

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Avaliação imunológica promovida pelo consumo de kombucha em
camundongos diabéticos**

Caroliny de Almeida Souza

Dissertação para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Cristina
Stewart Bittencourt Bogsan

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Avaliação imunológica promovida pelo consumo de kombucha em
camundongos diabéticos**

Caroliny de Almeida Souza

Dissertação para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Versão Original

Orientadora: Profa. Dra. Cristina
Stewart Bittencourt Bogsan

São Paulo

2019

Caroliny de Almeida Souza

**Avaliação imunológica promovida pelo consumo de kombucha em
camundongos diabéticos**

Comissão Julgadora da dissertação para
obtenção do título de Mestre em Ciências:

Orientadora/Presidente: Profa. Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S729a Souza, Caroliny de Almeida
Avaliação imunológica promovida pelo consumo de kombucha em camundongos diabéticos / Caroliny de Almeida Souza -- São Paulo, 2019.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt

1. Tecnologia de alimentos 2. Alimentos funcionais 3. Inflamação. 4. Diabetes Mellitus. I. T. II. Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt, orientador.

664 CDD

RESUMO

SOUZA, C. A. **Avaliação imunológica promovida pelo consumo de kombucha em camundongos diabéticos.** 2019. 75p. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O kombucha é uma bebida fermentada tradicional, originária da China, preparada pela fermentação de chá preto adoçado com cultura mista de bactérias e leveduras chamada *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY)*. Tem sido alegado que o mesmo possui propriedades funcionais, tais como recuperação ou manutenção de peso corporal, atividade antihiperlipidêmica, entre outras. Por não existirem estudos suficientes que as comprovem, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do consumo de kombucha como tratamento alternativo para amenizar e/ou retardar sintomas e complicações do *Diabetes Mellitus* e identificar as possíveis modificações metabólicas, morfológicas e imunológicas ocorridas em camundongos com diabetes tipo 1. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que, apesar de ter havido recuperação de massa corpórea próxima daquela que se tinha antes da indução da diabetes, esse efeito não foi exclusivo do kombucha e, embora a influência no controle glicêmico tenha sido maior nos camundongos normoglicêmicos que diabéticos, acredita-se que a administração por um período prolongado pudesse indicar melhores resultados, uma vez que as avaliações histológicas e morfométricas do intestino demonstraram resultados satisfatórios quanto ao aumento da superfície de mucosa e diminuição do infiltrado inflamatório, favorecendo a modulação imunológica. Logo, considera-se necessária a realização de mais trabalhos para comprovação da capacidade funcional do kombucha e elucidação de sua eficácia enquanto tratamento exclusivo e/ou complementar do diabetes.

Palavras-chave: Alimento funcional; inflamação; DM tipo 1.

ABSTRACT

SOUZA, C. A. **Immunologic evaluation promoted by the consumption of kombucha in diabetic mice.** 2019. 75p. Dissertation to obtain the title of Master in Sciences – Department of Pharmaceutical and Biochemical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Kombucha is a traditional Chinese fermented beverage prepared by fermenting sweetened black tea with mixed bacterial and yeast culture called Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY). It has been claimed that it has functional properties such as body weight recovery or maintenance, antihyperglycemic activity, among others. Because there are not enough studies to prove them, this study aimed to evaluate the influence of kombucha consumption as an alternative treatment to alleviate and/or delay symptoms and complications of *Diabetes Mellitus* and to identify possible metabolic, morphological and immunological changes in mice with type 1 diabetes. According to the results obtained, it was observed that, although there was a recovery of body mass close to the one obtained before diabetes induction, this effect was not unique to kombucha, and although the influence on glycemic control was greater in normoglycemic rather than diabetic mice, it is believed that administration over a prolonged period could indicate better results, since histological and morphometric evaluations of the intestine showed satisfactory results in terms of mucosal surface enlargement and decreased inflammatory infiltrate, favoring immune modulation. . Therefore, further work is considered necessary to prove the functional capacity of kombucha and to elucidate its effectiveness as an exclusive and / or complementary treatment of diabetes.

Keywords: Functional food; inflammation; type 1 DM.

O presente trabalho foi realizado parcialmente com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 1748593, pelo período de Setembro de 2018 a Fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Revisão bibliográfica	14
1.1.1	A <i>Diabetes Mellitus</i> (DM)	14
1.1.2	As alterações metabólicas, morfológicas e imunológicas na diabetes tipo 1.....	15
1.1.3	O interesse pela medicina complementar e alternativa	17
1.1.4	A relação entre fermentados tradicionais e alimentos funcionais	19
1.1.5	O kombucha	21
1.1.6	Os potenciais efeitos funcionais do kombucha.....	24
1.1.6.1	Capacidade antihiperlipidêmica.....	24
1.1.6.2	Recuperação ou manutenção de peso corporal	25
1.1.6.3	Capacidade antioxidante	25
1.1.6.4	Proteção hepática.....	26
1.1.6.5	Proteção renal	27
1.1.6.6	Proteção pancreática.....	28
1.1.6.7	Proteção cardiovascular	29
1.2	Justificativa	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	Geral.....	31
2.2	Específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Análises do produto	32
3.1.1	Análise prévia	32
3.1.2	Análises físico-químicas	33
3.1.2.1	Acidez total titulável.....	34
3.1.2.2	Densidade	35
3.1.2.3	Resíduo seco.....	35
3.1.2.4	Sólidos solúveis.....	36
3.1.2.5	Teor alcoólico	36
3.1.2.6	Cinética de acidificação.....	36
3.2	Análises dos animais	37

3.2.1	Aspectos macroestruturais	40
3.2.1.1	Descrição macromorfométrica e qualitativa.....	40
3.2.1.2	Volume	42
3.2.1.3	Variância devido a amostragem uniforme e sistematicamente aleatória (SURS)	43
3.2.2	Aspectos microestruturais	44
3.3.2.1	Estudo histológico	44
3.3.2.1.1	Densidade do volume.....	44
3.3.2.1.2	Volume total	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Análises do produto.....	46
4.1.1	Análise prévia	46
4.1.2	Análises físico-químicas	48
4.2	Análises dos animais.....	53
4.2.1	Massa corpórea.....	53
4.2.2	Glicemia.....	55
4.3	Análises histológicas	57
4.3.1	Estudo histológico qualitativo	58
4.3.2	Aspectos macroestruturais	61
4.3.3	Aspectos microestruturais	61
4.3.3.1	Densidade do volume	61
4.3.3.2	Volume total.....	62
4.3.3.3	Área total de superfície de mucosa	63
5	CONCLUSÃO	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7	ANEXO.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de produção do kombucha.

Figura 2. Delineamento da composição e acondicionamento do kombucha em análise prévia.

Figura 3. Delineamento experimental dos animais.

Figura 4. Análise prévia do perfil de acidificação do kombucha por 28 dias.

Figura 5. Cinética de acidificação do kombucha por período de 14 dias ($P < 0,05$; $R^2 = 0,9888$).

Figura 6. Ganho de peso (g) médio dos animais normoglicêmicos.

Figura 7. Ganho de peso (g) médio dos animais diabéticos.

Figura 8. Glicemia (mg/dL) média dos animais normoglicêmicos.

Figura 9. Glicemia (mg/dL) média dos animais diabéticos.

Figura 10. A - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal normoglicêmico; B - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético.

Figura 11. A - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu água ao longo de todo o período experimental; B - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu chá preto ao longo de todo o período experimental; C - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu kombucha ao longo de todo o período experimental.

Figura 12. A - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu chá ao longo de todo o período experimental; B - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu kombucha ao longo de todo o período experimental.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de acidificação de kombucha com ou sem líquido starter e exposto ou não à luz por período de 28 dias.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros físico-químicos de chá preto e kombucha. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 3. Tabela de diferenças completa referente à cinética de acidificação do kombucha por período de 14 dias.

Tabela 4. Identificação dos grupos com suas respectivas siglas São Paulo, 2019.

Tabela 05. Parâmetros macromorfométricos de peso, comprimento e volume; valores de cada parâmetro foram expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Tabela 6. Parâmetros macromorfométricos do intestino. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida de seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Tabela 7. Parâmetros macromorfométricos de densidade do intestino. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida de seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Tabela 8. Parâmetros morfoquantitativos de área total de superfície da mucosa (SA) do intestino. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida de seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

LISTA DE ANEXO

Anexo A. Ficha do Aluno, emitida pela Plataforma Janus.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as funções da microbiota já descritas na literatura, destaca-se a de integridade da barreira intestinal, viabilizando a homeostase metabólica, além de fortalecer o sistema imunológico do hospedeiro, protegendo contra doenças infecciosas. Dito isso, as doenças metabólicas tiveram ampliadas as suas possibilidades de tratamento, como por exemplo por meio da modificação da microbiota no *Diabetes Mellitus* (DM) (Bezerra et al., 2016).

Essa modificação pode ocorrer por meio do uso de probióticos que, por definição, são microrganismos que quando consumidos em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro (Badaró et al., 2008; Marsh et al., 2014).

Estudos experimentais mostram possíveis efeitos benéficos do uso de probióticos na prevenção e no tratamento da DM, possivelmente por meio da modulação da microbiota intestinal, da resposta imune e de outros mecanismos. Todavia, a verificação da eficácia do uso de probióticos no controle glicêmico de indivíduos diabéticos é complexa, devido a fatores que influenciam a microbiota intestinal, tais como: o uso de fármacos, a composição corporal, o balanço energético, a alimentação, o metabolismo dos carboidratos, a secreção de insulina e outros hormônios intestinais (Bezerra et al., 2016).

Diante da importância de se prevenir complicações crônicas associadas a DM e da necessidade de fortalecer estratégias terapêuticas alternativas no intuito de beneficiar o paciente diabético favorecendo o controle de peso, glicemia, entre outros; o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência do consumo de kombucha como tratamento alternativo para amenizar e/ou retardar sintomas e complicações do *Diabetes Mellitus* e identificar as possíveis modificações metabólicas, morfológicas e imunológicas ocorridas em camundongos com diabetes tipo 1.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 A *Diabetes Mellitus* (DM)

A *Diabetes Mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, caracterizada pela ausência de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer suas funções. Se caracteriza pelo aumento dos níveis séricos de glicose e também de outras importantes alterações metabólicas (Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD, 2016).

É um dos principais problemas de saúde pública da atualidade, de elevada prevalência populacional, alto custo no tratamento e sérias consequências. Segundo pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2016), entre 2006 e 2016, houve aumento de 61,8% de brasileiros diagnosticados com diabetes (passando de 5,5% para 8,9% da população).

A classificação da DM inclui diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos, sendo as mais comuns diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2 (Gross et al., 2002).

A diabetes tipo 1, presente em 5% a 10% dos casos, acomete com mais frequência crianças e adolescentes. É caracterizada pela destruição das células beta (β) do pâncreas, causando deficiência absoluta na produção de insulina, o que torna a pessoa que possui a doença dependente de insulina exógena. Pode ser resultado de processo autoimune ou de causa desconhecida (idiopática). Já a diabetes tipo 2, presente em 90% a 95% dos casos, acomete com mais frequência adultos. É caracterizada por falhas na secreção e ação da insulina e, em geral, se apresentam quando há ocorrência de hiperglicemia; porém pode haver predomínio de um deles, e nem sempre a pessoa que possui a doença torna-se dependente de insulina exógena (Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD, 2016).

Os termos "insulino-dependente" e "não insulino-dependente" anteriormente atribuídos respectivamente aos tipos 1 e 2 de diabetes não são mais utilizados (Gross et al., 2002).

O tratamento básico e o controle da doença consistem, primordialmente, na mudança do estilo de vida, adotando uma alimentação saudável e prática de atividade física regular, além do uso adequado da medicação, caso seja necessário. Contudo, há a necessidade de engajamento ao tratamento, no sentido de mudar comportamentos usualmente realizados nas atividades de vida diária (Cox & Gonder, 1992; SBD, 2016).

Essa adesão ao tratamento em pacientes crônicos, abrange a relação comportamental da pessoa e o aconselhamento dado pelo profissional da saúde, levando em consideração três estágios, são eles: (i) concordância, em que o paciente concorda inicialmente com o tratamento e segue as recomendações realizadas pelos profissionais de saúde, que o supervisiona de forma frequente e muitas vezes resulta em elevada eficácia do tratamento; (ii) adesão, em que há transição entre a assistência prestada pelos profissionais de saúde, que passam a realizar acompanhamento limitado, e responsabilização pelo autocuidado, implicando em participação ativa do paciente para com o tratamento; (iii) manutenção, em que o paciente, já sem vigilância (ou vigilância limitada), incorpora o tratamento em sua vida, ampliando seu autocontrole sobre os novos comportamentos (Assunção & Ursine, 2008).

A cronicidade da doença, as características de seu tratamento e a postura passiva frente a ele, podem contribuir para a baixa adesão comumente encontrada nos diabéticos (Cox & Gonder, 1992).

1.1.2 As alterações metabólicas, morfológicas e imunológicas na diabetes tipo 1

A Diabetes Mellitus está diretamente relacionada a problemas nas células β e na insulina. Na diabetes tipo 1, há uma redução da massa de células β devido à destruição autoimune das mesmas, levando a uma deficiência total de insulina

que pode progredir para estados de hiperglicemia e cetoacidose graves. No entanto, as células restantes das Ilhotas de Langerhans não são afetadas, havendo uma produção excessiva de glucagon, o que contribui também para o desencadeamento de hipoglicemia, dificultando o controle glicêmico (Fernandes, 2013).

Os processos metabólicos e as inter-regulações dos tecidos nos estados de jejum e pós-prandial sofrem alterações, podendo provocar os sintomas e complicações associados à doença. Na diabetes tipo 1, os tecidos e o metabolismo têm o mesmo comportamento que no estado de jejum (catabólico), com o objetivo de obter energia, apesar de haver fontes de aporte energético suficientes ou em excesso a partir da absorção no intestino. Assim, uma vez que o organismo reage como se estivesse sempre no estado de jejum devido à falta de produção de insulina, há um grande gasto dos tecidos e conseqüentemente possibilidade de perda de peso importante e prejuízos no estado nutricional (Fernandes, 2013).

Além das modificações metabólicas relatadas, diferentes estudos demonstram alterações morfológicas e funcionais do intestino na evolução do diabetes.

Maiores quantidades de mucosa, submucosa e camada muscular externa são observadas em trabalhos com animais diabéticos, além de expressivo aumento de volume e altura das criptas e microvilosidades, proporcionais às fases de desenvolvimento do animal. No intestino diabético, a hipertrofia ou hiperplasia epitelial ocorre nos estágios iniciais da doença antes do desenvolvimento da hiperglicemia em jejum, principalmente nas porções proximais do intestino (Okamoto et al., 2014).

Diferentes teorias tentam sugerir uma hipótese para o evento hiperplásico intestinal, como a sugerida por Santoro (2008) de que o tubo digestivo não está preparado para as grandes alterações que ocorreram nos nossos hábitos de vida nos últimos séculos: atividade social intensa, sedentarismo e acesso a alimentos de fácil absorção e altamente calóricos. Alimentos refinados, pobres em fibras, associados a um epitélio hiperabsortivo, deixariam o intestino distal “vazio”. A

consequência mais importante do intestino distal hipoestimulado seria uma menor estimulação das células L intestinais, secretoras de enterohormônios incretínicos. As incretinas são importantes para a homeostase glicêmica, já que incrementam a secreção de insulina pelo pâncreas. Sabe-se que diabéticos tem menores concentrações de GLP-1 plasmático, principal incretina do nosso organismo. A baixa concentração do enterohormônio, dentre outras causas, pode ser resultado de uma maior capacidade absorptiva do intestino proximal diabético, devido, por exemplo, pela maior expressão de transportadores de monossacarídeos SGLT1, GLUT5, GLUT2 na mucosa intestinal diabética.

