteriores também observaram a ação inibitória do chá verde e da kombucha preparada a partir de diferentes substratos contra a enzima α -glicosidase (Gao et al., 2013; Yang & Kong, 2016; Permatasari et al., 2021).

Segundo Xiao et al. (2013), os compostos fenólicos possuem alto potencial inibitório da enzima α -glicosidase, e entre os com maior potencial estão as catequinas, que são abundantes tanto no chá verde quanto na kombucha (Jayabalan et al., 2007). Entre as catequinas com maior potencial inibitório, estão a catequina galato, galatocatequina galato, epicatequina galato e epigalocatequina galato (Kamiyama et al., 2010). Jayabalan et al. (2007) verificaram que ao longo do processo de fermentação da kombucha preparada a partir de chá verde, o teor de catequinas presente na bebida varia de forma considerável. Os autores observaram ainda redução no conteúdo catequinas nos primeiros 9 dias de fermentação, com posterior pico significativo nos níveis de epicatequina e epigalocatequina no 12º dia. Esta redução inicial no conteúdo de catequinas pode explicar o menor potencial inibitório apresentado pela kombucha frente a α -glicosidase no presente estudo, entretanto, existe a necessidade de mais estudos para confirmar esta correlação.

4 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que o chá verde e a kombucha são bebidas ricas em compostos fenólicos e apresentam alta capacidade antioxidante, conferindo potencial terapêutico frente a processos oxidativos. Após os 7 dias de fermentação, a kombucha exibiu redução significativa em seus níveis de pH, além de aumento do percentual de acidez e do teor de sólidos totais, quando comparada ao chá não fermentado. As biotransformações ocorridas durante o processo fermentativo da kombucha também resultaram na modificação de sua capacidade antioxidante, apresentando potencial

inferior ao do chá não fermentado no ensaio de DPPH, e ausência de atividade na análise de TBARS. Ambas as bebidas apresentaram capacidade inibitória significativa da enzima α -glicosidase, apresentando potencial terapêutico no diabetes, sendo o percentual inibitório exercido pelo chá verde superior ao observado na kombucha.

Estudos comparativos entre o chá verde e a kombucha são escassos e controversos, apresentando resultados conflitantes frente a diversas análises, tanto ao caráter fenólico quanto antioxidante. O SCOBY utilizado na produção da kombucha pode apresentar variações em sua composição microbiológica de acordo com sua origem, clima e meio empregado para o processo fermentativo, o que pode explicar as variações encontradas no presente estudo e na literatura.

Por fim, ressalta-se ainda que, estão sendo realizadas análises de identificação de composto bioativos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), poder antioxidante redutor do íon ferro III (FRAP) e análise de citototoxicidade (MTT), para complementar os dados deste artigo quanto a caracterização do chá verde e da kombucha.

REFERÊNCIAS

- AL-MOHAMMADI, AR.; ISMAIEL, AA.; IBRAHIM, RA.; MOUSTAFA, AH.; ABOU, ZEID A.; ENAN, G. Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. **Molecules**, v. 26, p. 5026-5043, 2021.
- AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 2932–2937, 2006.
- ANTOLAK H, PIECHOTA D, KUCHARSKA A. Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). **Antioxidants (Basel)**, v. 10, p. 1541, 2021.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K.; BHARGAV, V. K. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants, **Journal of Food and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2568-2575, 2014.
- BANERJEE, D., HASSARAJANI, S. A., MAITY, B., NARAYAN, G., BANDYOPADHYAY, S. K., & CHATTOPADHYAY, S. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. **Food & function**, v. 1, p. 284–293, 2010.
- BARBALHO S.; BOSSO, H.; SALZEDAS-PESCININI, L.; GOULART, R. Green tea: A possibility in the therapeutic approach of inflammatory bowel diseases?: Green tea and inflammatory bowel diseases. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 43, p. 148-153, 2019.
- BELLASSOUED, K.; GHRAB, F.; MAKNI-AYADI, F.; VAN PELT, J.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CABRERA, C.; ARTACHO, R., GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.
- CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, n. 2, p. 63-72, 2016.
- CHU, S.-C.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha, **Food Chemistry**, v. 98, p. 502–507, 2006.
- GAO, J.; XU, P.; WANG, Y.; WANG, Y.; HOCHSTETTER, D. Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against α -amylase and α -glucosidase in vitro. **Molecules**, v. 18, p. 11614–11623, 2013.
- JAKUBCZYK, K.; KALDUŃSKA, J.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Chemical Profile and

Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. **Antioxidants**, v. 9, p. 447-461, 2020.

JAYABALANA, R.; MARIMUTHUB, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, p. 392-398, 2007.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008.

KAEWKOD T, BOVONSOMBUT S, TRAGOOLPUA Y. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. **Microorganisms**. V. 7, p. 700, 2019.

KAMIYAMA, O.; SANAE, F.; IKEDA, K.; HIGASHI, Y.; MINAMI, Y.; ASANO, N.; ADACHI, I.; KATO, A. In vitro inhibition of α -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. **Food Chem**, v. 122, p. 1061–1066, 2010.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

KOH LW, WONG LL, LOO YY, Kasapis S, Huang D, Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 148-154, 2010.

KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds, **Food Research International**, v. 43, p. 167-176, 2010.

LIU, Y.; WANG, X.; CHEN, Q.; LUO, L.; MA, M.; XIAO, B.; ZENG, L. *Camellia sinensis* and *Litsea coreana* Ameliorate Intestinal Inflammation and Modulate Gut Microbiota in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64, p. 17-27, 2020.

LUK, HY.; APPELL, C.; CHRYU, MC.; CHEN, CH.; WANG, CY.; YANG, RS.; SHEN, CL. Impacts of Green Tea on Joint and Skeletal Muscle Health: Prospects of Translational Nutrition. **Antioxidants**, v. 9, p. 1050-1078, 2020.

MALBAŠA, R. V.; LONCAR, E. S.; VITAS, J. S.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1727-1731, 2011.

MOORE, R.; JACKSON, K; MINIHANE, A. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1790-1802, 2009.

MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical. **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 323-333, 2020.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric

acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PERMATASARI, H. K., NURKOLIS, F., AUGUSTA, P. S., MAYULU, N., KUSWARI, M., TASLIM, N. A., WEWENGKANG, D. S., BATUBARA, S. C., & BEN GUNAWAN, W.

Kombucha tea from seagrapes (*Caulerpa racemosa*) potential as a functional anti-ageing food: in vitro and in vivo study. **Heliyon**, v. 7, e07944, 2021.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedicals Science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PURE, EA.; PURE EM. Antioxidant and Antibacterial Activity of Kombucha Beverages Prepared using Banana Peel, Common Nettles and Black Tea Infusions. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, p. 125-130, 2016.

SHARANGI, A. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**, v. 42, p. 529-535, 2009.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, PB.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; PINHO, PG.; FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chem**, v. 129, p. 454-462, 2011.

XIAO, J.; KAI, G.; YAMAMOTO, K.; CHEN, X. Advance in Dietary Polyphenols as α -Glucosidases Inhibitors: A Review on Structure-Activity Relationship Aspect. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 818-836, 2013.

YANG, X.; KONG, F. Evaluation of the in vitro α -glucosidase inhibitory activity of green tea polyphenols and different tea types. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, p. 777–782, 2016.

