

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

GREICE DOTTO SIMÕES

APLICAÇÃO DA KOMBUCHA NA ÁREA DA SAÚDE

Pelotas
2022

GREICE DOTTO SIMÕES

APLICAÇÃO DA KOMBUCHA NA ÁREA DA SAÚDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde e Comportamento.

Orientador: Fernanda Nedel

Pelotas
2022

GREICE DOTTO SIMÕES

APLICAÇÃO DA KOMBUCHA NA ÁREA DA SAÚDE

BANCA EXAMINADORA:

Professor Doutor Adriano Martimbianco de Assis

Professora Doutora Aline Longoni de Assis

Professora Doutora Camila Perelló Ferrúa

Professora Doutora Fernanda Nedel

S593a Simões, Greice Dotto

Aplicação da kombucha na área da saúde/Greice Dotto Simões.

– Pelotas: UCPEL, 2022.

127 f.

Tese (doutorado) – Universidade Católica de Pelotas, Programa de Pós- Graduação em Saúde e Comportamento, Pelotas, BR-RS, 2022.

Orientadora: Fernanda Nedel.

1. Kombucha. 2. Saúde. 3. Diabetes. 4. Revisão sistemática I.
Nedel, Fernanda. II. Título.

CDD 610

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Cristiane de Freitas Chim CRB 10/1233

RESUMO

Kombucha é uma bebida resultante da fermentação de chás ou sucos adoçados que contêm um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras como inóculo, também conhecido como Scoby. Kombucha foi estudada para entender melhor seus possíveis efeitos nas patologias animais. Este estudo revê sistematicamente a literatura para identificar quais aplicações da kombucha na área da saúde em animais. A fim de ampliar a compreensão desses mecanismos no tratamentos e prevenção de doenças buscou-se o desenvolvimento de dois artigos de revisão. O primeiro estudo revisou a literatura de forma sistemática e identificou que os órgãos predominantes utilizados para verificar o potencial de saúde do kombucha incluem fígado, pâncreas e rim. Entre as condições patológicas investigadas no fígado estão toxicidade, dieta hipercolesterolêmica e lesões. No segundo artigo, através de uma revisão sistemática foi verificado que a Kombucha possui efeitos antidiabéticos. Em ambas revisões considera-se que a kombucha possui na sua composição polifenóis e ácidos orgânicos aos quais podem ser atribuídos os efeitos benéficos em face dessas patologias.

Palavras-chave: kombucha; saúde; Diabetes; revisão sistemática

ABSTRACT

Kombucha is a beverage resulting from the fermentation of sweetened teas or juices that contain a symbiotic consortium of bacteria and yeasts as an inoculum, also known as Scoby. Kombucha was studied to better understand its possible effects on animal pathologies. This study systematically reviews the literature to identify which applications of kombucha in animal health. In order to broaden the understanding of these mechanisms in the treatment and prevention of diseases, the development of two review articles was sought. The first study systematically reviewed the literature and found that the predominant organs used to verify the health potential of the kombucha include liver, pancreas and kidney. Pathological conditions investigated in the liver include toxicity, a hypercholesterolemic diet and injuries. In the second article, through a systematic review it was found that Kombucha has antidiabetic effects. In both reviews it is considered that the kombucha has polyphenols and organic acids in its composition to which the beneficial effects can be attributed in the face of these pathologies.

Keywords: kombucha; health; Diabetes; systematic review

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Projeto

Figura 1 – Barreira intestinal em estado fisiológico, com muco, presença de <i>tight junctions</i> entre as células intestinais e a microbiota comensal em estado de homeostase.....	30
Figura 2 – A perda da barreira intestinal, ausência da camada de muco, distribuição irregular e perda de função das <i>tight junctions</i> , disbiose são algumas das características observadas no processo inflamatório da doença inflamatória intestinal	31
Figura 3 – Fermentação da kombucha.....	35
Figura 4 – Desenho dos grupos do experimento animal.....	43

Artigo 1

Figura 1 - Flow diagram of study selection	79
---	----

Artigo 2

Figura 1 - Flow diagram of study selection	119
---	-----

Artigo 3

Figura 1 - Análise da concentração de compostos fenólicos totais do chá verde e da kombucha durante 14 dias de fermentação pelo método de Folin-Ciocalteu. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão em µg de ácido gálico por mL ⁻¹ . Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si (p>0,05).....	110
Figura 2. Análise da capacidade antioxidante do chá verde e da kombucha fermentada por 14 dias, pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão em EC50 ug mL ⁻¹ . Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si (p>0,05).....	112
Figura 3. Análise da inibição da peroxidação lipídica do chá verde e kombucha fermentada por 14 dias, pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão em nm de Malonaldeído (MDA) mL ⁻¹ . Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si (p>0,05).....	114

Figura 4. Análise da citotoxicidade da kombucha fermentada por 14 dias, pelo método de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ($p>0,05$).....	115
Figura 5. Estrutura molecular celulósico derivado de Kombucha. A) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 600 a 4000 cm ⁻¹ . B) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 4000 a 2500 cm ⁻¹ . C) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 2000 a 1180 cm ⁻¹ . D) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 1180 a 600 cm ⁻¹	117
Figura 6. Curva da decomposição térmica do material celulósico da kombucha: a) Curva termogravimétrica (TGA); b) Curva termogravimetria derivada (DTG).....	119

LISTA DE TABELAS

Projeto

Tabela 1 - Lista de Alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde para os alimentos/ingredientes aprovadas pela Anvisa.....	21
Tabela 2 - Micro-organismos patogênicos utilizados para na análise da atividade antagonista da Kombucha e do chá verde verde (<i>Camellia Sinensis</i>).....	45
Tabela 3 - Critérios para pontuação de parâmetros de avaliação da evolução da doença inflamatória intestinal induzida por DSS.....	44
Tabela 4 – Escala da gravidade da inflamação na avaliação macroscópica.....	45
Tabela 5 – Critérios para avaliação microscópica.....	46

Artigo 1

Tabela 1 - Characteristics of the articles included.....	78
Tabela 2 - Application site of kombucha.....	84

Artigo 2

Tabela 1 - Results of the kombucha effect.....	102
Tabela 2 – Characteristics of included studies.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
CAT	Catalase
CU	Colite Ulcerativa
DSS	Dextrano Sulfato de Sódio
DC	Doença de Chron
DII	Doença Inflamatória Intestinal
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutationa Peroxidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL	Interleucina
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NaCl	Cloreto de Sódio
Ph	Potencial Hidrogeniônico
SOD	Superoxido Dismutase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNBS	Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
PROJETO	
1. IDENTIFICAÇÃO	15
1.1 Título	15
1.2 Doutoranda	15
1.3 Orientadora	15
1.4 Instituição	15
1.5 Curso	15
1.6 Linha de pesquisa	15
1.7 Data	15
2. INTRODUÇÃO	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
3.2.1 Artigo 1	17
3.2.2 Artigo 2	17
3.2.3 Artigo 3	19
3.2.2 Artigo 4	19
4. HIPÓTESES	19
4.1 Artigo 1	18
4.2 Artigo 2	18
4.3 Artigo 3	19
4.4 Artigo 4	19
5. REVISÃO DE LITERATURA	20
5.1 Alimentos funcionais.....	20
5.2 Probióticos.....	22
5.3 Prebióticos	23
5.4 Simbióticos.....	24
5.5 Compostos Fenólicos e Antioxidantes	24
5.6 kombucha.....	26
5.7 Colite Ulcerativa.....	29

5.8 Modelos experimentais.....	33
6. METODOLOGIA	34
6.1 Preparo da kombucha.....	35
6.2 Artigo 1.....	36
6.2.1 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais pelo método Folin Ciocalteau	36
6.2.2 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	36
6.2.3 Determinação de compostos fenólicos individuais por HPLC.....	36
6.2.6 Atividade Antimicrobiana.....	38
6.2.6.1 Teste de difusão em ágar por disco (micro-organismos indicadores).....	38
6.3 Artigo 2.....	39
6.3.1 Animais.....	39
6.3.2 Colite experimental induzida por Dextran Sulfato de Sódio.....	39
6.3.3 Estudo Piloto.....	40
6.3.4 Tratamentos.....	42
6.3.5 Avaliação da colite.....	43
6.3.5.1 Índice de Atividade da Doença (IAD).....	43
6.3.5.2 Avaliação macroscópica do cólon.....	44
6.3.5.3 Avaliação microscópica do cólon.....	45
6.3.6 Avaliação do estresse oxidativo.....	45
6.3.6.1 Determinação de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)..	45
6.3.6.2 Determinação da atividade da Catalase (CAT).....	46
6.3.6.3 Determinação da atividade da enzima Superoxido Dismutase (SOD).....	46
6.3.6.4 Determinação da atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPX1).....	46
6.3.6.5 Determinação das citocinas.....	47
6.3.6.6 Determinação do conteúdo de mucinas.....	47
6.3.7.7 Mieloperoxidase colônica.....	47
6.3.7.8 Análise de dados.....	47
6.4 Artigo 3	48
6.4.1 Estratégias de Busca	48
6.4.2 Pergunta de revisão	48
6.4.3 Seleção de Artigos	48

6.4.3.1 Critérios de inclusão	48
6.4.3.2 Critérios de exclusão	48
6.4.4 Coleta de Dados	49
6.5 Artigo 4	49
6.5.1 Estratégias de busca	49
6.5.2 Pergunta de revisão	49
6.5.3 Seleção de artigos	49
6.5.3.1 Critérios de inclusão	49
6.5.3.2 Critérios de exclusão	49
6.5.4 Coleta de dados	50
7. Aspectos éticos	51
8. CRONOGRAMA	52
9. ORÇAMENTO	53
10. REFERÊNCIAS	54
11. ARTIGO DE REVISÃO 1.....	65
12. ARTIGO DE REVISÃO 2.....	83
13. ARTIGO DE PESQUISA 3.....	101

APRESENTAÇÃO

Este volume tem por objetivo investigar os efeitos da kombucha na área da saúde. Para isso, foi elaborado um projeto para teste in vivo de colite ulcerativa aguda. Além disso, elaborou-se duas revisões sistemáticas onde na primeira foram verificados o potencial da kombucha na área da saúde e na segunda revisão, seu efeito na Diabetes.

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Aplicação da kombucha na área da saúde

1.2 Doutoranda: Greice Dotto Simões

1.3 Orientadora: Fernanda Nedel

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Doutorado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Pesquisa Experimental Aplicada à Saúde

1.7 Data: 2022

2. INTRODUÇÃO

Percebe-se cada vez mais a preocupação das pessoas com relação à importância de uma alimentação saudável, rica em nutrientes, sendo esta considerada um fator “potencial de crescimento e de desenvolvimento humano com qualidade de vida e cidadania, conforme destaca a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN)” (Pimentel, 2013).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento funcional é aquele que exerce um papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais no organismo humano (Brasil, 1999).

Os alimentos funcionais estão classificados conforme seus compostos bioativos e probióticos. São consideradas substâncias bioativas, os carotenóides, os fitoesteróis, os flavonóides, os fosfolipídios, os organossulfurados, polifenóis, entre outras. Os probióticos são micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (Brasil, 2013). Os compostos bioativos são considerados importantes para manutenção e nutrição do organismo, reduzindo a velocidade da reação dos radicais livres, e consequentemente, agindo como antioxidante (Melo e Andrade, 2010). O desequilíbrio na produção de radicais livres e na remoção destes pelas defesas antioxidantes, definido como estresse oxidativo, pode causar danos celulares ao atacar membranas, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos, levando a alterações funcionais e ao desenvolvimento de diversas doenças (Tureck et l., 2017).

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

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

alternativa (Hooper et al., 2012; Ambalam et al., 2016).

A dieta contém vários alimentos com uma série de benefícios para a saúde que oferecem uma excelente oportunidade para melhorar a saúde pública e o bem-estar. Os benefícios medicinais dos alimentos têm sido explorados desde tempos imemoriais. Estudos epidemiológicos mostraram uma ligação entre o consumo de alimentos derivados de plantas e uma série de benefícios para a saúde (Gul et al., 2016).

Kombucha é uma bebida fermentada obtida através da fermentação do chá adoçado (*Camellia sinensis*) com bactérias simbióticas e leveduras osmofílicas (Amarasinghe et al., 2016). Adquiriu uma popularidade significativa devido às suas várias alegações e alguns efeitos farmacológicos estabelecidos. Acredita-se que a maioria dessas propriedades benéficas possa ser atribuída aos polifenóis, ácidos orgânicos e uma série de outros ingredientes que são inerentes às matérias-primas ou são produzidos como resultado da fermentação microbiana (Bhattacharya et al., 2016).

Além disso, foi relatado que a kombucha constitui um potente suplemento terapêutico que reduziu o dano celular, melhorou a resistência ao câncer, preveniu doenças cardiovasculares, promoveu funções digestivas, estimulou o sistema imunológico, e problemas inflamatórios foram reduzidos (Greenwalt et al., 2000; Murugesan et al., 2009; Gharib, 2009).

Torna-se assim, necessária a pesquisa de métodos alternativos e menos nocivos para atenuar os efeitos da colite ulcerativa no organismo, e ainda elucidar o potencial da kombucha, frente à outras doenças.

Diante disso, propôs-se como produto final da presente tese o desenvolvimento de quatro artigos científicos. O primeiro artigo teve como intuito a caracterização química e microbiológica presentes na kombucha. No segundo artigo, buscou-se o efeito da kombucha em modelo animal de colite ulcerativa induzida por Dextran Sulfato de Sódio. O terceiro tratou-se de uma revisão sistemática, onde foram identificadas as aplicações da kombucha na área da saúde, considerando modelos animais. Por fim, o quarto artigo teve como propósito revisar sistematicamente a literatura para verificar o efeito da aplicação da kombucha na Diabetes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e quantificar os compostos bioativos presentes na kombucha e no chá verde (*Camellia sinensis*) e avaliar o efeito intestinal da kombucha frente ao modelo de colite ulcerativa induzida por Dextran Sulfato de Sódio em animais. Ainda, buscou-se na literatura, por meio de duas revisões sistemáticas a aplicação da kombucha na área da saúde.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Artigo 1

Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais e individuais da kombucha e do chá verde (*Camellia sinensis*).

Avaliar a atividade antioxidante da kombucha e do chá verde (*Camellia sinensis*).

Avaliar a atividade microbiológica da kombucha e do chá verde (*Camellia sinensis*).

3.2.2 Artigo 2

Avaliar a inflamação colônica dos animais tratados com kombucha e chá verde (*Camellia sinensis*) por intermédio da histologia.

Determinar os níveis de malonaldeído nos animais tratados com kombucha e chá verde (*Camellia sinensis*).

Determinar a atividade das enzimas antioxidantes intestinais CAT, SOD e GPx no tratamento com kombucha e chá verde (*Camellia sinensis*).

Dosar citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α no cólon dos animais tratados com kombucha e chá verde (*Camellia sinensis*).

Avaliar o efeito da kombucha sobre o conteúdo de mucinas no cólon dos animais tratados com kombucha e chá verde (*Camellia sinensis*).

Avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase no cólon dos animais tratados com kombucha e chá verde (*Camellia sinensis*).

3.2.3 Artigo 3

Revisar sistematicamente a literatura, a fim de estabelecer como a kombucha tem sido aplicada na saúde humana, considerando modelos animais.

3.2.4 Artigo 4

Revisar sistematicamente a literatura, a fim de estabelecer como a kombucha foi aplicada na Diabetes.

4. HIPÓTESES

4.1 Artigo 1

Será observada maior quantidade de compostos fenólicos na kombucha em relação ao chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada maior atividade antioxidante no kombucha em relação ao chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada maior atividade antimicrobiana do kombucha em relação ao chá verde (*Camellia sinensis*).

4.2 Artigo 2

Será observada uma diminuição na inflamação do cólon dos animais tratados com kombucha em relação tratamento com chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada uma diminuição nos níveis de Malonaldeído (MDA) nos animais tratados com kombucha em relação aos animais tratados com chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada uma maior redução da atividade da Catalase (CAT), Peroxidase (SOD) e Glutationa Peroxidase (GPx) nos animais tratados com kombucha em relação aos animais tratados com chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada maior diminuição das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α nos animais tratados com kombucha em relação aos animais animais tratados com chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada um maior conteúdo de mucina nos animais tratados com kombucha em relação ao chá verde (*Camellia sinensis*).

Será observada menor atividade da enzima mieloperoxidase nos animais tratados com kombucha em relação ao chá verde (*Camellia sinensis*).

4.3 Artigo 3

Haverá a identificação da aplicação da kombucha em diversas patologias com variações no modelo de indução, bem como na elaboração da kombucha utilizando diferentes chás, tempo de fermentação e períodos de tratamento.

Haverá a melhora nos parâmetros bioquímicos e histológicos avaliados.

4.3 Artigo 4

Haverá a predominância nos estudos da forma de indução de Diabetes em modelos animais, elaboração da kombucha, tempo de fermentação e período de tratamento

Haverá melhora nos parâmetros bioquímicos e histológicos avaliados.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Alimentos funcionais

A definição de alimento funcional é originária do Japão, em 1984, quando foi utilizado pela indústria para descrever alimentos fortificados com ingredientes específicos, inferindo-lhes efeitos benéficos à saúde (Bianco, 2008).

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

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

Para que esses alimentos sejam eficazes é necessário consumi-los regularmente associados ao aumento da ingestão de frutas, verduras, cereais integrais, carne, leite de soja e alimentos ricos em ômega-3. Na tabela 1 estão apresentados os

alimentos/ingredientes com as principais alegações de propriedade funcional ou de saúde (Brasil, 2002).

Tabela 1- Lista de Alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde para os alimentos/ingredientes aprovadas pela Anvisa.

Classes	Ingredientes funcionais	Benefícios*
Ácidos	Ômega 3	Manutenção de níveis saudáveis
Graxos	(EPA – Ácido Ecoisapentanóico e DHA – Ácido Decosahexaenóico)	de triglicerídeos.
Carotenóides	Licopeno, Luteína, Zeaxantina	Antioxidante que protege as células contra os radicais livres.
Fibras alimentares	Fibras alimentares, dextrina resistente, goma guar parcialmente hidrolisada, lactulose, polidextrose	Auxiliam o funcionamento do intestino.
	Beta glucana, psillium ou psyllium, quitosana	Auxilia na redução da absorção do colesterol.
	Fruto oligossacarídeo – fos, inulina (prebióticos)	Contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal.
Fitoesteróis	Fitoesteróis	Auxiliam na redução da absorção de colesterol
Polióis	Manitol/Xilitol/Sorbitol	Não produz ácidos que danificam os dentes.
Probióticos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei shirota</i> <i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>rhamnosus</i> <i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>defensis</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>b. Lactis</i>) <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal.
Proteína de soja	Proteína de soja	Pode ajudar a reduzir o colesterol.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2008.

*Desde que associados a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

Embora os alimentos funcionais tenham sido usados como medicamentos tradicionais no tratamento de doenças crônicas por vários séculos, são descobertas científicas modernas que estão estabelecendo os benefícios dos alimentos funcionais e compostos bioativos para a saúde e que fornecem os mecanismos subjacentes de suas ações (Hur et al., 2012; Larussa et al., 2017).

5.2 Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos ou componentes de células microbianas que, quando ingeridos em quantidades suficientes, são capazes de produzir efeitos benéficos no hospedeiro. Isto pode ser realizado através de diferentes formas: (Shadnoush et al., 2015; Giorgetti et al., 2015).

1. Alguns probióticos induzem a produção e secreção de diferentes substâncias com propriedades bactericidas como Lactobacilos e Bifidobacterias. O ácido lático produzido pelos Lactobacilos diminui o pH luminal, o que resulta na inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas. O mesmo ocorre quando probióticos aumentam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (Shadnoush et al., 2015; Giorgetti et al., 2015).
2. Deslocamento de microrganismos nocivos da interface lumén-mucosa ao competir pelos locais de ligação na superfície epitelial e camada mucosa, o que pode ser atingido através da β -defensina produzidas por alguns probióticos (Shadnoush et al., 2015; Sougioultzis, S., et al., 2006).
3. Modulação da imunidade da mucosa intestinal ao promover o desenvolvimento de células T reguladoras e, consequentemente, da produção de citocinas antiinflamatórias IL-10 e TGF- β (Shadnoush et al., 2015; Giorgetti et al., 2015).
4. Melhora da função da barreira intestinal por meio da regulação da homeostasia do epitélio além de diminuir a permeabilidade intestinal a microrganismos e outros抗igenos, atuando sobre as junções (Shadnoush et al., 2015; Giorgetti et al., 2015).

A quantidade e frequência de consumo de probióticos necessários para fornecer os benefícios funcionais a eles atribuídos dependerão da linhagem do microrganismo em questão e do efeito biológico desejado (Champagne et al., 2005). No Brasil, a legislação estabelece a quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos a faixa de 10^8 a

10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Tal valor equivale a 8-9 log UFC por porção do produto (Anvisa, 2008).

Pesquisas com probióticos estão sendo realizadas visando a proteção do corpo contra os radicais livres e retardando o aparecimento e evolução de doenças por meio da busca de antioxidantes naturais e seguros para administração em humanos (Mishra et al., 2015).

Segundo Stefe et al. (2008), os probióticos estão disponíveis nas formas naturais (leite fermentados, iogurte, sorvete, queijos, sucos fortificados e outros alimentos de origem vegetal fermentados) e preparações farmacêuticas podendo ser constituído de um único ou um conjunto de microrganismos.

5.3 Prebióticos

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que promovem alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal através do metabolismo de bactérias no intestino conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (Bindels et al., 2015).

Rodríguez et al. (2003), citam alguns requisitos para incluir um alimento como prebiótico: possuir origem vegetal, ser parcialmente fermentável por colônias de bactérias, não ser hidrolisada por enzimas digestivas, ser parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas, não ser absorvida na parte superior do trato gastrintestinal e ser osmoticamente ativa são requisitos para ser definido como prebiótico.

Os carboidratos não-digeríveis como a lactulose, a inulina e diversos oligossacarídeos são exemplos de substâncias prebióticas fermentáveis pelas bactérias benéficas do cólon (Cummingns e Macfarlane, 2002). Foi confirmado que o consumo de fruto-oligossacarídeos não digeríveis exercem impacto positivo sobre bifidobactérias, além disso, compostos fenólicos no chá podem afetar a composição de bactérias intestinais, incluindo a repressão de potenciais patógenos, enquanto promove o crescimento seletivo de probióticos (Kemperman et al. 2010; Tuohy et al. 2012).

Para garantir o estímulo da multiplicação de bifidobactérias no cólon recomenda-se doses diárias a partir de 4 a 5 g, chegando até 20g, que são eficientes quando administradas durante pelo menos 15 dias. (Komatsu et al., 2008).