Sabe-se também que a mediação dos processos imunológicos e inflamatórios em animais diabéticos é prejudicada, por exemplo, pela deficiência de macrófagos e, conseqüentemente, de produção de óxido nítrico, importante sinalizador intra e extracelular, contribuindo para o aumento de liberação das citocinas por células fagocíticas, que apesar de ser importante para reagir a agentes e/ou bactérias patogênicas, mantendo o estado de inflamação da mucosa intestinal controlado, a liberação exacerbada pode acarretar em danos significativos aos tecidos e órgãos do corpo (Wu et al., 2013; Monteleone et al., 2002).

Dito isso, observa-se que os fatores metabólicos, morfológicos e imunológicos estão conectados como uma grande rede de fundamental importância tanto para os homens como para os animais, sejam eles sadios ou enfermos, e que podem ser influenciados tanto negativamente (por doenças como a diabetes, prejudicando a homeostase), como positivamente (por alimentos com capacidade funcional, no sentido de alterar a microbiota intestinal e contribuir para a saúde geral) (Maciel et al., 2016).

1.1.3 O interesse pela medicina complementar e alternativa

A falta de adesão ao tratamento farmacológico tradicional em portadores de DM parece estar estreitamente associada à fatores demográficos, socioeconômicos, educacionais, suporte social, saúde, percepção da doença e

realização de outros tratamentos terapêuticos alternativos, como a medicina complementar e alternativa.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1962, “medicina alternativa” é caracterizada por uma prática de medicina tecnologicamente despojada, aliada a saberes médicos tradicionais, sendo “alternativa” àquela contemporânea, no intuito de solucionar os problemas de adoecimento de grandes grupos populacionais do mundo sem acesso à saúde. Depois, passou a designar práticas terapêuticas diversas da medicina científica, habitualmente adversas a essa medicina (Luz, 2005).

Hoje em dia, a medicina complementar e alternativa é entendida como um conjunto de sistemas, práticas e produtos de uso clínico que, embora não seja considerada como prática médica convencional, apresenta reconhecida eficácia pela comunidade científica. São exemplos de medicina alternativa: medicina chinesa, uso de ervas medicinais, homeopatia, técnicas de relaxamento terapêutico, suplementos vitamínicos, além de dietas especiais (Leal, Schwartzmann & Lucas, 2008).

As mudanças nas necessidades e valores na sociedade moderna em geral são refletidas diante do aumento da popularidade da medicina complementar e alternativa, uma vez que há crescimento de doenças crônicas e maiores acessos a informações de saúde - e interesse por elas -, despertando a consciência de direito a qualidade de vida (Rodrigues Neto, Faria & Figueiredo, 2009).

Ao passo que o conhecimento sobre os componentes fisiologicamente ativos dos alimentos - tanto de origem vegetal como animal - torna-se maior, muda-se o entendimento do papel da dieta sobre a saúde (American Dietetic Association - ADA, 2004).

Este fato faz com que, cada vez mais, expressões como qualidade de vida e alimentação saudável atraiam a atenção de pessoas de diferentes idades, classes sociais e graus de instrução. De igual modo, desperte o interesse a possibilidade de desenvolver estilo de vida saudável, privilegiando a alimentação

e a educação nutricional, pilares importantes na construção e manutenção da saúde.

Hoje em dia, os alimentos funcionais destacam-se pelas propriedades benéficas e específicas que possuem, além das propriedades nutricionais básicas, devido a presença de componentes com a capacidade de regular funções corporais, auxiliando na proteção contra doenças (Moraes & Colla, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem a função de estabelecer as diretrizes para a utilização de alegação funcional e as condições de registro dos alimentos funcionais. Essas alegações podem estar associadas à presença de ácidos graxos, carotenoides, fibras alimentares, fitoesteróis, polióis, além de microorganismos probióticos (Stringheta et al., 2007).

Se o interesse pela nutrição aumenta, a oferta de alimentos saudáveis também, como demonstra a resposta da indústria alimentícia à demanda do consumidor. Atualmente, a gama de alimentos funcionais disponíveis tem crescido muito, tornando-se essencial o (i) interesse da comunidade científica em produzir estudos com o objetivo de comprovar a atuação de alguns alimentos na redução do risco de certas doenças, (ii) o incentivo às pesquisas de novos componentes naturais e de desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado para estes ingredientes; (iii) a fiscalização ativa dos órgãos responsáveis para garantir respaldo ao consumidor, protegendo a saúde dos mesmos; e (iv) a orientação adequada sobre esses alimentos e ingredientes, pelos profissionais da saúde (Thamer & Penna, 2006).

1.1.4 A relação entre fermentados tradicionais e alimentos funcionais

A gastronomia expressa a identidade cultural de um povo, ou seja, ela tem o poder de conectá-lo do mundo subjetivo ao mundo social, refletindo o sentimento de pertencimento a um espaço. Ela envolve um conjunto de saberes

e fazeres específicos, chamados conhecimentos tradicionais, que são transmitidos de geração em geração, tornando-se um patrimônio cultural.

As ferramentas, técnicas de preparação, ingredientes e formas de consumo dos alimentos fornecem informações valiosas sobre uma comunidade, já que abrangem significados de realidade atual e histórica, formando conexões com a construção étnica dos indivíduos (Ronchetti & Müller, 2016).

Fazem parte da identidade cultural e gastronômica de certas populações os alimentos fermentados tradicionais, que são alimentos considerados vivos, ou seja, ricos em microrganismos.

Atualmente, os alimentos fermentados tradicionais têm despertado o interesse tanto da população em geral, principalmente pelo fato de estarem associados à saúde e qualidade de vida e possuírem potenciais elevados de funcionalidade; como das indústrias, que os exploram para o desenvolvimento de novos produtos (Bogsan, Nero & Todorov, 2015).

Os alimentos fermentados tradicionais, se encaixam na definição de alimentos funcionais, quando associados à benefícios à saúde. Dentre os alimentos funcionais, encontram-se os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos (Bogsan, Nero & Todorov, 2015).

Alimentos probióticos são aqueles que apresentam microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde de quem os consome (Hills et al., 2014; Marsh et al., 2014). Os prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microrganismos do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde. Já o produto referido como simbiótico é aquele no qual probióticos e prebióticos apresentam-se combinados (Raizel et al., 2011).

O aumento mundial na comercialização e consumo de produtos que contenham bactérias ou leveduras viáveis, como por exemplo o kombucha, é reflexo do maior interesse pelos efeitos benéficos desses microrganismos à saúde humana (Medeiros & Cechinel-Zanchett, 2019).

1.1.5 O kombucha

O kombucha é uma bebida tradicional, originária da China, preparada pela fermentação de chá preto adoçado com cultura mista de bactérias e leveduras chamada *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY)* (Yang et al., 2008).

A composição do SCOBY varia de acordo com sua origem, mas foram identificados em análise de sequenciamento de diversas amostras a predominância de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (>85%) e de leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* (>95% das culturas analisadas) (Marsh et al., 2014).

A fermentação promovida pela cultura simbiótica incorporada na matriz celulósica permite a formação de uma nova camada fresca a cada fermentação bem-sucedida, podendo a película que dá origem às outras, ser chamada de “mãe” (Marsh et al., 2014).

Existem diferenças entre as fermentações do kombucha. No início, é feita a “fermentação zero”. A partir dela, é feita a “primeira fermentação”, com a utilização de uma porção do líquido da fermentação anterior. Essa fermentação dará origem ao líquido starter (fermentação aeróbia), e então, as fermentações subsequentes utilizarão parte desse líquido starter (fermentação anaeróbia) tanto para regular a acidez do produto, otimizando o tempo de fermentação; como para evitar a contaminação por microrganismos patogênicos, preservando um ambiente saudável. Geralmente, a partir da “segunda fermentação” que o kombucha é saborizado (de forma opcional, com diferentes frutas e especiarias) e produz maior quantidade de gás.

As quantidades de chá, açúcar e microrganismos diferem em cada lugar. O procedimento padrão segundo Jayabalan et al. (2014), está brevemente descrito: (i) ferver 1 litro de água de torneira; (ii) durante a ebulição acrescentar 50g de sacarose; (iii) acrescentar 5 gramas de folhas de chá e removê-las por filtração após 5 minutos; (iv) despejar o líquido num recipiente esterilizado com água fervente; (v) esperar até que o líquido arrefeça à temperatura ambiente (20°C), (vi) acrescentar 24 gramas de *SCOBY* no recipiente; (vii) cobri-lo com uma toalha de papel para protegê-lo contra os insetos.

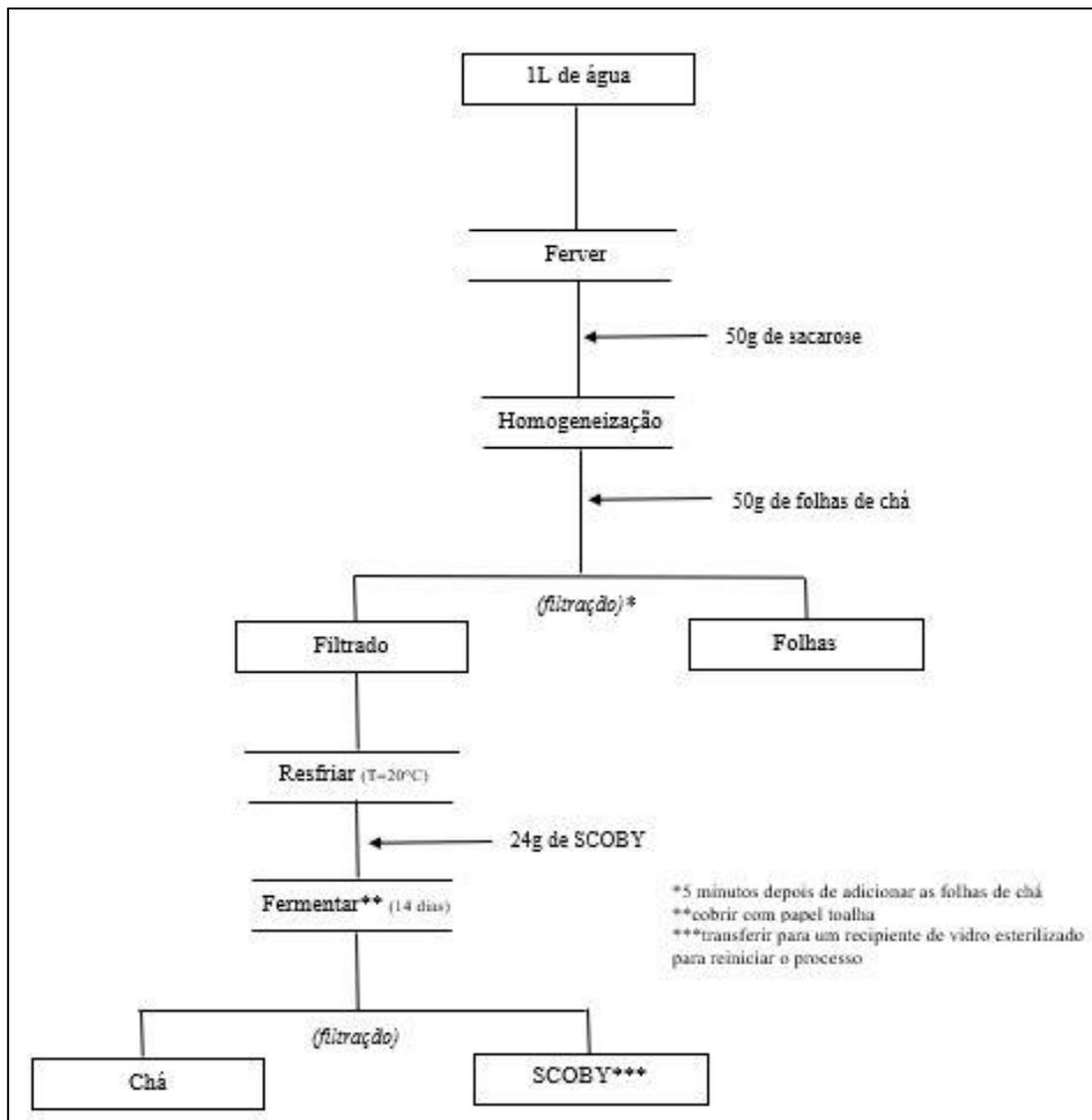


Figura 1. Fluxograma de produção do kombucha.

Em virtude dos benefícios promissores para a saúde revelados em estudos iniciais (Jayabalan et al., 2014), a procura e o consumo do kombucha aumentaram, e já existem alguns produtos sendo comercializados, como kombucha envasado e até mesmo o próprio SCOBY.

Entretanto, fica proibido o uso no rótulo do kombucha expressões como: artesanal, caseira, familiar, bebida viva, bebida probiótica, bebida milenar, elixir, elixir da vida, energizante, revigorante, especial, premium, dentre outras que atribuam características de qualidades superlativas e propriedades funcionais ainda não aprovadas em legislação específica, já que a comprovação científica

pré-mercado da segurança e funcionalidade de alimentos no Brasil seja uma exigência legal da ANVISA, conforme Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes, com o objetivo de proteger a saúde da população, reduzir os riscos associados ao consumo desses produtos e não induzir o consumidor ao engano (ANVISA, 2013; MAPA, 2019).

Há evidências bem fundamentadas da relação entre a qualidade da alimentação e os riscos de desenvolver a DM (Sartorelli & Franco, 2003). Dentre os alimentos fermentados tradicionais associados ao tratamento alternativo da DM já descritos na literatura, o kombucha apresenta papel de destaque.

Ele sofre majoritariamente dois processos de fermentação, alcoólica e acética. As leveduras e as bactérias da kombucha utilizam os substratos das suas atividades metabólicas de forma complementar. As leveduras, num processo anaeróbio utilizam o açúcar presente no meio como substrato para produção de dióxido de carbono e etanol na fermentação alcoólica. Já as bactérias acéticas, transformam o etanol em ácido acético, levando à produção do vinagre na fermentação acética. Os compostos aromáticos são formados por meio da reação entre o etanol residual e o ácido acético formado, dando origem ao acetato etílico, que fornece o aroma característico ao produto (Jayabalan, Marimuthu & Swaminathan, 2007; Marsh et al., 2014; Nespolo et al., 2015).

Tanto a simbiose entre os microrganismos presente no SCOBY como os produtos gerados na fermentação (como etanol e ácido acético) proporcionam um fator de segurança por manterem o pH ácido e apresentarem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, inibindo a contaminação da bebida. No entanto, quando ela ocorre, podem ser observados sinais característicos, tais como: não haver formação de novas colônias, o aspecto do SCOBY ficar diferente das fermentações anteriores (podendo apresentar “mofo” na superfície), o sabor da bebida se alterar, entre outros (Santos, 2016).

1.1.6 Os potenciais efeitos funcionais do kombucha

1.1.6.1 Capacidade antihiperglicêmica

Sabe-se que grande parte das pessoas com diabetes possui dificuldade em manter as taxas de glicemia próximas aos valores de referência, aumentando as chances de episódios de hiperglicemia que podem trazer impactos negativos para a saúde.

Pesquisadores constataram que o kombucha é capaz de alterar positivamente os níveis de glicose no sangue de ratos diabéticos, possivelmente por conter flavonóides no chá preto que se assemelham à ação da insulina, estimulando a lipogênese e o transporte de glicose nos adipócitos, podendo ser um potencial fator terapêutico no tratamento da DM, estimulando a absorção de glicose, sem a presença de receptores de insulina totalmente funcionais (Dashti & Morshedi 2000, 2010).