ARTIGO 2: *In vivo***Efeitos da administração de Chá Verde *versus* Kombucha no tratamento da colite ulcerativa em camundongos**

Jordan Teixeira Oliveira; Fernanda Machado da Costa; Mariana Parron Paim; Paola Quevedo da Costa; Victor dos Santos Barboza; Rodrigo de Almeida Vaucher; Paulo Cavalheiro Schenkel; Simone Pieniz

RESUMO

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada pela inflamação espontânea e recorrente do cólon. O chá verde e a kombucha são bebidas com alto potencial terapêutico, devido a sua alta concentração de compostos bioativos, que conferem às bebidas elevada capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório do chá verde e da kombucha frente ao modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético (4%). Setenta e dois (n=72) camundongos C57BL/6 machos (n=36) e fêmeas (n=36) foram divididos randomicamente em seis grupos: controle (n=12), controle + chá verde (n=12), controle + kombucha (n=12), ácido acético (n=12), ácido acético + chá verde (n=12) ou ácido acético + kombucha (n=12). Os animais dos grupos induzidos receberam administração intra-retal de ácido acético (4%); já os animais dos grupos controle receberam água estéril, através do mesmo procedimento. Os tratamentos com chá verde ou kombucha foram administrados por gavagem ao longo de 7 dias, sendo monitorado o consumo alimentar (CA) e o índice de atividade da doença (IAD). No 8º dia, os animais foram eutanasiados e realizou-se a determinação dos níveis plasmáticos da proteína C reativa (PCR) e análises macroscópicas e microscópicas do cólon, sendo então pontuados segundo escores de gravidade da inflamação. Como resultado, observou-se que os animais que receberam indução da colite por ácido acético apresentaram inflamação, ulceração e dano às criptas intestinais. Os tratamentos com chá verde e kombucha apresentaram efeito anti-inflamatório intestinal, reduzindo de forma significativa o escore histológico e macroscópico de inflamação. Os tratamentos também reduziram os níveis plasmáticos da PCR dos animais colíticos a níveis similares aos dos grupos controle. Com base nas análises histológicas do cólon, o tratamento com kombucha se mostrou o mais eficaz, apresentando redução significativa no dano às criptas intestinais, além de atenuar a perda das células caliciformes. Nenhum dos grupos apresentou alterações significativas

quanto ao CA e IAD. Com base nos dados apresentados, tanto o chá verde quanto a kombucha apresentam potencial terapêutico anti-inflamatório na colite ulcerativa induzida, entretanto, a kombucha apresentou maior potencial quando comparada ao chá verde.

Palavras chave: doença inflamatória intestinal; *Camellia sinensis*; ácido acético; chá fermentado.

ABSTRACT

Ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease (IBD) characterized by spontaneous and recurrent inflammation of the colon. Green tea and kombucha are beverages with high therapeutic potential, with great antioxidant and anti-inflammatory capacity, due to their high concentration of bioactive compounds, which give the drinks. Thus, the present study aimed to evaluate the anti-inflammatory potential of green tea and kombucha against the model of ulcerative colitis induced by acetic acid (4%). Seventy-two (n=72) male (n=36) and female (n=36) C57BL/6 mice were randomly divided into six groups: control (n=12), control + green tea (n=12), control + kombucha (n=12), acetic acid (n=12), acetic acid + green tea (n=12) or acetic acid + kombucha (n=12). The animals in the induced groups received intrarectal administration of acetic acid (4%); the animals of the control groups received sterile water, through the same procedure. Treatments with green tea or kombucha were administered by gavage over 7 days, with food intake (FI) and disease activity index (DAI) being monitored. On the 8th day, the animals were euthanized and the determination of plasma levels of C-reactive protein (CRP) and macroscopic and microscopic analysis of the colon were performed, being then scored according to inflammation severity scores. As a result, it was observed that the animals that received colitis induction by acetic acid showed inflammation, ulceration and damage to the intestinal crypts. The treatments with green tea and kombucha showed an intestinal anti-inflammatory effect, significantly reducing the histological and macroscopic inflammation score. The treatments also reduced the plasma CRP levels of the colitic animals to levels similar to those of the control groups. Based on histological analysis of the colon, kombucha treatment proved to be the most effective, showing a significant reduction in intestinal crypt damage, in addition to attenuating the loss of goblet cells. None of the groups showed significant alterations in terms of FI and DAI. Based on the data presented, both green tea and kombucha have anti-inflammatory therapeutic potential in induced ulcerative colitis, however, kombucha showed greater potential when compared to green tea.

Key words: inflammatory bowel disease; *Camellia sinensis*; acetic acid; fermented tea.

1 INTRODUÇÃO

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada pela inflamação espontânea e recorrente do cólon, podendo afetar um segmento ou todo o comprimento do cólon (Kornbluth e Sachar, 2010). A doença está associada a alterações funcionais, como na motilidade e no trânsito intestinal, podendo progredir de leve a severa, com características como dor abdominal, diarreia, fadiga, perda de peso, deficiências nutricionais e sangramento retal. Em casos graves, sangue e muco nas fezes, fístula, hemorroidas de fissura e anemia também são observados (Head, 2003). Em animais, estas características estão bem estabelecidas, incluindo a perda de peso, formação de úlcera, diarreia com sangue, perda de epitélio celular e infiltrações com neutrófilos (Xavier e Podolsky, 2007). Além disso, a inflamação afeta as camadas superficiais da parede intestinal (mucosa e submucosa), com consequente infiltração de células polimorfonucleares e plasmócitos, e posterior edema, hemorragia e necrose epitelial (Deroche et al., 2014).

Embora a etiologia da colite ulcerativa ainda não seja clara, é geralmente hipotetizada como sendo uma condição multifatorial, com prevalência similar entre os sexos. Dados epidemiológicos demonstram que o aparecimento da DII está associado a um estilo de vida e ambiente ocidentalizados, caracterizados pelo alto nível socioeconômico, uso de medicamentos, poluição, estresse e dietas ricas em alimentos ultraprocessados, como refrigerantes, alimentos ricos em açúcar refinado, salgadinhos e carnes processadas, além do alto consumo de gordura saturada (Shouval et al., 2017; King et al., 2020; Narula et al., 2021). Fatores genéticos e o perfil das bactérias comensais entéricas também fazem parte da fisiopatologia da doença, sendo requeridos para iniciar e manter a inflamação intestinal ou colônica. A disbiose ou desequilíbrio na composição da microbiota intestinal resultará na redução da barreira de muco protetor intestinal, podendo gerar lesões na mucosa, além de resultar na perda da integridade das junções intercelulares intestinais (*tight junctions*) (Ostanin et al., 2009; Hering et al., 2012; Wang et al., 2019). A perda da integridade desta barreira física (*leaky gut*) pode levar a alterações na resposta imune, observada na DII, com um elevado influxo de substâncias presentes no lúmen, como bactérias entéricas e antígenos, que irão promover a sobrecarga do sistema imunológico, induzindo a resposta inflamatória e o estresse oxidativo intestinal (El-Abhar et al., 2008; Silva et al., 2008; Chandra et al., 2019).

O tratamento da DII inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores, além da terapia biológica

(Chang, 2020). Considerando que os pacientes precisam de tratamento ao longo da vida, e muitas das terapias disponíveis possuem diversos efeitos colaterais secundários, a busca de novas abordagens é crescente e necessária (Del Carmen et al., 2017). Tratamentos que alteram a composição e/ou atividade de microbiota intestinal, como intervenções com probióticos, prebióticos e compostos fenólicos, podem constituir como uma opção terapêutica alternativa (Hooper et al., 2012; Ambalam et al., 2016; Liu et al., 2020).

O chá verde é uma bebida milenar muito consumida ao redor do mundo, e é produzido a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis*, apresentando diversos benefícios à saúde. Por ser rico em compostos fenólicos, principalmente catequinas, possui alto poder antioxidante e anti-inflamatório, apresentando efeito protetor em diversas doenças crônicas, como nas doenças cardiovasculares, respiratórias, câncer, diabetes e hipertensão arterial sistêmica. Também há evidências de que o chá possa apresentar benefícios como atividade antibacteriana e antiviral, nas doenças inflamatórias intestinais, doenças cognitivas, doenças periodontais, entre outras (Cabrera et al., 2006; Barbalho et al., 2019; Liu et al., 2020).