Diferentes grupos de microrganismos são necessários para a fermentação de polímeros complexos, tais como polissacarídeos e proteínas no colón. Os principais

produtos de fermentação bacteriana no cólon são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que exercem efeitos benéficos como alívio da constipação, melhoria da absorção de minerais, redução do nível de glicose no sangue, regulação do metabolismo dos lipídeos, diminuição da incidência de câncer do cólon e a modulação do sistema imunitário. Outros efeitos incluem a inibição de bactérias patogênicas e o "efeito de barreira", que limita o número de locais de adesão disponíveis no intestino (Roberfroid et al., 2010; Gullón et al., 2014).

5.4 Simbióticos

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

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

Simbióticos foram sugeridos para reduzir processos inflamatórios na mucosa intestinal, e ter o potencial para induzir a remissão da doença inflamatória intestinal (DII) (Steed et al., 2008).

5.5 Compostos Fenólicos e Antioxidantes

Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais encontrados nas plantas, sendo originados ao longo de todo o processo metabólico. Essas substâncias fenólicas, ou polifenóis, contêm inúmeras variedades de compostos: flavonóides simples, ácidos fenólicos, flavonóides complexos e antocianinas (Babbar et al., 2014). Geralmente estão relacionados às respostas de defesa na planta. No entanto, os metabólitos fenólicos desempenham um papel importante em outros processos, por exemplo, incorporando substâncias atraentes para acelerar a polinização, coloração para camuflagem e defesa contra herbívoros, bem como atividades antibacterianas e antifúngicas (Alasalvar et al., 2001; Edreva et al., 2008).

Os compostos fenólicos possuem importantes propriedades biológicas e farmacológicas. A bioatividade destes compostos pode estar relacionada à sua capacidade de quelar metais, inibir lipoxigenase e seqüestrar radicais livres e assim inibir os processos da oxidação em certos sistemas (Decker, 1997).

Os radicais livres são classificados como grupos de átomos ou moléculas altamente reativas contendo um ou mais elétrons não pareados. Possuem a capacidade de doar ou ganhar elétrons de outras moléculas na tentativa de emparelhar seus elétrons, gerando uma espécie mais estável, sendo normalmente produzidos em organismos vivos. Estudos em animais comprovaram que, quando produzidos em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) se comportam como importantes mediadores de quase todas as funções celulares (Sari et al., 2012). Os radicais livres e oxidantes podem ser prejudiciais ou úteis para o corpo, pois desempenham um papel duplo como compostos tóxicos e benéficos. São produzidos a partir de metabolismos celulares normais ou de fontes externas (poluição, fumaça de cigarro, radiação, medicamentos). Quando ocorre uma sobrecarga não podendo ser gradualmente destruída, o acúmulo desses radicais livres gera um fenômeno chamado estresse oxidativo (Pham-Huy et al., 2008).

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

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

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

5.6 kombucha

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

A bebida é preparada por fermentação de chá adoçado usando leveduras e bactérias como inóculo, também conhecido como fungo do chá ou SCOPY ("Colônia Simbiótica de Bactérias e Fermento"; Sreeramulu et al., 2000). O SCOPY, segundo Jayabalan et al. (2010), é constituído majoritariamente por proteína e fibras. Sempre é formado um SCOPY na superfície do recipiente a cada nova fermentação, o qual deve ser guardado uma parte para a próxima e assim sucessivamente. Geralmente é utilizada a

infusão de chá preto, porém outros tipos de chás também podem ser usados como base, como por exemplo, o chá verde, branco, dentre outros (Fu et al., 2014).

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

O consumo de Kombucha tornou-se bastante popular em todo o mundo devido às suas várias alegações e alguns efeitos farmacológicos estabelecidos que incluem anti-diabético (Bhattacharya et al. 2013), hepatoprotetor (Bhattacharya et al. 2011), antioxidante (Bhattacharya et al. 2013; Bhattacharya et al. 2011), distúrbios metabólicos, aterosclerose, problemas inflamatórios, artrite e até câncer (Jayabalan et al. 2014). A kombucha é também conhecida por sua atividade antimicrobiana contra diferentes organismos patogênicos (Battikh et al. 2013; Greenwalt et al. 1998; Jayabalan et al. 2014; Sreeramulu et al. 2000). A combinação entre kombucha e quitosana apresentou efeito antimicrobiano principalmente para *E. coli* em filmes para embalagens ativas de carne prolongando sua vida útil (Ashraf et al. 2018). Kombucha também mostrou atividade antimicrobiana contra o enteropatógeno *Vibrio cholerae*, permeabilizando suas membranas bacterianas (Amarasinghe et al., 2018). Bhattacharya et al. (2016) encontraram excelente potencial antimicrobiano frente a bactérias enteropatogênicas *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Salmonella Typhimurium* devido à interação combinada de seu conteúdo fenólico.

A bebida é composta de duas fases: um biofilme flutuante e uma fase líquida ácida. Ácido acético, ácido glucônico e etanol são os principais componentes do líquido, mas também no biofilme devido à sua grande capacidade de absorção de água (Czaja et al., 2006). Sob condições aeróbicas e associação simbiótica de bactérias e leveduras ocorre a transformação de açúcar e chá no período de 7 a 10 dias em uma bebida levemente gaseificada, levemente ácida e refrescante, composta de vários ácidos, aminoácidos,

vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas (Malbaša et al., 2011). O pH do chá de kombucha é abaixo de 4 devido às quantidades significativas de vários ácidos (Jayabalan et al., 2008). Srihari e U. Satyanarayana (2012), verificaram a presença de ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, vitaminas B1, B2, B6 e vitamina C como os principais constituintes, além do aumento da atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais com o aumento do tempo de fermentação. Segundo Ettayebbi et al. (2003), este aumento no conteúdo total de polifenóis e flavonóides no chá de Kombucha pode ser devido à degradação de polifenóis e flavonóides complexos em moléculas menores por algumas enzimas liberadas pela associação de microrganismos presentes. Microrganismos como *Candida tropicalis* são conhecidos por serem capazes de degradar vários polifenóis.

Os componentes fenólicos incluem catequina, epicatequina, epicatequina galato, galocatequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato (Hara, 1995), e têm a capacidade de eliminar radicais livres, em particular espécies reativas de oxigênio (ROS), e possuem altos níveis de propriedades antioxidantes de amplo alcance (Srihari e Satyanarayana, 2012). A presença de polifenóis do chá é conhecido por transmitir ao kombucha a atividade antioxidante (Jayabalan et al., 2014). Estudos que examinam o chá kombucha preparado usando substratos como chá verde, chá preto e resíduos de chá mostraram ter uma alta atividade de remoção de radicais (Jayabalan et al., 2008). Houve um aumento da atividade antioxidante do kombucha feito com chá preto do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia de fermentação analisado no estudo de Chakravorty et al. (2016). Salafzoon et al. (2017) relatam que kombucha acrescido de gengibre apresentou efeitos antioxidantes em modelos animais com câncer de mama, verificados através da notável diminuição da superóxido dismutase (SOD) nefrótica e hepática e dos tecidos tumorais. Além disso, houve redução nos níveis de malonaldeído (MDA) em ambos os órgãos testados com atenuação da peroxidação lipídica e dano celular e evitou a depleção hepática de glutationa redutase (GSH) que pode resultar em carcinogênese. Em ratos hipercolesterolêmicos, a kombucha reduziu o processo de peroxidação lipídica e aumentou o sistema de defesa antioxidante quando comparados ao tratamento controle que utilizou o chá de *Camellia sinensis* isoladamente (Bellassoued, 2015).

Em estudo semelhante, com modelos animais diabéticos e dislipidêmicos o kombucha, inibiu as atividades de α -amilase e lipase no plasma e pâncreas e foi supressor do aumento dos níveis de glicose no sangue. Curiosamente, observou-se que o kombucha induziu um atraso acentuado na absorção de LDL-colesterol e triglicérides e um aumento significativo no colesterol HDL. As análises histológicas mostraram também que exerceu

uma ação de melhoria sobre o pâncreas e eficientemente protegeu as funções do fígado e rim de ratos diabéticos, evidenciada pela redução significativa em aspartato transaminase, a alanina-transaminase e atividade transpeptidase gama-glutamil no plasma, bem como nos conteúdos de creatinina e ureia (Aloulou, 2012).

Já o efeito hepatoprotetor, foi atribuído ao microrganismo *Gluconacetobacter sp.* A4, que é um produtor primário de ácido D-Sacarico-1,4-lactona, presente no processamento da kombucha (Wang et al., 2013).

5.7 Colite Ulcerativa

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

A doença pode progredir de leve a grave com muitas características, como dor abdominal, diarréia, fadiga, perda de peso, sangramento retal e fezes com sangue. Em casos graves, sangue e muco nas fezes, fístula, hemorróidas de fissura e anemia são observados (Head, 2003). Em animais estas características estão bem estabelecidas incluindo a perda de peso, formação de úlcera, diarréia com sangue, perda de epitélio celular e infiltrações com neutrófilos (Xavier e Podolsky, 2007).

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

1. Leve – frequência de fezes menos do que 4 vezes por dia com ou sem presença de sangue nas fezes, sem distúrbios sistêmicos.
2. Moderado- frequência de fezes 4 vezes por dia ou mais com ou sem sangue nas fezes e algumas alterações sistêmicas.
3. Grave- frequência de fezes mais do que 6 vezes por dia com presença de sangue, febre acima de 37,5 °C, dor abdominal, anemia.
4. Fulminante- frequência de fezes mais do que 10 vezes por dia com hemorragia contínua, dilatação de cólon e abdominal duro à palpação. Além da classificação por

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

Os dados epidemiológicos atualmente disponíveis mostram que essas doenças são mais freqüentes em países industrializados (Victoria et al., 2009). A maior incidência e prevalência são observadas na Europa e na América. Um ambiente ocidentalizado e estilo de vida, que estão associados com alto nível socioeconômico, uso de medicamentos, dietas ricas em açúcar e gorduras, poluição e estresse, está relacionado ao aparecimento da doença (Shouval et al., 2017). Embora a etiologia da Colite Ulcerativa ainda não seja clara, é geralmente hipotetizado como sendo uma condição multifatorial induzida por uma combinação de microbiota genética, ambiental e intestinal, que desencadeia na mucosa luminal a alta produção de mediadores pró-inflamatórios desenvolvendo estresse oxidativo no intestino (El-Abhar et al., 2008). A severidade da doença inclui os fatores genéticos e também bactérias comensais entéricas que são requeridas para iniciar e manter a inflamação intestinal ou colônica (Ostanin et al., 2009).

A inflamação tem um papel importante na patogênese da CU, pois as substâncias oxidantes que participam do desenvolvimento da inflamação podem causar lesões e destruir tecidos resultando no equilíbrio entre agressão e defesa caracterizando estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A barreira intestinal é formada por uma monocamada de células epiteliais colunares polarizadas unidas por junções intercelulares (*tight junctions*) que mantém as ligações das células e a separação do conteúdo luminal do intestino com o meio intracelular, conforme mostra a Figura 1. A análise de biópsias do cólon sigmóide de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal revelou que há uma diminuição no número de junções, assim como diminuição da sua capacidade estrutural.

Citocinas pró- inflamatórias presentes na DII, dentre outros fatores podem induzir este tipo de defeito na barreira intestinal, assim como regular a expressão gênica e os processos de redistribuição das junções intercelulares (Hering et al., 2008; Neurath, 2014).

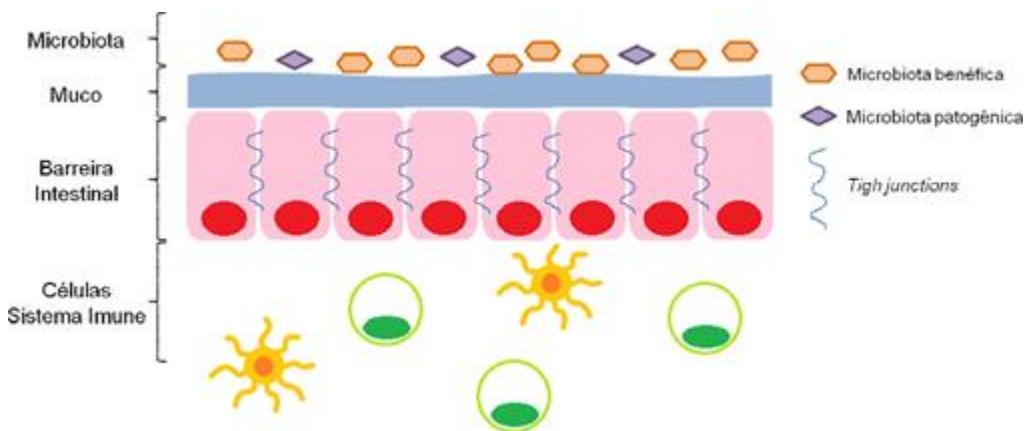


Figura 1. Barreira intestinal em estado fisiológico, com muco, presença de *tigh junctions* entre as células intestinais e a microbiota comensal em estado de homeostase.

A perda desta barreira física pode levar a alterações na resposta imune, observada na DII, favorecendo um elevado influxo de substâncias presentes no lúmen, como por exemplo, bactérias entéricas e antígenos, promovendo uma sobrecarga do sistema imunológico, induzindo a resposta inflamatória, conforme mostrado na figura 2 (Silva et al., 2008).

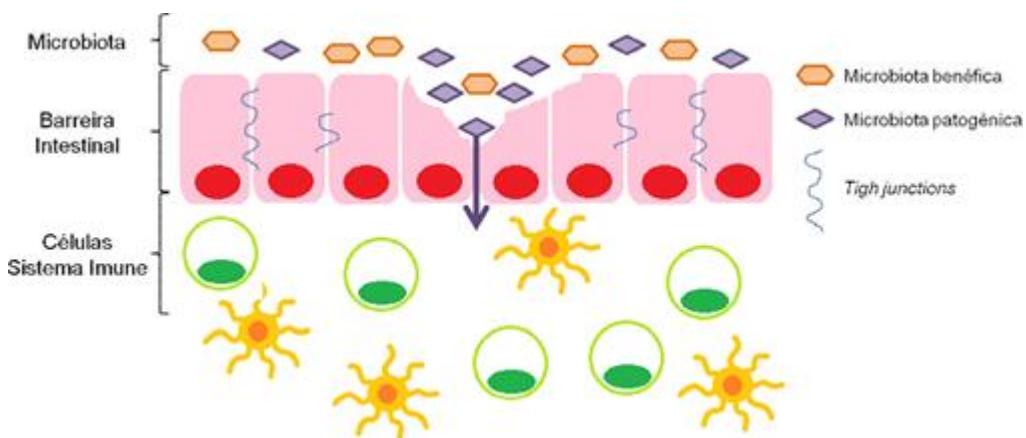


Figura 2. A perda da barreira intestinal, ausência da camada de muco, distribuição irregular e perda de função das *tigh junctions*, disbiose são algumas das características observadas no processo inflamatório da doença inflamatória intestinal.

A desregulação no sistema imunológico intestinal apresenta um importante papel na patogênese dessas doenças. Pacientes com doença inflamatória intestinal têm

presença de extensivo infiltrado inflamatório, edema, perda de células caliciformes, diminuição na produção de muco, hiperplasia de células crípticas e ulceração, observados em cortes histológicos (Ostanin et al., 2009).

A inflamação causada pela doença está relacionada a disfunções na resposta imune, especialmente das células T presentes na mucosa intestinal, além do desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6 e IL-12, e citocinas anti-inflamatórias, tais como IL -4, IL-10, IL-11 e de expressão de proteínas inflamatórias que incluem ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), os quais desempenham um papel importante na inflamação patológica (Sakthivel e Guruvayoorappan, 2014).

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

A cirurgia é necessária em pacientes com doença ativa crônica ou grave refratária. Terapias farmacêuticas não foram bem sucedidas; entretanto, a cirurgia é tipicamente vista como um último recurso e nem sempre é curativa (Crohns and Colitis Foundation, 2014; Hancock, 2008). Em pacientes com colite ulcerativa leve a moderada, as diretrizes atuais dos EUA recomendam o tratamento inicial com aminosalicilato (5-ASA) ou indução sequencial com corticosteróides seguido de terapia de manutenção com 5-ASA (Kornblut e Sachar, 2010; Vege et al., 2015).

Em pacientes com colite ulcerativa moderada a grave, um imunossupressor (IMS), como azatioprina ou 6-mercaptopurina, pode ser prescrito como terapia de manutenção após a indução com corticosteróides (Vege et al., 2015). Alternativamente, um anticorpo biológico, tipicamente anti-fator de necrose tumoral (TNF) -a, como infliximabe ou adalimumabe, pode ser prescrito com ou sem IMS simultânea para promover e manter a cura da mucosa e a remissão clínica (Kornblut e Sachar, 2010; Kopylov et al., 2016).

O uso de probióticos é uma forma alternativa de terapia para a colite ulcerativa (Ghouri, 2014). Eles auxiliam em diversos processos do organismo, dentre eles, a alteração da microbiota intestinal, inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estimulação da imunidade intestinal e o aumento da produção de butirato, um ácido graxo

de cadeia curta que atua como agente anti-inflamatório (Ghouri, 2014; Derikx et al., 2016).

5.8 Modelos experimentais

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

Os modelos de colite por ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), DSS e oxazolona são os modelos mais empregados. O TNBS, dissolvido em etanol, é administrado via intra-retal, em ratos ou camundongos. O etanol ocasiona desorganização da barreira intestinal, enquanto o TNBS age como hapteno, levando a uma resposta Th1, com densa infiltração celular, que atinge todas as camadas do cólon, como na Doença de Chron. Oxazolona também é um agente administrado via intra-retal em camundongos ou ratos, geralmente após pré-sensibilização subcutânea (abdômen), que induz aumento de produção de citocinas Th₂ e inflamação no cólon distal com similaridades à colite ulcerativa. Já o DSS é adicionado à agua dos bebedouros de ratos ou camundongos (solução de 2 – 5 %), por períodos variados (frequentemente 5 – 7 dias) (Wirtz et al., 2007; Randhawa et al., 2014). Provoca uma lesão química no epitélio intestinal, resultando na exposição da lâmina própria e do compartimento da submucosa a antígenos luminais e bactérias entéricas, desencadeando inflamação (Kitajima et al. 1999).

O DSS é um polissacarídeo sulfatado, carregado negativamente, solúvel em água, com propriedades anticoagulantes, produzindo modelos de colite aguda ou crônica em camundongos com peso molecular que varia de 40 a 50 kDa (Chassaing et al., 2014; Eichele e Kharbanda, 2017).

6. METODOLOGIA

6.1 Preparo da Kombucha

O biofilme de microrganismos (scoby), será adquirido comercialmente da marca Tao Kombucha® sendo adquirido acondicionado em embalagem plástica com seu líquido de partida. Os recipientes de fermentação serão esterilizados a 121°C por 20 min. O scoby será inoculado com seu líquido de partida (100 mL) em chá verde, previamente preparado com 1 L de água e sacarose (80 g/L) e 8 g/L de folhas secas por 3 min com água a 74 °C. O recipiente será recoberto com pano Perflex e elástico para evitar contaminação. Serão realizadas três fermentações com a finalidade de padronizar a kombucha para o estudo. Na primeira fermentação será utilizado o scoby inteiro e para segunda fermentação será dividido em quatro partes. Na terceira e última fermentação os scobys apenas serão transferidos para o novo recipiente. A primeira e segunda fermentação serão realizadas por 7 dias, já a terceira fermentação será realizada por 7 e 14 dias a 27±1°C, pois segundo a literatura, entre esses dias ocorrem diferenças significativas nos constituintes químicos da kombucha (Gaggia et al., 2019; Bellasoued et al., 2015; Kallel et al., 2012). Amostras do líquido de todos os recipientes da terceira fermentação serão coletados após 7 e 14 dias de fermentação, formando um *pool* para análises químicas e microbiológicas (Figura 3), sendo armazenados a -20°C (Kallel et al., 2012).

Após decorrido os 14 dias será interrompida a fermentação retirando os scobys e armazenando-os em 300 mL de chá verde e 100 mL de kombucha em recipiente fechado a 5°C.

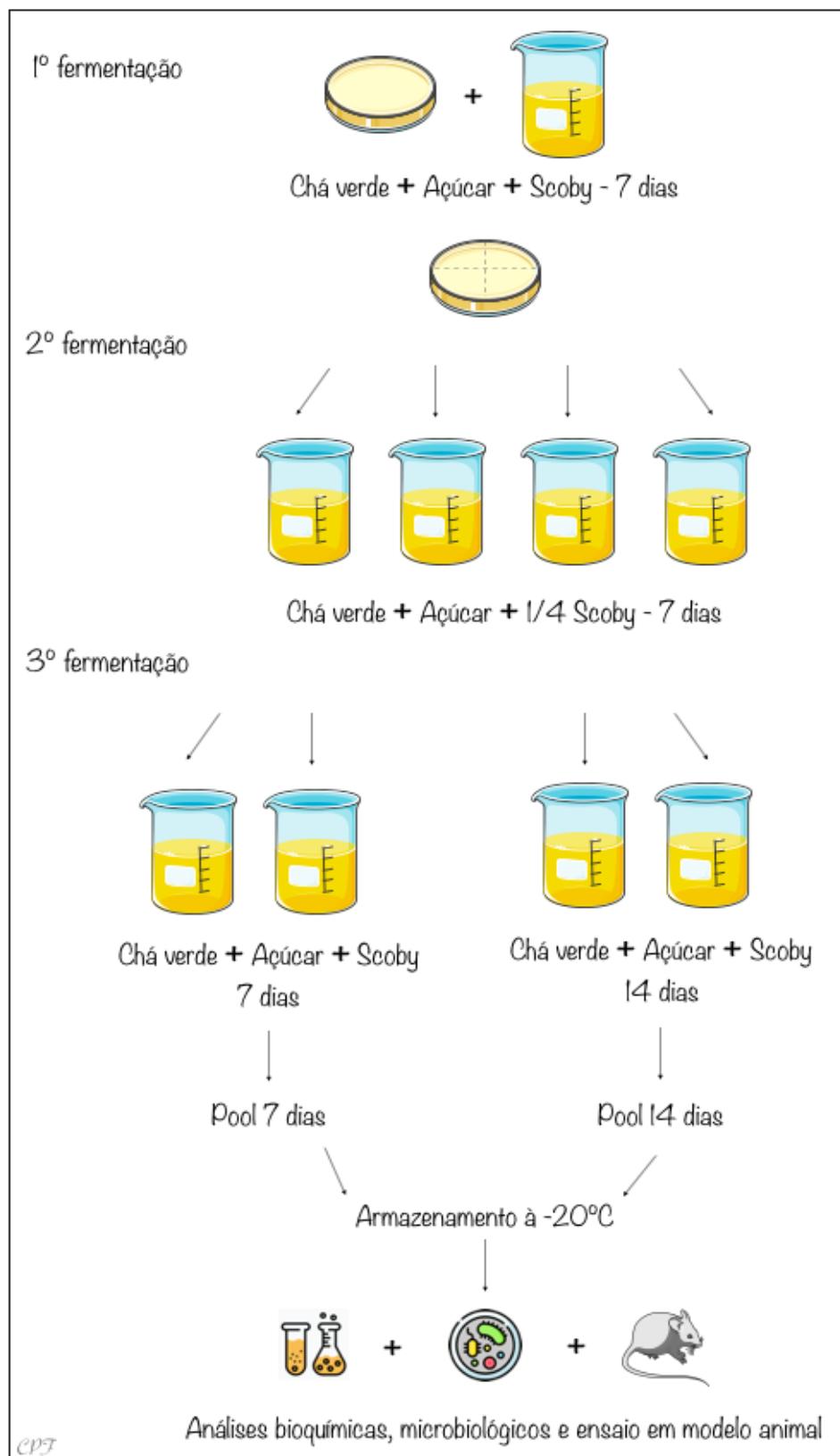


Figura 3. Fermentação da kombucha.