Bhattacharya, Gachui & Sil (2013) também observaram uma diminuição do nível sérico de glicose em cerca de 56,4% em ratos diabéticos tratados com kombucha em comparação a ratos diabéticos não tratados.

Outro estudo demonstrou que a administração de kombucha a ratos diabéticos diminuiu significativamente a hemoglobina glicosilada (HbA1c) e aumentou os níveis de insulina plasmática, hemoglobina e glicogênio tecidual. Além disso, reverteu significativamente as atividades enzimáticas alteradas na gliconeogênese, tais como a glicose-6-fosfatase, a frutose-1,6-bisfosfatase e a hexoquinase nos tecidos dos animais (Srihari et al., 2013).

No mais, Aloulou et al. (2012) mencionaram os resultados satisfatórios do kombucha em relação ao chá preto, pois demonstrou ser um melhor supressor do aumento dos níveis de glicose no sangue em estudos *in vivo* (ratos diabéticos com DM induzida por aloxana).

1.1.6.2 Recuperação ou manutenção de peso corporal

Indivíduos com diabetes descompensada têm grande susceptibilidade à perda de peso não intencional, pois a glicose, que é substrato para formação de energia no organismo, não consegue exercer o seu papel, fazendo com que o organismo precise recorrer a outras fontes de energia, como reservas de gordura e proteína (Ministério da Saúde, 2000).

Os pesquisadores Dashti & Morshedi (2010) identificaram que todos os animais submetidos a indução de diabetes apresentavam perda significativa de peso. Mas, ao consumirem kombucha, ganharam peso de forma progressiva até recuperaram a massa corpórea de antes da indução de DM.

Srihari et al. (2013) também relataram que, apesar de haver uma diminuição de peso corporal significativa em ratos diabéticos quando comparados com animais normoglicêmicos, provavelmente devido à degradação excessiva das proteínas presentes nos tecidos, se tratados com kombucha, os diabéticos podem ganhar peso.

Bhattacharya, Gachui & Sil (2013) também constataram a eficácia da administração de kombucha na recuperação de peso corporal.

1.1.6.3 Capacidade antioxidante

Embora a diabetes seja uma doença multifatorial, há evidências científicas que sugerem que o aumento da formação de radicais livres e a capacidade reduzida dos sistemas fisiológicos de defesa antioxidante estão envolvidos na patogênese, desenvolvimento e progressão de suas complicações (Rocha et al., 2006).

Por esse motivo, os antioxidantes aparecem com papel de destaque no tratamento complementar da doença, pois impedem a ação dos radicais livres, evitando a formação de lesões nas células. Eles também podem reparar as lesões presentes, removendo os danos e reconstituindo as células danificadas (Bianchi & Antunes, 1999).

Um dos papéis protetores dos vegetais, frutas e chás é fornecer vitaminas antioxidantes e fitoquímicos específicos que inibem as reações oxidativas. Os principais fitoquímicos são os compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos (Dashti & Morshedi, 2000).

Vários estudos têm demonstrado que o kombucha pode reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo às células; sendo, portanto, um forte candidato a agente antioxidante (Aloulou et al., 2012).

A capacidade do kombucha de eliminar efetivamente radicais como DPPH, hidroxilo e superóxido, demonstrada por Bhattacharya, Gachui & Sil (2013), foi justificada pelo alto conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides presentes no kombucha. Esse alto teor, segundo os autores, possivelmente se deve ao efeito do chá preto, com as enzimas liberadas pelas bactérias e leveduras durante o processo de fermentação que degradam os polifenóis complexos em moléculas pequenas, aumentando o total de compostos fenólicos e flavonóides.

1.1.6.4 Proteção hepática

O glicogênio é a principal forma de armazenamento intracelular de glicose, e seu nível nos tecidos – principalmente fígado e músculo esquelético – indica um reflexo direto da atividade de insulina, já que ela é capaz de regular o armazenamento de glicogênio, estimulando sua síntese (glicogênio sintase) e inibindo sua via de degradação (glicogênio fosforilase). Além disso, o fígado desempenha um papel fundamental na glicólise e na gliconeogênese. As atividades diminuídas das enzimas reguladoras hexoquinase e fosfofrutoquinase, ocorrem devido à deficiência (parcial ou total) de insulina e desequilíbrios no metabolismo de carboidratos, aumentando a produção de glicose hepática (Carvalheira, Zecchin & Saad, 2002).

Em pesquisa realizada por Srihari et al. (2013), a atividade da enzima glicolítica hexoquinase diminuiu no fígado de ratos diabéticos, provavelmente devido à deficiência de insulina. A administração de kombucha a ratos diabéticos

levou ao aumento dos níveis de insulina que, por sua vez, ativou as respectivas enzimas, aumentando o uso de glicose pelo fígado e diminuindo a gliconeogênese, evitando a hiperglicemia e levando a um aumento significativo do conteúdo de glicogênio hepático e músculo esquelético.

Bhattacharya, Gachui & Sil (2013) demonstraram em estudos com camundongos Swiss albinos diabéticos por indução com aloxana, que as atividades de Alanina Amino Transferase (ALT ou TGP) e Fosfatase Alcalina (ALP ou FAL) no soro sofreram aumentos significativos quando comparados aos animais normoglicêmicos, indicando algum tipo de disfunção. A administração de kombucha reduziu de forma acentuada esses dois índices de toxicidade hepática, o que pode ser comparado aos resultados do fármaco padrão, glibenclamida (anti-hiperglicêmico oral do grupo das sulfonilureias).

A administração de kombucha também exerceu função protetiva eficaz ao fígado de ratos diabéticos em outro estudo, evidenciada por diminuição significativa das atividades dos índices de toxicidade hepática no plasma: Aspartato Transaminase (AST ou TGO), Alanina Amino Transaminase (ALT ou TGP) e Gama Glutamil Transpeptidase (Gama-GT ou GGT) (Aloulou et al., 2012).

1.1.6.5 Proteção renal

Sabe-se que a diabetes causa lesões de órgãos-alvo (LOA), tais como fígado e rins.

No que se refere aos rins, episódios recorrentes de hiperglicemia podem gerar um conjunto de alterações metabólicas, levando à formação de substâncias anormais que são depositadas nesse tecido, tais como proteínas glicosiladas e produtos da via sorbitol. Conseqüentemente, dá origem tanto a alterações estruturais, na barreira de filtração glomerular, como a alterações enzimáticas, na membrana basal. Além disso, pode causar expansão do volume plasmático, condicionando um aumento no fluxo e pressão nos capilares renais,

levando a um aumento no filtrado glomerular que, por sua vez, pode acarretar em nefropatia diabética grave (Pereira et al., 1999).

Curiosamente, o kombucha demonstrou ser eficaz em ajudar a prevenir o desenvolvimento de complicações renais em alguns estudos. Podemos citar:

Ratos diabéticos não tratados apresentaram aumento significativo nos níveis de creatinina e uréia sérica, além de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e glutathiona nos rins; resultados reversos (próximos aos animais normoglicêmicos) foram encontrados em animais diabéticos tratados com kombucha. Além disso, a atividade renal da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD), diminuída em ratos diabéticos, aumentou com a administração de kombucha (Aloulou et al., 2012; Bhattacharya, Gachui & Sil, 2013).

1.1.6.6 Proteção pancreática

Aloulou et al. (2012) isolaram pâncreas de ratos Wistar diabéticos tratados com kombucha para medir atividades de lipase e α -amilase e realizar análises histológicas. A análise histológica revelou que os tecidos pancreáticos dos ratos diabéticos por indução com aloxana apresentaram uma clara atrofia de células Beta, entretanto, o pâncreas dos ratos diabéticos que foram tratados com kombucha mostrou uma melhora significativa. Além disso, os ratos diabéticos sofreram aumentos significativos nas atividades de α -amilase e lipase no plasma e no pâncreas; mas a administração de kombucha revelou uma inibição significativa desses fatores.

Acredita-se também que parte da atividade anti-hiperglicêmica do kombucha ocorra através da liberação de insulina do pâncreas, exercendo um efeito insulínico direto. Além disso, os polifenóis presentes no kombucha, tais como teaflavinas e tearubiginas, poderiam prevenir danos e morte de células beta pancreáticas, bem como preservar a secreção de insulina e estimular a regeneração desse tipo de célula em ratos diabéticos. A diabetes causa destruição de células beta das Ilhotas de Langerhans resultando em diminuição

acentuada nos níveis de insulina, como também do teor de glicogênio nos tecidos (fígado e músculo). O glicogênio é a principal forma intracelular armazenável de glicose e sua concentração em vários tecidos, especialmente no fígado e nos músculos esqueléticos, indica o reflexo direto atividade da insulina. A administração de kombucha a ratos diabéticos resultou em um significativo aumento no teor de glicogênio hepático e muscular, o que pode ser devido ao aumento dos níveis de insulina (Gross et al, 2002; Srihari et al., 2013).

1.1.6.7 Proteção cardiovascular

A diabetes é um distúrbio multifatorial caracterizado pela incapacidade de produzir e/ou utilizar a insulina – prejudicando o controle dos níveis de glicose no sangue, que pode levar a distúrbios no metabolismo de gorduras e proteínas, defeitos nas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e consequente estresse oxidativo, entre outros; gerando estado inflamatório no organismo, favorecendo o aparecimento de placas de gordura, aumentando o LDL-colesterol e outras substâncias nas paredes das artérias e restringindo o fluxo sanguíneo. Entre as funções da insulina, podemos citar a dilatação das artérias; logo, sua deficiência torna-se um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Diante do exposto, diversos estudos têm almejado encontrar agentes terapêuticos alternativos que auxiliem na prevenção dos agravos à saúde corriqueiros desta doença (Maciel et al. 2016; Oltman et al., 2000).

Aloulou et al. (2012) descreveram de forma clara o potencial efeito funcional do kombucha no assunto em questão, uma vez que, em experimentos *in vivo*, a administração do kombucha a animais diabéticos levou à produção tardia de LDL-colesterol e triglicerídeos e a um aumento significativo do colesterol HDL-colesterol.

1.2 Justificativa

O kombucha está popularizado no mundo todo. Seu consumo virou sinônimo de alimentação moderna e saudável. No Brasil, os usuários adquirem a bebida e suas culturas (*SCOBY*) em busca dos benefícios à saúde alegados pelos vendedores e por outros consumidores, e os manipulam e produzem de acordo com a orientação popular. Isso ocorre de forma equivocada, já que o kombucha não possui registro de propriedade funcional no órgão responsável (ANVISA).

Este trabalho teve por objetivo a influência do consumo de kombucha como tratamento alternativo para amenizar e/ou retardar sintomas e complicações do *Diabetes Mellitus* e identificar as possíveis modificações metabólicas, morfológicas e imunológicas ocorridas em camundongos com diabetes tipo 1.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar as modificações metabólicas, morfológicas e imunológicas promovidas pelo consumo de kombucha em camundongos *BALB/c* com diabetes tipo 1.

2.2 Específicos

- Estudar a cinética de acidificação do kombucha;
- Analisar a modificação dos parâmetros físico-químicos no decorrer da fermentação da bebida;
- Avaliar a influência do kombucha no metabolismo dos animais, por meio do controle de peso e glicemia;
- Investigar as alterações morfológicas e imunológicas no trato gastrointestinal decorrentes do consumo da bebida fermentada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análises do produto

As análises de chá preto foram feitas com o chá preto natural Leão Fuze® (0,5%) acrescido de açúcar mascavo Lowçúcar® (5%) e água destilada (100%). Conforme descrição da empresa do chá, o mesmo é composto por folhas e talos de chá preto (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), sendo que a porção de 1,6g (1 sachê) não contém quantidade significativa de proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio.

As análises de kombucha foram feitas a partir da seguinte composição: fermentação natural, *SCOBY* (2,4% - origem: doação), chá preto natural Leão Fuze® (0,5%), açúcar mascavo Lowçúcar® (5%) e água destilada (100%), conforme procedimento padrão descrito por Jayabalan et al. (2014).

3.1.1 Análise prévia

Foi padronizado o preparo e acondicionamento do kombucha antes da caracterização físico-química do kombucha, para identificar o momento ideal de administração da bebida aos animais na fase *in vivo* do trabalho, com base na variação de pH da fermentação.

As seguintes variáveis foram estudadas: líquido starter (presente ou ausente) e exposição à luz (presente ou ausente). A forma de preparo que envolve o tempo de infusão (5 minutos) e a quantidade dos itens que compõe a bebida (*SCOBY*, água destilada, açúcar mascavo e líquido starter - quando presente) foi sempre a mesma, respeitando o procedimento padrão descrito por Jayabalan et al. (2014).

O pH foi determinado semanalmente, por um período de 28 dias, utilizando pHmetro (KASVI, modelo K39-1014B).

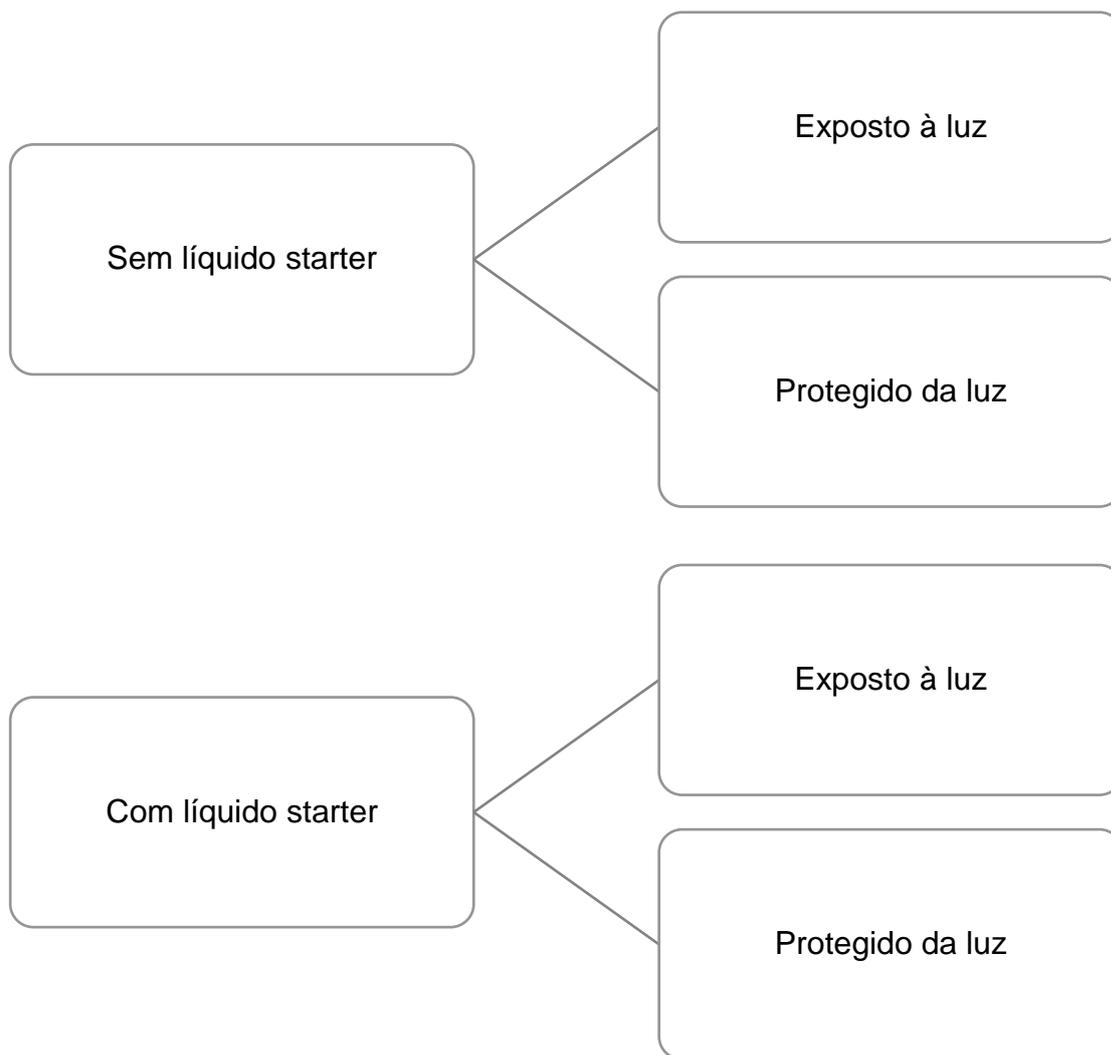


Figura 2. Delineamento da composição e acondicionamento do kombucha em análise prévia.