Já a kombucha, é uma bebida obtida por meio da fermentação do chá verde ou chá preto adoçado com bactérias simbióticas e leveduras osmofílicas (Amarasinghe et al., 2018). A bebida adquiriu grande popularidade devido a diversas potenciais propriedades farmacológicas estabelecidas, como efeito antimicrobiano, antioxidante, hepatoprotetor, anti-diabético, nos distúrbios metabólicos, nas doenças cardiovasculares, nos distúrbios inflamatórios, no câncer e na colite ulcerativa (Bhattacharya et al., 2013; Bhattacharya et al., 2016; Leal et al., 2018; Pakravan et al., 2019). Acredita-se que a maioria de suas propriedades benéficas possa ser atribuída aos polifenóis, ácidos orgânicos, micro-organismos com potencial probiótico (principalmente leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias ácido acéticas) e uma série de outros ingredientes que são inerentes às matérias-primas ou são produzidos durante a fermentação microbiana (Bhattacharya et al., 2016; Antolak et al., 2021). Observou-se que durante o processo fermentativo da kombucha, pode ocorrer um aumento na concentração de compostos fenólicos e flavonoides, conferindo a bebida maior potencial antioxidante, superior ao do chá não fermentado, entretanto, as evidências não são unânimes (Jayabalan et al., 2008; Bhattacharya et al., 2011).

Com base na necessidade de pesquisas sobre métodos alternativos que apresentem menores efeitos colaterais no tratamento da colite ulcerativa, assim como a escassez de estudos que avaliem o potencial terapêutico da kombucha nas DII, o presente estudo teve

como objetivo avaliar o potencial efeito anti-inflamatório intestinal do chá verde e da kombucha no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético em camundongos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do chá verde

As folhas de chá verde foram adquiridas comercialmente da marca Yamamotoyama® (China). Todos os recipientes utilizados no preparo foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. O chá foi preparado utilizando 1 L de água e 10 g L⁻¹ de folhas secas, as quais permaneceram em infusão por 7 min em água a 85 °C, e então, coadas em filtro de náilon. O chá foi preparado diariamente e administrado fresco, tanto para o tratamento quanto para o preparo da kombucha (Komes et al., 2010).

2.2 Preparo da kombucha

A kombucha foi adquirida comercialmente da marca Viva Mais®, acondicionada em embalagens plásticas lacradas. Todos os recipientes utilizados no preparo foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. O SCOBY (Colônia Simbiótica de Bactérias e Leveduras), da mesma marca (Viva Mais®), foi inoculado com seu líquido de partida (100 mL) em chá verde previamente preparado, conforme descrito no item anterior, e adicionado sacarose (60 g L⁻¹). O recipiente foi recoberto com tecido poroso para evitar contaminação e deixado em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante 7 dias (Kallel et al., 2012; Chakravorty et al., 2016). Após decorrido os 7 dias, a fermentação foi interrompida e a kombucha foi envazada em embalagens estéreis e mantidas sob refrigeração a 5 °C. As amostras foram coletadas para formação do *pool* que foi utilizado para administração nos animais do presente estudo. O SCOBY foi coletado e armazenado em 300 mL de chá verde e 100 mL de kombucha em recipiente fechado a 5 °C, para futuras análises (Kallel et al., 2012).

2.3 Avaliação do experimento *in vivo*

2.3.1 Animais

Foram utilizados 72 (n=72) modelos biológicos de camundongos C57BL/6 machos (n=36) e fêmeas (n=36), provenientes do Biotério Central da UFPEL. Estes foram divididos randomicamente em seis grupos compostos de 12 animais cada (machos (n=6)/ fêmeas (n=6)), com 60 dias de idade, mantidos em gaiolas, em ambiente com controle de temperatura (23 ± 2 °C) e luz (12:12 horas ciclo escuro/claro). O experimento foi conduzido

no Laboratório de Nutrição Experimental, da Faculdade de Nutrição (UFPEL), onde os animais permaneceram em adaptação ao ambiente do laboratório e ao controle do consumo da dieta padrão (Nuvilab®) e água *ad libitum* por uma semana. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Guia para cuidados e uso de animais de laboratório” do *National Research Council* (NRC, 2011).

2.3.2 Colite experimental induzida por Ácido Acético (AA)

A colite ulcerativa foi induzida com ácido acético (4%), sob anestesia leve com isoflurano (inalação). Depois de lavagem anal mecânica com água destilada estéril, os animais dos grupos colíticos, foram tratados com 0,1 ml de ácido acético (4%), com auxílio de um cateter de polipropileno (0,7 x19 mm) o qual foi inserido no cólon via intra-retal. Os grupos controles foram tratados com 0,1 ml de água destilada estéril utilizando o mesmo método, para servir como o controle do grupo exposto. Imediatamente após a aplicação das soluções via intra-retal, os animais foram mantidos em posição pronada por 15 segundos com ácido acético e, posteriormente, lavados novamente com água destilada estéril (Sanei et al., 2014).

Ao longo do protocolo foi avaliado o índice de atividade da doença (IAD), onde os animais foram monitorados em relação a mudanças de peso corporal, presença de sangue nas fezes e consistência das mesmas. O consumo alimentar (CA) dos animais também foi monitorado, com pesagem (g) no dia 1º e ao final do experimento (8º dia/ eutanásia). Ao final de 7 dias, os animais foram eutanasiados e os cólons foram coletados e lavados com solução salina (0,9%). Após esse procedimento, foi realizada a análise macroscópica e microscópica do cólon.

2.4 Delineamento experimental

2.4.1 Delineamento experimental

Foi realizado cálculo amostral com nível de confiança de 95%, distribuídos em seis grupos com 12 animais cada (n=12). Um grupo como controle positivo, um controle negativo e quatro grupos tratamento, compostos de seis (n=6) animais machos e seis (n=6) animais fêmeas, conforme demonstrado a seguir (Tabela 4).

Tabela 1 – Ensaio *in vivo*, com animais saudáveis/controle (C) e colíticos (AA), que receberam administração de água (como tratamento controle), chá verde (CV) ou kombucha (K), por gavagem (1 mL 100g⁻¹). Os 72 animais foram divididos seis grupos compostos por 12 (n=12) animais cada, subdivididos em seis (n=6) animais machos e seis (n=6) animais fêmeas.

Grupos	Variáveis independentes	Variáveis dependentes
Animais saudáveis	1-Dieta padrão + água estéril (C) 2-Dieta padrão + chá verde (C + CV) 3-Dieta padrão + kombucha (C + K)	Índice de Atividade da Doença (IAD) Consumo Alimentar (CA)
Animais que receberam indução de colite com AA (4%)	4-Dieta padrão + água estéril (AA) 5-Dieta padrão + chá verde (AA + CV) 6-Dieta padrão + kombucha (AA + K) Obs.: Todos os animais tiveram acesso a água <i>ad libitum</i>	Inflamação colônica (histologia) Proteína C reativa (PCR)

Foram utilizados 72 (n=72) modelos biológicos de camundongos C57BL/6 machos (n=36) e fêmeas (n=36), provenientes do Biotério Central da UFPEL. Estes foram divididos randomicamente em seis grupos compostos de 12 animais cada (machos (n=6)/ fêmeas (n=6)). Nos grupos tratamento, os animais receberam água estéril (controle) ou ácido acético 4% (induzidos), chá verde ou kombucha, por gavagem, na dosagem de 1 mL 100g⁻¹ de peso corporal, com início no 1º dia (após a semana de adaptação), mantendo-se até o 7º dia. No 8º dia de experimento os animais foram submetidos a um jejum de 3 horas e, posteriormente, sedados com isoflurano e eutanasiados por punção cardíaca, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea, 2004). O trato gastrointestinal foi dessecado e armazenado parte em 10% de formalina tamponada, e parte armazenado para análises complementares posteriores de estresse oxidativo, mieloperoxidase colônica (MPO), bem como para a expressão de genes relacionados a resposta inflamatória. As amostras de sangue foram coletadas em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para análise do perfil bioquímico. Os demais órgãos coletados como fígado, coração, baço, cérebro e rim foram excisados individualmente para serem utilizados em análises complementares e/ou projetos futuros. Estes procedimentos foram realizados com auxílio de uma Médica Veterinária com conhecimento específico sobre as técnicas aplicadas.