6.2 Artigo 1 – Caracterização química e microbiológica

6.2.1 Caracterização química e microbiológica da kombucha e do chá verde (*Camellia sinensis*)

As análises de caracterização química da kombucha e do chá verde serão realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pelotas e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

6.2.2 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais pelo método Folin-Ciocalteau

A quantificação de compostos fenólicos totais será determinada por meio de técnica espectrométrica sendo utilizado o método adaptado de Swain e Hillis (1959). Serão homogeneizadas 0,5mL de chá kombucha e adicionados 20mL de metanol (Synth®). A amostra será centrifugada a 10000rpm por 15 minutos. Serão coletados 250 μ L do sobrenadante e adicionados à amostra 4mL de água destilada e 250 μ L de Folin-Ciocalteau (Merck®) (1:1). Os tubos serão agitados e após 5 minutos serão adicionados 0,5mL de Na₂CO₃ (Sigma®) (7%). Após 2 horas, a absorbância será medida a 725nm. A quantidade de fenóis totais nas amostras será quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico entre as concentrações de 10 a 100 μ g/mL. A quantificação dos compostos fenólicos totais será realizada em triplicata e os resultados expressos em μ g de ácido gálico por g de amostra (μ g g⁻¹).

6.2.3 Determinação de Compostos Fenólicos Individuais por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

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

As análises cromatográficas com fase reversa foram feitas por gradiente, com coluna C18 (4.6 mm x 250 mm) empacotada com partículas de 5 µm de diâmetro; a fase móvel foi composta por água contendo 1% de ácido acético (A) e metanol (B) e o programa de eluição foi: 5% de B por 2 min; 20% de B até 10 min; 40, 50, 60, 70 e 80% de B a cada 10 min (BARBOSA FILHO et al., 2014). A kombucha e a fase móvel serão filtrados em filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e desgaseificados em banho de ultrassom antes do uso. Soluções estoque de referência foram preparadas na fase móvel utilizada, nas concentrações de 0,020 a 0,200 mg/mL para quercetina, rutina, luteolina, cumarina e campferol, e nas concentrações de 0,035 a 0,250 mg/mL para os ácidos gálico, clorogênico e caféico. A quantificação será feita a partir da integração dos picos utilizando o método de calibração externa, em 254 nm para ácido gálico, 280 nm para cumarina, 327 nm para os ácidos clorogênico e caféico, e 365 nm para quercetina, rutina, luteolina e campferol. Os picos cromatográficos serão confirmados pela comparação dos tempos de retenção com aqueles dos padrões de referência e pelo espectro. Todos os procedimentos cromatográficos serão feitos em temperatura ambiente.

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

6.2.4 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

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

de álcool metílico 50% (40mL), acetona 70% (Merck®) (40mL) e água (20mL) com 3,9 mL do radical DPPH e após, homogeneizado e armazenado no escuro por 45 minutos. Será utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515nm) serão monitoradas a cada minuto, onde será observada a redução da absorbância até sua estabilização. A curva padrão será realizada a partir da solução inicial de DPPH (60 μ M), variando a concentração de 10 μ M a 50 μ M. Cada uma destas soluções de DPPH (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M e 60 μ M) será armazenada em ambiente escuro por 45 minutos, e após, transferidas para cubetas de vidro, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 515nm. Os resultados serão expressos em EC50 (μ g mL⁻¹). O experimento será realizado em triplicata com três repetições.

6.2.5 Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana que a kombucha e o chá verde exercem sobre os micro-organismos patogênicos será realizada conforme o Teste de Difusão em Ágar por disco.

6.2.5.1 Teste de difusão em ágar por disco (Micro-organismos indicadores)

Os micro-organismos indicadores utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana serão: *Escherichia coli* ATCC 8739; *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076; *Listeria monocytogenes* ATCC 19114; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (tabela 2). Os micro-organismos indicadores serão suspensos em solução de NaCl (Synth®) a 0,85% padronizado para um índice de turbidez de OD600 equivalente a 0,150 no espectrofotômetro, correspondendo a uma solução padrão de turbidez McFarland de 0,5. Uma alíquota de 20ul da kombucha e do chá verde serão aplicadas separadamente sobre discos de celulose esterilizados (5mm) em placas de BHA previamente inoculados com uma zaragatoa embebida em uma cultura de cada bactéria indicadora. As placas serão incubadas a 37°C e as zonas de inibição serão medidas após 24h. O diâmetro das zonas de inibição serão medidos utilizando um paquímetro de calibre e halos \geq 7mm que serão considerados inibidora (Bromberg et al., 2006). O experimento será realizado em triplicata.

Tabela 2 - Micro-organismos patogênicos utilizados para a análise da atividade antagonista da kombucha e do chá verde (*Camellia Sinensis*).

Classe	Micro-organismo	Origem
Gram-negativo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	*ATCC
	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 1307	ATCC
Gram-positivo	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1911	ATCC
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	ATCC
<i>American</i>		
	Type	Culture
		Collection

6.3 Artigo 2 - Avaliação *in vivo*

6.3.1 Animais

Serão utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 8 semanas de vida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Desde o início até o final da execução do experimento todos os animais serão mantidos com ração e água à disposição. Os animais permanecerão no Biotério Central durante todo o experimento e serão mantidos em caixas (65x25x15cm) com ciclo de 12h claro-escuro e temperatura controlada (24-26°C) e terão o descarte adequado após ao final do experimento. Todos os procedimentos com animais serão realizados de acordo com o “Guia para cuidados e Uso de animais de Laboratório” do *National Research Council* (NRC, 2011).

6.3.2 Colite experimental induzida por Dextran Sulfato de Sódio

A colite aguda será induzida por administração de DSS (2,5%) diluído na água de beber dos animais administrado em bebedouro durante 7 dias. Ao longo do protocolo será avaliado o índice de atividade da doença (IAD), onde os animais serão monitorados em relação a mudanças de peso corporal, presença de sangue nas fezes e consistência das mesmas. Ao final de sete dias, os animais serão eutanasiados, os cólons coletados, lavados com solução salina a 0,9%, pesados e seus comprimentos mensurados. Após esse procedimento será feita a análise macroscópica e microscópica do cólon.

6.3.3 Estudo Piloto

Após aprovação no Comitê de Ética Animal será realizado o estudo piloto a fim de estabelecer um modelo animal de colite ulcerativa aguda utilizando Dextran Sulfato de Sódio (DSS).

Serão utilizados um total de 12 machos da espécie *Mus musculus* da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de vida. Os mesmos serão divididos em 2 grupos: experimental e controle. Ao grupo experimental (N=6) será fornecido na água de bebida dos animais DSS em uma concentração de 2,5% w/v por 7 dias consecutivos. O controle do consumo de água-DSS será realizado mediante a mensuração do volume presente no momento da colocação da garrafa na gaiola e três dias depois, quando será feita a troca por água-DSS frescos (espera-se um consumo diário, por animal, de aproximadamente 0,15 g/dia de DSS). Ao grupo controle (N=6) será oferecido água livre de DSS. Ambos os grupos (experimental e controle) receberão ração padrão do biotério. Durante o experimento, diariamente os animais serão monitorados quanto ao Índice de Atividade da Doença (perda de peso percentual, mensurado por balança analítica, consistência das fezes, avaliado macroscopicamente, e sangramento fecal, avaliado com Teste de Sangue Oculto).

No 8º dia os animais serão eutanasiados por exsanguinação, por punção cardíaca, pós anestesia inalatória com isoflurano. O sangue total será utilizado para a realização de hemograma completo. Serão removidos o cólon intestinal, o baço e a gordura retroperitoneal e gonadal. O cólon intestinal será avaliado macroscopicamente (presença de edema, ulceração, hemorragia e dilatação) e microscopicamente utilizando a técnica de coloração hematoxilina-eosina (presença de infiltrado inflamatório). O baço será pesado com balança analítica, e o lisado semeado em placas de ágar não seletivo. A gordura retroperitoneal e gonadal será pesada em balança analítica após a remoção. Os animais serão submetidos aos seguintes procedimentos:

1. Índice de Atividade da Doença (IAD) (Larner et al., 2019):

O IAD é um dos principais parâmetros de acompanhamento da evolução da colite ulcerativa aguda induzida por substância química (Wirtz et al., 2017). Será realizado diariamente durante os 7 dias de indução, como largamente preconizado pela literatura (Chassaing et al., 2015, Wirtz et al., 2017 Larner et al., 2019), uma vez que o tratamento com DSS é de curta duração e o acompanhamento torna-se primordial para denotar uma evolução constante da doença e garantir o bem estar do animal em experimentação. O

mesmo é calculado pela formula: [DAI= (score da perda de peso + score da consistência das fezes + score do sangramento fecal)/3] (Chen et al., 2015). Para a determinação do score da perda de peso, os animais serão pesados utilizando uma balança analítica e avaliados de acordo com os seguintes parâmetros:

- a) Score da perda de peso: 0, perda de menos de 1%; 1, perda de 1 a 1,5%; 2, perda de 5 a 10%; 3, perda de 10 a 20%; 4, mais de 20%.

Para a determinação do score da consistência das fezes e do sangramento fecal os animais terão as suas fezes coletadas mediante a colocação de um único animal em uma gaiola sem maravalha por 15-30 min. As fezes serão, então, coletadas com uma pinça estéril e analisadas macroscopicamente para a determinação da consistência das fezes, por dois avaliadores cegos (os dois avaliadores serão os mesmos até o fim do experimento), e classificados de acordo com os scores abaixo. Para a sangramento fecal será realizada avaliação com o Teste de Sangue Oculto (Abon Biopharm, Hangzhou, China) e os resultados avaliados de acordo com os scores abaixo.

- a) Score da consistência das fezes: 0, bem formada; 2, fezes pastosas; 4, fezes aquosas.
- b) Score do sangramento fecal: 0, nenhum sangramento; 2, pequena quantidade de sangue; 4, alta quantidade de sangue.

2. Avaliações do sangue total, cólon intestinal, baço e gordura retroperitoneal e gonadal

O sangue total será utilizado para a realização de hemograma completo. Após eutanásia a região abdominal do animal será pulverizada com etanol 70% e será realizada um incisão ventral na linha média. Serão removidos o cólon intestinal, o baço e a gordura retroperitoneal e gonadal.

- Cólono Intestinal: Após a remoção do cólon, os mesmos serão lavados com solução salina a 0,9%, pesados e seus comprimentos mensurados. Após esse procedimento será feita a análise macroscópica e microscópica do cólon. Para a avaliação macroscópica o cólon será aberto longitudinalmente sobre a margem mesentérica e lavado em solução salina para análise. As alterações macroscópicas na mucosa colônica serão avaliadas usando-se uma escala de dano macroscópico (Topal et al., 2014).

- a) Escala de dano macroscópico: 0, preservação da mucosa com aparência normal; 1, edema; 2, ulceração e hemorragia; 3, úlceras múltiplas e abundantes e dilatação da parede intestinal.

3. Avaliação Microscópica

A avaliação microscópica do cólon será realizada com a terceira parte distal do cólon, o qual será cortada longitudinalmente e fixada em paraformaldeído tamponado a 4%. As secções embebidas em parafina, cortadas com 5 µm de espessura serão coradas com hematoxilina-eosina e as imagens serão analisadas em microscópio. Nas secções colônicas serão avaliados 3 parâmetros (Chassaing et al., 2014):

a) Escala de dano microscópico

Gravidade da inflamação: 0, ausência da inflamação nas células da lâmina própria; 1, granulócitos na lâmina própria; 2, células inflamatórias que se estendem na submucosa; 3, infiltrado inflamatório.

Dano na cripta: 0, criptas intactas; 1, perda de um terço basal; 2, perda de dois terços basais; 3, perda da cripta inteira; 4, mudança da superfície epitelial com erosão; 5, erosão confluente. Ulceração: 0, ausência de úlcera; 1, um ou dois pontos de ulceração; 2, três ou quatro pontos de ulcerações; 3, ulceração confluente ou extensa. O máximo escore histológico de colite é 11 (Laroui et al., 2012).

Baço: Após a remoção do baço o mesmo será pesado e posteriormente o seu lisado (100mg/ml em PBS) semeado em placas de ágar não seletivo (Chassaing et al., 2014). O aumento do baço relaciona-se com a extensão da inflamação e anemia na colite ulcerativa aguda, e o cultivo em ágar indica a extensão da disseminação bacteriana no intestino.

Tecido Retroperitoneal e Gonodal: Ambos serão dissecados e pesados em balança analítica.

6.3.4 Tratamentos

Será realizado o cálculo amostral com nível de confiança de 95%, distribuídos nos seguintes tratamentos:

Controle positivo: animais que receberão tratamento com DSS

Controle negativo 1: animais que não receberão indução de colite aguda e sem tratamento com kombucha

Controle negativo 2: animais que não receberão indução de colite aguda e receberão tratamento com kombucha

Tratamento 1: animais colíticos que receberão Kombucha

Tratamento 2: animais colíticos que receberão chá verde (*Camellia sinensis*)

Nos grupos tratamento os animais receberão kombucha e chá verde por gavagem de 0,1 mL/100g de peso corporal, com início no 1º dia, mantendo-se até o 7º dia.

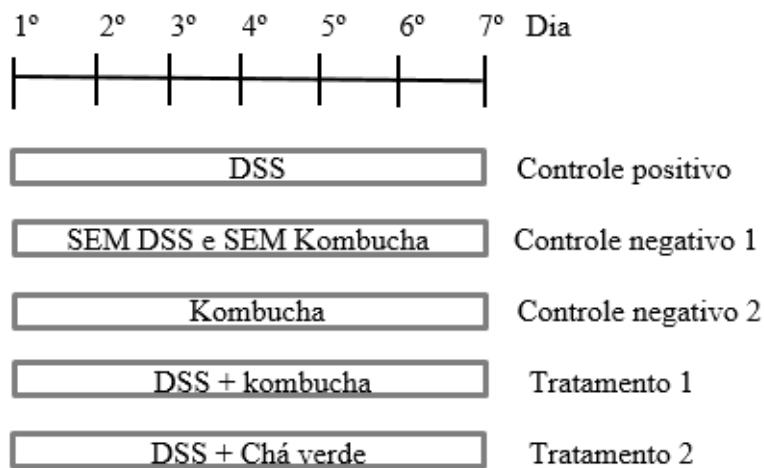


Figura 4. Desenho dos grupos do experimento animal

6.3.5 Avaliação da Colite

A avaliação da colite nos animais será realizada no piloto e no estudo com a kombucha.

6.3.5.1 Avaliação da Atividade da Doença

A gravidade da colite será monitorada diariamente por um índice de atividade da doença (DAI), incluindo perda de peso, consistência das fezes e sangramento (Tabela 3) e serão somados os escores dos três parâmetros. Os animais com escores maiores que 9 serão eutanasiados.

Tabela 3 - Critérios para pontuação de parâmetros de avaliação da evolução da doença inflamatória intestinal induzida por DSS, segundo Larner et al. (2019).

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

6.3.5.2 Avaliação Macroscópica do Cólono

O cólono será aberto longitudinalmente sobre a margem mesentérica e lavado em solução salina para análise. As alterações macroscópicas na mucosa colônica serão avaliadas usando-se uma escala de dano macroscópico (Topal et al., 2014) (Tabela 4).

Tabela 4 – Escala da gravidade da inflamação na avaliação macroscópica.

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

6.3.5.3 Avaliação Microscópica do Cólono

A terceira parte distal do cólono será cortada longitudinalmente e fixada em paraformaldeído tamponado a 4%. As secções embebidas em parafina, cortadas em seções de 5 µm serão coradas com hematoxilina-eosina e as imagens serão analisadas em microscópio. Nas secções colônicas serão avaliados 3 parâmetros (Tabela 5), segundo Gil-Martinez et al (2019).

Tabela 5 – Critérios para avaliação microscópica.

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

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

6.3.6 Avaliação do estresse oxidativo

Após a eutanásia dos animais serão retiradas amostras do cólon que serão armazenados a -80°C até a realização das análises. Todas as determinações bioquímicas serão realizadas nos homogeneizados dos fragmentos do cólon.

6.3.6.1 Determinação de Substâncias Reativas ao TBARS

Para avaliar a extensão da lipoperoxidação, detectamos a formação das substâncias reativas ao TBARS através de uma reação aquecida e ácida. Essa abordagem é amplamente adotada para medir estados redox lipídicos. A amostra será homogeneizada e misturada com 0,6 mL de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,67% e, em seguida, serão aquecidas por 25 minutos em banho-maria em ebulição. A concentração de TBARS será determinada medindo a absorbância de cada amostra a 532 nm. Será preparada uma curva de calibração, usando 1,1,3,3-

tetrametoxipropano como padrão. Os resultados serão expressos em nmol de TBARS/mg de proteína (Draper e Hadley, 1990).

6.3.6.2 Determinação da atividade da enzima Catalase (CAT)

A amostra (60 µg) será homogeneizada e misturadas com 150 µl de tampão fosfato (125 mM, pH 7,4). A reação será iniciada pela adição de 10 mL de H₂O₂ (0,5 mM). Um branco será preparado com 190 mL de tampão fosfato e 10 mL de H₂O₂ (0,5 mM). A taxa de diminuição da densidade óptica será medida a 240 nm após 1 min em relação ao branco. Uma unidade de atividade de CAT será definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mM de H₂O₂ por minuto a 37°C. A atividade específica será expressa em unidades/mg de proteína (Aebi, 1984).

6.3.6.3 Determinação da atividade da enzima Superoxido Dismutase (SOD)

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

6.3.6.4 Determinação da atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

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

6.3.6.5 Determinação das Citocinas

Os tecidos do cólon serão homogeneizados em solução tamponada com fosfato (50 mM; pH 7,4) contendo 1% de coquetel inibidor de protease para obter 10% de

homogeneizado de tecido. Os homogenizados serão centrifugados a 5000g por 20min. O sobrenadante será usado para estimar os níveis de citocinas, TNF- α , IL-6 e IL-1 β usando kits de ELISA específicos para cada animal, de acordo com as instruções do fabricante (Alavala et al. 2019).

6.3.6.6 Avaliação do conteúdo de mucinas

A análise histoquímica para mucina será realizada de acordo com Mowry e Winkler (1956). Os cortes histológicos serão oxidados em ácido periódico 0,5% por 5 min, lavados em água destilada, corados com reativo de Schiff por 20 min e lavados em água sulfurosa e em água corrente. As lâminas serão contracoradas com hematoxilina por 20 s, desidratadas em uma série ascendente de álcoois, diafanizadas em xanol e montadas entre lâmina e lamínula. As lâminas serão observadas em microscópio óptico em aumento de 400x e fotografadas. As glicoproteínas (mucinas) coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) serão quantificados com o programa ImageJ® de acordo com descrito por Pereira et al. (2013).

6.3.6.7 Mieloperoxidase colônica (MPO)

O MPO colônico é um marcador de neutrófilos, e sua concentração no tecido se correlaciona com a extensão da infiltração de neutrófilos. O tecido colônico será pesado (50-100 mg) e lavado cuidadosamente em PBS até livre de matéria fecal e armazenado a -80°C até serem analisados. A seguir será homogeneizado com brometo de hexadeciltrimetilâmônio a 0,5% (Sigma®) em PBS 50 mM, pH 6,0. O tecido será congelado-descongelado 3 vezes, submetido à sonicação por 10 s para obter uma suspensão homogênea do tecido e centrifugado em alta velocidade a 4 °C. A MPO será testada no sobrenadante em uma placa de 96 poços, adicionando 1 mg/mL de dicloridrato de dianisidina (Sigma®) e 0,5 × 10-4% de H₂O₂, medindo a densidade óptica a 450 nm. A MPO de neutrófilos humanos (Sigma®) pode ser usado como padrão (Faixa: 0,5-0,015 U / ml). Uma unidade de atividade MPO é definida como a quantidade necessária para degradar 1,0 μmol de peróxido / min a 25 °C. O resultado será expresso como U/mg de proteína ou U/g de tecido (Chassaing et al., 2015).

6.3.6.8 Análise de Dados

A avaliação dos dados será realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA)

de duas vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de $p<0,05$. Para a elaboração dos gráficos será utilizado o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

6.4 Artigo 3: Revisão sistemática da literatura.

6.4.1 Estratégia de Busca

A pesquisa eletrônica foi realizada sem restrição da data inicial até julho de 2019, nos bancos de dados PubMed, Scopus, Scielo, Science Direct e ISI Web of Knowledge. A pesquisa inicial foi realizada usando o MeSH e os termos relevantes: (Kombucha) OR (chá Kombucha). Todas as referências foram gerenciadas no software EndNote X7 (Thomson Reuters, Nova York, NY, EUA). Inicialmente, referências duplicadas foram excluídas. Os títulos, resumos e metodologias de estudo foram selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão por dois revisores de forma independente (GDS e CCdoA). As listas foram comparadas e, em caso de desacordo, um consenso foi alcançado através da discussão. Quando um consenso não foi alcançado, um terceiro revisor decidiu se o artigo deveria ser incluído (FN). Esta revisão sistemática seguiu as declarações do PRISMA, com alguns ajustes (Moher et al., 2009).

6.4.2 Pergunta de Revisão

What are the applications of Kombucha in human health, considering animal models?

6.4.3 Seleção de artigos

6.4.3.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão foram estudos em modelo animal que investigaram o kombucha aplicado à saúde humana. O uso de modelo animal para estudar a aplicação em saúde de kombucha foi realizado com o objetivo de controlar fatores de confusão nas variáveis de interesse.

6.4.3.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram: estudos não relacionados ao kombucha, estudos relacionados ao kombucha, mas não relacionados à área da saúde, revisões de literatura, seção de livros, estudos não originais, idiomas diferentes do português, inglês e espanhol.

6.4.4 Coleta de dados

Os dados foram extraídos e tabulados de forma independente por dois revisores para serem submetidos à análise descritiva. A metanálise dos dados não foi viável, dada a ausência de concordância na literatura até o momento.