3.1.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas, realizadas em triplicata, constaram de acidez total titulável, densidade, resíduo seco, sólidos solúveis, teor alcoólico e cinética de acidificação.

As análises estatísticas foram feitas no programa *Minitab 19 Statistical Software*, sendo os experimentos de acidez total titulável, densidade, resíduo seco, sólidos solúveis e teor alcoólico avaliados por ANOVA (análise de variância) seguida por teste de Tukey, para comparação dos resultados encontrados entre as amostras; já a cinética de acidificação foi avaliada por

análise de regressão, com o objetivo de verificar a existência de uma relação funcional entre a variável dependente (pH) com a variável independente (tempo).

3.1.2.1 Acidez total titulável

Os métodos de determinação da acidez podem ser os que avaliam a acidez titulável ou fornecem a concentração de íons de hidrogênio livres, por meio do pH (realizado na cinética de acidificação), sendo que o primeiro método é inversamente proporcional ao segundo.

A acidez total titulável é a quantidade de ácido de uma amostra que reage com uma base de concentração conhecida (solução padrão). O método utilizado foi o de titulação volumétrica com indicador, e fundamenta-se na reação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali, com uso de indicador fenolftaleína (IAL, 2008) até o ponto de equivalência ou potenciômetro até que a solução atinja pH = 8,2.

Pipetou-se 10ml da amostra em um frasco Erlenmeyer de 500ml contendo 100ml de água destilada. Foi adicionado 0,5ml de fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio padronizada 0,01N até coloração rósea persistente. Cálculo:

$$(V_{\text{NaOH}} \times f_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 100) \div V_a$$

V_{NaOH} = volume em ml de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

f_{NaOH} = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

N_{NaOH} = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V_a = volume da amostra

3.1.2.2 Densidade

A densidade é o indicador que relaciona a quantidade de massa que um alimento ocupa em um volume de 1m³.

A determinação da densidade em diferentes momentos de um produto fermentado possibilita a identificação do comportamento dos microrganismos contidos naquele alimento.

Para analisa-la, em balão volumétrico de 25 mL, pesou-se a massa vazia e depois preenchido até o traço de aferição, com água ou amostra analisada. Os balões volumétricos foram mantidos em banho de água a 20°C por 10 minutos e pesados em balança analítica. Cálculo:

$$(M_{bam} - M_b) \div (M_{bH_2O} - M_b)$$

M_{bam} = Massa do balão volumétrico com amostra

M_b = Massa do balão volumétrico vazio

M_{bH_2O} = Massa do balão volumétrico com água

3.1.2.3 Resíduo seco

O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco.

O método utilizado foi o de estufa à vácuo. Com auxílio de uma pipeta volumétrica, foi transferido 100mL de amostra para uma cápsula de porcelana previamente aquecida a 80°C por 2 horas, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. As cápsulas foram colocadas em estufa à vácuo a 80°C até completa evaporação da água, esfriadas em dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica (IAL, 2008). Os resultados foram expressos em % de resíduo seco/sólidos totais.

3.1.2.4 Sólidos solúveis

Os valores de concentração de açúcares totais dissolvidos foram acompanhados por meio de uso de refratômetro (GT427, Lorben), calibrado com água destilada, para verificação do Brix do chá preto e do kombucha durante o seu processo de fermentação.

3.1.2.5 Teor alcoólico

A importância dessa análise se dá pela mudança das características organolépticas do kombucha, o que poderia interferir na sua aceitação por parte dos animais, e na capacidade de desidratação do álcool quando apresentado em grandes volumes.

A graduação alcoólica (% v/v) foi obtida pela tabela de conversão da densidade relativa a 20°C determinada no destilado alcoólico da amostra.

Ajustou-se a temperatura da amostra a 20°C e transferiu-se 100ml da mesma para um frasco Erlenmeyer com junta esmerilhada de 500ml. Foi conectado o frasco de destilação ao condensador, intercalando uma conexão intermediária com bola de segurança, e a amostra foi aquecida e destilada até aproximadamente $\frac{3}{4}$ do volume inicial. O destilado foi recolhido em balão volumétrico de 100ml, completado com água até traço de aferição, mantido em banho de água a 20°C por 10 minutos e pesado em balança analítica.

Utilizou-se a tabela de conversão de densidade em porcentagem de álcool em volume segundo o Instituto Adolfo Lutz (2008), sendo o resultado expresso em % de álcool em volume a 20°C.

3.1.2.6 Cinética de acidificação

Um processo de decomposição, seja por oxidação, hidrólise, ou fermentação, quase sempre altera a concentração dos íons de hidrogênio (Souza et al., 2010).

A atividade acidificante durante o período de fermentação do kombucha, promovida pela produção de ácidos por bactérias (sobretudo ácido acético e ácido láctico), podem ser descritas pela curva de pH, medindo a queda do mesmo em intervalos regulares.

Para realizar a curva de acidificação, as fermentações - feitas em triplicata, foram monitoradas no intervalo de 24 horas por um período de 14 dias com pHmetro da marca KASVI, modelo K39-1014B, calibrado periodicamente com soluções tampão de pH 4 e 7.

A partir dos dados obtidos, foram calculados: (i) tempo no qual atinge-se a velocidade máxima de acidificação [$T_{máx,h}$]; (ii) velocidade máxima de acidificação [$V_{máx}(dpH/dt)$]; (iii) pH do kombucha quando a velocidade máxima de acidificação foi atingida [pH em $V_{máx}$] e (iv) tempo para atingir o pH 2,0 [$t_{pH2,0}$].

3.2 Análises dos animais

Foi realizado treinamento no Biotério IQ/FCF-USP antes de dar início à fase experimental. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA (Protocolo nº 558).

Foram utilizados 55 camundongos BALB/c, machos, com 28 dias de idade (4 semanas), provenientes do Biotério FMUSP – Rede de Biotérios USP, transportados em gaiolas fechadas e pré-autoclavadas, fornecidas pelo biotério da FCF-IQ/USP, por carro oficial da Rede de Biotérios USP até o local de pesquisa (Biotério da FCF/IQ-USP).

Antes de dar início à fase experimental, foi realizado período de adaptação de 7 dias, com o intuito de proporcionar aos animais a oportunidade de recuperação do transporte e familiarização ao novo ambiente, facilitando a convivência em grupo e acostumando-os com a pesquisadora responsável.

As gaiolas continham maravalha autoclavada, com troca a cada 2 dias; temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; ciclos de fotoperíodo controlados (12 horas

claro/escuro) com início às 7:00 horas; umidade relativa ($55 \pm 10\%$) e exaustão de ar (15 a 20 trocas de ar por hora).

Durante essa fase, os animais receberam ração convencional (NUVITAL, Nuvilab, PR, Brasil) e líquido para hidratação (água) *ad libitum*. Eles foram identificados com marcador permanente, por diferentes cores na cauda, e divididos em 8 grupos de 6 a 7 animais cada, em gaiolas coletivas grandes (dimensões: 49x34x16), conforme ilustrado na figura 3.

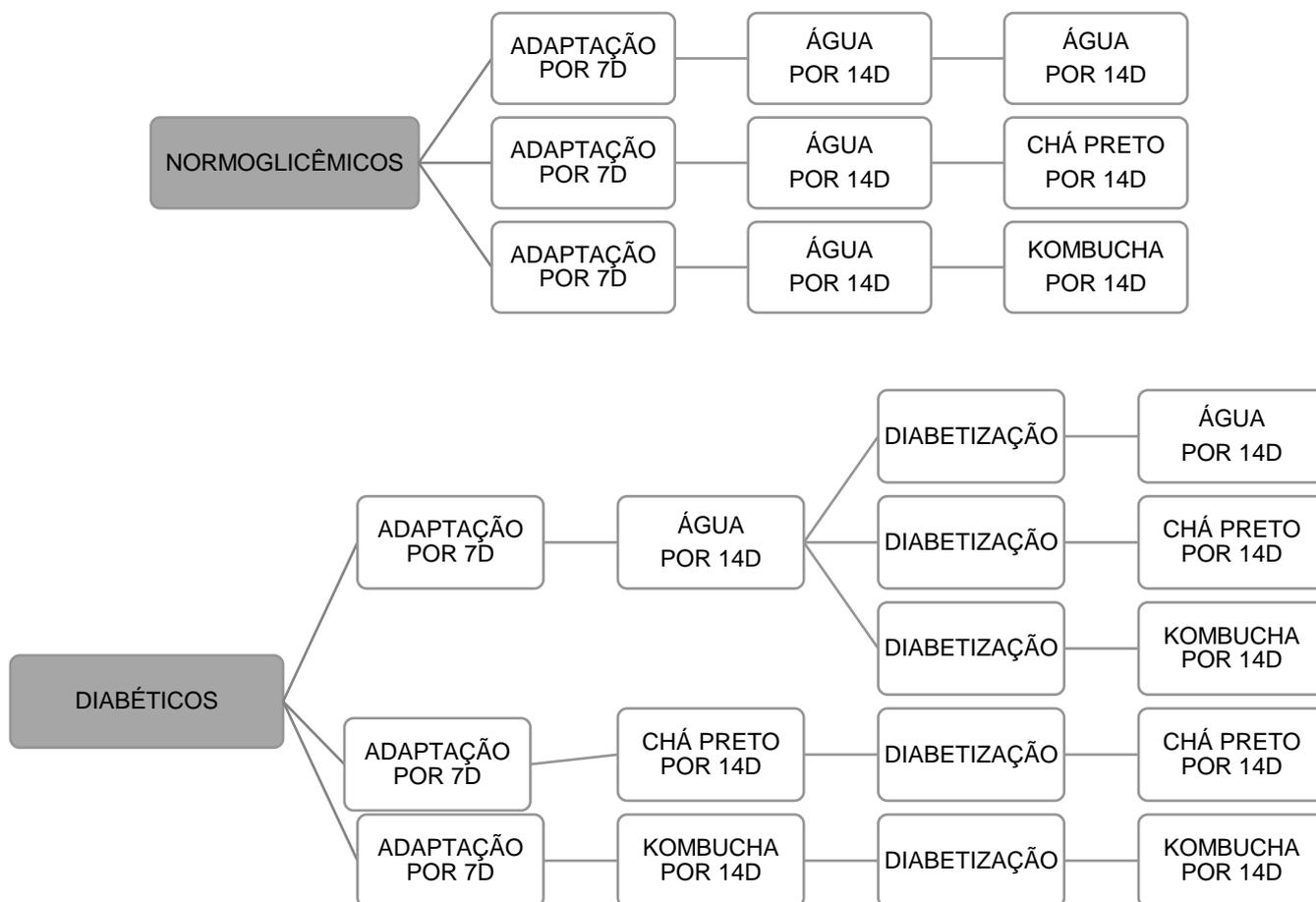


Figura 3. Delineamento experimental dos animais.

Ao final do período de adaptação, os animais passaram a receber o líquido de hidratação correspondente ao grupo (água, chá preto ou kombucha) *ad libitum* pelo período descrito na Figura 3 (“Delineamento experimental dos

animais”). Tanto o chá preto como o kombucha foram trocados diariamente, sendo que o tempo de fermentação do kombucha correspondia ao dia do tratamento, a saber: no 1º dia de tratamento os camundongos receberam kombucha fermentado por 1 dia, no 2º dia de tratamento os camundongos receberam kombucha fermentado por 2 dias, e assim sucessivamente. A forma de preparo das bebidas foi descrita no item “3.1 Análises do produto”.

Para indução de *Diabetes Mellitus* tipo 1, os animais dos grupos diabéticos foram deixados 12h de jejum (apenas de ração), e então administrada aloxana monoidratada (50 mg/kg; Sigma Chmical Co., St Louis, MO, USA) diluída em solução salina fisiológica (0,9% NaCl), por via intravenosa. Nos demais camundongos foi administrada apenas a solução salina fisiológica (0,9% NaCl), por via intravenosa. Após 5h do processo de diabetização, a ração foi disponibilizada aos animais e em 10 dias, a presença de diabetes foi verificada pela aferição de glicemia (critério: ≥ 300 mg/dL), na alíquota de sangue a partir da veia da cauda, determinada por glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnóstica, São Paulo, SP, Brasil).

Ao final do protocolo de diabetização, o tratamento seguiu conforme planejado (água, chá preto ou kombucha *ad libitum*) e anteriormente descrito na Figura 3 (“Delineamento experimental dos animais”).

Todos os animais foram avaliados periodicamente quanto:

- ao peso corporal;
- à glicemia, na alíquota de sangue a partir da veia da cauda, determinada por glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnóstica, São Paulo, SP, Brasil), sempre às 7h00.

Os camundongos foram eutanasiados com sobredosagem de quetamina 300mg /kg + xilazina 30mg/kg, por via intraperitoneal, e então foram realizados os procedimentos necessários para extração dos tecidos de interesse para as análises subsequentes e as carcaças foram entregues ao Biotério FCF-IQ/USP.

3.2.1 Aspectos macroestruturais

3.2.1.1 Descrição macromorfológica e amostragem

Após realizar a individualização do intestino grosso do trato gastrointestinal foi realizada a descrição macromorfológica, utilizando-se paquímetro digital (Digimess, Brasil) e balança analítica Q-500L210C (Quimis, Brasil). Os itens analisados foram: peso e comprimento crânio-caudal.

A amostragem de cada seguimento foi baseada no princípio do *smooth fractionator* (Gundersen, 2002; Muniz et al., 2013). Cada órgão foi seccionado seriadamente em fatias de aproximadamente 2,5 mm de espessura, em total de 25 fatias. Cada fatia foi utilizada para estimar o volume de cada órgão conforme descrito no item 2.3.2. Para dar continuidade a amostragem, após a estimativa do volume, a primeira fração (Fn1: 4-1) de fatias foi aplicada a fim de gerar 5 conjuntos de fatias (figura 4), um conjunto foi selecionado para dar continuidade à amostragem.