2.5 Avaliação *in vivo* da colite ulcerativa

2.5.1 Avaliação da atividade da doença

O consumo alimentar (CA) e a gravidade da colite foi monitorada diariamente (do 1º dia ao 8º dia/ eutanásia) por um Índice de Atividade da Doença (IAD) (Larner et al., 2019), o qual inclui análise de perda de peso, consistência das fezes e sangramento anal (Tabela 5). Os parâmetros foram avaliados tanto individualmente quanto em conjunto, pois os camundongos com soma de escores superiores a 9 necessitam ser eutanasiados, como forma de evitar o sofrimento do animal. Os resultados foram expressos pela média do grupo por parâmetro, sendo considerado significativo aqueles grupos que atingiram escores superiores a 0,5 (Ran et al., 2008).

Tabela 2– Critérios para pontuação de parâmetros de avaliação da evolução da doença inflamatória intestinal induzida por ácido acético.

Escore	Perda de peso corporal (%)	Consistência das fezes	Sangramento anal
0	Nenhum	Bem formada	Nenhum
1	1-5	-	-
2	5-10	Pastosas	Local
3	10-20	-	-
4	≥20	Aquosas	Severa

Fonte: Larner et al. (2019).

2.5.2 Avaliação macroscópica do cólon

O cólon foi aberto longitudinalmente sobre a margem mesentérica e lavado em solução salina (0,9%) para análise. As alterações macroscópicas na mucosa colônica foram avaliadas com a utilização de uma escala de dano macroscópico, conforme demonstrado na Tabela 6 (Topal et al., 2014).

Tabela 3 – Escala da gravidade da inflamação na avaliação macroscópica.

Escore	Gravidade da inflamação
0	Mucosa com aparência preservada
1	Edema e congestão
2	Ulceração e hemorragia
3	Múltiplas úlceras e parede intestinal diluída

2.5.3 Avaliação microscópica do cólon

A terceira parte distal do cólon foi cortada longitudinalmente e fixada em paraformaldeído tamponado a 4%. As secções embebidas em parafina, cortadas em secções de 5 µm foram coradas com hematoxilina-eosina e as imagens foram analisadas em microscópio. Nas secções colônicas foram avaliados três parâmetros, segundo Gil-Martinez et al. (2019) (Tabela 4).

Tabela 4 – Critérios para avaliação microscópica.

Escore	Gravidade da inflamação	Dano na cripta	Ulceração
0	Ausência de inflamação nas células da lâmina própria	Criptas intactas	Ausência
1	Granulócitos nas células da lâmina própria	Perda de um terço basal	Um ou dois pontos de ulceração
2	Células inflamatórias que se estendem na submucosa	Perda de dois terços basais	Três ou quatro pontos de ulceração
3	Infiltrado inflamatório	Perda da cripta inteira	Ulceração confluyente ou extensa
4	—	Mudança da superfície epitelial com erosão	—
5	—	Erosão confluyente	—

Os parâmetros foram somados, sendo que o máximo escore histológico para colite grave é igual a 11 (Laroui et al., 2012).

2.6 Avaliação bioquímica: proteína C reativa (PCR)

O sangue total dos camundongos foi coletado por pulsão cardíaca e transferidos para tubos Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) contendo EDTA. Após, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. O plasma foi separado e utilizado na avaliação bioquímica utilizando kits comerciais da marca Labtest® (Minas Gerais, Brazil), em analisador automático Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Os parâmetros mensurados no estudo foram: albumina e proteínas totais, que foram utilizadas para a determinação quantitativa por turbidimétrica dos níveis de Proteína C Reativa (PCR) nos animais.

2.7 Análise dos dados

Para análise estatística, foi utilizada a análise de variância (two-way ANOVA), com auxílio do Software GraphPad Prism 6 para Windows para comparação entre os diversos parâmetros avaliados no experimento. Considerando-se diferença significativa para ANOVA, utilizou-se o Teste Tukey. Todos os testes foram realizados com significância estatística em nível de 5% ($p < 0,05$) (GraphPad Software, San Diego, USA).

2.8 Aspectos éticos

Foram usadas todas as estratégias que visam minimizar o número de animais utilizados no experimento. O tamanho do grupo foi planejado segundo o relato da literatura e cálculo amostral para cada um dos modelos e/ou ensaios.

Os ensaios experimentais foram escolhidos visando induzir o mínimo de desconforto possível. Em muitos casos a metodologia descrita na literatura foi adaptada, abdicando-se de medidas que tragam mais danos aos animais e ou introduzindo alternativas que levem ao menor desconforto. Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados no *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – ILAR/EUA e no Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA, 2004).

Os animais foram eutanasiados isoladamente dos demais para que não houvesse estresse. As carcaças dos animais eutanasiados foram dispensadas em saco plástico fechado e depositados em bombona com tampa para recolhimento por empresa especializada. Materiais tóxicos e contaminados foram tratados conforme protocolo da instituição.

3 RESULTADOS

Entre os 72 animais do estudo, 69 sobreviveram até o final do experimento (taxa de sobrevivência de 95,83%), sendo que ocorreu uma morte no grupo controle, uma no grupo ácido acético, e uma no grupo ácido acético + kombucha. Todos os animais que receberam indução de colite ulcerativa (grupos ácido acético, ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha) apresentaram sangramento retal logo após a administração intra-retal de ácido acético (4%), o mesmo não ocorreu com os animais dos grupos controle (controle, controle + chá verde e controle + kombucha), que receberam administração intra-retal de água estéril.

3.1 Índice de Atividade da Doença (IAD) e Consumo Alimentar (CA)

O IAD, que avalia a perda de peso corporal, consistência das fezes e sangramento anal, foi monitorado diariamente, do dia 1º ao 8º dia/ eutanásia. Quanto a avaliação do peso

corporal (Figura 1), nenhum dos grupos apresentou perda de peso. Os resultados referentes a consistência das fezes e sangramento anal podem ser observados na Tabela 5. Apenas os grupos controle e controle + chá verde não apresentaram alterações na consistência das fezes, entretanto, as alterações observadas nos demais grupos foram inferiores ao escore mínimo indicativo de alteração referente a colite (0,5). Quanto ao escore de sangramento anal, apenas os grupos que receberam indução da colite ulcerativa obtiveram pontuação, entretanto, o escore médio dos grupos também foi inferior ao escore indicativo de alteração (0,5).

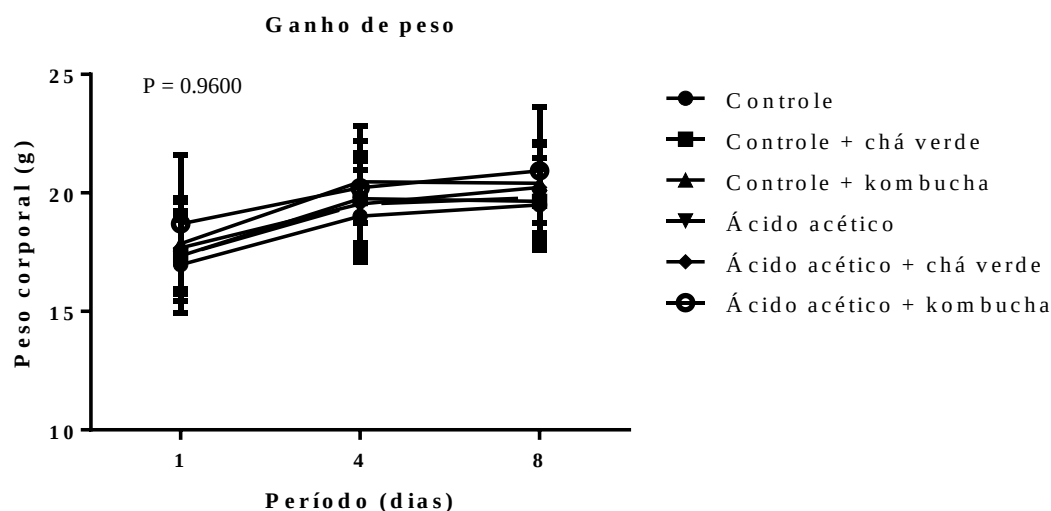


Figura 1 - Ganho de peso corporal ao longo dos oito dias de experimento. Os dados foram expressos em média em grama (g) de peso corporal por grupo $\pm$ desvio padrão. Nenhum dos grupos apresentou perda de peso e não houve diferença significativa quanto ao ganho de peso entre grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Escore de consistência das fezes (0: bem formada, 2: pastosas, 4: aquosas) e sangramento anal (0: nenhum, 2: local, 4: severa), referentes ao Índice de Atividade da Doença.