6.5 Artigo 4: Revisão sistemática da literatura

6.5.1 Estratégia de Busca

A pesquisa eletrônica foi realizada sem restrição da data inicial até julho de 2019, nos bancos de dados PubMed, Scopus, Scielo, Science Direct e ISI Web of Knowledge. A pesquisa inicial foi realizada usando o MeSH e os termos relevantes: (Kombucha) OR (chá Kombucha). Todas as referências foram gerenciadas no software EndNote X7 (Thomson Reuters, Nova York, NY, EUA). Inicialmente, referências duplicadas foram excluídas. Os títulos, resumos e metodologias de estudo foram selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão por dois revisores de forma independente (GDS e CCdoA). As listas foram comparadas e, em caso de desacordo, um consenso foi alcançado através da discussão. Quando um consenso não foi alcançado, um terceiro revisor decidiu se o artigo deveria ser incluído (FN). Esta revisão sistemática seguiu as declarações do PRISMA, com alguns ajustes (Moher et al., 2009).

6.5.2 Pergunta de Revisão

How has kombucha been applied to diabetes?

6.5.3 Seleção dos artigos

6.5.3.1 Critérios de Inclusão

O critério de inclusão foi estudos em modelo animal que investigaram o kombucha aplicado ao diabetes.

6.5.3.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram estudos não relacionados ao kombucha; estudos relacionados ao kombucha, mas não relacionados ao diabetes; estudos sem mencionar claramente o desenvolvimento do modelo de diabetes mellitus; revisões de literatura, seção de livros, sem estudos originais, idiomas diferentes do português, inglês e espanhol; nenhuma restrição de dados foi aplicada.

6.5.4 Coleta dos dados

Os dados foram extraídos e tabulados de forma independente por dois revisores para serem submetidos à análise descritiva. A metanálise dos dados não foi viável, dada a ausência de concordância na literatura até o momento.

7. Aspectos éticos

Serão usadas todas as estratégias que visam minimizar o número de animais usados em cada experimento. O tamanho do grupo será planejado segundo o relato da literatura e cálculo amostral para cada um dos modelos e/ou ensaios.

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

Ademais, estarão em acordo com *Ethical Guideline for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela International Association for the Study of Pain (IASP). Tais procedimentos são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área. Obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO-27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*).

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

8. CRONOGRAMA

9. ORÇAMENTO

Descrição	Valor unitário	Subtotal
Ponteiras e microtubos	R\$ 400,00	R\$ 400,00
Luvas	R\$ 20,00	R\$ 200,00
Reagentes diversos	R\$ 5.000,00	R\$ 5.000,00
<i>Kits</i> para Bioquímica	R\$ 200,00	R\$ 2.000,00
TOTAL		R\$ 7.600,00

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALASALVAR, C.; GRIGOR, J.M.; ZHANG, D.L.; QUANTICK, P.C.; SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1410–1416, 2001.
- ALAVALA, S.; SANGARAJU R.; NALBAN, N; SAHU, B. D.; JERALD, M. K.; KILARI, E. K.; SISTLA, R. STEVIOSIDE, a diterpenoid glycoside, shows anti-inflammatory property against Dextran Sulphate Sodium-induced ulcerative colitis in mice, **European Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 855, p. 192-201, 2019.
- ALI, A. A.; ABD AL HALEEM, E. N.; KHALEEL, S. A.-H.; SALLAM, A. S. Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 268–275, 2017.
- ALOULOU, A.; HAMDEN, K.; ELLOUMI, D.; BOU ALI, M.; HARGAFI, K.; JAOUADI, B.; AYADI, F.; ELFEKI, A.; EMNA AMMAR, E. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 63, p. 1-9, 2012.
- AMARASINGHE, H.; WEERAKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. aY. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2016.
- AMBALAM, P. et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119–131, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 06 out. 2019.
- ASHRAFI, A.; JOKAR, M.; MOHAMMADI NAFCH, A. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 444-454, 2018.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K.; BHARGAV, V. K. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants, **Journal of Food and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2568-2575, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, 9 jan. 2002.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H. C. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and its effect on *Listeria monocytogenes* in bovine meat. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DERIKX, L. A. A. P., NISSEN, L. H. C., SMITS, L. J. T., SHEN, B., & HOENTJEN, F. Risk of Neoplasia After Colectomy in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 798–806, 2016.

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

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid-Peroxidation. **Method Enzymology**, v. 186, p. 421-31, 1990.

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

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

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

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

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **The British Journal of Nutrition**, v. 88, Suppl 1, p. S39-49, 2002.

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

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

GAGGIÀ, F.; BAFFONI, L.; GALIANO, M. et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 2019.

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

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

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

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

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

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

GULLÓN, B; GULLÓN, P; TAVARIA, F; PINTADO, M; GOMES, A. M; ALONSO, J. L; PARAJO, J. C. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinooligosaccharides from wheat bran. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 438-449, 2014.

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

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

HARA, Y. et al. Chemical composition of tea. *Food Reviews International*, v. 11, p. 435-459, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KIM, H. S.; JEONG, S. G.; HAM, J. S.; CHAE, H. S.; LEE, J. M.; AHN, C. N. Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from

Korean infant feces. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v . 19, n. 9, p. 1335–1341, 2006.

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

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

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

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

KORNBLUTH, A.; SACHAR, D. B. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 7, p. 1371-1385, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological of Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 2015.

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

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

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

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

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

OSTANIN, D. V.; BAO, J.; KOBOZIEV, I.; GRAY, L.; ROBINSON-JACKSON, S. A.; KOSLOSKI-DAVIDSON, M.; PRICE, V. H.; GRISHAM, M. B. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. **American Journal of Physiology**, v. 296, n. 2, p. 135-146, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 3, n. 1, p. 16-33. 2008.

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

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

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

VEGE, S. S.; ZIRING, B.; JAIN, R.; MOAYYEDI, P. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Asymptomatic Neoplastic Pancreatic Cysts. **Gastroenterology**, v. 148, n. 4, p. 819-822, 2015.

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

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

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

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

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

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



Kombucha Application in Health: Systematic Review

**Greice Dotto Simões, Cainá Corrêa do Amaral, Camila Perelló Ferrúa,
Amanda de Lima Aldrighi, Karoline Brizola de Souza, Geovanna Peter
Corrêa, Roberta Giorgi and Fernanda Nedel***

*Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GP Cell),
Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil*

***Corresponding Author:** Fernanda Nedel, Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GP Cell), Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

DOI: 10.31080/ASNH.2022.06.1093

Received: June 23, 2022

Published: July 11, 2022

© All rights are reserved by **Greice Dotto Simões**.

Abstract

The kombucha beverage (KB) is a drink resulting from the fermentation of sweetened teas or juices containing a symbiotic consortium of bacteria and yeast as inoculum, also known as Scooby. KB consumption has become popular worldwide due to its various claims and some scientifically established properties including anti-diabetic, hepatoprotective and antioxidant potential, and its effects in metabolic disorders, atherosclerosis, inflammatory problems, arthritis, and cancer. Thus, KB have been studied in animal models to better comprehend its possible effects on human health. Given the above, the present study aimed to systematically review the literature in order to establish in which human health conditions have KB been applied considering animal models. A search was carried out in PubMed, Scopus, Scielo, ScienceDirect, and ISI Web of Knowledge, using the descriptors "(Kombucha [MeSH])" and "(Kombucha tea [MeSH])". Of the 1214 studies found, 40 were included in the systematic review. A total of 24 human health conditions have been investigated considering the use of KB using as experimental research animal models. The health conditions: diabetes, hepatotoxicity and physiological conditions were the most prevalently studied. In conclusion, KB has been studied in diverse human health conditions considering animal models, showing a great potential to modulate biological parameters in both physiological and pathological conditions.

Keywords: Kombucha Beverage; Human Health; Animal Model; Physiological Condition; Pathological Condition

Abbreviations

KB: Kombucha Beverage; SCOBY: Symbiotic Bacteria and Yeast Colony

Introduction

Kombucha beverage (KB) is a traditional drink commonly consumed in Asia [1], and according to its etymology, it is derived from two Japanese words "kombu" for algae and "cha" for tea [2]. The origin of KB is uncertain, but it is believed to have emerged

in Manchuria (northeastern China), where it was sought for its suspected "magical" properties [3]. KB is prepared by fermenting sweetened tea using yeast and bacteria as inoculum, a mature bacterial cellulose biofilm also known as tea fungus or SCOBY ("Symbiotic Bacteria and Yeast Colony") [1]. The SCOBY from a previously brewed kombucha culture, is commonly placed over the solution and allowed to ferment for several days. The carbon source in the solution, generally sucrose, is important to initiate a cascade of metabolic processes that generates a carbonated and slightly acidic drink at the end [4].

KB is a combination of three fermentations: alcoholic, lactic and acetic, due to the presence of several coexisting yeasts and bacteria in the environment, being initiated by osmotolerant microorganisms and finally dominated by acid tolerant species [5]. The beverage consumption has become quite popular worldwide due to its various claims and some scientifically established properties including anti-diabetic [6], hepatoprotective [7] and antioxidant potential [6,7], and its effects in metabolic disorders, atherosclerosis, inflammatory problems, arthritis, and cancer [8]. KB is also known for its antimicrobial activity against different pathogenic organisms [1,8-10].

Considering the increasing concern over the alarming rates of diseases worldwide and in light of the promising opportunities of KB regarding prevention and/or treatment of pathological conditions, the present study aimed to systematically review the literature in order to establish in which human health conditions have KB been applied considering animal models.

Materials and Methods

Review question

In which human health conditions have KB been applied considering animal models?

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criterion was studies that used animal models to investigated KB applied to human health outcomes. The use of animal models was conducted to control confounding factors in variables of interest.

The exclusion criteria were studies unrelated to KB, studies related to KB but unrelated to health areas, reviews, congress summaries, patent descriptions, book section, hypothesis articles, commentaries, opinion articles, previews, articles published in different languages than Portuguese, English and Spanish, letters, articles that were not fully available even after attempting to contact the authors.

Search strategy

The electronic search was conducted without initial date restriction up to and including July 2019 in PubMed, Scopus, Scielo, ScienceDirect, and ISI Web of Knowledge databases. The initial search was conducted using the MeSH and relevant entry terms: (Kombucha) OR (Kombucha tea). All references were managed in the EndNote X7 software (Thomson Reuters, New York, NY, US). Initially, duplicate references were excluded. Titles, abstracts, and study methodologies were screened based on the inclusion and exclusion criteria by two independent reviewers (GDS and CCdOA). Lists were compared and in case of disagreement, a consensus was reached by discussion. When a consensus was not achieved, a third reviewer decided if the article should be included (FN). This systematic review followed the PRISMA statements, with some adjustments [11].

Results and Discussion

The initial search yielded 1214 articles. After removing 430 duplicated titles, a total of 784 articles were included for title and abstract screening, remaining 54 articles. After reading the full text 14 studies were excluded and 40 articles remained, satisfying the inclusion criteria. Figure 1 displays the PRISMA flowchart for the study selection process.

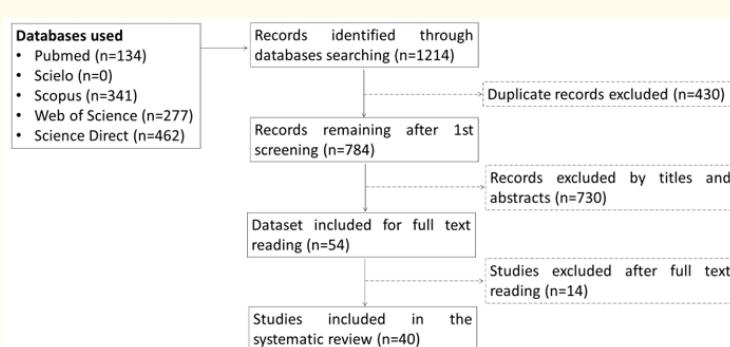


Figure 1: Flowchart of study selection.

Table 1 reports the 24 human health conditions studied by the 40 included articles. The health conditions more prevalent were diabetes (7 studies, 17.5%), hepatotoxicity (6 studies, 15.0%) and physiological conditions (4 studies, 10.0%). Three health conditions (hypercholesterolemia, non-alcoholic fatty liver disease, and myocardial injury) were each evaluated by two studies (5.0%), and eighteen (ulcer, skin wounds, silicosis, hyperglycemia, nephrotoxicity,

electromagnetic field exposition, steatosis, irradiation, transient cerebral ischemia and reperfusion, non-alcoholic steatohepatitis, post-operative peritoneal adhesion formation, autoimmune encephalomyelitis in model of multiple sclerosis, aging-related skin abnormalities, oxidative stress, cancer, hyperuricemia, cytotoxicity, and kampuchea-synthesized bacterial cellulose biocompatibility with sciatic nerve) were verified by only one study (2.5%).

Author, year	Animal (sex)	Injury induction	Target	Condition	KB preparation				KB application	
					Tea or juice	Tea or juice concentration*	Sugar concentration*	Fermentation period	Exposure period	Route/method of administration
Abshenas., et al. 2012	Balb/c mice (male)	Acetaminophen by oral administration	Liver	Hepatotoxicity	Black tea	12 g/L	100 g/L	12 days	7 days	Oral/-
Al-Dulaimi., et al. 2018	Wistar rats (male)	-	Blood	Physiological [#]	Black tea	1.5 g/L	50 g/L	-	21 days	Oral/Gavage
Aloulou., et al. 2012	Wistar rats (male)	Alloxan by intraperitoneal injection + glucose solution after 6 hours	Pancreas	Diabetes	Black tea	12 g/L	100 g/L	12 days	1 month	Oral/Gavage
Banerjee., et al. 2010	Swiss mice (male)	Indomethacin dissolved in distilled water and suspended in gum acacia	Stomach	Ulcer	Black tea	5 gl/L	100 g/L	2 - 4 - 7 days	7 days	Oral/-
Barati., et al. 2013	Wister rats (male and female)	Open wound created on dorsal surface	Skin	Skin wounds	Black tea	12 g/L	100 g/L	8 - 10 days	20 days	Topical/Bandage
Bellassoued., et al. 2015	Wistar rats (male)	Cholesterol-rich diet	Liver Kidney	Hypercholesterolemia	Green tea	12 g/L	100 g/L	12 days	16 weeks	Oral/Gavage
Bhattacharya., et al. 2013	Swiss rats (male)	Alloxan by intraperitoneal injection	Liver Kidney Pancreas Heart Blood	Diabetes	Black tea	5 g/L	100 g/L	14 days	14 days	Oral/-
Fu., et al. 2013	Sprague-Dawley rats (Male and female)	Intratracheal injection of mycillin containing silica dust	Lung	Silicosis	Chinese herbal extract [†]	9 g/L	-	2 weeks	4 weeks	Inhalation /Spray

Gamboa-Gomez., <i>et al.</i> 2017	C57BL/6 mice (female)	High saturated fat and fructose diet	Blood	Hyperglycemia	Quercus convallata and Quercus arizonica infusions	10 g/L	10 g/L	7 days	14 weeks	Oral/Gavage
Garib, 2009	Albino rats (male)	Trichloroethylene by oral administration	Kidney Blood	Nephrotoxicity	Black tea	12 g/L	100 g/L	8 - 10 days	2 weeks	Oral/-
Gharib., <i>et al.</i> 2014	Wistar rats (male)	Exposed to microwave 950 MHz	Brain Spleen Intestine	Electro magnetic field exposition	Black tea	12 g/L	100 g/L	-	1 week	Oral/Stomach tube
Hartmann., <i>et al.</i> 2000)	C57-BL/6 mice (male and female)	-	Brain Heart Kidney Liver Spleen	Physiological [#]	Black tea	2.5 g/L	70 g/L	7 days	-	-
Hosseini., <i>et al.</i> 2015	Wistar rats (male)	Single intraperitoneally injection of 120mg/kg alloxan BW	-	Diabetes	Green tea	12 g/L		-	4 weeks	Oral/Gavage
Hyun., <i>et al.</i> 2016	C57BLKS and C57BLKS db/db mice (male)	Methionine/choline-deficient diet	Liver	Steatosis	Black tea	10 g/L	100 g/L	14 days	3 weeks	Oral/-
Ibrahim, 2011	Albino rats (male)	Cadmium chloride by intraperitoneal injection + Gama irradiation of whole body	Liver Kidney Blood	Irradiation effects	Black tea	12 g/L	100 g/L	8 - 10 days	2 weeks before treatment + 4 weeks after treatment	Oral/Gavage
Jayabalan., <i>et al.</i> 2010	Albino rats (male)	Aflatoxin B1 by intraperitoneal injection	Liver	Hepatotoxicity	Black tea	12 g/L	100 g/L	14 days	30 days	Oral/Drinkers
Jung., <i>et al.</i> 2019	C57BLKS db/db mice (male)	Methionine/choline-deficient diet	Liver	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	Black tea	10 g/L	100 g/L	14 days	3 weeks	Oral/-
Kabiri., <i>et al.</i> 2013	Wistar rats (male)	Thioacetamide by intraperitoneal injection	Liver Blood	Hepatotoxicity	-			-	3 weeks	-
Kabiri., <i>et al.</i> 2014	Wistar rats (male)	Thioacetamide by intraperitoneal injection	Liver	Hepatotoxicity	Black tea	12 g/L	100 g/L	12 days	3 weeks	-
Kabiri and Setorkim, 2016	Wistar rats (male)	Middle cerebral artery occlusion	Brain	Transient cerebral ischemia and reperfusion	-	10 g/L	80 g/L	8 - 10 days	-	Intrapерitoneal/ Intrapерitoneal injection

Lobo and Shenoy, 2014	Wistar rats (male)	Isoproterenol by subcutaneous administration	Heart Blood	Myocardial injury	Black tea	7.5 g/L	100 g/L	7 days	30 days	Oral/-
Lobo., et al. 2017	Wistar rats (male)	Isoproterenol by subcutaneous administration	Heart Blood	Myocardial injury	Black tea	7.5 g/L	100 g/L	7 days	30 days	Oral/-
Lee., et al. 2019	C57BKS db/db mice (male)	Methionine/choline-deficient diet	Liver Blood	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)	Black tea	10 g/L	100 g/L	14 days	4 weeks	Oral/-
Maghsoudi and Mohammadi, 2009	Wistar rats (male)	Abdominal operation	Abdomen	Post-operative intraperitoneal adhesion formation	-			-	-	Intrapерitoneal/-
Marzban., et al. 2015	C57BL/6 mice (female)	Inoculation of myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 by injecting subcutaneously + 2 doses of lyophilized pertussis toxin by intraperitoneal injection	Brain Cere bellum Heart Blood	Autoimmune encephalo myelitis in model of multiple sclerosis	Black tea	12 g/L	100 g/L	12 days	3 weeks	Oral/-
Murugesan., et al. 2009	Albino rats (male)	Carbon tetrachloride by Intraperitoneal injection of	Liver Blood	Hepatotoxicity	Black tea	10.5 g/L	100 g/L	14 days	30 days	Oral/-
Pakravan., et al. 2018	NMRI mice (female)	-	Skin	Aging-related skin abnormalities [#]	Black tea	12 g/L	100 g/L	14 days	14 days	Intra dermal /-
Sai Ram., et al. 2000	Sprague-Dawley rats (male)	Force feeding of sodium dichromate	Liver Blood Erythrocyte	Oxidative stress	Black tea [‡]	12 g/L	100 g/L	8 - 10 days	-	Oral/Gastric cannula
Salarfzoon., et al. 2018	BALB/c mice (female)	Invasive breast cancer cell subcutaneously injected into the left flank	Tumor Blood Liver Kidney	Cancer	Ginger tea	-	100 g/L	10 days	30 and 60 days	Oral/Gavage
Semjonovs., et al. 2014	Wistar rats (male)	High-fat diet	Blood	Physiological [#]	Black tea	12 g/L	70 g/L	1 day	60 days	Oral/Intragastric tube
Srihari., et al. 2013	Wistar rats (male)	Streptozotocin by intraperitoneal injection	Blood Liver	Diabetes	Black tea [‡]	4.5 g/L	100 g/L	14 days	45 days	Oral/Stomach tube
Sukrama, 2015	Wistar rats	High purine diet	Blood	Hyperuricemia	-			4 - 8 - 12 days	-	-

Vijaya raghavan., et al. 2000	Wister rats (female)	-	Blood Lung Liver Spleen Kidney Heart	Physiological [#]	Black tea [‡]	10 g/L	100g/L	8 days	90 days	Oral/Gavage and drinkers
Wang., et al. 2014	ICR mice (male)	-	Liver Blood	-	Black tea	5 g/L	100 g/L	8 days	35 days	Oral/Intra gastrically
		Acetami nophen by intra peritoneally injection	Liver Blood	Hepatotoxicity	Black tea	5 g/L	100 g/L	8 days	2 weeks	Oral/Intra gastrically
Yang., et al. 2009	ICR mice	Hyperchole strolaemic diet	Liver	Hyperchole sterolemia	Black tea	5 g/L	100 g/L	8 days	12 weeks	Oral/-
Yapar., et al. 2010	Albino mice (male)	Phenol	Erythro- cyte Lung Liver Heart Stomach Intestine Kidney	Induced cytotoxicity	Black tea	20 g/L	200 g/L	8-10 days	20 days	Oral/Gavage
Zhu., et al. 2014	Sprague-Dawley rats (male)	Sciatic nerve exposition by making a skin incision and splitting the underlying muscles in the left lateral thigh	Sciatic nerve	Kampuchea-synthesized bacterial cellulose biocompatibility with sciatic nerve	Black tea	5 g/L	100 g/L	7 days	1 - 3 - 6 weeks	Surgical/ Surgically implantation into the spatium inter musculare along the sciatic nerve.
Zubaidah., et al. 2018	Wistar rats (male)	Streptozotocin by intraperitoneal injection	Pancreas Blood	Diabetes	Snake fruit juice	1000 g/L	100 g/L	14 days	28 days	Oral/-
Zubaidah., et al. 2019a	Wistar rats (male)	Streptozotocin by intraperitoneal injection	Pancreas Blood	Diabetes	Snake fruit juice	20 g/L	100 g/L	14 days	28 days	Oral/-
					Black tea	20 g/L	100 g/L	14 days	28 days	Oral/-
Zubaidah., et al. 2019b	Wistar rats (male)	Streptozotocin by intraperitoneal injection	Pancreas Blood	Diabetes	Snake fruit juice	1000 g/L	100 g/L	14 days	28 days	Oral/Intra gastrically tube

Table 1: Description of animal characteristics, substance, conditions and dose used to induce health conditions, and the main methodology used for KB preparation and treatment of induction by author and year of publication.

* Values present in the included articles and standardized for this review.

Without induction of pathological condition.

† Mixing tea (2 g/L) + dried *Siratia grosvenori* fruit (5 g/L) + wild chrysanthemum (2 g/L).

‡ Black tea described by the article as industrialized brand.