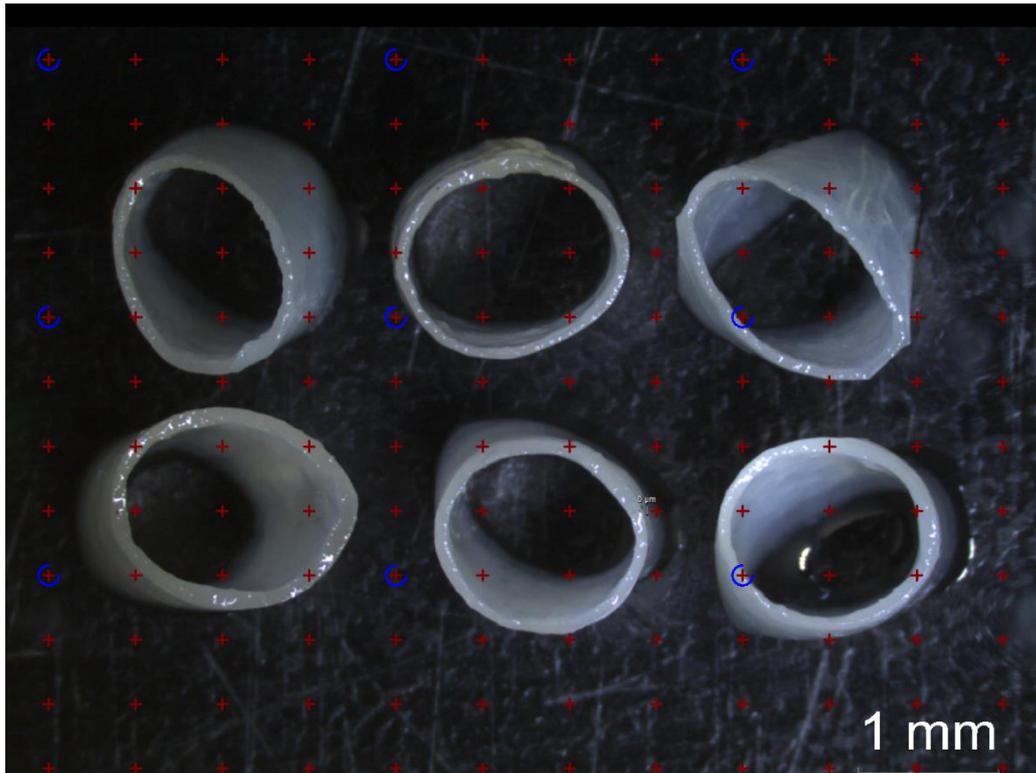


Figura 4. Foto macrográfica da divisão do intestino em fatias. Escala de barra: 1mm.

As fatias amostradas foram seccionadas, originando blocos de tecido de tamanhos diferentes. Estes blocos foram organizados seguindo o delineamento do *smooth fractionator* (Gundersen, 2002) e, em seguida, selecionados fracionalmente por meio de amostragem sistemática e uniformemente aleatória *Systematic Uniform Random Sampling* (SURS) (Gundersen et al., 1988).

Com a aplicação desta segunda fração ($F_n2: 4^{-1}$), os blocos de tecido foram separados em 4 conjuntos onde, em um dos conjuntos amostrados, foi realizado o estudo histológico e estereológico.

3.2.1.2 Volume (\hat{V})

Para a estimativa do volume da parede (\hat{V}_{IG}), foi empregado o Princípio de Cavalieri (Mayhew e Olsen 1991; Howard e Reed, 2005; Muniz et al., 2013). Para tal, um sistema-teste quadrático foi aplicado sobre os anéis de cada órgão cortados com o *Tissue Slider* conforme descrito no item 2.3.1. A seguinte fórmula foi empregada para esta estimativa:

$$\hat{V} := \sum p. (a/p). \bar{t}.$$

Onde:

- $\sum p$ = somatória de pontos que tocam a parede;
- \bar{t} = espessura média das secções;
- a/p = área associada a cada ponto.

O coeficiente de erro (CE) para a estimativa de volume foi calculado de acordo com a fórmula modificada por Gundersen et al. (1988). O coeficiente de erro (CE) foi expresso em porcentagem. A fórmula para o cálculo de Variância (*noise*) da contagem de pontos segue abaixo ilustrada:

$$\text{Var} [\textit{noise}] := c. \alpha. \sqrt{(n. \Sigma P)}$$

Onde:

- c é uma constante ($c = 0.0724$);
- α é um coeficiente que determina o formato básico de cada secção do material;
- a = área média das secções, b = perímetro médio das secções, então: $\alpha = b / \sqrt{a}$;
- n é o número de secções;
- ΣP é o número total de pontos que tocam a parede.

3.2.1.3 Variância devido a amostragem uniforme e sistematicamente aleatória (SURS)

$$\text{Var [surs]} := (3(A-\text{var}[noise])-4B+C)/240$$

$$\text{CE} := \sqrt{\text{var}[\text{total}]} := \text{Var [noise]} := c. \alpha. \sqrt{(n. \Sigma P) + \text{Var [surs]} := (3(A-\text{var}[noise])-4B+C)/240}$$

3.2.2 Aspectos microestruturais

3.2.2.1 Estudo histológico (delineamento estereológico)

Após a amostragem, o conjunto de blocos de tecido originados, foram conservados em solução de formaldeído 4% em tampão fosfato, permanecendo nele por quarenta e oito horas. Em seguida, foi realizado o procedimento de desidratação em sequência crescente de etanol (70%, 90% e absoluto) e xilol (etanol/xilol, xilol I e II), sendo então o material incluso em parafina.

Estes blocos de tecidos, agora incluídos em parafina foram seccionados (5 μm) em micrótomo (Leica RM 2265).

As secções destinadas para as análises estereológicas foram colocadas em lâminas com aderência eletrostática e coradas com solução de Hematoxilina e Eosina (Merck), em seguida foram desidratadas em séries crescentes de etanóis, diafanizadas em xilóis e montadas sob lamínula com DPX (Fluka).

Os parâmetros estereológicos descritos a seguir foram estimados por meio do software estereológico newCAST™ by Visiopharm (Versão 4.5.1.324).

3.2.2.1.1 Densidade do volume das túnicas muscular, submucosa e mucosa do intestino

A densidade de volume (V_v) refere-se à fração de volume ocupada pelas túnicas muscular (V_{VMUS}), submucosa (V_{VSUB}) e mucosa (V_{VMUC}); no intestino grosso.

Para a estimativa de V_v um sistema teste foi sobreposto sobre o espaço referência. Foram contados o número total de pontos sobre a região de interesse (túnicas) (P_{int}) e o número total de pontos sobre o espaço referência (P_{ref}) (Muniz et al., 2013; Nyengaard e Alwasel, 2014).

A seguinte equação foi utilizada:

$$V_v := \frac{\sum P_{int}}{\sum P_{ref}}$$

A densidade de volume varia de 0 a 1, e pode ser expressa em porcentagem (Muniz et al., 2013).

3.2.2.1.2 Volume total das túnicas muscular, submucosa e mucosa do intestino

O volume total das túnicas Muscular (V_{totMUS}), Submucosa (V_{totSUB}) e Mucosa (V_{totMUC}) foi estimado pela multiplicação da densidade de volume (V_v) de cada compartimento pelo volume do órgão (Muniz et al., 2013; Nyengaard e Alwasel, 2014), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\hat{V}_{tot} := \hat{V}_v \cdot \hat{V}$$

3.2.3 Análise estatística

Para as variáveis que apresentaram distribuição simétrica e igualdade de variância foram utilizados o teste one-way ANOVA seguido pelos testes post-hoc de Tukey e Fisher para comparações múltiplas (Kutner et al., 2005). No entanto, quando as variáveis em estudo possuíam distribuição não simétrica e/ou não apresentaram igualdade de variância, foram utilizados o teste de mediana de Mood ou os testes de Kruskal–Wallis e de Mann-Whitney. Diferenças entre grupos foram consideradas significantes quando ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do produto

4.1.1 Análise prévia

A tabela 1 demonstra o perfil de acidificação (ao longo de 28 dias, em intervalos de 7 dias) de fermentação do kombucha, com ou sem líquido starter e exposto (fermentação em vidro transparente sobre a bancada exposto à luz natural) ou não (fermentação em vidro transparente sobre a bancada, protegido com papel alumínio, impedindo a ação da luz natural) à luz.

Tabela 1. Perfil de acidificação de kombucha com ou sem líquido starter e exposto ou não à luz por período de 28 dias.

KOMBUCHA	D0	D7	D14	D21	D28
Sem líquido starter e sem exposição a luz	4,7100 ± 0,0557	3,8600 ± 0,0173	3,6767 ± 0,2079	3,3367 ± 0,1305	3,1667 ± 0,0987
Sem líquido starter e com exposição a luz	4,6467 ± 0,0451	3,8533 ± 0,1801	3,5833 ± 0,2281	3,3567 ± 0,2346	3,2500 ± 0,2179
Com líquido starter e sem exposição a luz	3,9500 ± 0,0100	3,5400 ± 0,1212	3,5133 ± 0,1457	3,3267 ± 0,0643	3,1667 ± 0,0577
Com líquido starter e com exposição a luz	3,9533 ± 0,0451	3,3800 ± 0,0436	3,3733 ± 0,1286	3,3167 ± 0,0839	3,1400 ± 0,0529

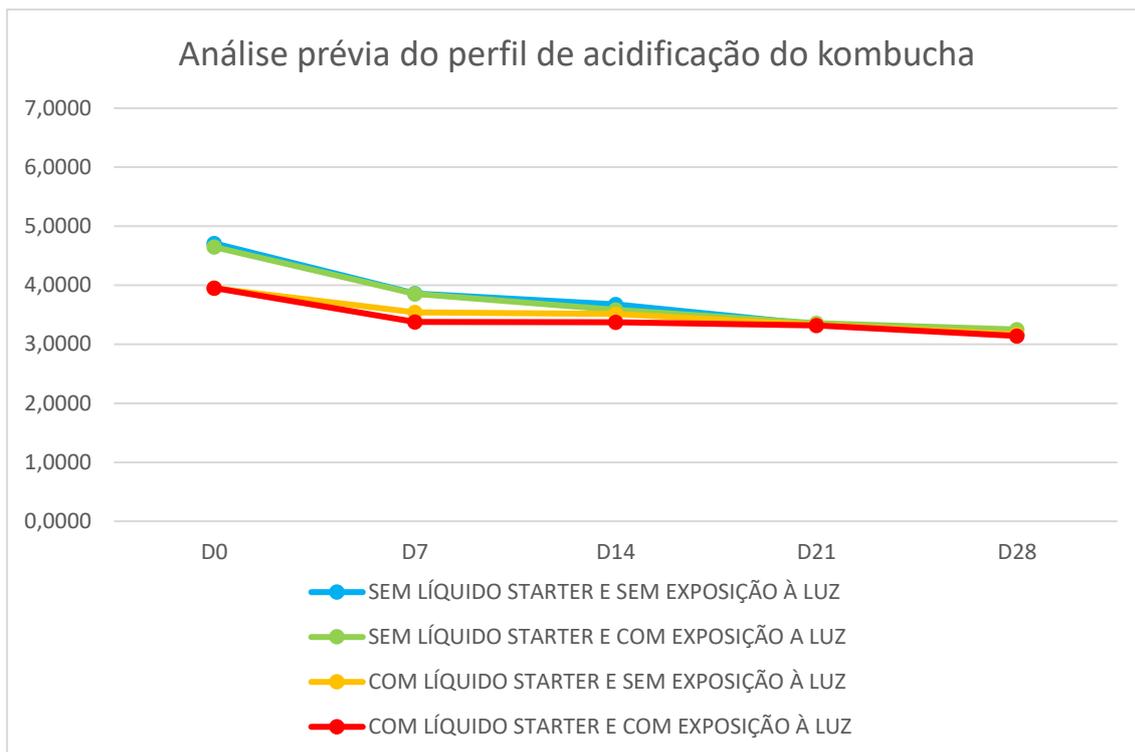


Figura 4. Análise prévia do perfil de acidificação do kombucha por 28 dias.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que as amostras com líquido starter tinham pH menores nos primeiros dias. Com o decorrer da fermentação (aproximadamente a partir do D14), todos os kombuchas apresentaram pH similar, independentemente da composição ou acondicionamento, permitindo a conclusão de que as variáveis estudadas pouco influenciaram no perfil de acidificação do kombucha.

Ficou definido para as análises subsequentes os seguintes fatores: kombucha exposto à luz durante sua produção e acondicionamento (e na administração aos animais conforme ciclos de fotoperíodo controlados do biotério) e sem líquido starter (a fim de facilitar a aceitação do consumo por parte dos animais, já que a bebida estaria menos ácida no início da fermentação; e de viabilizar a correlação entre período de fermentação do produto e influência nos parâmetros analisados).

4.1.2 Análises físico-químicas

A tabela 2 demonstra os resultados sobre às análises físico-químicas realizadas de amostras de chá preto e kombucha fermentado por 1, 7 e 14 dias.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros físico-químicos de chá preto e kombucha. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Análises	Chá preto	Kombucha D1	Kombucha D7	Kombucha D14
Acidez total titulável (%)	0,3103 ± 0,0185 ^c	0,4662 ± 0,0197 ^{cb}	0,5497 ± 0,0000 ^b	2,4254 ± 0,1366 ^a
Densidade (g/cm³)	1,0181 ± 0,0018 ^a	1,0162 ± 0,0022 ^{ab}	1,0143 ± 0,0003 ^{ab}	1,0132 ± 0,0023 ^b
Resíduo seco (%)	5,3546 ± 0,0842 ^a	5,1492 ± 0,0740 ^{ab}	4,8762 ± 0,1681 ^b	4,3384 ± 0,0957 ^c
Sólidos solúveis (°Bx)	4,5333 ± 0,1155 ^a	4,5333 ± 0,1155 ^a	3,5333 ± 0,4619 ^b	2,9000 ± 0,1732 ^b
Teor alcoólico (% v/v)	0,0333 ± 0,0577 ^b	0,3333 ± 0,1528 ^{ba}	0,4667 ± 0,1528 ^a	0,6333 ± 0,2309 ^a

Sabe-se que a acidez é resultante dos ácidos orgânicos existentes no alimento, dos adicionados propositadamente e também daqueles provenientes das alterações químicas dos mesmos. Sua determinação pode fornecer importantes dados sobre o estado de conservação de um produto alimentício.

De acordo com os resultados obtidos, descobriu-se que o chá preto continha acidez total titulável estatisticamente semelhante ao kombucha D1 que, por sua vez, foi correspondente ao kombucha D7. Já o kombucha D14 divergiu das demais amostras, indicando elevação de acidez mediante o tempo de fermentação, aumentando cerca de 5,20 vezes em relação ao kombucha D1.

Santos, Barbosa e Lacerda (2017) relataram acidez total titulável de 1,067 ± 0,024% no kombucha fermentado por 25 dias, e Santos et al. (2019) encontraram os valores de 0,27 para a bebida no D0 e 1,89 no D6. Ambos os estudos apresentaram valores inferiores (portanto, mais ácido) ao do presente

trabalho.

Diferenças consideráveis também foram encontradas nas análises de densidade de chá preto e kombucha D14. Os resultados apresentaram padrão inversamente proporcional ao tempo de fermentação e, conseqüentemente, de atividade microbiana.

Indo de encontro às análises anteriores, o resíduo seco do chá preto foi maior que o do kombucha, independentemente do tempo de fermentação. Entretanto, diferenças estatísticas significativas apenas foram identificadas quando confrontadas as amostras entre chá preto, kombucha D7 e kombucha D14.

O teor de sólidos solúveis/açúcares foi o mesmo no chá preto e no kombucha fermentado por 1 dia. Ele diminuiu proporcionalmente ao grau de turbidez da amostra de kombucha (identificável por observação direta), e em 7 e 14 dias as reduções da concentração de açúcares em relação ao chá preto/kombucha D1 foram de 22,06% e 36,03%, respectivamente.

Lima et al. (2019), utilizando 10% de açúcar em kombucha de base combinada de chá verde e mate, identificou Brix 10° no D0, 7,67° no D6 e 5,33° no D12. Considerando que no presente trabalho a utilização de açúcar foi de 5% no kombucha a base de chá preto, os resultados são semelhantes.