Grupo	Consistência das fezes	Sangramento anal
Controle	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
Controle + chá verde	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
Controle + kombucha	0,208 ^a $\pm$ 0,002	0,000 $\pm$ 0,000
Ácido acético	0,022 ^d $\pm$ 0,001	0,022 ^c $\pm$ 0,002
Ácido acético + chá verde	0,146 ^b $\pm$ 0,002	0,083 ^a $\pm$ 0,002
Ácido acético + kombucha	0,043 ^c $\pm$ 0,001	0,043 ^b $\pm$ 0,002

*Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. ^{a-b-c-d}Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

O consumo alimentar dos camundongos (Figura 2) foi avaliado ao longo do experimento (1º ao 8º dia/ eutanásia) como forma de verificar a possível interação entre as alterações de peso e a ingestão alimentar dos animais. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

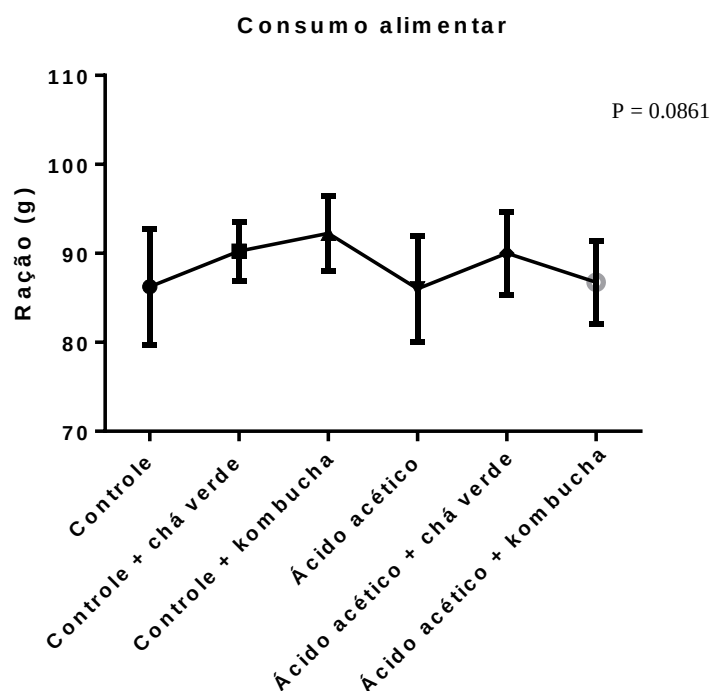


Figura 2 – Consumo alimentar ao longo dos oito dias de experimento. Os dados foram expressos em média em gramas (g) de consumo de ração por grupo $\pm$ desvio padrão. Nenhum dos grupos apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

3.2 Análise Macroscópica e Microscópica do Cólon

Na análise macroscópica do cólon (Tabela 6), pode-se observar que os animais que receberam indução de colite por ácido acético (grupo ácido acético, ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha) apresentaram inflamação visível, o que não foi observado nos grupos controle (controle, controle + chá verde e controle + kombucha), que receberam escore 0. O grupo ácido acético recebeu escore máximo (3), indicando a presença de múltiplas úlceras e parede intestinal diluída. Já os animais colíticos que receberam tratamento com chá verde e kombucha (grupo ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha), apresentaram escore inflamatório 2 (ulceração e hemorragia), indicando atenuação do processo inflamatório, em comparação ao grupo ácido acético.

Tabela 6 – Escala de gravidade da inflamação na avaliação macroscópica do cólon.

Grupo	Gravidade da inflamação
Controle	0*
Controle + chá verde	0
Controle + kombucha	0
Ácido acético	3 ^a
Ácido acético + chá verde	2 ^b
Ácido acético + kombucha	2 ^b

*Escore 0: mucosa com aparência preservada; 1: edema e congestão; 2: ulceração e hemorragia; 3: múltiplas úlceras e parede intestinal diluída. ^{a-b}Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

A análise microscópica do cólon ocorreu em três parâmetros, gravidade da inflamação, dano na cripta e ulceração, sendo os três escores somados (Tabela 7). Os animais dos grupos controle (controle, controle + chá verde e controle + kombucha) apresentaram epitélio preservado, sem alterações referentes a inflamação, edema ou ulceração (Figura 3), recebendo escore total 0. A indução da colite ulcerativa foi confirmada em todos os grupos que receberam administração de ácido acético (grupo ácido acético, ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha), apresentando infiltrado inflamatório, dano na cripta e ulceração extensa. O grupo ácido acético recebeu o escore histológico máximo (11), caracterizando a colite grave, com presença de erosão confluyente da cripta intestinal. Já os grupos ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha apresentaram escores 10 e 9, respectivamente, mostrando efeito protetor significativo dos tratamentos, com atenuação do dano na cripta, sendo o tratamento com kombucha o mais eficaz.

Tabela 7 – Escala de gravidade da inflamação na avaliação microscópica do cólon.

Grupo	Gravidade da inflamação	Dano na cripta	Ulceração	Escore total
Controle	0	0	0	0
Controle + chá verde	0	0	0	0
Controle + kombucha	0	0	0	0
Ácido acético	3	5	3	11 ^a
Ácido acético + chá verde	3	4	3	10 ^b
Ácido acético + kombucha	3	3	3	9 ^c

*O escore de gravidade da inflamação vai de 0-3, de dano na cripta de 0-5 e ulceração de 0-3. Os três escores foram somados, sendo que o escore máximo é 11. ^{a-b-c}Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

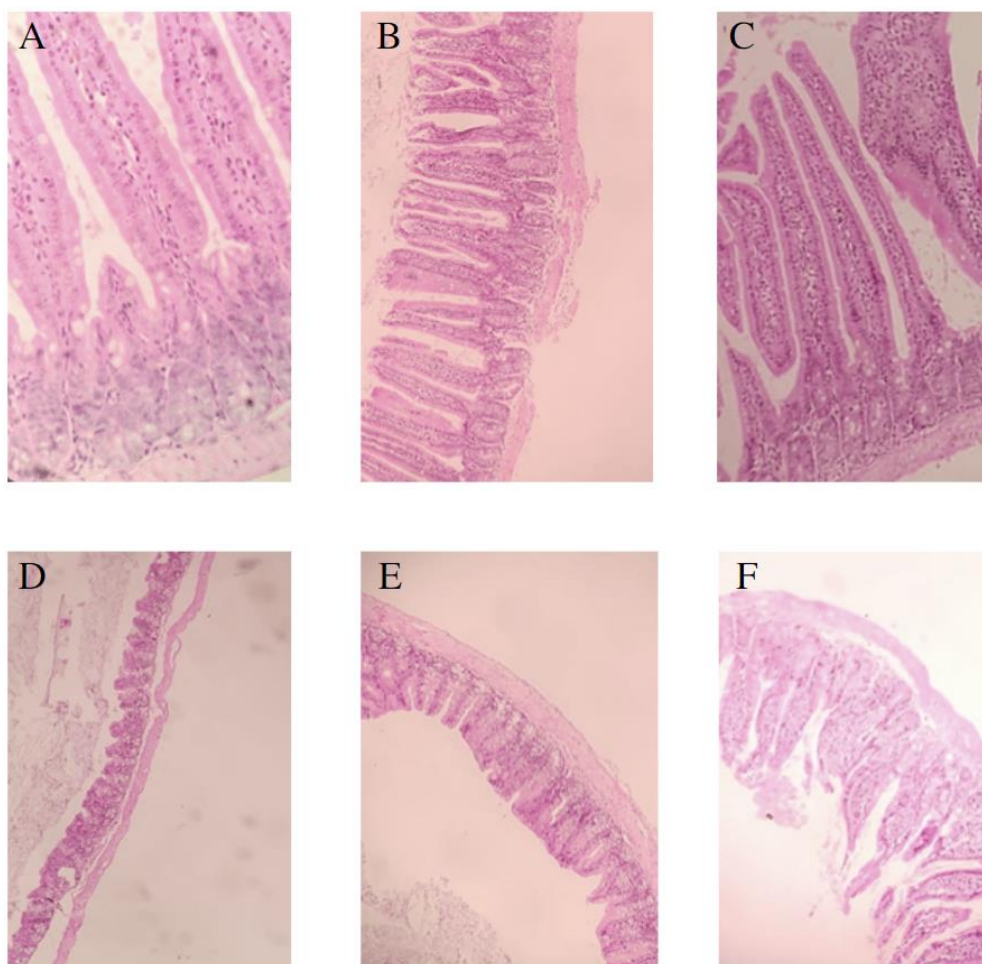


Figura 3 – Cortes histológicos representativos de todos os grupos. Grupos controle (A), controle + chá verde (B), e controle + kombucha (C): cortes histológicos sem presença de inflamação, edema ou ulceração. Grupo ácido acético (D): corte histológico apresentando inflamação, ulceração e dano