The literature is not clear as to what led to the initial research in these three health conditions (diabetes, hepatotoxicity and physiological conditions). It can be speculated that since KB is a popular beverage included among many traditional fermented foods across the world and its consumption has been related long ago to curative effects on a number of human diseases, mainly based on personal observation and testimonials could have contributed to the onset of studies in the animal models related to diabetes, hepatotoxicity, and physiological conditions.

Diabetes is one of the most prevalent diseases in the world, with an estimated 693 million people affected in 2045 [12]. Its complications involve increased cardiovascular risk, including atherosclerosis, nephropathy, retinopathy, and neuropathy [13]. In this context, KB has been studied for its hypoglycemic and antilipemic effects [14]. In studies with diabetic rats, the KB reduced the levels of pancreatic amylase and lipase, leading to a reduction in cholesterol, triglycerides, and serum glucose [6,14].

In addition, treatment with KB decreased glycated hemoglobin [6,15] a parameter that assesses the glycemic average of the last 3 months in humans. Finally, KB was able to reduce the oxidative stress caused by hyperglycemia [6,16], as well as having a preventive effect against kidney injuries by reducing urea and creatinine and liver injuries by reducing alkaline phosphatase (ALP) and alanine transaminase (ALT) [6]. These results show the therapeutic and preventive potential of KB in the face of diabetes and its complications, thus stimulating increased research in this area.

The liver is responsible for metabolizing most of the drugs and toxins present in the body and, therefore, any damage caused by hepatotoxic agents has serious consequences. In both prophylaxis and treatment, KB was able to reduce levels of bilirubin, lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), ALT, ALP, and aspartate aminotransferase (AST) [17-20], enzymes that can indicate liver damage when they are increased. It also reduced the amount of malondialdehyde (MDA), a marker of oxidative stress [17,18]. Histologically, the results also demonstrated that KB has a hepatoprotective effect [17-19], that is, it can protect the liver against injuries. Thus, it is possible that KB can be used to modulate biological parameters in liver damage and/or used as a hepatoprotective agent in situations of predisposition to liver damage.

Studies were also carried out to evaluate the effects of KB in a physiological environment, that is, without special diets or toxicity induction. A decrease in ALT, AST and ALP was observed, which, as already mentioned, are markers of liver damage, in addition to a reduction in cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and triglycerides, responsible for the development of atherosclerosis [21,22]. In addition, it reduced serum glucose, preventing the onset of diabetes, as well as increased levels of high-density lipoprotein (HDL), which prevents the formation of atherosclerosis [21]. The animals that received KB showed weight gain, in addition to an increase in liver and splenic weight, but they had a longer life span and increased behaviors indicative of increased environmental awareness and responsiveness [23]. Through histology, no organ toxicity was observed, and there was no development of addiction to drinking [24]. On the other hand, KB demonstrated cytotoxicity against thymocytes, perhaps attributed to the alcoholic content of the drink (about 1.5%) [24].

In all other applications of KB - gastric ulcer, hypercholesterolemia, silicosis, nephrotoxicity, electromagnetic field exposition, hepatic steatosis, irradiation effects, non-alcoholic fatty liver disease, transient cerebral ischemia and reperfusion, myocardial injury, post-operative intraperitoneal adhesion formation, autoimmune encephalopathy in multiple sclerosis, aging-related skin abnormalities, oxidative stress, breast cancer, hyperuricemia, induced cytotoxicity and biocompatibility with sciatic nerve - benefits were attributed to the consumption of the drink [25-42].

Studies used mostly male rodents (30 studies, 75.0%), 5 used females (12.5%), 3 used both genders (7.5%) and 2 did not report this variable (5.0%). The condition induction was most commonly accomplished through chemical substance administration (23 studies, 57.5%) and diet consumption (8 studies, 20%).

Among the tea used to develop the KB, the black tea (30 studies, 75.0%) and green tea (2 studies, 5%) were the most prevalent, 4 articles did not inform the tea used (10.0%).

The effects of KB can be attributed to its chemical composition. The antibacterial and antioxidant effects can be related to the pres-

ence of acetic acid, capable of combating bacteria such as *Helicobacter pylori* - associated with gastritis, peptic ulcer and even gastric cancer [10,43] and to bind to toxins and eliminate them from the body [28]. In addition to acetic acid, there are several other components with antioxidant properties, such as gluconic acid, glucuronic acid, polyphenols, and flavonols [6,19], which may be responsible for the hepatoprotective effect and reduction in the lipid profile [18,21]. Polyphenols, such as theaflavins and thearubigins, can also prevent the damage and death of pancreatic cells, one of the kombucha's antihyperglycemic mechanisms [15,28]. Moreover, the drink seems to have a direct insulinotropic effect on the pancreas, that is, it induces the release of insulin, in addition to decreasing gluconeogenesis [15]. Organic acids (mainly acetic, gluconic, glucuronic acid, citric, L-lactic, malic, tartaric, malonic, oxalic, succinic, pyruvic, and usnic); sugars (sucrose, glucose and fructose), water-soluble vitamins, amino acids, biogenic amines, purines, pigments, lipids, proteins, hydrolytic enzymes, ethanol, carbon dioxide, polyphenols, minerals (manganese, iron, nickel, copper, zinc, plumb, cobalt, chromium, and mcadmium), anions (fluoride, chloride, bromide, iodide, nitrate, phosphate, and sulfate), D-saccharic acid-1,4-lactone, and metabolic products of yeasts and bacteria, are also found in the drink composition [44], and could contribute for its biological effects.

Although KB preparation can vary, it is usually made with black tea [45,46], in agreement with our results. This preference can be due to higher concentrations of ethanol, lactic acid, gluconic acid, and acetic acid, obtained with black tea in comparison to other substrates. Green tea, which is also widely used for KB production, has advantages over black tea, such as reduced fermentation time. However, the oxidation of black tea leaves has a unique flavor [10,47], which may be another reason for the greater use of this tea.

The KB needs to be sweetened so that the fungi and bacteria colonies can grow, producing an adequate fermentation [45]. Although most antioxidant activities increase with incubation time, prolonged fermentation is not recommended due to the high concentration of organic acids, which can be harmful for human and animal consumption [48]. In addition, the CO₂ generated can accumulate at the interface between the biofilm and the broth, blocking nutrients exchange and creating a starvation environment [48].

Thus, It has been described as an adequate fermentation time

of approximately 15 days, however, the choice of the fermentation period also depends on the expected sensory attributes of KB consumers [46].

In regard to the KB fermentation period, 17.5% (7 studies) used ≤ 7 days, 25% (10 studies) ranged from 8 to 10 days, 42.5% (17 studies) used ≥ 11 days, 2.5% (1 study) used 4, 8 and 12 days and 12.5% (5 studies) did not inform the period used.

The animal exposure to KB was up to 3 weeks in 37.5% of the studies (15 studies), from 4 to 6 weeks in 35.0% (14 studies), more than 6 weeks in 15% (6 studies) and not mentioned in 12.5% (5 studies) of the studies included in the systematic review.

There was great variation in the period of animal exposure to KB, ranging from 7 days to 16 weeks [19,26]. Indeed, there is a lack of consensus on the ideal period of animal exposure to KB. This could be attributed in part to the different health conditions that have been evaluated (n = 24), as well as the effects expected when treating health conditions with KB, which can vary significantly. Additionally, no study found toxicity in the consumption of KB, generating doubt if the same would occur in longer experiments.

The administration of KB used mostly the oral route (75.0% of the studies) and the intraperitoneal, topical, inhalation, intradermal and surgical route were used in 15.0% of the studies; the remaining studies did not describe the route of KB administration. Gavage (9 studies, 22.5%) is the method predominately used for KB administration when the oral route was chosen, others methods included stomach tube (2 studies, 5.0%), drinkers (2 studies, 5.0%), intragastrically tube (3 studies, 7.5%) gastric cannula (1 study, 2.5%), surgically implantation into the spatiun intermusculare along the sciatic nerve (1 study, 2.5%), intraperitoneal injection (1 study, 2.5%), spray (1 study, 2.5%), bandage (1 study, 2.5%) and not informed (20 studies, 50.0%).

Regarding the administration of KB, the oral route through gavage was the most used, possibly due to the greater control of the quantity consumed by the animals. Even so, several methods were used according to the necessity of the experiment, which demonstrates the heterogeneity of the studies presented in this systematic review.

Although KB has several applications in the health field with good results, there is a scarce number of studies in humans [49] and most lack methodology standardization, leading to a great risk of bias. In this sense, experimental research conducted in animal models provides a controlled environment that enables the comprehension of biological mechanisms of physiological and pathological conditions. Yet is important to interpret results with caution when translating experimental results in animal models to humans. However, there is little evidence about harm in terms of drink consumption in humans, with isolated cases and involving a small number of individuals [8].

Conclusion

In conclusion, KB has been studied in 24 human health conditions considering animal models, most commonly in diabetes, hepatotoxicity, and physiological conditions, showing a great potential to modulate biological parameters in both physiological and pathological conditions. Thus, studies are necessary to verify other health conditions that could benefit from KB effects and to comprehend its biological mechanism of action, as well as the conduction of well-designed studies in humans so that these results could sum to the existing knowledge from experimental research in animal models.

Acknowledgements

The authors have no acknowledgements to declare.

Conflict of Interest

Bibliography

1. Sreeramulu G., et al. "Kombucha fermentation and its antimicrobial activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48.6 (2000): 2589-2594.
2. Amarasinghe H., et al. "Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha "Tea Fungus" during extended periods of fermentation". *Food Science and Nutrition* 6.3 (2018): 659-665.
3. Jarrel J., et al. "The kombucha consortia of yeasts and bacteria". *Mycologist* 14.4 (2000): 166-170.
4. Marsh AJ., et al. "Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples". *Food Microbiology* 38 (2014): 171-178.
5. Soto SAV., et al. "Understanding kombucha tea fermentation: a review". *Journal of Food Science* 83.3 (2018): 580-588.
6. Bhattacharya S., et al. "Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats". *Food and Chemical Toxicology* 60 (2013): 328-340.
7. Bhattacharya S., et al. "Protective effect of kombucha tea against tertiary butylhydroperoxide-induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes". *Indian Journal of Experimental Biology* 49.7 (2011): 511-524.
8. Jayabalan R., et al. "A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13.4 (2014): 538-550.
9. Battikh H., et al. "Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas". *Journal of Food Biochemistry* 37.2 (2013): 231-236.
10. Greenwalt CJ., et al. "Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea *Kombucha*". *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 31. 3 (1998): 291-296.
11. Moher D., et al. "Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement". *Plos Medicine* 6.7 (2010): 1000097.
12. Cho NH., et al. "IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045". *Diabetes Research and Clinical Practice* 138 (2018): 271-281.
13. Forbes JM., et al. "Mechanisms of diabetic complications". *Physiological Reviews* 93.1 (2013): 137-188.
14. Aloulou A., et al. "Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12.63 (2012): 1-9.

- 40
15. Srihari T., et al. "Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation". *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4.11 (2013): 1978-1981.
 16. Zubaidah E., et al. "In vivo evaluation of snake fruit Kombucha as hyperglycemia therapeutic agent". *International Food Research Journal* 25.1 (2018): 453-457.
 17. Murugesan GS., et al. "Hepatoprotective and curative properties of kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity". *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19.4 (2009): 397-402.
 18. Jayabalan R., et al. "Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation". *Food Science and Biotechnology* 19.3 (2010): 843-847.
 19. Abshenas J., et al. "Protective Effect of Kombucha Tea against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice: A Biochemical and Histopathological Study". *Comparative Clinical Pathology* 21.6 (2012): 1243-1248.
 20. Kabiri N., et al. "Protective Effect of Kombucha Tea on Liver Damage Induced by Thioacetamide in Rats". *Journal of Biological Sciences*. 14.5 (2014): 343-348.
 21. Al-dulaimi F., et al. "Bioactivity Study of Kombucha Black tea and Kombucha with Skim Milk on Some of Physiological and Biochemical Parameters in Male Albino Rats". *International Journal of Pharmaceutical Research* 10.1 (2018): 301-306.
 22. Semjonovs I., et al. "Evaluation of Physiological Effects of Acetic Acid Bacteria and Yeast Fermented Non-alcoholic Beverage Consumption in Rat Model". *Journal of Medical Sciences* 14 (2014): 147-152.
 23. Hartmann AM., et al. "Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in c57-bl/6 mice: a pilot study". *Nutrition* 16.9 (2000): 755-761.
 24. Vijayaraghavan R., et al. "Subacute (90 Days) Oral Toxicity Studies of Kombucha Tea". *Biomedical and Environmental Sciences* 13.4 (2000): 293-299.
 25. Banerjee D., et al. "Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action". *Food and Function* 1.3 (2010): 284-293.
 26. Bellassoued K., et al. "Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity". *Pharmaceutical Biology* 53.11 (2015): 1699-1709.
 27. Fu C., et al. "Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage". *Food Science Technology* 34.1 (2013): 123-126.
 28. Gharib OA. "Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats". *Chinese Medicine* 4.23 (2009): 1-6.
 29. Gharib OA. "Effects of Kombucha on some trace element levels in different organs of electromagnetic field exposed rats". *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7.1 (2014): 18-22.
 30. Hyun J., et al. "Kombucha tea prevents obese mice from developing hepatic steatosis and liver damage". *Food Science and Biotechnology* 25 (2016): 861-866.
 31. Ibrahim NK. "Possible protective effect of kombucha tea fermented on cadmium chloride induced liver and kidney damage in irradiated rats". *International Journal of Biotechnology and Bioengineering* 5.7 (2011): 408-413.
 32. Jung Y., et al. "Effect of kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease". *Food Science and Biotechnology* 28.1 (2019): 261-267.
 33. Kabiri N., et al. "Protective effect of kombucha tea on brain damage induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in rat". *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11.3 (2016): 675-683.
 34. Lobo RO., et al. "Bio-tea prevents membrane destabilization during Isoproterenol-induced myocardial injury". *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 5. 3 (2017): 146-154.
 35. Magsoudi H., et al. "The effect of kombucha on post-operative intra-abdominal adhesion formation in rats". *The Indian Journal of Surgery* 71.2 (2009): 73-77.

- 41
36. Marzban F., et al. "Kombucha tea ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse model of multiple sclerosis". *Food and Agricultural Immunology* 26.6 (2015): 782-793.
 37. Pakravan N., et al. "Cosmeutical effect of ethyl acetate fraction of kombucha tea by intradermal administration in the skin of aged mice". *Journal of Cosmetic Dermatology* 17.6 (2018): 1216-1224.
 38. Ram S., et al. "Effect of kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats". *Journal of Ethnopharmacology* 71.2 (2000): 235-240.
 39. SalafzoonS., et al. "Evaluation of the antioxidant impact of ginger-based kombucha on the murine breast cancer model". *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 15.1 (2017).
 40. Sukrama IDM., et al. "Xanthine oxydase inhibition of kombucha tea in hyperuricemia induced wistar rat". *Bali Medical Journal* 4.1 (2015): 2302-2914.
 41. Yapar K., et al. "Protective effect of kombucha mushroom (KM) tea on phenol -induced cytotoxicity in albino mice". *Journal of Environmental Biology* 31.5 (2010): 615-621.
 42. Zhu C., et al. "Kombucha synthesized bacterial cellulose: preparation, characterization, and biocompatibility evaluation". *Journal of Biomedical Materials Research A* 102.5 (2014): 1548-1557.
 43. Steinkraus KH., et al. "Investigations into the Antibiotic Activity of Tea Fungus/Kombucha Beverage". *Acta Biotechnologica* 16.2-3 (1996): 199-205.
 44. Leal JM., et al. "A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites". *CYTA-Journal of Food* 16.1 (2018): 390-399.
 45. Greenwalt CJ., et al. "Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects". *Journal of Food Protection* 63.7 (2000): 976-981.
 46. Villarreal-Soto S. A., et al. "Understanding Kombucha tea fermentation: a review". *Journal of Food Science* 83.3 (2018): 580-588.
 47. Stagg GV., et al. "The nutritional and therapeutic value of tea-a review". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26.10 (1975): 1439-1459.
 48. Chu S., et al. "Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha". *Food Chemistry* 98.3 (2006): 502-507.
 49. Kapp JM., et al. "Kombucha: A Systematic Review of the Empirical Evidence of Human Health Benefit". *Annals of Epidemiology* 30 (2019): 66-70.

Effects of Kombucha in Diabetes Induced Animal Models: a Systematic Review

Greice Dotto Simões¹, Roberta Giorgi¹, Cainá Corrêa do Amaral¹, Camila Perelló Ferrúa¹, Geovanna Peter Corrêa¹, Tiago Fernandez Garcia¹, Amanda de Lima Aldrighi², Karoline Brizola de Souza², Aline Longoni dos Santos¹, Adriano Martimbianco de Assis¹, Priscila Marques Moura de Leon³, Fernanda Nedel^{1*}

¹*Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil.*

²*Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil.*

³*Equine Genomics Research Group - GenE, Nucleus of Biotechnology, Technological Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.*

***Corresponding author:** Fernanda Nedel, Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Félix da Cunha Street, 412, postal code: 96010-901, Pelotas, RS, Brazil. Tel.: +55 53 2128 8408; fax: +55 53 2128 8229 96010-901. E-mail: fernanda.nedel@gmail.com

Email:

Greice Dotto Simões: greicedotto@hotmail.com

Roberta Giorgi: robertagiorgi@hotmail.com

Cainá Corrêa do Amaral: caina.amaral@ucpel.edu.br

Camila Perelló Ferrúa: camila_perello@hotmail.com

Geovanna Peter Corrêa: geovannapeter_@live.com

Tiago Fernandez Garcia: tiagogarcia.fisio@gmail.com

Amanda de Lima Aldrighi: amandaldrighi@hotmail.com

Karoline Brizola de Souza: kf_ina@hotmail.com

Aline Longoni dos Santos: aline_longoni@hotmail.com

Adriano Martimbianco de Assis: adriano.assis@ucpel.edu.br

Priscila Marques Moura de Leon: primleon@gmail.com

Fernanda Nedel: fernanda.nedel@gmail.com

Abstract

This study aimed to systematically review the literature to identify the effects of KB in animal models of diabetes induction. A search was carried out in the following databases: PubMed, Scopus, Scielo, ScienceDirect, and ISI Web of Knowledge, using the descriptors “[Kombucha [MeSH]]” and “[Kombucha tea [MeSH]]”. From the articles found, two independent and previously calibrated reviewers, using the EndNote X7 (Thomson Reuters, New York, US), selected those that investigated the effects of KB in animal models of diabetes induction. Of the 1214 studies found, 7 were included in the systematic review. All studies used male rats and induced diabetes with alloxan or streptozotocin. The most prevalent substrate applied in the KB fermentation was sweetened black tea (BT). The included studies focused on biochemical analysis, mainly in markers for diabetes (glucose, insulin and glycated hemoglobin), lipid profile, antioxidant molecules, and histological analyses of the pancreas and the liver, demonstrating a reverse in damages caused by the chemical induction of diabetes in animal models. In this study, a panel of KB effects in parameters altered by diabetes induction in rats was created, which could contribute to understanding the benefits of KB administration.

Keywords: Kombucha; Polyphenols; Antioxidant; Animal Model; Diabetes Induction; Systematic Review.

Abbreviations

ALP, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; ALX, alloxan; AMPK, 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; AST, alkaline phosphatase; BT, black tea; DNA, desoxyribonucleic acid; DSL, D-saccharic acid 1,4-lactone F-1,6-BA, Fructose-1,6-bisphosphatase; g/L, Gram per liter; GGT, Gamma-glutamyl transpeptidase; G-6-Pase, Glucose-6-phosphatase; GT, Green tea; HbA_{1c}, Glycated hemoglobin; KB, Kombucha beverage; KB-BT, Kombucha beverage was prepared with black tea, KB-GT, Kombucha beverage was prepared with green tea, KB-SF, Kombucha beverage was prepared with snake fruit juice; MDA, Malondialdehyde; mg/kg, Milligram per kilogram; mL/kg, Milliliter per kilogram; OGTT, Oral glucose tolerance test; OS, Oxidative stress; ROS, Reactive oxygen species; SCOBY, Symbiotic culture of bacteria and yeast, SF, Snake fruit; SOD, Superoxide dismutase; STZ, Streptozotocin; KB, kombucha beverage; SCOBY, Symbiotic Bacteria and Yeast Colony

Introduction

Fermented beverages are nowadays used worldwide and kombucha is one of the most studied in scientific research, especially concerning its chemical and antimicrobial properties, and the treatment of several diseases and health promotion in animal models [1,6]. Kombucha beverage (KB) is originated from northeast China about 220 B.C, where it was known as “divine Che” for being an energizing and detoxifying drink tasting like sparkling apple cider or sour vinegary, depending on the period of fermentation [7-9]. In 414 A.D. a Korean physician named Kombu introduced the “divine Che” in Japan to treat the digestive problems of a Japanese king. Subsequently, kombucha was disseminated by trade routes to Russia and eastern Europe with fluctuating popularity since World War II, when it was extended from Russia to western Europe, particularly France, Italy and Switzerland, and North Africa [1, 9-11].

Traditionally the KB is prepared through fermentation for 7 to 10 days, by sweetened tea of a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) [12-14]. The SCOBY is generally compound by acetic acid bacteria (*Komagataeibacter*, *Gluconobacter* and *Acetobacter* species), yeasts (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, and *Brettanomyces bruxellensis*), and often lactic acid bacteria (*Lactobacillus* and *Lactococcus*) [12-14]. Although black tea sweetened with sucrose is considered the ideal substrate for KB fermentation [9], formulations with other types of tea, such as green tea (GT), red tea [15], oolong tea [14], peppermint tea [16], lemon balm tea [16], and rooibos tea [17], and also with fruit juices, like pomegranate [18], cherry [19], and snake fruit (SF) [20], has become commonly used.

The beverage resulting from the SCOBY fermentation in tea or juice fruit is rich in chemical components, among which organic acids (acetic acid, glucuronic acid, gluconic acid, citric acid, L-lactic acid, malic acid, tartaric acid, malonic acid, oxalic acid, succinic acid, pyruvic acid, and usnic acid), D-saccharic acid 1,4-lactone (DSL), sugars (sucrose, glucose, and fructose), vitamins (B₁, B₂, B₆, B₁₂ e C), amino acids, biogenic amines, purines, pigments, lipids, proteins hydrolytic enzymes, ethanol, carbon dioxide, minerals (ions of zinc, copper, iron, and manganese), anions (fluoride, chloride, bromide, iodide, nitrate, phosphate, and sulfate), and metabolic products of yeasts and bacteria are the most frequently reported [1, 6, 14]. Furthermore, other substances derived from the mixture used as a substrate to produce KB are significantly increased during fermentation, such as polyphenols, flavonoids, and tannin [15, 20-22].

This set of chemicals could be related to the anti-inflammatory and antioxidant properties of KB. Two properties that once modulated can significantly impact the negative outcomes of various chronic conditions, including diabetes [2, 6]. Therefore, studies have been carried out to evaluate the potential of KB in minimizing the damage caused by diabetes induction [22-24].