O teor alcóolico aumentou em 90,01% do 1° ao 14° dia de fermentação do kombucha, justificando sua análise. Embora esteja dentro das normas de qualidade do kombucha submetido a processos industriais e destinados a consumo humano como bebida, descritas na Portaria nº 103, de 20 de setembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que indica teor alcóolico de até 1,5% por volume (% v/v), os resultados foram distintos dos descritos por Santos, Barbosa e Lacerda (2017), $0,43 \pm 0,08\%$ - teor alcóolico inferior mesmo em fermentação de maior período (25 dias).

De acordo com Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019 também do MAPA, na rotulagem do kombucha industrializado sem álcool somente poderá ser utilizada a expressão "zero álcool", "zero % álcool", "0,0%",

ou similares, no produto que contiver até 0,5% v/v de álcool. Já aqueles que contiverem graduação alcoólica entre 0,6 a 8,0% v/v, deve estar declarado obrigatoriamente no painel principal do rotulo, expresso em porcentagem em volume (% v/v), em complementação à expressão "Teor alcoólico" nas mesmas dimensões da denominação, admitindo tolerância de 0,1% v/v.

Diante do exposto, constata-se que o tipo e proporção dos componentes do produto, tempo de infusão e de fermentação, além de modo de preparo e de armazenamento, têm a capacidade de alterar significativamente as análises físico-químicas do produto.

Os achados aqui mencionados corroboram com os mecanismos descritos na literatura referentes às fermentações alcoólica e acética que geram prioritariamente etanol, dióxido de carbono, ácido acético e ácido glucônico, contribuindo nas características organolépticas e de segurança (já que inibem a proliferação de microorganismos contaminantes) do produto.

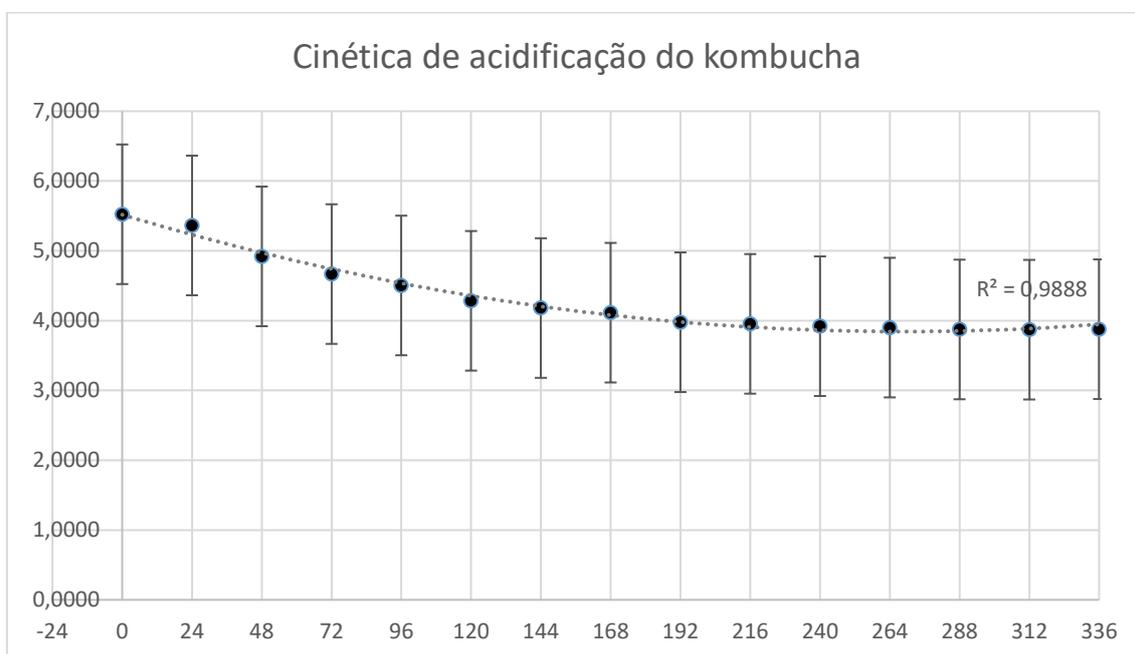


Figura 5. Cinética de acidificação do kombucha por período de 14 dias ($P < 0,05$; $R^2 = 0,9888$).

Tabela 3. Tabela de diferenças completa referente à cinética de acidificação do kombucha por período de 14 dias.

Variável independente (eixo x) - em dias	Variável independente (eixo x) - em horas	Variável dependente (eixo y) - média das amostras	Desvio padrão	f[xk, xk+1]*- 1000 velocidade	f[xk,...xk+2] aceleração
D0	0	5,52	0,30	6,67	-0,000246
D1	24	5,36	0,18	18,47	0,000165
D2	48	4,92	0,12	10,56	0,000078
D3	72	4,67	0,04	6,81	-0,000049
D4	96	4,50	0,03	9,17	0,000101
D5	120	4,28	0,01	4,31	0,000032
D6	144	4,18	0,03	2,78	-0,000061
D7	168	4,11	0,02	5,69	0,000098
D8	192	3,98	0,01	0,97	-0,000009
D9	216	3,95	0,02	1,39	0,000012
D10	240	3,92	0,02	0,83	-0,000006
D11	264	3,90	0,02	1,11	0,000020
D12	288	3,87	0,02	0,14	0,000009
D13	312	3,87	0,01	-0,28	
D14	336	3,88	0,02		

Um dos objetivos da realização da cinética de acidificação era avaliar o tempo necessário para alcançar o pH 2,0, pois o consumo do kombucha se tornaria desagradável devido à alta acidez e, conseqüentemente, baixa palatabilidade. No entanto, com base nos dados encontrados, pode-se concluir que o período de 14 dias de fermentação não foi suficiente para atingir o pH 2, sendo que, a partir do D11, o pH apresentou baixas variações, mantendo-se em aproximadamente 3,87.

Os parâmetros cinéticos observados no perfil de fermentação estão descritos abaixo:

- $T_{máx,h}$: O tempo no qual atingiu-se a velocidade máxima de acidificação foi compreendido no intervalo de 24 a 48 horas.
- $V_{máx}(dpH/dt)$: Com base na aproximação da derivada de primeira ordem, o intervalo que compreendia os dias 1 e 2 [D1, D2] apresentou maior velocidade de acidificação, sendo que, de maneira geral, conforme aumentava o tempo de acidificação, diminuía sua velocidade.

- pH em $V_{\text{máx}}$: O pH do kombucha quando a velocidade máxima de acidificação foi atingida abrangia o intervalo de 5,37 a 4,89.

Paludo (2017) analisou o comportamento do pH durante a fermentação de kombuchas utilizando o chá mate e chá verde em sua composição, que iniciaram com pH de 4,37 e 4,10 respectivamente e após 7 dias de fermentação decresceu para 3,10 e 2,81 e Santos, Barbosa & Lacerda (2017) relataram pH $3,98 \pm 0,03$ em kombucha de chá preto fermentado por 25 dias. Esses resultados indicam que a velocidade de acidificação do kombucha a base de outros chás é maior daquele composto por chá preto.

4.2 Análises dos animais

4.2.1 Massa corpórea

As figuras 6 e 7 dizem respeito ao ganho de peso (g) dos animais normoglicêmicos e diabéticos durante as diferentes fases de tratamento.

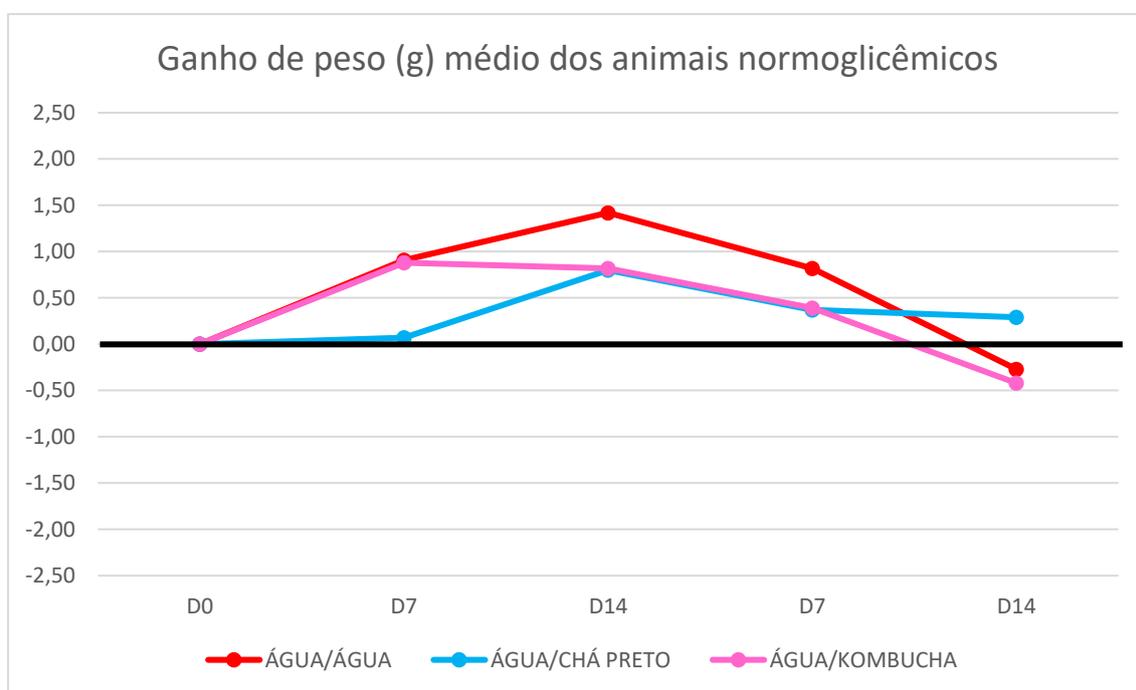


Figura 6. Ganho de peso (g) médio dos animais normoglicêmicos.

**Interpretação do eixo X, da esquerda para a direita: D0 indica término do período de adaptação de 7 dias e início do tratamento de 14 dias com água para todos os grupos; D7 indica 7º dia de tratamento com água para todos os grupos; D14 indica término do primeiro e início do segundo tratamento de 14 dias com líquido de hidratação conforme respectivo grupo (água, chá preto ou kombucha); D7 indica 7º dia de tratamento específico do grupo; D14 indica término do tratamento específico do grupo e eutanásia dos animais.*

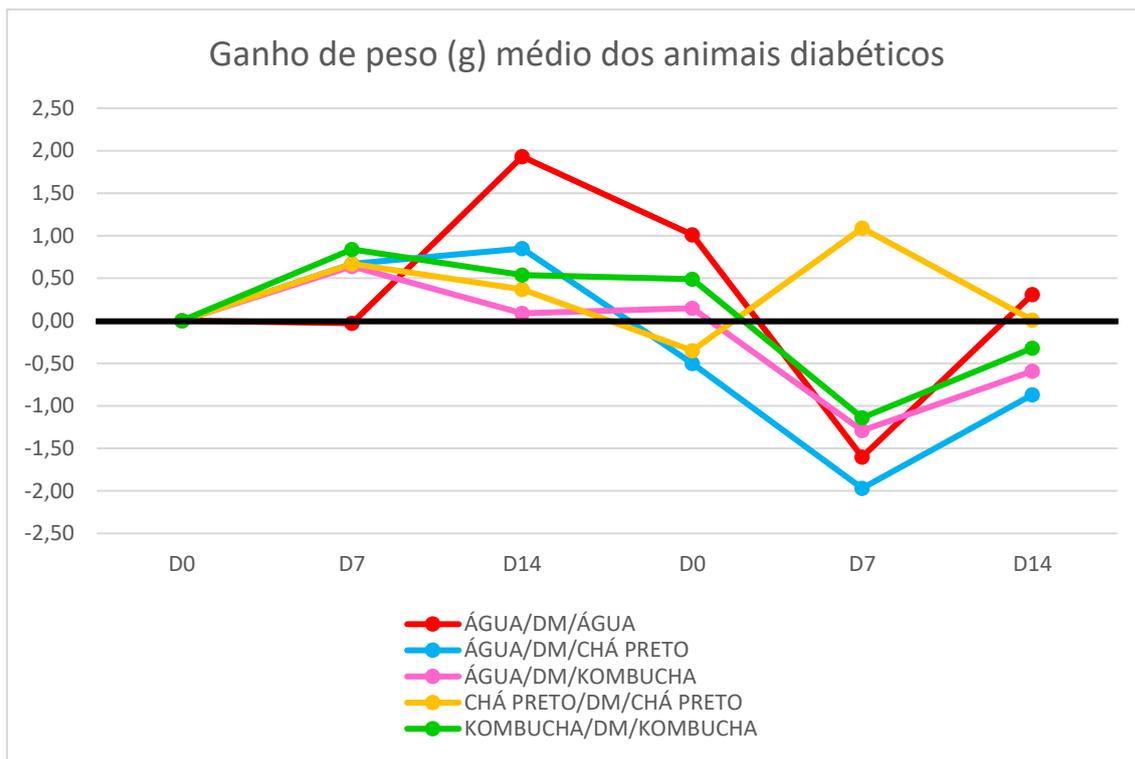


Figura 7. Ganho de peso (g) médio dos animais diabéticos.

**Interpretação do eixo X, da esquerda para a direita: D0 indica término do período de adaptação de 7 dias e início do tratamento de 14 dias com líquido de hidratação conforme respectivo grupo (água, chá preto ou kombucha); D7 indica 7º dia de tratamento específico; D14 indica término do primeiro tratamento; D0 indica término do protocolo de 10 dias de indução de diabetes e início do segundo tratamento de 14 dias com líquido de hidratação conforme respectivo grupo (água, chá preto ou kombucha); D7 indica 7º dia de tratamento específico do grupo; D14 indica término do tratamento específico do grupo e eutanásia dos animais.*

A figura 7 evidencia variação de peso do D0 ao D14, período que compreende ao primeiro tratamento. Após cumprimento do protocolo de 10 dias para confirmação de diabetes, quase todos os grupos perderam peso de forma significativa, a não ser aquele tratado antes e depois com chá preto (Chá Preto/DM/Chá Preto), que recuperou em média 1,09g entre o D0 e o D7. Depois disso, a velocidade da perda de peso dos animais pertencentes aos demais

grupos e do ganho de peso do grupo houve do grupo Chá Preto/DM/Chá Preto (0,01g) diminuíram. De maneira geral, no D14, os animais estavam todos próximos do peso anterior ao início do tratamento, demonstrando que independente do líquido de hidratação consumido, houve recuperação gradativa da massa corpórea.

4.2.2 Glicemia

As figuras 8 e 9 demonstram a glicemia média dos animais pertencentes aos grupos normoglicêmicos e diabéticos.