as criptas acentuado, com grande redução de células caliciformes. Grupo ácido acético + chá verde (E): corte histológico com presença de inflamação, ulceração, e dano as criptas menos acentuado, também exibindo redução de células caliciformes. Grupo ácido acético + kombucha (F): corte histológico com presença de inflamação, ulceração, e dano as criptas ainda menos acentuado, apresentando pequena redução de células caliciformes.

3.3 Proteína C reativa (PCR)

A partir da análise dos níveis de proteína C reativa nos animais em estudo (Figura 4), observa-se uma elevação significativa nos níveis plasmáticos deste importante biomarcador de fase aguda de inflamação no grupo ácido acético. Entretanto, os tratamentos com chá verde e kombucha apresentaram redução significativa em seus níveis nos grupos ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha, não apresentando diferença significativa dos grupos controle (grupo controle, controle + chá verde e controle + kombucha). Portanto, fica evidente a ação anti-inflamatória do chá verde e da kombucha frente a inflamação exercida pela colite ulcerativa. Observa-se também que os tratamentos com chá verde e kombucha também apresentaram redução dos níveis de PCR entre os animais saudáveis, entretanto a diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

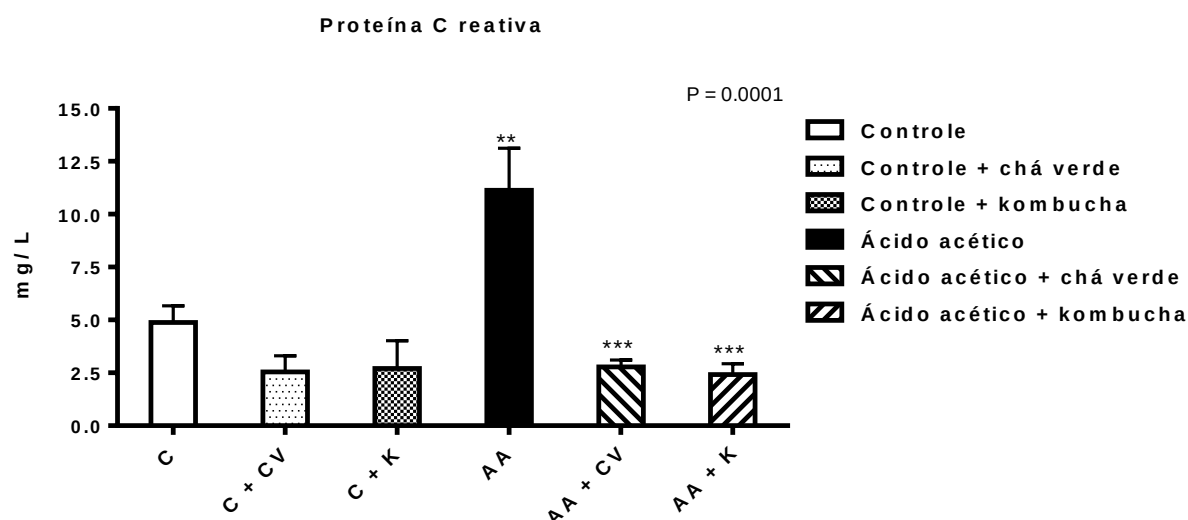


Figura 4 – Os tratamentos com chá verde e kombucha inibiram de forma significativa a resposta inflamatória de fase aguda nos animais com colite ulcerativa induzida por ácido acético, observada por meio da avaliação dos níveis de proteína C reativa plasmáticos. Os resultados foram expressos em média em mg/L por grupo $\pm$ desvio padrão. ^{a-b}Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$).

4 DISCUSSÃO

A colite ulcerativa é uma DII caracterizada por lesões inflamatórias no intestino grosso, e o modelo de colite induzida por administração intra-retal de ácido acético é amplamente estabelecido na literatura, causando inflamação não transmural no cólon, além de dano histológico significativo, semelhantes a DII em humanos (Randhawa et al., 2014; Grupa et al., 2018). Considerando que os indivíduos acometidos pela doença necessitam de tratamento ao longo de toda a vida e muitas das terapias disponíveis possuem diversos efeitos colaterais adversos, a busca por alternativas terapêuticas é extremamente relevante (Del Carmen et al., 2017). Tanto o chá verde quanto a kombucha já demonstraram previamente serem eficazes como formas terapêuticas em modelos animais de colite ulcerativa, devido a sua alta concentração de compostos bioativos, apresentando elevada capacidade antioxidante e anti-inflamatória (Pakravan et al., 2019; Liu et al., 2020).

No presente estudo, a indução da colite ulcerativa por ácido acético foi confirmada por meio das análises histológicas, onde observou-se inflamação, dano na cripta e ulceração significativa em todos os grupos induzidos (ácido acético, ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha). No momento da administração intra-retal de ácido acético, observou-se sangramento retal significativo, todavia, não resultou em alterações significativas quanto ao IAD (média de escores inferior a 0,5 em todos os grupos) (Ran et al., 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Sanei et al. (2014), os quais não observaram alterações quanto a sangramento e consistência das fezes ao longo do experimento. Entretanto, outros estudos verificaram aumento significativo no escore de perda de peso, consistência das fezes e sangramento anal em camundongos com colite induzida por ácido acético (Gupta et al., 2018; Wang et al., 2019).

Tanto na análise macroscópica quanto a microscópica do cólon, os animais do grupo ácido acético apresentaram escore inflamatório máximo (3 e 11, respectivamente), com erosão confluyente das criptas, o que indica a presença de colite ulcerativa grave. A ruptura do epitélio intestinal observada pelo extensivo dano as criptas levam ao aumento da permeabilidade intestinal, e bactérias comensais, normalmente inócuas, podem se tornar patogênicas ao cruzar o epitélio e induzir uma resposta imunológica e inflamação intestinal, característicos da colite ulcerativa (Chang, 2019; Pakravan et al., 2019). Os tratamentos com chá verde e kombucha ao longo de 7 dias apresentaram efeito anti-inflamatório significativo ($p < 0,05$) no cólon dos camundongos colíticos, observado pela redução no escore

macroscópico (2, em ambos tratamentos) e no escore microscópico (grupo ácido acético + chá verde (escore 10) e grupo ácido acético + kombucha (escore 9)), com efeito mais expressivo no tratamento com a kombucha. A redução no escore microscópico total ocorreu devido à atenuação no dano as criptas colônicas.