Diabetes is a metabolic disorder that represents a global public health problem with an estimated prevalence of 9.3% in 2019 (463 million people) and is expected to enhance to 10.2% (578 million) in 2030 and 10.9% (700 million) in 2045 [25]. Diabetes, especially type 2, is related to high morbidity and mortality. It can cause kidney insufficiency, blindness, non-traumatic amputation, and cardiovascular disease [26], and long-term hyperglycemia can lead to damage of vital organs culminating in cardiovascular disease, neuropathy, nephropathy, and retinopathy [27], therefore compromising the life quality and life expectancy of diabetic patients. Consequently, there is a growing desire among scientists who investigate this outcome to establish new approaches in association with the already available therapies, as an attempt to achieve adequate blood glucose control. In this sense, kombucha has been showing a promising opportunity in modulating altered parameters in diabetes considering animal models. Thus, we aimed to systematically review the literature to identify the effects of KB in diabetes induced animal models.

Materials and Methods

Review question

What are the effects of KB in diabetes induced animal models?

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criterion was studies that used animal models to investigate the effects of KB in diabetes. The use of animal models was conducted to control confounding factors in the variables of interest.

The exclusion criteria were: studies unrelated to KB, studies related to KB but unrelated to health areas, reviews, congress summaries, patent descriptions, book section, hypothesis articles, commentaries, opinion articles, previews, articles published in different languages than Portuguese, English and Spanish, letters, articles that were not fully available even after attempting to contact the authors.

Search strategy

The electronic search was conducted without initial date restriction up to and including July 2019 in PubMed, Scopus, Scielo, ScienceDirect, and ISI Web of Knowledge databases. The initial search was conducted using the MeSH and relevant entry terms: (Kombucha) OR (Kombucha tea). All references were managed in the EndNote X7 software (Thomson Reuters, New York, NY, US). Initially, duplicate references were excluded. Titles, abstracts, and study methodologies were screened based on the inclusion and exclusion criteria by two independent reviewers (GDS and CCdoA). Lists were compared and in case of disagreement, a consensus was reached by discussion. When a consensus was not achieved, a third reviewer decided if the article should be included (FN). This systematic review followed the PRISMA statements, with some adjustments [28].

Data extraction

Data were extracted and tabulated independently by three reviewers (GDS, CCdoA, and CPF) to be submitted to descriptive analysis. Cases of disagreement were handled as described above. A meta-analysis of the data was not feasible, given the absence of agreement in the literature to date.

Quality assessment

The Review Manager 5.3 software was used to assess the quality of the included study in the systematic review. The checklist was composed of nine domains: (1) description of the animals used and the gender, (2) description of the animal's age at the outset of diabetes, (3) description of the animal's weight at the outset of diabetes, (4) description of the substance and dose used for diabetes intraperitoneal induction, (5) description of the KB preparation, (6) description of the KB application to the animal model, (7) biological analysis related to KB effects, (8) comparison of results between positive and negative control and (9) comparison between results concerning KB effects.

Two independent researchers (CCdoA and GPC) assessed the quality of the studies based on criteria previously established. Cases of disagreement were discussed until a consensus was reached. When a consensus was not obtained, a third reviewer participated in the discussion (FN). Studies risk of bias was evaluated according to the presence (yes, Y) or absence (no, N) of the nine domains. Studies with up to 30% of Ys had a high risk of bias, above 30% and lower than 65% had a medium risk, and above 65% had a low risk of bias.

Results and Discussion

The initial search yielded 1214 articles. After removing 430 duplicated titles, a total of 784 articles were included for the title and the abstract screening, remaining 54 articles. After reading the full text, 47 studies were excluded and 7 articles remained, satisfying the inclusion criteria. Figure 1 displays the PRISMA flowchart for the study selection process.

Table 1 describes the animal characteristics, the substance and dose used to induce diabetes, and the main methodology used for KB preparation and treatment of diabetes induction.

All of the articles used male rats and six chose the Wistar strain. To induce diabetes all studies used intraperitoneal injection, 4 used streptozotocin (STZ) (three articles a 45 mg/kg dosage and one a 47.5 mg/kg dosage) and 3 used alloxan (ALX) dissolved in saline (two studies a 120 mg/kg dosage and one a 150 mg/kg dosage).

Based on the results of this systematic review, the KB has shown an important potential to modulate the damages caused by the diabetic induction and consequences of exposure to hyperglycemia in preclinical rodent models, reversing the negative results reported in the included studies. From the findings reported by these studies, we create a panel of KB effects in parameters altered by diabetes induction in rats, which could contribute to understanding the benefit of KB administration (Figure 3).

The animal used in all studies comprise male rats and the diabetes was induced by STZ or ALX. Chemical induction of diabetes in preclinical rodent models is usually performed with these two substances, despite others that are available for this purpose. The active principle of STZ and ALX is related to there cytotoxicity to pancreatic β -cells, producing a disruption in homeostasis and leading to the development of hyperglycemia due to pathways that included OS, established by a reduction of antioxidants and increase of pro-oxidants biomarkers, which are generated from the overproduction of reactive oxygen species (ROS)[29]. The DNA of pancreatic islets is one of the ROS targets after exposure to ALX and STZ, and the consequence is DNA fragmentation in pancreatic β -cells with subsequent cell apoptosis [30].

In the presence of an unbalanced cellular environment due to ROS, an augmentation in insulin resistance and an impairment in insulin secretion from β -cells can be observed. This leads to the oxidation of proteins and carbohydrates with the production of adverse compounds such as MDA, an end product of polyunsaturated fatty acids peroxidation [31]. On the other hand, prolonged exposure to hyperglycemia induces protein glycation also attributable to OS, more specifically to ROS, increasing intracellular and extracellular free radical circulation, with disturbance in cellular core and triggering signaling pathways for several molecular mechanisms [32, 33]. The cell injury caused by ROS in both conditions can be minimized by the enzymatic catalyze of harmful oxidants, such as superoxide formed in oxygen metabolism. SOD is the enzyme that can convert this very damaging compound into molecular oxygen peroxide, a less toxic substance, and this makes it extremely relevant in the presence of OS [34].

The KB was prepared with black tea (KB-BT) (4 studies, using 4.2, 4.5, 12, and 20 g/L concentrations) or green tea (KB-GT) (1 study, using 12 g/L concentration) or snake fruit juice (KB-SF) (3 studies, using 20 g/L and 1000 g/L), sugar at 100 g/L (all studies) and most used 14 days of fermentation (5 studies). Regarding the application of KB for treatment of diabetic induction, the exposure period occurred between 14 to 45 days (14 days - 1 study - KB-BT; 28 days - 4 studies - KB-GT and KB-SF; 30 days

- 1 study - KB-BT; 45 days - 1 study - KB-BT) and all studies used the oral route to administration the beverage, with 2 studies applying by gavage (KB-BT and KB-GT), 2 studies by intragastric tube (KB-BT and KB-SF) and 3 not revealing the method of KB administration (KB-BT and KB-SF).

To prepare the KB the included studies used sucrose in a concentration of 100 g/L and BT, GT, or SF in varying concentrations. These variations seemed to cause little impact when considering a positive or no reversion of the adverse consequences of diabetes induction in rats since all studies showed the KB potential to reverse diabetic parameters. Nevertheless, it is important to mention that when comparing 3 mg/kg, 6 mg/kg, and 12 mg/kg concentration of KB-BT, the intermediary dosage was more effective in decreasing the glycemia, HbA_{1c} blood level, and G-6-Pase and F-1,6-BA activity in the liver, and increasing the insulin and total hemoglobin blood levels and hexokinase activity in the liver [35]. Contrarily, analyzing KB-SF in concentrations of 5 mL/kg, 10 mL/kg, and 15 mL/kg revealed better results for the highest dosage in reversing OS biomarkers, with a significant increase in SOD blood level and decrease in MDA blood level [20]. These results may reflect the differences between the substrate used to produce KB, the SCOBYS, the KB preparation, the animal exposure to KB, and/or the ideal concentration of KB for a certain parameter modulation.

The KB fermentation usually increases the polyphenol content in teas or juices, such as total flavonoids in KB-BT [15], KB-GT [15], and KB-SF [20], the tannin in KB-BT and KB-SF [22], quercetin in KB-BT, KB-GT [21], and KB-SF [22], and catechins [21], theaflavin, and thearubigin in KB-BT and KB-GT [1, 15, 21]. The polyphenols are widely recognized due to their capacity to improve human and animal health by minimizing the OS state through their antioxidant activity, stimulating the restoration of the unbalanced cellular environment [39-41]. Therefore, the disturbance in oxidant and antioxidant balance promoted by diabetes induction (showed in four studies), could have been diminished by the polyphenols present in KB, as all studies demonstrated an increase in SOD and a reduction in MDA levels in the blood and the pancreas.

Table 2 describes the aim, treatment groups, biological analysis and collection site, and results of the included studies. All studies that conducted glucose analysis (5 studies - KT-BT and KB-SF) identified a statistically significant decrease in blood levels in the diabetic group treated with KB. Two studies (KB-BT) verified the blood levels of insulin and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) and identified, respectively, a significant increase and decrease in these diabetes biomarkers.

The decreased activity of hexokinase (a glycolytic enzyme responsible for the adequate use of hepatic glucose) is observed in insulin deficiency associated with altered carbohydrate metabolism, which occurs in diabetes, leading to an impairment in glucose utilization by the liver [36, 37]. Instead, the hepatic activities of G-6-Pase and F-1,6-BA are increased in diabetes, favoring gluconeogenesis, and contributing to fasting hyperglycemia. Insulin deficiency associated with hyperglycemia can stimulate the activity of these enzymes, favoring the storage of glycogen in the liver [38]. In rats that suffered induction by diabetic drugs, this is also observed, but the KB-BT showed the capability to increase the activity of hexokinase and decrease the activity of G-6-Pase and F-1,6-BA, which probably contributes to the reduction of glucose levels in the blood [35].

In the pancreas, the enzymatic activity, DNA damage, histological and immunohistochemical parameters were evaluated. The enzymatic analysis revealed a reduction in lipase, α-amylase, and caspase-3 activity when rats after diabetes induction were treated with KB-BT (all analyzed in one study). One study

showed inhibition of DNA fragmentation when animals were treated with KB-BT. Two studies carried out a histological analysis, the atrophy in pancreas cells demonstrated by the diabetic group was reverted when the animals were treated with KB-BT. Three studies that used KB-SF conducted immunohistological analysis and showed improvement in the structure and function of Langerhans island, augmentation in the number of β -cells, and low immunoreactive response against the anti-insulin in the diabetic rats treated with KB.

One of the included studies showed that KB-BT attenuated the DNA fragmentation in pancreatic tissue and attributed this effect to the scavenging free radicals properties of this beverage [42]. This study also evaluated the levels of active caspase-3 in pancreatic tissue, since this cysteine protease causes DNA fragmentation culminating in apoptosis. It revealed that KB-BT could decrease the active caspase-3 levels in pancreatic tissue homogenate of diabetes induced rats [42]. The protective effect could be due to the theaflavin present in BT, which could be enhanced by the fermentation with kombucha. This flavonoid has shown the capacity to prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress [43]. This data suggest that the hypoglycemic effect of KB-BT can come from the inhibition of pancreatic β -cells apoptosis through scavenging the reactive free radicals.

The outcomes of KB-BT exposure in diabetic induced rats was also evaluated in the liver. Two studies analyzed liver damage markers in blood samples, one study performed a histological analysis, and another study evaluated the enzymatic activity and the glycogen storage in the liver. All the liver damage markers (alkaline phosphatase - AST, alanine transaminase - ALT, aspartate transaminase - ALP, and gamma-glutamyl transpeptidase - GGT), decreased when the diabetic animals were exposed to KB-BT. The group treated with KB showed a normal arrangement around the central vein and reduction in hepatocytes apoptosis that was distorted and augmented, respectively, in the diabetes group. Furthermore, the diabetic rats exposed to KB-BT showed a reduction in the glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) and fructose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-BA) activities and an increase in hexokinase activity and glycogen storage.

The lipid metabolism was also verified in diabetic rats exposed to KB (4 studies - KB-BT and KB-SF). Increase in high-density lipoprotein cholesterol blood levels (4 studies - KB-BT and KB-SF), and a decrease in total cholesterol (3 studies - KB-BT and KB-SF), triglycerides (4 studies - KB-BT and KB-SF), and low-density lipoprotein cholesterol (4 studies - KB-BT and KB-SF) was observed in the diabetic groups treated with KB.

Oxidative stress (OS) was evaluated in four studies and the superoxide dismutase (SOD) (4 studies - KB-BT and KB-SF) and malondialdehyde (MDA) (4 studies - KB-BT and KB-SF) were the most prevalent markers analyzed. Results showed an increase in SOD activity and a decrease in MDA levels in the blood of diabetic animals exposed to KB-SF (3 studies). One study performed an extensive oxidative stress analysis in different organs, showing an increase in SOD activity and a decrease in MDA levels in the pancreas, and a decrease in SOD activity and MDA levels in the liver of diabetic animals exposed to KB-BT.

Figure 2 shows the quality of the included studies. The parameters that showed a low risk of bias were: description of the animals used and gender, description of the substance and dose used for diabetes intraperitoneal induction, biological analysis related to KB effects, comparison of results between positive and negative controls, and comparison between results concerning KB effects. The parameters that showed a medium risk of bias were: description of the KB preparation and description of the KB application to the

animal model. A high risk of bias was identified in the parameters: description of the animal's age and weight in the outset of diabetes.

Compiling the results from the included studies, the scientific literature at this moment is consensual in showing that the exposure to KB after diabetes induction in rats improves alterations caused by hyperglycemia. All studies observed that KB decreased blood levels of glucose and glycosylated Hb, and increased insulin in diabetic rats. One important mechanism to be considered in the reduction of glycemia is the decrease of α -amylase both in blood and pancreas, which could be associated with the polyphenols content in KB, whereas a minor concentration of this enzyme diminished the glucose absorbable from diet carbohydrates, such as starch [23, 44]. Additionally, flavonoids found in high concentration in KB-BT, KB-GT, and KB-SF exert an important antidiabetic activity on induced diabetic and obese rats, with a considerable contribution of catechins, by enhancing the mRNA and protein expression of the glucose transporter GLUT-4, generating hypoglycemic effects through glucose oxidation and insulin-mimetic activities [45, 46].

Five of the included studies evaluated the pancreas by immunohistochemistry, an important evaluation since diabetes induction causes damage to this organ. They observed that in diabetic animals exposed to KB-BT the atrophy of the pancreas cells was reverted and the exposure to KB-SF improved the structure and function of Langerhans island, augmented the number of β -cells, and reduced the immunoreactive response against the anti-insulin. This enhancement may be provided by another important flavonoid present in KB-BT, KB-GT, and KB-SF: the quercetin [21, 22, 47], which demonstrated the potential to protect the induced diabetic rats from damage and death of the pancreatic β -cells, maintaining the cellular architecture, preserving the secretion of insulin, and stimulating the regeneration of these cells [48].

Additionally, the polyphenols from oolong tea, which included some catechins in similarity to KB, have shown the capacity to decrease pancreatic lipase activity *in vitro* [49]. This enzyme, secreted by the pancreas is known for its hydrolysis activity of dietary non-absorbable triglycerides into absorbable glycerol and free fatty acids. Diabetes induction increases its activity creating an elevation in plasma triglycerides and cholesterol levels [50]. Exposing diabetes induced rats to KB-BT and KB-SF decreases the triglycerides and cholesterol levels, which could be possibly linked to the decrease in lipase activity stimulated by the polyphenols of these KB [50].

Furthermore, there are two other compounds of all KB preparations that can be considered bioactive in reducing the negative effects derived from diabetes induction: acetic acid [51] and DSL [52]. The acetic acid is an organic acid produced from acetic acid bacteria metabolism, that showed improvement in fasting plasma glucose, HbA1c, and OGTT levels in exposed hyperglycemic mice [51]. This is in great part due to the activation of hepatic 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and probably it is the same pathway triggered in the improvement of these parameters in diabetic induced rats after KB exposure. Another influence of acetic acid in alterations caused by diabetes induction is the lipid profile, diminishing the blood levels of cholesterol and triglycerides, by inhibiting lipogenesis in the liver and excretion in fecal bile acid as seen in rats fed with a cholesterol-rich diet, which is possibly what occurs in the included studies that showed a decrease in these parameters [53].

The DSL action, differently from the acetic acid and more similar to polyphenols, focuses on the OS

promoted by diabetic induction, peculiarly in the use of ALX. DSL has detoxifying and antioxidant properties that restore the levels of plasma insulin and prevent the apoptosis of pancreatic β -cell via a mitochondrial-dependent pathway [52]. Additionally, the polyphenols of BT, GT, and SF have shown the potential to increase the antioxidant capacity of DSL, in this sense one of the included studies showed higher concentrations of DSL in the KB-BT when compared with BT, which could be associated with the increasing level of polyphenols present in KB [42, 54].

The main limitation of this systematic review reflects an important challenge in studies that investigate diabetes induction by ALX or STZ, although it is a methodology well established and widely used. It is difficult to clearly identify what are the alterations due to consequences of hyperglycemia, or the negative impact of chemical exposure used to induce diabetes. However, this may impact on understanding the mechanisms by which KB exerts its effect on diabetes, but does not diminish the potential of KB to modulate important parameters in diabetes when considering animal models. Moreover, differences between the tea or juice used to prepare KB makes it difficult to directly compare the results, since the KB chemical composition may vary, influencing significantly the final results.

Conclusion

In conclusion, it is possible to identify that KB can modulate important parameters in diabetes, reversing negative outcomes caused by diabetic induction, and exposure to hyperglycemia in preclinical rodent models. However other studies are necessary to understand more profoundly the mechanism by which this modulation occurs.

Acknowledgements

The authors have no acknowledgements to declare.

Conflict of interest

None.

Bibliography

- [1] Jayabalan R., et al. "Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13.4 (2014): 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- [2] Gamboa-Gómez C. I., et al. "In vitro and in vivo assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of Oak leaves (*Quercus convallata* and *Quercus arizonica*) infusions and fermented beverages". *Food Research International* 102 (2017): 690-699. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.011>
- [3] Hartmann A. M., et al. "Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in c57-bl/6 mice: a pilot study". *Nutrition* 16.9 (2000): 755-61. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00333-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00333-7)

- [4] Salafzoon S., *et al.* "Evaluation of the antioxidant impact of ginger-based kombucha on the murine breast cancer model". *Journal of Complementary e Integrative Medicine* 15.1 (2017). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29055172/#:~:text=Conclusions%20The%20consumption%20of%20kombucha,in%20the%20breast%20cancer%20models>.
- [5] Pakravan N., *et al.* "Cosmeceutical effect of ethyl acetate fraction of Kombucha tea by intradermal administration in the skin of aged mice". *Journal of Cosmetic Dermatology* 17.6 (2018): 1216-1224. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29152918/#:~:text=KT%20ethyl%20acetate%20fraction%20\(KEAf,abnormalities%20in%20the%20aged%20skin](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29152918/#:~:text=KT%20ethyl%20acetate%20fraction%20(KEAf,abnormalities%20in%20the%20aged%20skin).
- [6] Ivanišová E., *et al.* "The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage". *Journal of Food Science and Technology* 57 (2020): 1840-1846. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-019-04217-3>
- [7] Chen C. *et al.* "Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation". *Journal of Applied Microbiology* 89.5 (2020): 834-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11119158/>
- [8] Dufresne C., *et al.* "Tea, Kombucha, and health: A review". *Food Research International* 36.6 (2000): 409-421. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996900000673>
- [9] Dutta H., *et al.* "Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects". *In Production and Management of Beverages* (2019): 259-288. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128152607000080>
- [10] Greenwalt C. J., *et al.* "Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects". *Journal of Food Protection* 63.7 (2000): 976-981. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10914673/>
- [11] Kapp J. M., *et al.* "Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit". *Annals of Epidemiology* 30 (2019): 66-70. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047279718307385>
- [12] Tran T., *et al.* "Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage". *Foods* 9.7 (2020): 963. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7404802/>
- [13] Villarreal-Soto S. A., *et al.* "Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review". *Journal of Food Science* 83.3 (2018): 580-588. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29508944/>
- [14] Leal J. M., *et al.* "A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites". *CYTA - Journal of Food* 16.1 (2018): 390-399. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2017.1410499>
- [15] Jakubczyk K., *et al.* "Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea". *Antioxidants* 9.5 (2020): 447. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7278673/>
- [16] Veličanski A., *et al.* "Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from lamiaceae family". *Romanian Biotechnological Letters* 18.1 (2013): 8034-8042. <https://rombio.unibuc.ro/wp-content/uploads/2022/05/18-1-17.pdf>

- [17] Gaggia F., *et al.* "Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity". *Nutrients* 11.1 (2018). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30577416/>
- [18] Yavari N., *et al.* "Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice". *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4.8 (2010): 3250-3256. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103359612>
- [19] Yavari N. *et al.* "Glucuronic Acid Rich Kombucha-fermented Pomegranate Juice". *Journal of Food Research* 7.1 (2018): 61-69. <https://www.ccsenet.org/journal/index.php/jfr/article/view/64447>
- [20] Zubaidah E., *et al.* "Potential of snake fruit (Salacca zalacca (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium". *Biocatalysis. and Agricultural Biotechnology* 13, (2018): 198-203. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818117305017>
- [21] Cardoso R. R., *et al.* "Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities". *Food Research International* 128 (2019): 108782. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919306684>
- [22] Zubaidah E., *et al.* "Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars". *Nutrition and Food Science* 49.2 (2019). <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-07-2018-0201/full/html?skipTracking=true>
- [23] Aloulou A., *et al.* "Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12.63 (2012). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22591682/>
- [24] Hosseini S. A., *et al.* "A comparison between the effect of green tea and Kombucha prepared from green tea on the weight of diabetic rats". *Biomedical and Pharmacology Journal* 12 (2015): 141-146. <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Comparison-between-the-Effect-of-Green-Tea-and-on-Hosseini-Gorjani/1069437fa68ef2c74de70905100b4cc913f26090>
- [25] Saeedi P., *et al.* "Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas". *Diabetes Research and Clinical Practice* 157 (2019): 107843. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31518657/>
- [26] García-Molina L.; *et al.* "Improving type 2 *Diabetes mellitus* glycaemic control through lifestyle modification implementing diet intervention: a systematic review and meta-analysis". *European Journal of Nutrition* 59.4 (2020): 1313-1328. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781857/>
- [27] Afroz A., *et al.* "Glycaemic Control for People with Type 2 Diabetes Mellitus in Bangladesh - An urgent need for optimization of management plan". *Scientific Reports* 9 (2019): 10248. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31308457/>
- [28] Moher D., *et al.* "Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement". *Plos Medicine* 6.7 (2010): 1000097. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19621072/>
- [29] Shakya A., *et al.* "Comprehensive Review on Preclinical Diabetic Models". *Current Diabetes Reviews* 16.2 (2020): 104-116. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31074371/>