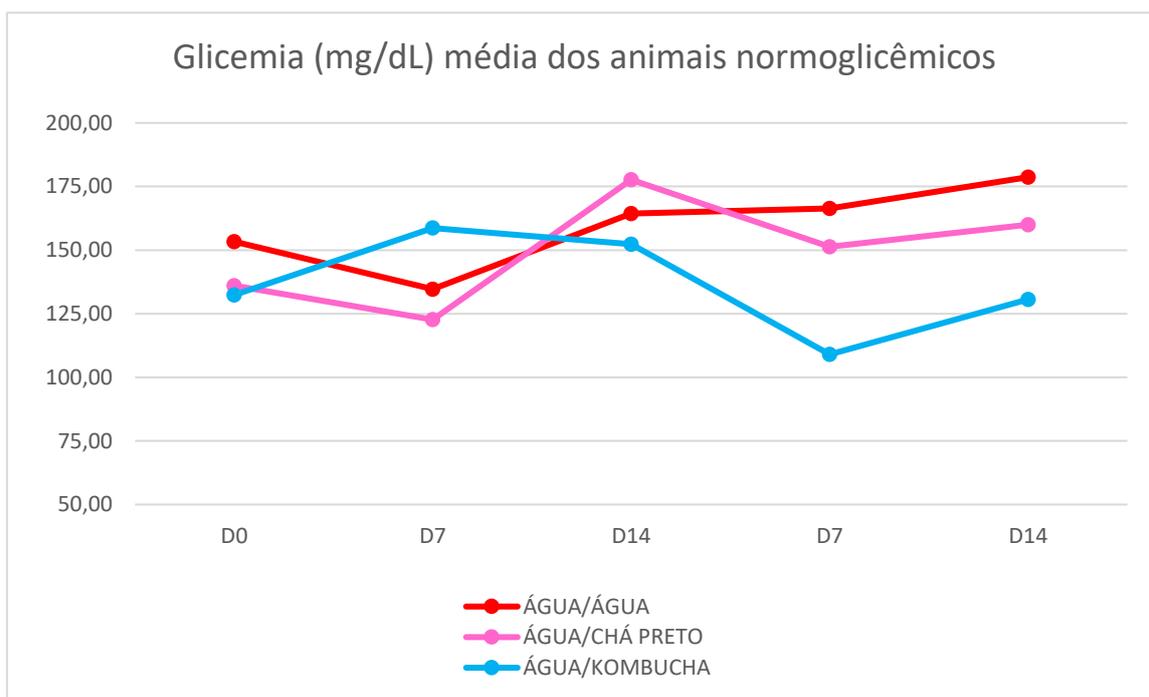


Figura 8. Glicemia (mg/dL) média dos animais normoglicêmicos.

**Interpretação do eixo X, da esquerda para a direita: D0 indica término do período de adaptação de 7 dias e início do tratamento de 14 dias com água para todos os grupos; D7 indica 7º dia de tratamento com água para todos os grupos; D14 indica término do primeiro e início do segundo tratamento de 14 dias com líquido de hidratação conforme respectivo grupo (água, chá preto ou kombucha);*

D7 indica 7º dia de tratamento específico do grupo; D14 indica término do tratamento específico do grupo e eutanásia dos animais.

Pode-se observar oscilação na glicemia média dos animais normoglicêmicos, tanto no primeiro tratamento com água (que era comum a todos e compreendeu o período do D0 ao D14), como no tratamento com a bebida específica do grupo (que se iniciou de forma posterior ao primeiro tratamento e se encerrou no D14). Entretanto, foi observada redução de glicemia em maior intensidade nos primeiros 7 dias de tratamento com kombucha (28% em relação ao último dia de tratamento com água), ainda que nesse período a bebida apresente maior concentração de açúcar em relação à segunda semana, conforme demonstrado nas análises de sólidos solúveis. O chá preto também foi capaz de reduzir a glicemia dos animais normoglicêmicos, embora em menor intensidade que o kombucha (14,83%). Os animais tratados apenas com água obtiveram maior glicemia média de todos os grupos.

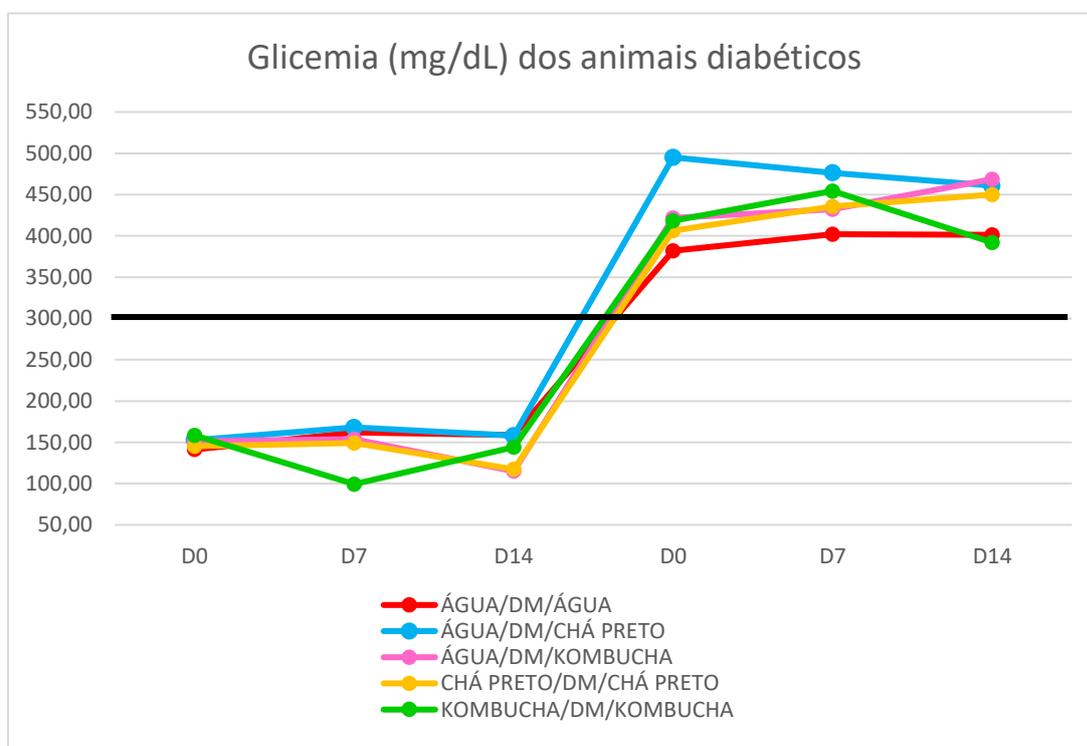


Figura 9. Glicemia (mg/dL) média dos animais diabéticos.

**Interpretação do eixo X, da esquerda para a direita: D0 indica término do período de adaptação de 7 dias e início do tratamento de 14 dias com líquido de hidratação conforme respectivo grupo (água, chá preto ou kombucha); D7 indica 7º dia de tratamento específico; D14 indica término do primeiro tratamento; D0 indica término do protocolo de 10 dias de indução de diabetes e início do segundo tratamento de 14 dias com líquido de hidratação conforme respectivo grupo (água, chá preto ou kombucha); D7 indica 7º dia de tratamento específico do grupo; D14 indica término do tratamento específico do grupo e eutanásia dos animais.*

A figura 9 revela que a média glicêmica dos animais pertencentes aos grupos diabéticos manteve-se em aproximadamente 133,67mg/dL entre os dias D0 e D14; após a indução de diabetes com aloxana, foi para 450,67mg/dL (aproximadamente 3,37x maior).

O consumo de kombucha ou de chá preto anteriormente à indução da doença parece não ter agido como fator protetivo, já que os valores de glicemia dos animais que consumiram essas bebidas foram próximos daqueles que consumiram água no mesmo período.

Embora as glicemias tenham apresentado poucas variações após a indução da diabetes, não parece eficaz a realização de tratamento exclusivo da doença por meio do consumo de kombucha e/ou de chá preto. Talvez a administração do kombucha por um período maior ou a utilização do mesmo enquanto tratamento complementar e alternativo apresentasse melhores resultados.

4.3 Análises histológicas

Para descrever os resultados foram usadas siglas para cada grupo conforme identificado na tabela 4.

Tabela 4. Identificação dos grupos com suas respectivas siglas São Paulo, 2019.

Grupo	Sigla
Água – Água normoglicêmico	A-A NG
Água – Chá preto normoglicêmico	A-C NG
Água – Kombucha normoglicêmico	A-K NG
Água – Água Diabético	A-A DG
Água – Chá preto Diabético	A-C DM
Água – Kombucha Diabético	A-K DM
Chá preto – Chá preto Diabético	C-C DM
Kombucha – Kombucha Diabético	K-K DM

4.3.1 Estudo histológico qualitativo

Após a coloração das secções histológicas com a técnica da Hematoxilina e Eosina, foi observado que os intestinos apresentaram características histológicas típicas da espécie, independentemente da idade.

O cólon possui a estrutura histológica típica do tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular e serosa/adventícia. A mucosa é revestida por epitélio colunar (cilíndrico) simples (lâmina epitelial), com microvilosidades longas e recoberta por camada de muco. A mucosa não contém vilosidades, mas muitas criptas de Lieberkühn, nas quais numerosas células caliciformes e enteroendócrinas foram encontradas. Os animais diabéticos apresentaram camada mucosa comprometida e infiltrado inflamatório exacerbado, conforme esperado (figura 10).

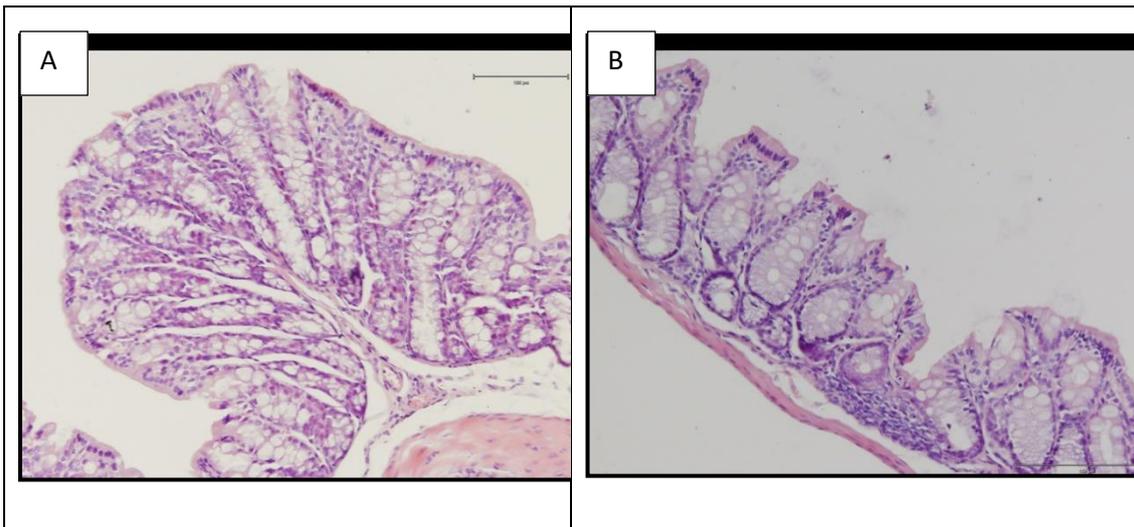


Figura 10. A - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal normoglicêmico; B - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético.

Os animais normoglicêmicos que consumiram água (figura 11 A), chá preto (figura 11 B) e kombucha (figura 11 C), não mostraram alteração das estruturas histológicas. Enquanto os animais diabéticos que consumiram chá apresentaram redução do infiltrado inflamatório. Os animais que consumiram kombucha apresentaram o tecido intestinal com mesmo perfil de infiltrado celular observado nos animais normoglicêmicos. Desta forma, o kombucha modula a resposta imunológica de maneira anti-inflamatória, restaurando o perfil de mucosa saudável (figura 12 A e B).

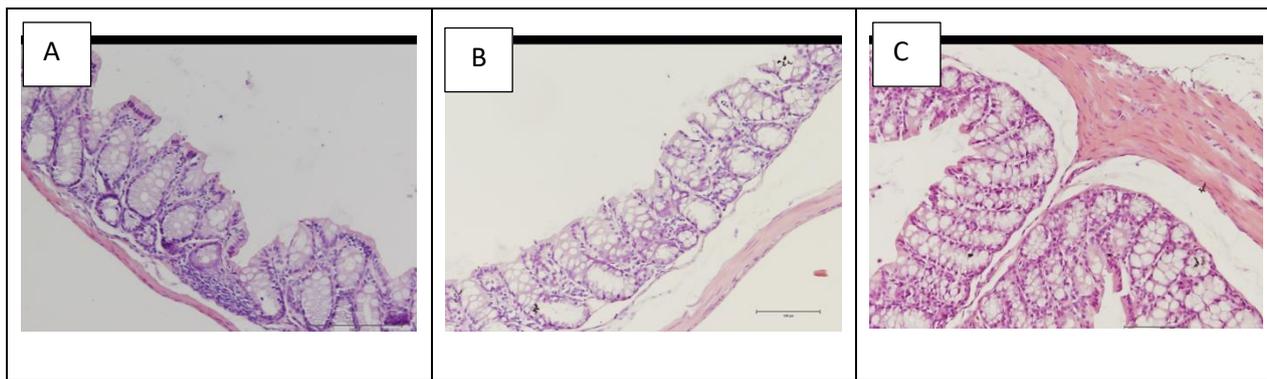


Figura 11. A - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu água ao longo de todo o período experimental; B - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu chá preto ao longo de todo o período experimental; C - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu kombucha ao longo de todo o período experimental.

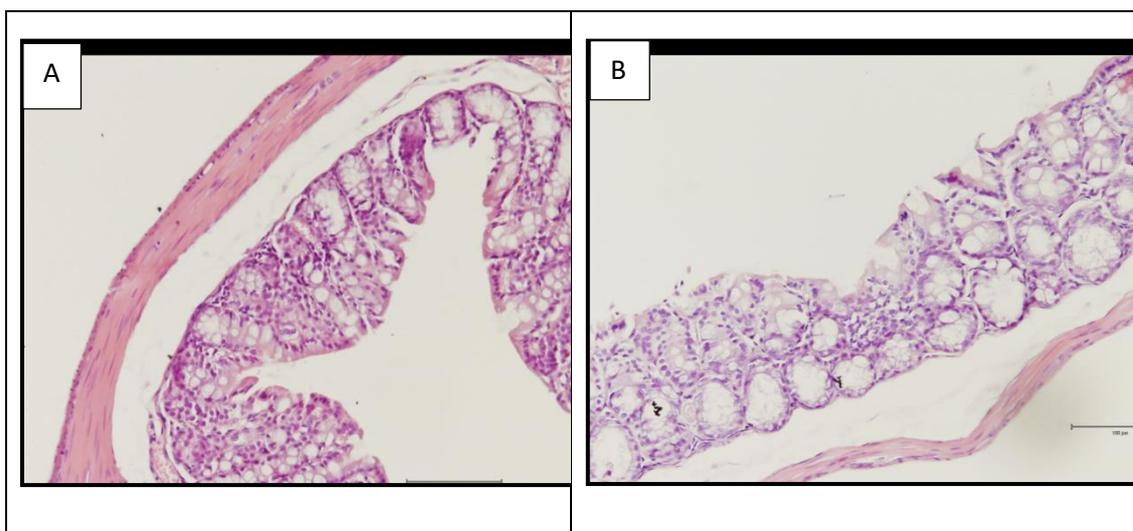


Figura 12. A - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu chá ao longo de todo o período experimental; B - Corte histológico de cólon corado por hematoxilina e eosina de animal diabético que consumiu kombucha ao longo de todo o período experimental.

4.3.2 Aspectos macroestruturais

Os parâmetros macromorfométricos tais como peso, comprimento (crânio-caudal) e volume foram sumarizados na tabela 5.

Tabela 05. Parâmetros macromorfométricos de peso, comprimento e volume; valores de cada parâmetro foram expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Parâmetros	Grupos							
	A-A (NG)	A-C (NG)	A-K (NG)	A-A (DM)	A-C (DM)	A-K (DM)	C-C (DM)	K-K (DM)
Peso (g)	0,45(0,18) ^a	0,33(0,23) ^a	0,30(0,25) ^a	0,48(0,18) ^a	0,45(0,19) ^a	0,32(0,25) ^a	0,41(0,24) ^a	0,43(0,22) ^a
Comprimento crânio-caudal (cm)*	10,00(0,26) ^a	9,00 (0,15) ^a	10,00(0,17) ^a	9,00(0,26) ^a	10,50(0,25) ^a	9,50(0,14) ^a	9,50(0,18) ^a	8,50(0,24) ^a
Volume ((V)*mm³)	1,08(0,21) ^a	1,05(0,17) ^a	0,99(0,22) ^a	0,78(0,21) ^a	0,88(0,25) ^a	0,95(0,19) ^a	0,79(0,28) ^a	0,80(0,19) ^a

As médias assinaladas com a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente.