A proteína C reativa é um marcador específico de inflamação de fase aguda, e apresenta meia vida de 19 horas em humanos, podendo ser utilizado de forma eficiente para monitorar a severidade e a resposta ao tratamento na colite ulcerativa (Croft et al., 2022). Segundo Simons et al. (2014), o limite superior dos níveis de PCR em camundongos C57BL/6 saudáveis é de 9 mg/ L, sendo que em humanos, níveis acima de 10 mg/ L é um indicador de colite severa (Lynch et al., 2013). No presente estudo, o grupo colítico que não recebeu tratamento (grupo ácido acético) apresentou elevação significativa da PCR (11,125 mg/ L), indicando inflamação severa, entretanto, os animais colíticos que receberam tratamento (grupo ácido acético + chá verde e ácido acético + kombucha) apresentaram normalização em seus níveis (2,775 e 2,425 mg/ L, respectivamente), atingindo níveis inferiores ao grupo controle (4,875 mg/ L), mas sem diferença significativa ($p > 0,05$). Os grupos controle + chá verde e controle + kombucha também apresentaram redução nos níveis de PCR (2,55 e 2,7 mg/ L, respectivamente) quando comparados ao grupo controle (4,875 mg/ L), apesar de não apresentar diferença significativa ($p > 0,05$). Estes resultados indicam o alto potencial anti-inflamatório tanto do chá verde quanto da kombucha que, além de reduzir este biomarcador inflamatório de forma significativa nos animais com colite ulcerativa, também apresentou pequeno potencial anti-inflamatório nos animais saudáveis.

A ação anti-inflamatória sistêmica e intestinal do chá verde e da kombucha já foram observadas em outros estudos (Al Bitar e Laham, 2013; Pakrvan et al., 2019; Liu et al., 2020). Al Bitar e Laham (2013) verificaram que o tratamento com extrato de chá verde reduziu os danos histológicos causados pelo ácido acético, além de reduzir dos níveis de mieloperoxidase no cólon, que é um marcador de infiltração por neutrófilos e aumentar os níveis da enzima antioxidante Glutathione (GSH). Em modelo de colite ulcerativa induzida por diluição de 3% de dextran sulfato de sódio (DSS) na água de beber dos animais, Liu et al. (2020) observaram que a administração de extrato de chá verde reduziu de forma significativa os danos histológicos e a atividade das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12 e TNF- α plasmáticas, com supressão da ativação de Nf- κ B, e aumentou da citocina anti-inflamatória IL-10. No mesmo estudo, a administração do extrato de chá também exerceu efeito prebiótico na microbiota intestinal dos camundongos, aumentando a abundância de

bactérias potencialmente benéficas, como *Faecalibaculum* e *Bifidobacterium*, e diminuindo a abundância de bactérias potencialmente patogênicas, como *Bacteroides* e *Mucispirillum*, além de restaurar a produção de ácidos gráxos de cadeia curta nas fezes dos animais colíticos, que havia sido suprimida. A administração de galato de epigallocatequina (EGCG) isolado, que é um polifenol presente tanto no chá verde quanto na kombucha, se mostrou eficaz no tratamento da colite ulcerativa, apresentando efeito modulador intestinal observado pelo aumento na abundância de *Akkermansia* e na produção de butirato, além de reduzir o escore histológico (Wu et al., 2021). Em outro estudo, Pakravan et al. (2019) avaliaram o efeito da administração de kombucha filtrada, preparada a partir de chá preto, em camundongos com colite ulcerativa induzida por DSS (3,5%). Observou-se que os animais que receberam tratamento com kombucha tiveram maior taxa de sobrevivência e menor perda de peso, além de melhora de distúrbios digestivos, como sangramento e diarreia, quando comparados a animais com a mesma idade que não receberam tratamento. Após a avaliação histológica e molecular, verificou-se que os animais tratados com kombucha apresentaram redução na extensão do dano na mucosa e melhora significativa na expressão das proteínas zonula occludens (ZO-1 e ZO-2), que são proteínas associadas a integridade das *tight junctions*, resultando na diminuição da permeabilidade intestinal.

No presente estudo, a kombucha apresentou atividade restaurativa da mucosa intestinal superior ao chá verde, segundo a avaliação histológica, reduzindo o dano às criptas intestinais e restaurando as células caliciformes, que são importantes secretoras de muco protetor, contribuindo para a integridade das *tigh junctions*. Além do elevado conteúdo fenólico, a presença de ácidos orgânicos exclusivamente na kombucha, como o ácido glicurônico, ácido glucônico, ácido acético e ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL) conferem à bebida potencial antimicrobiano, antioxidante, detoxificante, e aumentam a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na mesma (Antolak et al., 2021). Saluk-Juszczak et al. (2008) verificaram atividade antioxidante significativa do DSL, apresentando redução da peroxidação lipídica plaquetária e de lipídios plasmáticos. Shen et al. (2016) avaliaram os efeitos terapêuticos preventivos do ácido acético (0,3%), concentração similar ao encontrado na kombucha (Cardoso, 2020), diluído na água de beber de camundongos por 28 dias previamente à indução da colite ulcerativa por DSS (3%). Como resultado, observou-se por meio de análise histológica que os animais que receberam o pré-tratamento com ácido acético apresentaram redução no dano às criptas, na perda de células caliciformes, na infiltração de células mononucleares e na gravidade dos danos à mucosa

colônica, assim como encontrado no presente estudo, além de redução do IAD e da expressão de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-17A, INF- γ , IL-12/IL-23p40) no cólon. No mesmo estudo, previamente a indução da colite, observou-se aumento nos níveis de bactérias comensais ácido lácticas e ácido acéticas, como *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e *Enterococcus faecalis*, ao mesmo tempo que ocorreu diminuição dos níveis de *Escherichia coli* nas fezes dos animais que estavam no grupo que recebeu o pré-tratamento com ácido acético (0,3%), mostrando potencial efeito modulador da microbiota intestinal (Shen et al., 2016). Portanto, a presença dos ácidos orgânicos presentes na kombucha podem acrescer ao potencial medicinal exercido pelos compostos fenólicos presentes na mesma, sendo o principal diferencial terapêutico frente ao chá verde.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados, observou-se que os tratamentos com chá verde e kombucha exerceram potencial terapêutico anti-inflamatório frente ao modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético em camundongos. Ambos tratamentos apresentaram redução significativa nos escores macroscópico e microscópico do cólon, com efeito mais expressivo sendo observado no grupo que recebeu tratamento com kombucha, apresentando maior redução nos danos as criptas e maior restauração das células caliciformes no cólon. Acredita-se que esse efeito superior possa ser atribuído a concentração de ácidos orgânicos, além do conteúdo fenólico que também é encontrado no chá não fermentado. Entretanto, mais estudos comparativos são necessários, para verificar o potencial terapêutico destas bebidas na colite ulcerativa, assim como a necessidade de estudos clínicos que avaliem a eficácia e a segurança destes tratamentos.

É importante destacar ainda que, estão sendo realizadas análises de identificação da Mieloperoxidase colônica (MPO), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressão gênica de citocinas inflamatórias no tecido cólon, para complementar os dados deste estudo.

REFERÊNCIAS

AL BITAR, V.; LAHAM, S. Methylsulfonylmethane and green tea extract reduced oxidative stress and inflammation in an ulcerative colitis. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, V. 6, P. 153-158, 2013.

AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. aY. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.

AMBALAM, P. et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119–131, 2016.

ANTOLAK, H.; PIECHOTA, D.; KUCHARSKA, A. Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). **Antioxidants (Basel)**, v. 10, p. 1541-1561, 2021.

BARBALHO S.; BOSSO, H.; SALZEDAS-PESCININI, L.; GOULART, R. Green tea: A possibility in the therapeutic approach of inflammatory bowel diseases?: Green tea and inflammatory bowel diseases. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 43, p. 148-153, 2019.

BHATTACHARYA, D.; BHATTACHARYA, S.; PATRA, M. M.; CHAKRAVORTY, S.; SARKAR, S.; CHAKRABORTY, W.; HEMANTA, K.; GACHHUI, R. Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 885–896, 2016.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P, C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328-340, 2013.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. **Pathophysiology**, v. 18, p. 221–234, 2011.

CABRERA, C.; ARTACHO, R., GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.

CARDOSO, R.; NETO, R.; D'ALMEIDA, C.; PIMENTA DO NASCIMENTO, T.; PRESSETE, C.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H.; CAMERON, L.; FERREIRA, M.; BARROS, F. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food research international**, v. 128, p. 108782, 2020.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, n. 2, p. 63-72, 2016.

CHANDRA, N.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, S. Bacterial biofilms in human gastrointestinal tract: An intricate balance between health and inflammatory bowel diseases. **World Journal of Pharmacology**, v. 8, p. 26-40, 2019.