- [30] Szkudelski, T. "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas". *Physiological Research* 50.6 (2001): 537-46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11829314/>
- [31] Rehman K., et al. "Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? " *Journal of Cellular Biochemistry* 118.11 (2017): 3577-3585. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28460155/>
- [32] Butkowski E. G. et al. "Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammatory markers". *Redox Report* 22.6 (2017): 257-264.
- [33] Yaribeygi H., et al. "A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress". *Journal of Cellular Physiology* 234.2 (2019) 1300-1312. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30146696/>
- [34] Karunakaran U., et al. "A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense". *Diabetes Metab. J.* 37.2 (2013): 106-12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23641350/>
- [35] Srihari T. et al. "Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats". *Journal of Functional Foods* 5.4 (2013): 1794-1802. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464613001928#:~:text=In%20the%20present%20study%2C%20kombucha,conferring%20organic%20acids%20and%20vitamins>.
- [36] Hamden K., et al. "Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes and hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats". *Scientia Pharmaceutica* 81.1 (2013): 233-46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23641341/>
- [37] Han H. S. et al. "Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective". *Experimental and Molecular Medicine* 48.3 (2016): e218. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4892876/>
- [38] Yoshida T., et al. "CS-917, a fructose 1,6-bisphosphatase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia after meal loading in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats". *European Journal of Pharmacology* 601.1-3 (2008): 192-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19014931/>
- [39] Rice-Evans C. A., et al. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radical Biology Medicine* 20.7 (1996): 933-56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8743980/>
- [40] Piccolella S. et al. "Nutraceutical polyphenols: New analytical challenges and opportunities". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 175 (2019): 112774. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336288/>
- [41] Lushchak, V. I. "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification". *Chemical Biological Interactions* 224 (2014): 164-75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25452175/>
- [42] Bhattacharya S., et al. "Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats". *Food Chemical Toxicology* 60 (2013): 328-40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23907022/>

- [43] Feng Q., et al. "Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 1A1 in cell cultures". *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50.1 (2002): 213-20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11754570/>
- [44] Sun L., et al. "Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review". *Critical Reviews Food Science and Nutrition* 60.4 (2020): 541-555. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30799629/>
- [45] Daisy P., et al. "Insulin mimetic impact of Catechin isolated from Cassia fistula on the glucose oxidation and molecular mechanisms of glucose uptake on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats". *Phytomedicine* 17.1 (2010): 28-36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19931438/>
- [46] Hajiaghaalipour F. et al. "Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus". *International Journal Biological Science* 11.5 (2015): 508-524. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400383/>
- [47] Rohaeti E., et al. "Inhibition of α-Glucosidase, Total Phenolic Content and Flavonoid Content on Skin Fruit and Flesh Extracts of Some Varieties of Snake Fruits". In *IOP Conf Ser: Earth and Environmental Science* 59 (2017): 012066. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/58/1/012066>
- [48] Coskun O., et al. "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas". *Pharmacological Research* 51.2 (2005): 117-23. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15629256/>
- [49] Nakai M., et al. "Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro". *Jornal of Agricultural and Food Chemistry* 53.11 (2005): 4593-4598. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf047814%2B#:~:text=Inhibitory%20Effect%20of%20OTPP%20on,largely%20contributed%20to%20inhibit%20lipase>.
- [50] Nielsen T. S. et al. "Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease". *Journal of Molecular Endocrinology* 52.3 (2014): R199-222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24577718/>
- [51] Sakakibara S. et al. "Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344.2 (2006): 597-604. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16630552/>
- [52] Bhattacharya S., et al. "D-saccharic acid-1,4-lactone ameliorates alloxan-induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats through inhibiting pancreatic β-cells from apoptosis via mitochondrial dependent pathway". *Toxicology and Applied Pharmacology* 257.2 (2011): 272-83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21982801/>
- [53] Fushimi T., et al. "Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet". *The British Journal of Nutrition* 95.5 (2006): 916-24. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611381/#:~:text=In%20conclusion%2C%20dietary%20acetic%20acid,fed%20a%20diet%20containing%20cholesterol>.
- [54] Olas B., et al. "D-glucaro 1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets". *Cell Biology Toxicology* 24.2 (2008): 189-99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17846905/>

Figures and Tables

Table 1 – Description of animal characteristics, substance and dose used to induce diabetes, and the main methodology used for KB preparation and treatment of diabetes induction by author and year of publication.

Table 2 - Describes the aim, treatment groups, biological analysis (site), and results of the included studies.

Figure 1. Flowchart of study selection.

Figure 2. Quality assessment of the included studies.

Figure 3. Panel of KB effects in parameters altered by rats with induced diabetes. The arrows represent the increases (\uparrow) and decrease (\downarrow) in the parameters evaluated. The filled arrows (\blacktriangleleft) and dashed arrows (\uparrow) represent, respectively the diabetes induction and the KB effect in induced diabetes rats. ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine transaminase, AST: aspartate transaminase, CAT: catalase, F-1,6-BA: Fructose-1,6-biphosphatase activity, G-6-pase: glucose-6-phosphatase, GR: glutathione reductase, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase, GSH: glutathione, GST: glutathione S-transferases, Hb: hemoglobin, HDL-Ch: high density lipoprotein-cholesterol, LDL-Ch: low-density lipoprotein-cholesterol, MDA: malondialdehyde, ROS: reactive oxygen species, SOD: superoxide dismutase, TC: total cholesterol, TG: triglycerides.

Table 1 – Description of animal characteristics, substance and dose used to induce diabetes, and the main methodology used for KB preparation and treatment of diabetes induction by author and year of publication.

Author, Year	Animal	Gender	Animal age - onset diabetes	Animal weight - onset diabetes	Substance and dose for diabetes intraperitoneal induction	KB preparation		KB applied to animal model		
						Tea or juice concentration	Sugar concentration	Fermentation period	Exposure period	Route/method of KB administration
Aloulou et al., 2012	Wistar rats	Male	-	179 ± 10 g	ALX at 150 mg/kg bw	Black tea at 12 g/L	100 g/L	12 d	30 d	Oral/Gavage
Bhattacharya et al., 2013	Swiss rats	Male	6 w	180 to 200 g	ALX at 120 mg/kg bw	Black tea at 4.2 g/L	100 g/L	14 d	14 d	Oral/-
Hosseini et al., 2015	Wistar rats	Male	-	200 to 220 g	ALX at 120mg/kg bw	Green tea at 12 g/L	100 g/L	-	28 d	Oral/Gavage
Srihari et a., 2013 tube	Wistar rats	Male	30 w	180 to 220 g	STZ at 45 mg/kg bw	Black tea at 4.5 g/L	100 g/L	14 d	45 d	Oral/Intragastric
Zubaidah et al., 2018	Wistar rats	Male	3 m	-	STZ at 47.5 mg/kg bw	Snake fruit juice at 1000 g/L	100 g/L	14 d	28 d	Oral/-
Zubaidah, Afgani et al., 2019	Wistar rats	Male	3 m	-	STZ at 45 mg/kg bw	Snake fruit juice at 20 g/L	100 g/L	14 d	28 d	Oral/-
Zubaidah, Ifadah et al., 2019	Wistar rats	Male	2.5 to 3.0 m	150 to 200 g	STZ at 45 mg/kg bw	Black tea 20 g/L	100 g/L	14 d	28 d	Oral/-
						Snake fruit juice at 1000 g/L	100 g/L	14 d	28 d	Oral/Intragastric tube

ALX: alloxan monohydrate; d: days; g: gram; g/L: gram per liter; m: month; mg/kg bw: milligram per kilogram of body weight; STZ: streptozotocin; w: week.

Table 2 - Describes the aim, treatment groups, biological analysis (site), and results of the included studies.

Author/year	Studies aim	Groups (n)	Biological analysis (site)	Results (p value)
Aloulou et al., 2012	Evaluated the biological activities of KT towards pancreatic lipase and α -amylase as well as its effects on liver-kidney function.	G1: Normal control - Con (n=8) G2: Diabetes (n=8) G3: Con + BT by gastric gavage (5 ml/kg bw) every d (n=8) G4: Con + kT by gastric gavage(5 ml/kg bw) every d (n=8) G5: Diabetes + BT by gastricgavage (5 ml/kg bw) every d (n=8) G6: Diabetes + KT by gastricgavage (5 ml/kg bw) every d (n=8)	AST (blood) ALT (blood) GGT (blood) α -amylase (blood) (pancreas) Urea (blood) Creatinina (blood) TG (blood) LDL-Ch (blood) HDL-Ch (blood) to G2.Lipase activity (plasma) G2. Lipase activity (pancreas) G2. Histological analyses (pancreas)	Decreased (G5 - 52.58 ± 23.75 U/L and G6 - 47.75 ± 36.14 U/L; p < 0.05) compared to G2(77.17 ± 9.35 U/L). Decreased (G3 - 23.33 ± 4.13 U/L, G4 - 21.33 ± 4.13 U/L , G5 - 41.67 ± 5.16 U/L and G6 - 36.9 ± 10.68 U/L; p < 0.05) compared to G2 (72.3 ± 3.47 U/L). Decreased (G3 - 16.50 ± 4.76 U/L, G4 - 13.67 ± 1.63 U/L, G5 - 26.83 ± 6.40 U/L and G6 - 23.67 ± 5.88 U/L; p < 0.05) compared to G2 (45.83 ± 6.15 U/L). Decreased (G5 - $52 \pm 11\%$ and G6 - $37 \pm 8\%$; p < 0.05) compared to G2. α -amylase Decreased (G5 - $70 \pm 17\%$ and G6 - $52 \pm 7\%$; p < 0.05) compared to G2. Glucose (blood) Decreased (G5 - $65 \pm 14\%$ and G6 - $50 \pm 11\%$; p < 0.05) compared to G2. Decreased (G3 - 0.5 ± 0.07 g/L, G4 - 0.47 ± 0.06 g/L, G5 - 0.77 ± 0.36 g/L and G6 - 0.63 ± 0.25 g/L;p < 0.05) compared to G2 (1.05 ± 0.11 g/L). Decreased (G3 - 12 ± 2.19 mg/L, G4 - 9.83 ± 1.47 mg/L, G5 - 18.83 ± 2.86 mg/L and G6 - 15.4 ± 2.59 mg/L; p < 0.05) compared to G2 (25.5 ± 2.59 mg/L). Decreased (G5 - $59 \pm 21\%$; p < 0.05) compared to G2. Decreased (G5 - $65 \pm 14\%$; p < 0.05) compared to G2. Increased (G5 - $137 \pm 18\%$; and G6 - $157 \pm 30\%$; p < 0.05) compared to G2. Decreased (G5 - $80 \pm 15\%$ and G6 - $68 \pm 10\%$; p < 0.05) compared to G2. Decreased (G5 - $68 \pm 17\%$ and G4 - $62 \pm 10\%$; p < 0.05) compared to G2. G2 showed atrophy of β -Cells and G1 exhibited normal islets, while the G5 and G6 exhibited a marked amelioration.
			Body weight ALT (blood) (61.25 ± 3.8 IU/L). ALP (blood) Glucose (blood)	Decreased (G3 - 154.66 ± 4.03 g, G5 - 178.83 ± 2.64 g and G6 - 189.5 ± 2.88 g; p < 0.05) compared to G1(215.16 ± 4.07 g) and G4 (192.17 ± 3.40 g). Decreased (G4 - 39.8 ± 2.49 IU/L and G5 - 47.9 ± 2.64 IU/L; p < 0.05) compared to G3. Decreased (G4 - 30.62 ± 1.5 KA Units, G5 - 38.45 ± 1.82 KA Units and G6 - 40.34 ± 2.88 KA Units; p < 0.05) compared to G3 (58.18 ± 2.73 KA Units). Decreased (G4 - about 56.4%, 130.17 ± 5.88 mg/dL, G5 - about 48.5%, 153.67 ± 6.6 mg/dL and G6 - 111.83 ± 5.7 mg/dL; p < 0.05) compared to G3 (298.41 ± 13.25 mg/dL).

Bhattacharya et al., 2013 Investigated the role in ameliorating the oxidative stress in diabetes related complications in organs like pancreas, liver, kidney and heart of ALX induced diabetic rats in comparison to that of unfermented tea. Evaluated the effect of KT on ALX-induced DNA fragmentation and activation of caspase-3 in the pancreatic tissue of experimental rats to address its protective mechanism.

G1: Control (vehicle only) - Cont(n=6)
G2: KT orally at 150 mg LEx/kg bw for 14 d to know whether any toxic effect was produced by KT - KT (n=6)
G3: Diabetic animals - ALX (n=6)
G4: Diabetic animals + KT orally at 150mg LEx/kg bw for 14 d after diabetic induction - ALX + KT (n=6)
G5: Diabetic animals + BT orally at 150 mg LEx/kg bw for 14 d - ALX + BT (n=6)
G6: Diabetic animals + Glibenclamide at 1 mg/kg bw for 14 d - ALX + GB(n=6)

Urea nitrogen (blood)	Decreased (G4 - 30.6 ± 2.23 mg/dL, G5 - 34.6 ± 1.79 mg/dL and G6 - 24.68 ± 1.46 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G3 (42.73 ± 2.74 mg/dL).
Creatinine (blood)	Decreased (G4 - 0.157 ± 0.013 mg/dL, G5 - 0.184 ± 0.015 mg/dL and G6 - 0.149 ± 0.013 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G3 (0.226 ± 0.021 mg/dL).
TG (blood)	Decreased (G4 - 92.37 ± 5.46 mg/dL, G5 - 105.53 ± 5.17 mg/dL and G6 - 90.45 ± 4.35 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G3 (159.37 ± 6.74 mg/dL).
TC (blood)	Decreased (G4 - 124.21 ± 8.4 mg/dL, G5 - 140.67 ± 7.82 mg/dL and G6 - 111.17 ± 7.43 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G3 (181.46 ± 10.07 mg/dL).
HDL-Ch (blood)	Increased (G4 - 29.26 ± 1.3 mg/dL, G5 - 25.37 ± 1.2 mg/dL and G6 - 33.19 ± 1.6 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G3 (19.63 ± 0.9 mg/dL).
Glycated Hb (blood)	Decreased (G4 - 0.471 ± 0.054 mg/g Hb, G5 - 0.636 ± 0.061 mg/g Hb and G6 - 0.462 ± 0.05 mg/g Hb; $p < 0.05$) compared to G3 (0.875 ± 0.07 mg/g Hb).
Insulin (blood)	Increased (G4 - 1.67 ± 0.11 ng/mL, G5 - 1.34 ± 0.1 ng/mL and G6 - 1.79 ± 0.12 ng/mL; $p < 0.05$) compared to G3 (0.75 ± 0.07 ng/mL).
SOD (liver)	Decreased (G4 - 47.8 ± 2.2 Unit/mg protein, G5 - 49.97 ± 2.38 Unit/mg protein and G6 - 47.1 ± 2.25 Unit/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (59.5 ± 2.8 Unit/mg protein).
SOD (kidney)	Increased (G4 - 32.3 ± 1.52 Unit/mg protein, G5 - 29.7 ± 1.38 Unit/mg protein and G6 - 33.6 ± 1.56 Unit/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (21.8 ± 1.05 Unit/mg protein).
SOD (pancreas)	Increased (G4 - 2.53 ± 0.11 Unit/mg protein, G5 - 2.15 ± 0.1 Unit/mg protein and G6 - 2.63 ± 0.12 Unit/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (1.2 ± 0.05 Unit/mg protein).
SOD (heart)	Decreased (G4 - 6.3 ± 0.23 Unit/mg protein, G5 - 6.8 ± 0.19 Unit/mg protein and G6 - 6.7 ± 0.2 Unit/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (8.4 ± 0.4 Unit/mg protein).
CAT (liver)	Decreased (G4 - 100.66 ± 5.2 μ mol/min/mg protein, G5 - 112.57 ± 5.52 μ mol/min/mg protein and G6 - 91.43 ± 4.47 μ mol/min/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (167.4 ± 8.12 μ mol/min/mg protein).
CAT (kidney)	Increased (G4 - 81.42 ± 4.05 μ mol/min/mg protein, G5 - 71.73 ± 3.48 μ mol/min/mg protein and G6 - 81.63 ± 4.05 μ mol/min/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (53.28 ± 2.54 μ mol/min/mg protein).
CAT (pancreas)	Increased (G4 - 75.99 ± 3.6 μ mol/min/mg protein, G5 - 68.14 ± 3.3 μ mol/min/mg protein and G6 - 83.79 ± 4.08 μ mol/min/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (56.52 ± 2.7 μ mol/min/mg protein).
CAT (heart)	Decreased (G4 - 41.5 ± 2.05 μ mol/min/mg protein, G5 - 51.6 ± 2.48 μ mol/min/mg protein and G6 - 39.54 ± 1.77 μ mol/min/mg protein; $p < 0.05$) compared to G3 (57.5 ± 2.67 μ mol/min/mg protein).

GST (liver)	Increased (G4 - 0.62 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 0.59 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 0.61 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (0.45 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GST (kidney)	Increased (G4 - 0.61 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 0.52 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 0.53 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (0.38 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GST (pancreas)	Increased (G4 - 0.27 ± 0.012 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 0.24 ± 0.011 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 0.28 ± 0.013 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (0.16 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GST (heart)	Increased (G4 - 0.108 ± 0.005 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 0.101 ± 0.005 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 0.106 ± 0.005 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (0.082 ± 0.004 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GR (liver)	Increased (G4 - 37.43 ± 1.7 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 33.59 ± 1.65 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 36.24 ± 1.72 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (24.59 ± 1.2 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GR (kidney)	Increased (G4 - 19.5 ± 0.92 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 17.68 ± 0.85 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 17.34 ± 0.84 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (13.7 ± 0.6 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GR (pancreas)	Increased (G4 - 26.89 ± 1.2 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 21.79 ± 1.06 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 26.8 ± 1.24 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (16.65 ± 0.73 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GR (heart)	Increased (G4 - 18.7 ± 0.9 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 15.9 ± 0.72 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 20.6 ± 1.03 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (12.4 ± 0.52 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GPx (liver)	Increased (G4 - 80.66 ± 4.1 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 72.14 ± 3.4 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 77.8 ± 3.75 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (45.29 ± 2.24 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GPx (kidney)	Increased (G4 - 95.43 ± 4.5 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 81.07 ± 4.02 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 98.25 ± 4.6 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (67.87 ± 3.2 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GPx (pancreas)	Increased (G4 - 15.32 ± 0.73 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 14.52 ± 0.7 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 16.38 ± 0.79 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (6.38 ± 0.3 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
GPx (heart)	Increased (G4 - 69.8 ± 3.2 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, G5 - 57.4 ± 2.57 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and G6 - 74.4 ± 3.62 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; $p < 0.05$) compared to G3 (25.5 ± 1.17 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).
ROS (Liver)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.
ROS (kidney)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.
ROS (pancreas)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.
ROS (heart)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.
Protein carbonyl (Liver)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.
Protein carbonyl (kidney)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.
Protein carbonyl (pancreas)	Decreased (G4, G5 and G6; $p < 0.05$) compared to G3.

		Protein carbonyl (heart) MDA (Liver) MDA (kidney) MDA (pancreas) MDA (heart) GSH (liver) GSH (kidney) GSH (pancreas) GSH (heart) DNA fragmentation (pancreas) Caspase-3 activation (pancreas)	Decreased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Decreased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Decreased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Decreased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Decreased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Increased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Increased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. Not significant. Increased (G4, G5 and G6; p < 0.05) compared to G3. G3 showed DNA cleavage, indicating apoptosis, which was almost inhibited in G4 and G5. Increased by 2.3 folds in G3 pancreatic tissue, but lowered in G4 and G5.	
		Histological studies (liver)	Liver histological analysis of G3 showed a distortion in the arrangement of cells around the central vein, periportal fatty infiltration and formation of apoptotic bodies. G4 and G5 showed a normal arrangement around central vein and reduction in hepatocytes apoptosis.	
		Histological studies (kidney)	G3 showed degenerated glomeruli, basement membrane thickening, marked proliferation of mesangial cells and mesangial matrix accumulation, which is attenuated in G4 and G5.	
		Histological studies (pancreas)	In G3 was observed a distortion in islets of Langerhans with atrophy of acinar cells. G4 and G5 showed a partial restoration and KT and BT offered protection to β -cell mass.	
		Histological studies (heart)	G3 showed disorganization of normal radiating pattern of cell plates in the heart, but these changes are reduced in G4 and G5.	
Hosseini et al., 2015	Evaluated the influence of KT made from GT.	G1: Control group (diabetic) (n=10) G2: Green Tea - GT (n=10) G3: Diabetic receiving Kombucha prepared from the GT (n=10)	Body weight	Decreased (G2 - 186.5 ± 4.5 g and G3 - 211.6 ± 5.3 g; p = 0.0001 and p = 0.024, respectively) compared to G1 (177.7 ± 6.9 g).

Srihari et al., 2013	Evaluated the biological activities of KT in the treatment of diabetes on experimental rats, with emphasis on the changes in levels of glucose, insulin, Hb, HbA1c, hepatic glycogen content, and the activities of some important carbohydrate metabolizing enzymes in STZ-induced experimental rats.	Oral glucose tolerance test(blood)	Not significant.
		Total haemoglobin (blood)	Increased (G4 - 8.88 ± 0.48 g/dL, G5 - 10.58 ± 0.98 g/dL and G6 - 9.42 ± 0.38 g/dL; p < 0.05) compared to G3 (8.02 ± 0.59 g/dL).
		Glycated Hb (blood)	Decreased (G4 - 0.62 ± 0.05 mg/g Hb, G5 - 0.36 ± 0.03 mg/g Hb and G6 - 0.56 ± 0.05 mg/g Hb; p < 0.05) compared to G3 (0.74 ± 0.06 mg/g Hb).
		G-6-pase activity (liver)	Decreased (G5 - 0.22 ± 0.02 μ mol of Pi liberated/min/mg protein; p < 0.05) compared to G3 (0.28 ± 0.02 μ mol of Pi liberated/min/mg protein).
		F-1,6-BA activity (liver)	Decreased (G5 - 0.39 ± 0.03 μ mol of Pi liberated/min/mg protein; p < 0.05) compared to G3 (0.61 ± 0.04 μ mol of Pi liberated/min/mg protein).
		Hexokinase activity (liver)	Increased (G5 - 135.58 ± 10.40 μ mol of glucose phosphorylated/min/g protein; p < 0.05) compared to G3 (106.98 ± 8.2240 μ mol of glucose phosphorylated/min/g protein).
		Glycogen (liver) Glycogen (muscle) Body weight	Increased (G5 - 28.98 ± 2.36 mg/g tissue; p < 0.05) compared to G3 (19.88 ± 1.64 mg/g tissue). Not significant. Increased (G4, G5 and G6; p 0.05) compared to G3.
Zubaidah et al.2018	G1: Normal - P0 (n=5) G2: Diabetes mellitus (DM) - P1(n=5) G3: DM + KS - P2 (5 mL/kg bw/d)(n=5) G4: DM + KS - P3 (10 mL/kg bw/d)(n=5) G5: DM + KS - P (15 mL/kg bw/d)(n=5)	Glucose (blood) SOD (blood) MDA (blood) Immunohistochemical staining (pancreas)	Decreased (G3, G4 and G5; p < 0.05) in a range of 31-59% compared to G2. Increased (G3 - 41.95 ± 6.21 unit/100 μ L; G4 - 43.87 ± 5.92 unit/100 μ L and G5 - 46.75 ± 2.78 unit/100 μ L; p < 0.05) compared to G2 (18.56 ± 5.42 unit/100 μ L). Decreased (G3 - 0.45 ± 0.04 ng/100 μ L, G4 - 0.29 ± 0.02 ng/100 μ L and G5 - 0.20 ± 0.04 ng/100 μ L; p < 0.05) compared to G2 (0.58 ± 0.08 ng/100 μ L). G3, G4 and G5 showed improvement of Langerhans islands structure and function of insulin secretion compared to G2. The size and shape of the Langerhans island of G2 were smaller and irregular than G1 and G3, G4 and G5. G2 showed a very low immunoreactive response against the anti-insulin. G3, G4 and G5 the number and arrangement of endocrine cells look more homogeneous, and the intensity of the brown color was increased compared to G2. G3, G4 and G5 have regeneration of pancreatic β -cells.