4.3.3 Aspectos microestruturais (delineamento estereológico)

4.3.3.1 Densidade do volume

As estimativas dos parâmetros morfoquantitativos de Densidade do volume das Túnicas Muscular, Submucosa e Mucosa foram sumarizados na tabela 6.

Tabela 06. Parâmetros macromorfométricos do intestino. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida de seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Camadas	Grupos							
	A-A (NG)	A-C (NG)	A-K (NG)	A-A(DM)	A-C(DM)	A-K (DM)	C-C (DM)	K-K(DM)
Muscular (mm³)	0,39(0,07) ^a	0,28(0,09) ^a	0,25(0,24) ^a	0,36(0,08) ^a	0,33(0,07) ^a	0,24(0,11) ^a	0,27(0,43) ^a	0,39(0,05) ^a
Submucosa (mm³)	0,34(0,31) ^a	0,23(0,12) ^a	0,19(0,33) ^a	0,33(0,21) ^a	0,32(0,31) ^a	0,23(0,15) ^a	0,19(0,223) ^a	0,34(0,22) ^a
Mucosa (mm³)	0,06(0,23) ^a	0,07(0,22) ^a	0,08(0,37) ^a	0,07(0,33) ^a	0,08(0,23) ^a	0,07(0,28) ^a	0,07(0,39) ^a	0,10(0,43) ^a

As médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente.

4.3.3.2 Volume total

As estimativas dos parâmetros morfoquantitativos de densidade do volume das Túnicas Muscular, Submucosa e Mucosa foram sumarizadas na tabela 7.

Tabela 07. Parâmetros macromorfométricos de densidade do intestino. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida de seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Camadas	Grupos							
	A-A (NG)	A-C (NG)	A-K (NG)	A-A (DM)	A-C (DM)	A-K (DM)	C-C (DM)	K-K(DM)
Muscular (mm³)	0,42(0,03) ^a	0,29(0,15) ^a	0,24(0,29) ^a	0,29(0,33) ^a	0,29(0,17) ^a	0,22(0,41) ^a	0,21(0,13) ^a	0,31(0,25) ^a
Submucosa (mm³)	0,36(0,21) ^a	0,24(0,14) ^a	0,18(0,23) ^a	0,28(0,27) ^a	0,28(0,21) ^a	0,21(0,15) ^a	0,15(0,23) ^a	0,27(0,28) ^a
Mucosa (mm³)	0,06(0,24) ^a	0,07(0,26) ^a	0,07(0,47) ^a	0,06(0,43) ^a	0,07(0,13) ^a	0,06(0,38) ^a	0,05(0,29) ^a	0,08(0,33) ^a

As médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente.

4.3.3.3 Área total de superfície da mucosa (SA)

As estimativas dos parâmetros morfoquantitativos de área total de superfície da mucosa (SA) foram sumarizados na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros morfoquantitativos de área total de superfície da mucosa (SA) do intestino. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida de seu coeficiente de variação (CV). São Paulo, 2019.

Camadas	Grupos							
	A-A (NG)	A-C (NG)	A-K (NG)	A-A (DM)	A-C (DM)	A-K (DM)	C-C (DM)	K-K(DM)
Superfície mucosa (mm³)	4,01(0,12) ^a	3,86(0,18) ^a	3,99(0,29) ^a	2,84(0,36) ^b	2,44(0,26) ^b	5,01(0,19) ^c	2,12(0,32) ^a	4,14(0,21) ^a

As médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si, estatisticamente.

5 CONCLUSÃO

Diante das alegações de benefícios à saúde vinculadas ao kombucha, seu consumo aumentou exponencialmente em todo o mundo (sobretudo no hemisfério ocidental), ampliando sua identidade de bebida fermentada tradicional para alimentação moderna, saudável e probiótica (ainda que não possua esse tipo de registro pelo órgão responsável em nosso país).

Dentre as possíveis capacidades funcionais já mencionadas na literatura, destaca-se a de tratamento alternativo para controle de diabetes e suas complicações, corroborando a concepção de influência da microbiota intestinal no estado de saúde geral.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do consumo de kombucha como tratamento alternativo para amenizar e/ou retardar sintomas e complicações do *Diabetes Mellitus* e identificar as possíveis modificações metabólicas, morfológicas e imunológicas ocorridas em camundongos com diabetes tipo 1.

Concluiu-se que, apesar de ter havido recuperação de massa corpórea próxima daquela que se tinha antes da indução da diabetes, esse efeito não foi exclusivo do kombucha e, embora a influência no controle glicêmico tenha sido maior nos camundongos normoglicêmicos que diabéticos, acredita-se que a administração por um período prolongado pudesse indicar melhores resultados, uma vez que as avaliações histológicas e morfométricas do intestino demonstraram resultados satisfatórios quanto ao aumento da superfície de mucosa e diminuição do infiltrado inflamatório, favorecendo a modulação imunológica.

Logo, há necessidade de realização de mais estudos para comprovação da capacidade funcional do kombucha e elucidação de sua eficácia enquanto tratamento exclusivo e/ou complementar do diabetes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloulou, A.; Hamden, K.; Elloumi, D.; Ali, M. B.; Hargafi, K.; Jaouadi, B.; Ayadi, F.; Elfeki, A.; Anmar, E. (2012). Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 63-71.

American Dietetic Association - ADA. (2004). Position of the American Dietetic Association: Functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(5): 814-826.

Assunção, T. S.; Ursine, P. G. S. (2008). Estudo de fatores associados à adesão ao tratamento não farmacológico em portadores de diabetes mellitus assistidos pelo Programa Saúde da Família, Ventosa, Belo Horizonte. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13: 2189-2197.

Badaró, A. C. L.; Guttierres, A. P. M.; Rezende, A. C. V.; Stringheta, P. C. (2008). Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 1. *Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição*, 2(3): 1-20.

Bezerra, A. N.; Carvalho, N. S.; Viana, A. C. C.; Moraes, S. R. (2016). Efeito da suplementação de probióticos no diabetes mellitus: Uma revisão sistemática. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 15(2): 129-139.

Bhattacharya, S.; Gachui, R.; Sil, P. C. (2013). Effect of kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 60: 328-340.

Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12(2): 123-130.

Bogsan, C. S. B.; Nero, L. A.; Todorov, S. D. From traditional knowledge to an innovative approach for bio-preservation in food by using lactic acid bacteria (2015). *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*. Microbiology Monographs.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2018). Portaria nº 103, de 20 de setembro de 2018. *Submete à consulta pública, pelo prazo de 75 dias, o Projeto de Instrução Normativa que visa estabelecer em todo território nacional o padrão de identidade e qualidade de kombucha*. Publicado no Diário Oficial da União em 28 de setembro de 2018, edição 188, seção 1.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2019). Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019. *Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional*. Publicado no Diário Oficial da União em 18 de setembro de 2019, edição 181, seção 1, página 13.

Brasil. Ministério da Saúde. *Abordagem nutricional em diabetes mellitus*. (2000). Coordenadores: Anelena Soccal Seyffarth, Laurenice Pereira Lima, Margarida Cardoso Leite. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2000. 155 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2013). *Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes*. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2013. 45 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. (2016). *Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – VIGITEL*. Brasília/DF.

Carvalho, J. B. C.; Zecchin, H. G.; Saad, M. J. A. (2002). Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 46(4): 419-425.

Cox, D. J.; Gonder, F. L. (1992). Major developments in behavioral diabetes research. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 60(4): 628-638.

Dashti, M. H.; Morshedi, A. (2000). A comparison between the effect of black tea and kombucha tea on blood glucose level in diabetic rat. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*, 13(2): 83-87.

Dashti, M. H.; Morshedi, A. (2010). Chronic consumption of kombucha and black tea prevents weight loss in diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes And Obesity*, 2(2): 23-26.

Fernandes, N. S. M. (2013). *Alterações metabólicas no diabético*. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2013.

Gross, J. L.; Silveiro, S. P.; Camargo, J. L.; Reichelt, A. J.; Azevedo, M. J. (2002). Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 46(1): 16-26.

Gundersen, H. J. G.; Bagger, P.; Bendtsen, T. F. (1988). The new stereologic tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 96: 857-881.

Gundersen, H. J. G. (2002). The smooth fractionator. *Journal of Microscopy*, 207: 191-210.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8): 506-514.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Edição IV (1ª edição digital). São Paulo/SP: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

Jayabalan, R.; Malbaša, R.; Lončar, E. S.; Vitas, J.; Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 538-550.

Jayabalan, R.; Marimuthu, S.; Sathishkumar, M. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1): 392-398.

Kutner M.H., Nachtsheim C.J., Neter J., Li W. (2005). *Applied linear statistical models*. 5 ed. McGraw-Hill Irwin, New York, p. 1396.

Leal, F.; Schwartsmann, G.; Lucas, H. S. (2008). Medicina complementar e alternativa: uma prática comum entre os pacientes com câncer. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 54(6): 471-86.

Lima, N. S.; Silva, N. F. S.; Abreu, B. S.; Modesto, K. R. (2019). Verificação de viabilidade em amostra de kombucha. *Revista de Iniciação Científica e Extensão*, 2(2): 71-75.

Luz, M. T. (2005). Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. *PHYSIS: Revista de Saúde Coletiva*, 15: 145-176.

Maciel, F. R.; Punaro, G. R.; Rodrigues, A. M.; Bogsan, C.S.B.; Rogero, M. M.; Oliveira, M. N.; Mouro, M. G.; Higa, E.M.S. (2016). Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats. *Clinical Nutrition*, 35(5): 1066-1072.

Marsh, A.; Sullivan, O.; Hill, C.; Ross, R.; Cotter, P. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38: 171-178.

Mayhew, T. M.; Olsen, D. R. (1991). Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. *Journal of Anatomy*, 178: 133-144.

Medeiros, S. C. G.; Cechinel-Zanchett, C. C. (2019). Kombucha: efeitos *in vitro* e *in vivo*. *Infarma – Ciências Farmacêuticas*, 31(2): 73-79.

Monteleone, I.; Vavassori, P.; Biancone, L., Monteleone, G.; Pallone, F. (2002). Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut*, 50(3), iii60 – iii64.

Moraes, F. P.; Colla, L. M. (2006). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2): 109-122.

Muniz, E.; Ladd, A. A. B. L.; Ladd, F. V. L.; Silva, A. A. P.; Kmit, F. V.; Borges, A. S.; Teixeira, R.; Mota, L. S. L. S.; Belli, C. B.; Zoppa, A. L. V.; Silva, L. C. L. C.; Melo, M. P.; Coppi, A. A. (2013). 3-D technology used to accurately understand equine ileocolonic aganglionosis. *Cells Tissues Organs*, 198(2): 160-168.

Nespolo, C. R.; Oliveira, F. A.; Pinto, F. S. T.; Oliveira, F. C. (2015). *Práticas em tecnologia de alimentos*. Porto Alegre, Artmed.

Nyengaard, J. R.; Alwasel, S. H. (2014). Practical stereology of the stomach and intestine. *Ann Anat*, 196(1): 41-47.

Okamoto, J. M.; Lopes, C. B.; Veiga, R. B.; Luz, J. L. R.; Camargo, T. V.; Rodrigues, M. R. S. (2014). Alterações morfofuncionais intestinais no diabetes: revisão da literatura. *Ciências Biológicas e da Saúde*, 20(2): 143-147.

Oltman, C. L.; KANE, N. L.; GUTTERMAN, D. D.; BAR, R. S.; DELLSPERGER, K. C. (2000). Mechanism of coronary vasodilation to insulin and insulin-like growth factor I is dependent on vessel size. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 279, E176-E181.

Paludo, N. (2017). *Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul – UFRGS. Porto Alegre, 2017. 47 p.

Pereira, C.; Lourenço, F.; Castro, P.; Rola, J.; Jacquet, J. (1999). A Diabetes Mellitus e suas complicações. Relembrar para prevenir. *Medicina Interna*, 6(1), 54-66.

Raizel, R.; Santini, E.; Kopper, A. M.; Filho, A. D. R. (2011). Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência & Saúde*, 4(2), 66-74.

Rocha, F. D.; Teixeira, V. L.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A. C. (2006). Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87(2), 49-54.

Rodrigues Neto, J. F.; Faria, A. A.; Figueiredo, M. F. S. (2009). Medicina complementar e alternativa: utilização pela comunidade de Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 55(3), 296-301.

Ronchetti, A. G.; Müller, S. G. (2016). Identidade e comida: gastronomia tradicional de Florianópolis apreciada como patrimônio cultural imaterial. *Revista Memorare*, 3(3), 37-53.

Santoro, S. (2008). Is the metabolic syndrome a disease of the foregut? Yes, excessive foregut. *Ann Surg*, 247(6): 1074-1075.

Santos, M. J. (2016). *Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração*. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2016. 229 p.

Santos, W. C. R.; Barbosa, C. D.; Lacerda, I. A. C. (2017). *Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto*. Apresentação na 69ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) – UFMG. Belo Horizonte/MG.

Santos, Y. M. A.; Mota, M. M. A.; Santiago, A. M.; Gouveia, D. S.; Dantas, R. L.; Moreira, I. S. (2019). Avaliação da composição de kombucha a base de

diferentes chás (verde e preto). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, 12(03): 01-06.

Sartorelli, D. S.; Franco, L. J. (2003). Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. *Caderno de Saúde Pública*, 19(1), 29-36.

Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD. (2016). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)*. São Paulo/SP.

Souza, L. M.; Correia, K. C.; Santos, A. M. G.; Barreto, L. P.; Bezerra Neto, E. (2010). Comparação de metodologias de análise de pH e acidez titulável em polpa de melão. *X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX 2010)*, UFRPE, Recife.

Srihari, T.; Karthikesan, K.; Ashokkumar, N.; Satyanarayana, U. (2013). Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. *Journal Of Functional Foods*, 5, 1794-1802.

Stringheta, P. C.; Oliveira, T. L.; Gomes, R. C.; Amaral, M. P. H.; Carvalho, A. F.; Vilela, M. A. P. (2007). Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2): 181-194.

Thamer, K. G.; Penna, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 589-595.

Wu, J; Li, M.; Liu, L.; An, Q.; Zhang, J., Zhang, J. (2013). Nitricoxide and interleukinsare involved in cell proliferation of RAW264.7 macrophages activated by viili exopolysaccharides. *Inflammation*, 36, 954 – 961.

Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2008). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2),446-455.

6 ANEXO

Anexo A. Ficha do Aluno, emitida pela Plataforma Janus.

Impresso em: 14/09/2019 08:23:15

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9133 - 10578212/1 - Caroliny de Almeida Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5790-1/1	Desenvolvimento de Lipídeos como Alimentos Funcionais e Nutracêuticos	04/10/2017	09/11/2017	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5748-2/1	Imunologia de Mucosas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/11/2017	30/11/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/6	Aprimoramento Pedagógico	03/04/2018	30/04/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5715-7/4	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	15/05/2018	09/07/2018	120	8	100	A	N	Concluída
FBT5788-1/3	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/08/2018	26/08/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5773-8/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	06/08/2018	14/10/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/6	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2018	22/10/2018	90	6	100	A	N	Concluída
QBQ5747-11/4	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	02/09/2018	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71