CHANG, JT. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. **N Engl J Med**, v. 383, p. 2652-2664, 2020.

COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. 2004. [Acesso 2017 dez 29]. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>.

CROFT, A.; LORD, A.; RADFORD-SMITH, G. Markers of systemic inflammation in acute attacks of ulcerative colitis: What level of C-reactive protein constitutes severe colitis?. **Journal of Crohn's & colitis**, jjac014, 2022.

DEL CARMEN, S. et al. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 122–129, 2017.

DEROCHE, T. C.; XIAO, S.; LIU, X. Histological evaluation in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 2, n. 3, p. 178-192, 2014.

EL-ABHAR, H. S.; HAMMAD, L.; GAWAD, H. S. A. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 367-72, 2008.

GIL-MARTÍNEZ, A. L.; ESTRADA, C.; CUENCA, L.; CANO, J. A.; VALIENTE, M.; MARTÍNEZ-CÁCERES, C. M.; FERNÁNDEZ-VILLALBA, E.; HERRERO, M. T. Local Gastrointestinal Injury Exacerbates Inflammation and Dopaminergic Cell Death in Parkinsonian Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 4, p. 418-930, 2019.

GUPTA, RA.; MOTIWALA, MN.; MAHAJAN, UN.; SABRE, SG. Protective effect of *Sesbania grandiflora* on acetic acid induced ulcerative colitis in mice by inhibition of TNF- α and IL-6. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 222–232, 2018.

HEAD, K. A.; JURENKA, J. S. Inflammatory bowel disease part I: ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 247–83, 2003.

HERING, N. A.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 5, p. 1035-44, 2012.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and

potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

KING, D., REULEN, R. C., THOMAS, T., CHANDAN, J. S., THAYAKARAN, R., SUBRAMANIAN, A., GOKHALE, K., BHALA, N., NIRANTHARAKUMAR, K., ADDERLEY, N. J., & TRUDGILL, N. Changing patterns in the epidemiology and outcomes of inflammatory bowel disease in the United Kingdom: 2000-2018. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 51, p. 922–934, 2020.

KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds, **Food Research International**, v. 43, p. 167-176, 2010.

KORNBLUTH, A. e SACHAR, D. B. Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 3, p. 501–523, 2010.

LARNER, D. P.; JENKINSON, C.; CHUN, R. F.; WESTGATE, C. S. J.; ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Free versus total serum 25-hydroxyvitamin D in a murine model of colitis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 189, p. 204-209, 2019.

LAROUÏ, H.; INGERSOLL, S. A.; LIU, H. C. et al. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-12, 2012.

LEAL, J.; SYÁREZ, L.; JAYABALAN, R.; OROS, J.; ESCALANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

LIU, Y.; WANG, X.; CHEN, Q.; LUO, L.; MA, M.; XIAO, B.; ZENG, L. *Camellia sinensis* and *Litsea coreana* Ameliorate Intestinal Inflammation and Modulate Gut Microbiota in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64 (6), p. 17-27, 2020.

LYNCH, RW.; LOWE, D.; PROTHEROE, A.; DRISCOLL, R.; RHODES, JM.; ARNOTT, ID. Outcomes of rescue therapy in acute severe ulcerative colitis: data from the United Kingdom inflammatory bowel disease audit. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 38, p. 935–945, 2013.

NARULA, N.; WONG, ECL.; DEHGHAN, M.; MENTE, A.; RANGARAJAN, S.; LANAS, F.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; ROHATGI, P.; LAKSHMI, PVM.; VARMA, RP.; ORLANDINI, A.; AVEZUM, A.; WIELGOSZ, A.; POIRIER, P.; ALMADI, MA.; ALTUNTAS, Y.; NG KK.; CHIFAMBA, J.; YEATES, K.; PUOANE, T.; KHATIB, R.; YUSUF, R.; BOSTRÖM, KB.; ZATONSKA, K.; IQBAL, R.; WEIDA, L.; YIBING, Z.; SIDONG, L.; DANS, A.; YUSUFALI, A.; MOHAMMADIFARD, N.; MARSHALL, JK.; MOAYYEDI, P.; REINISCH, W.; YUSUF, S. Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: prospective cohort study. **BMJ**, v. 374, n. 1554, 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for care and use of laboratory animals**. 8^a ed.. Washington: The National Academies Press, 2011.

OSTANIN, D. V.; BAO, J.; KOBOZIEV, I.; GRAY, L.; ROBINSON-JACKSON, S. A.; KOSLOSKI-DAVIDSON, M.; PRICE, V. H.; GRISHAM, M. B. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. **American Journal of Physiology**, v. 296, n. 2, p. 135-146, 2009.

PAKRAVAN, N.; KERMANIAN, F.; MAHMOUDI, E. Filtered Kombucha tea ameliorates the leaky gut syndrome in young and old mice model of colitis. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 22, p. 1158–1165, 2019.

RAN, ZH.; CHEN, C.; XIAO, SD. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates rats colitis induced by acetic acid. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 189-196, 2008.

RANDHAWA, P.K.; SINGH, K.; SINGH, N.; JAGGI, A.S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean journal of physiology & pharmacology**, v. 18, p. 279–288, 2014.

SALUK-JUSZCZAK, J., OLAS, B., NOWAK, P., STAROŃ, A., & WACHOWICZ, B. Protective effects of D-glucaro-1,4-lactone against oxidative modifications in blood platelets. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, v. 18, p. 422–428, 2008.

SANEI, M. H.; HADIZADEH, F.; ADIBI, P.; ALAVI, S. A. Inflammatory cells' role in acetic acid-induced colitis. **Advanced biomedical research**, v. 3, 193, 2014.

SILVA, M. A.; JURY, M.; PORRAS, M.; VERGARA, P.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial barrier dysfunction and dendritic cell redistribution during early stages of inflammation in the rat: role for TLR-2 and -4 blockage. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 5, p. 632-44, 2008.

SIMONS, JP.; LOEFFLER, JM.; AL-SHAWI, R.; ELLMERICH, S.; HUTCHINSON, WL.; TENNENT, GA.; PETRIE, A.; RAYNES, JG.; DE SOUZA, JB.; LAWRENCE, RA.; READ, KD.; PEPYS, MB. C-reactive protein is essential for innate resistance to pneumococcal infection. **Immunology**, v. 142, p. 414–420, 2014.

SHEN, F.; FENG, J.; WANG, X.; QI, Z.; SHI, X.; AN, Y.; ZHANG, Q.; WANG, C.; LIU, M.; LIU, B.; YU, L. Vinegar Treatment Prevents the Development of Murine Experimental Colitis via Inhibition of Inflammation and Apoptosis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, p. 1111–1121, 2016.

SHOUVAL, D. S.; RUFO, P. A. The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 10, p. 999-1005, 2017.

TOPAL, F.; YONEM, O.; TUZCU, N.; TUZCU, M.; ATASEVEN, H.; AKYOL, M. (2014). Strontium Chloride: Can It Be a New Treatment Option for Ulcerative Colitis? **BioMed Research International**, p. 1–5, 2014.

WANG, G.; XU, B.; SHI, F.; DU, M.; LI, Y.; YU, T.; CHEN, L. Protective Effect of Methane-Rich Saline on Acetic Acid-Induced Ulcerative Colitis via Blocking the TLR4/NF- κ B/MAPK Pathway and Promoting IL-10/JAK1/STAT3-Mediated Anti-inflammatory Response. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, ID. 7850324, 2019.

WANG, R.; LUO, Y.; LU, Y.; WANG, D.; WANG, T.; PU, W.; WANG, Y. Maggot Extracts Alleviate Inflammation and Oxidative Stress in Acute Experimental Colitis via the Activation of Nrf2. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, ID. 4703253, 2019.

Wu, Z.; Huang, S.; Li, T.; Li, N.; HAN, D.; ZHANG, B.; et al. Gut microbiota from green tea polyphenol-dosed mice improves intestinal epithelial homeostasis and ameliorates experimental colitis. **Microbiome**, v. 9, p. 184, 2021.

XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, p. 427-434, 2007.