Zubaidah et al., 2019

Compared snake fruit and black tea KT, and metformin as diabetes therapy agents.

G1: Normal - P0 (n=5)
G2: Diabetes - P1 (n=5)
G3: Diabetes with the BT KT - P2 (5 mL/kg bw/d) (n=5)
G4: Diabetes with the snake fruit kombucha - P3 (5 mL/kg bw/d) (n=5)
G5: Diabetes with the metformin - P4 (45 mL/kg bw/d) (n=5)

Fasting plasma glucose (blood)

Decreased (G3 and G4; $p < 0.05$) compared to G2.

Decreased (G3 - 51.50 ± 5.20 mg/dL, G4 - 44.75 ± 3.79 mg/dL and G5 - 52.50 ± 9.00 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (75.25 ± 10.50 mg/dL).

Decreased (G3 - 73.25 ± 24.53 mg/dL; G4 - 52.50 ± 28.84 mg/dL; G5 - 91.75 ± 26.71 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (102.75 ± 22.94 mg/dL).

Increased (G3 - 40.50 ± 9.95 mg/dL, G4 - 58.7 ± 2.87 mg/dL and G5 - 56.75 ± 21.65 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (37.75 ± 5.70 mg/dL).

Decreased (G3 - 11.50 ± 1.91 mg/dL, G4 - 7.25 ± 1.26 mg/dL and G5 - 11.00 ± 0.82 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (14.25 ± 3.40 mg/dL).

Increased (G3 - 39.50 ± 11.71 unit/100 μ L, G4 - 44.55 ± 5.98 unit/100 μ L and G5 - 31.78 ± 3.79 unit/100 μ L; $p < 0.05$) compared to G2 (17.66 ± 4.79 unit/100 μ L).

Decreased (G3 - 0.44 ± 0.02 ng/100 μ L, G4 - 0.46 ± 0.02 ng/100 μ L and G5 - 0.39 ± 0.02 ng/100 μ L; $p < 0.05$) compared to G2 (0.83 ± 0.02 ng/100 μ L).

G3, G4 and G5 showed increasing Langerhans island structures and insulin secretions. The size and shape of the structures from the G2 were irregular and smaller than those of G1, G3, G4 and G5.

G2 showed a very low immunoreactive response to anti-insulin. G3 and G5 showed an improvement in the Langerhans island structures, and in the size, shape, distributions, and numbers of the β -cells, as well as the high intensity of the brown color when compared to G2.

Zubaidah, Ifadah, et al., 2019

Study the anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars.

G1: Normal (n=4)
G2: Diabete control - DM (n=4) **G3:** DM + KS Suwatu (5 mL/kg/d)(n=4)
G4: DM + KS Madura (5 mL/kg/d)(n=4)
G5: DM + KS Pondoh (5 mL/kg/d)(n=4)
G6: DM + KS Bali (5 mL/kg/d) (n=4)

Immunohistochemical staining(pancreas)

Glucose (blood)

Decreased (G3 - 110.3 ± 2.9 mg/dL, G4 - 114.8 ± 9.4 mg/dL, G5 - 189.3 ± 15.4 mg/dL and G6 - 140.0 ± 14.4 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (413.3 ± 8.3 mg/dL).

Decreased (G3 - 49.0 ± 2.6 mg/dL, G4 - 51.0 ± 3.5 mg/dL, G5 - 66.8 ± 5.7 mg/dL and G6 - 53.0 ± 4.2 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (75.3 ± 5.7 mg/dL).

Decreased (G3 - 52.5 ± 6.8 mg/dL, G4 - 74.5 ± 2.7 mg/dL and G6 - 92.0 ± 8.1 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (102.8 ± 6.9 mg/dL).

Increased (G3 - 46.8 ± 1.3 mg/dL and G4 - 46.5 ± 2.1 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (37.8 ± 5.7 mg/dL).

Decreased (G3 - 7.3 ± 1.0 mg/dL, G4 - 10.3 ± 1.3 mg/dL and G6 - 10.3 ± 1.3 mg/dL; $p < 0.05$) compared to G2 (14.3 ± 1.3 mg/dL).

Increased (G3 - 44.6 ± 1.9 unit/100 μ L, G4 - 41.7 ± 0.8 unit/100 μ L and G5 - 30.8 ± 3.6 unit/100 μ L; $p < 0.05$) compared to G2 (18.7 ± 1.4 unit/100 μ L).

Immunohistochemical (pancreas)

Decreased (G3 - 0.37 ± 0.03 ng/100 μ L, G4 - 0.48 ± 0.03 ng/100 μ L, G5 - 0.42 ± 0.04 ng/100 μ L and G6 - 0.47 ± 0.02 ng/100 μ L; $p < 0.05$) compared to G2 (0.84 ± 0.02 ng/100 μ L).

G2 the size and shape of the Langerhans islands were smaller compared to G1, and that also had a verylow immune reactive response against anti-insulin. Number of pancreatic β -cells that produced insulin in G2 was decreased ($p < 0.05$) when compared to G1.

Improvements of the Langerhans island structure andfunctions of the insulin secretion occurred in G3, G4, G5 and G6 compared to G2. The number of pancreatic β -cells that produced insulin in G3 (72.2 ± 17.9) and G4 (73.5 ± 17) was significantly higher ($p < 0.05$) than those in G2 (42.1 ± 11.5).

ALX: alloxan monohydrate; d: days; g: gram; g/L: gram per liter; m: month; mg/kg bw: milligram per kilogram of body weight; STZ: streptozotocin; w: week; %: per cent; ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; BT KT: kombucha tea fermented by black tea; CAT: catalase; DNA: deoxyribonucleic acid; F-1,6-BA: fructose-1,6-bisphosphatase; G-6-pase activity: glucose-6-phosphatase activity; g: gram; g/dL: gram per deciliter; g/L: gram per liter; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione; GST: glutathione S-transferases; GT: green tea; Hb: hemoglobin; Hb1Ac: glycated hemoglobin; HDL-Ch: high density lipoprotein-cholesterol; IU/L: international unit per liter; IU/mL: international unit per milliliter; KA Units: King-Armstrong units; KT: kombucha tea; LDL-Ch: low-density lipoprotein-cholesterol; LEx/kg bw: lyophilized to dryness per kilogram of body weight; MDA: malondialdehyde; mg: milligram; mg/g: milligram per gram; mg/g Hg: milligram per gram of hemoglobin; mg/dL: milligram per deciliter; mg/kg bw: milligram per kilogram of body weight; mL/kg bw/d: milligram per kilogram of body weight a day; mg/kg/d: milligram per kilogram a day; mg/L: milligram per liter; mL/kg/d: milligram per kilogram a day; ng/mL: nanogram per milliliter; ng/100 μ L: nanogram per 100 microliter; nmol/min/mg protein: nanomole per minute per milligram of protein; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; U/L: unit per liter; Unit/mg protein: unit per milligram of protein; Unit/100 μ L: unit per 100 microliter; μ mol/min/mg protein: micromole per minute per milligram of protein; μ mol of Pi liberated/min/mg protein: micromole of Pi libertated per minute per milligram of protein; μ mol of glucose phosphorylated/min/g protein: micromole of glucose phosphorylated per minute per gram of protein.

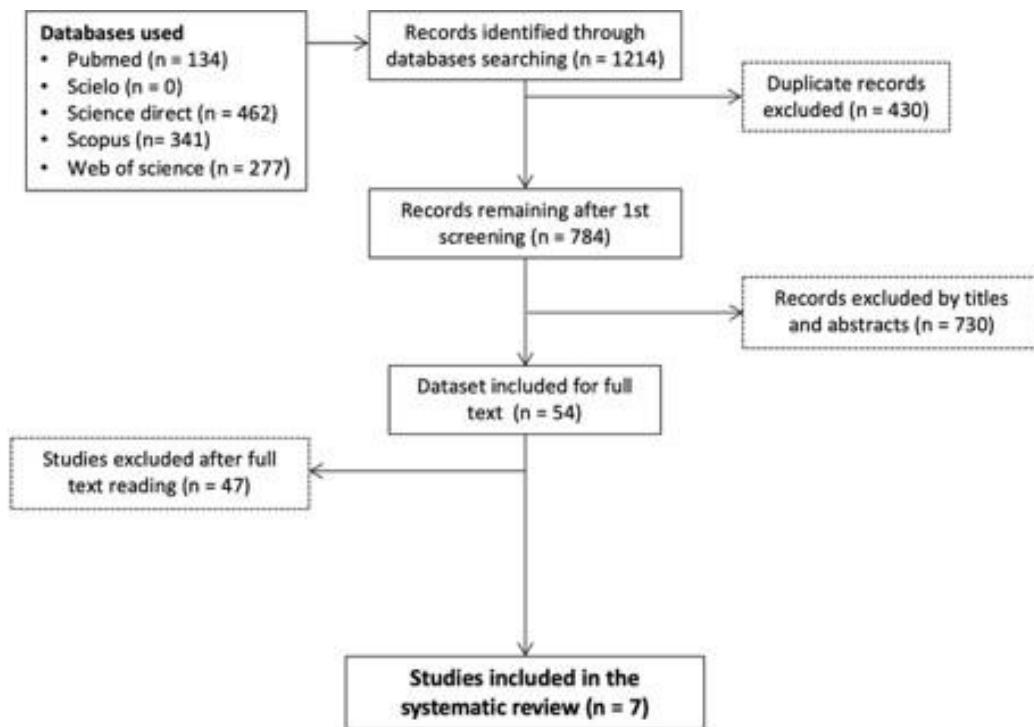


Figure 1. Flowchart of study selection.

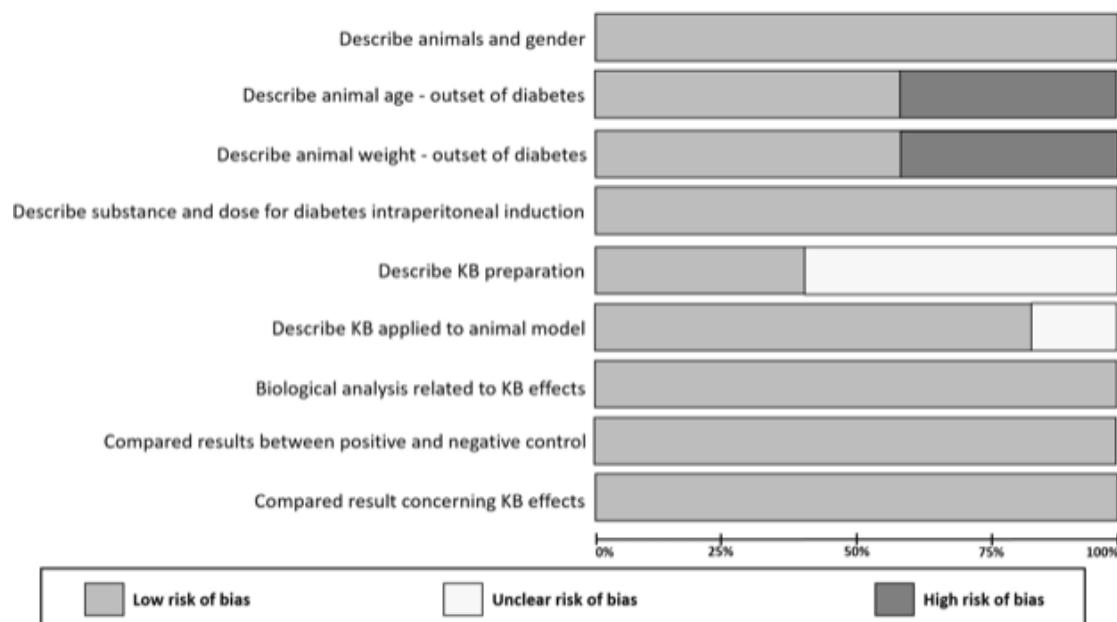


Figure 2. Quality assessment of the included studies.

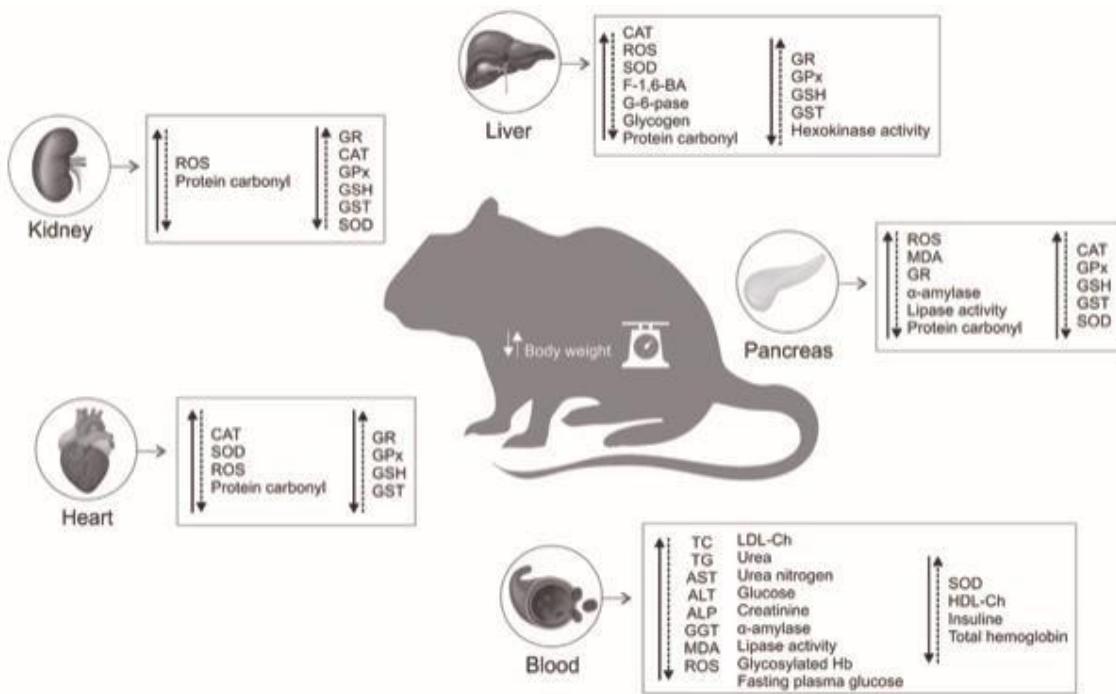


Figure 3. Panel of KB effects in parameters altered by rats with induced diabetes. The arrows represent the increases (\uparrow) and decrease (\downarrow) in the parameters evaluated. The filled arrows (\uparrow) and dashed arrows (\downarrow) represent, respectively the diabetes induction and the KB effect in induced diabetes rats. ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine transaminase, AST: aspartate transaminase, CAT: catalase, F-1,6-BA: Fructose-1,6-biphosphatase activity, G-6-pase: glucose-6-phosphatase, GR: glutathione reductase, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase, GSH: glutathione, GST: glutathione S-transferases, Hb: hemoglobin, HDL-Ch: high density lipoprotein-cholesterol, LDL-Ch: low-density lipoprotein-cholesterol, MDA: malondialdehyde, ROS: reactive oxygen species, SOD: superoxide dismutase, TC: total cholesterol, TG: triglycerides.

Composição Química e Propriedades Bioativas da Bebida Kombucha e Análise Térmica da Resistência da Membrana de Celulose Microbiana Utilizada na Preparação

Chemical Composition and Bioactive Properties of Kombucha Beverage and Thermal Analysis Resistance of the Microbial Celulose Membrane Used in the Preparation

Greice Dotto Simões¹; Taiciane Gonçalves da Silva³; Karlla Tessmann³; Robson Andreazza²;
Cícero de Coelho Escobar²; Simone Pieniz³; Fernanda Nedel^{1*}

¹Program in Health and Behavior, Catolic University of Pelotas, 96015-560, Pelotas-RS, Brazil.

²Environmental Sciences Program, Engineering Center, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil.

³Department of Nutrition, Federal University of Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil.

¹Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil. E-mail: fernanda.nedel@ucpel.edu.br

*Corresponding Author

Resumo

Com o avançar das tecnologias e a busca de um estilo de vida saudável, os alimentos e bebidas fermentadas vêm sendo utilizados expressivamente na alimentação da população de modo geral, devido aos seus diversos benefícios à saúde. A kombucha ganhou um espaço significativo neste amplo mercado consumidor, por ser uma bebida probiótica, proveniente da fermentação do chá de *Camellia Sinensis* no qual ocorrem uma simbiose de leveduras e bactérias. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar a composição química, quantificar os compostos fenólicos,

antioxidantes, verificar a viabilidade celular da kombucha, bem como a resistência térmica de membrana celulósica microbiana utilizada na elaboração da bebida. Como parâmetros foram utilizadas as análises de quantificação de compostos fenólicos totais por meio do método de Folin-Ciocalteau, verificada a capacidade antioxidant pelo método de DPPH e pela reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e viabilidade celular por meio do ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), curva Termogravimétrica (TGA) e curva Termogravimetria Derivada (DTG). De acordo com os resultados obtidos foi observada diferença significativa na concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidant entre o chá verde e a kombucha. Com relação a peroxidação lipídica, houve redução somente no chá verde e aumento da oxidação nas amostras da bebida kombucha. Houve diminuição nas maiores concentrações de kombucha na viabilidade celular e observou-se que uma menor concentração de kombucha aumentou significativamente a quantidade de células. Na análise de FTIR foram encontrados radical hidroxila (-OH) envolvido em ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, alcadieno, presença de carbonila (C=O) presentes em amidas, evidenciando, dessa forma, a presença de proteínas nas amostras, além da presença de outras ligações glicosídicas. Quanto aos resultados de TGA, observou-se maior perda de massa na temperatura de 106 °C, resultado este confirmado pela análise de DTG. Desta forma, sugere-se que a concentração dos fitoquímicos durante o período de fermentação é atribuída principalmente ao chá verde e o Scoby pode ser considerado um material proteico e de baixa estabilidade térmica.

Palavras-chave: *Camellia Sinensis*, compostos bioativos, alimentos funcionais, bebida fermentada, Scoby

Introdução

Alimentos funcionais são aqueles que, além das qualidades nutricionais, contêm substâncias que ajudam na redução dos riscos de algumas doenças, por isso são considerados promotores de saúde, devido a seus componentes ativos, podendo influenciar na qualidade e expectativa de vida das pessoas (Salgado, 2009). Muitas bebidas são consideradas como funcionais, dentre estas, os chás. O chá produzido de plantas como *Camellia sinensis*, é a segunda bebida mais consumida no mundo por suas características sensoriais satisfatórias e propriedades promotoras da saúde (Hajiaghaalipour et al., 2015). Geralmente, é classificado em três tipos – chá verde, chá preto e chá *oolong* – de acordo com o modo de processamento das folhas. O chá verde é produzido secando suas folhas para impedir a fermentação, enquanto as folhas do chá preto e *oolong* são fermentados total ou parcialmente, respectivamente (Shirakami e Shimizu, 2018).

O chá verde contém componentes polifenólicos, que incluem flavanóis, flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos, que totalizam cerca de 30% do peso seco das folhas. A maioria dos polifenóis do chá verde se apresentam como flavanóis, e dentre estes, predominam as catequinas (Lamarão e Fialho, 2009).

Kombucha é uma bebida fermentada que foi consumida pela primeira vez na China há mais de 2000 anos e, desde então, tornou-se popular em muitos países (Jayabalan et al., 2014). É obtida a partir do chá adoçado, geralmente chá preto ou verde, pela ação de um consórcio de bactérias ácido acético e leveduras osmofílicas (chamada “fungo do chá”), por um período de 7 a 21 dias (De Roos e De Vuyst, 2018; Dickmann et al., 2017; Kapp e Sumner, 2019). O fungo do chá, na forma de um biofilme celulósico, transforma os componentes do açúcar e do chá em compostos bioativos com efeitos terapêuticos (Emiljanowicz e Malinowska-Pańczyk, 2019).

A composição microbiana do Scoby é formada principalmente por bactérias ácido acéticas incluindo a *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum* e leveduras que quebram a sacarose em glicose e frutose (Jonas e Farah, 1998; AL-Kalifawi e Hassan, 2014), sendo que a subunidade de glicose forma

as microfibrilas de celulose que são excretadas pelos poros da parede celular das bactérias (Keshk e Sameshima, 2005; AL-Kalifawi e Hassan, 2014). A celulose é o biopolímero mais abundante e amplamente aceito como excipiente em produtos farmacêuticos e indústrias. A fórmula molecular da membrana celulósica microbiana ($C_6H_{10}O_5$), é a mesma fórmula da membrana celulósica vegetal, porém as estruturas física e química são diferentes (AL-Kalifawi e Hassan, 2014). Comparado com a membrana celulósica vegetal, a membrana celulósica microbiana apresenta várias vantagens que incluem: alta pureza, maior capacidade de retenção de água, cristalinidade e hidrofilicidade (Phisalaphong e Jatupaiboon, 2008; AL-Kalifawi e Hassan, 2014). Considerando esses fatos, é essencial caracterizar a membrana celulósica microbiana produzida a partir da kombucha.

Na literatura, estudos que investiguem a ação benéfica da bebida kombucha para a saúde ainda são escassos, havendo, desta forma, necessidade de estudos que ampliem a compreensão dos benefícios atribuídos à saúde, bem como conhecimento específico da composição da membrana celulósica microbiana (Scoby) adicionada na elaboração desta bebida. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo analisar a composição bioativa e antioxidante do chá verde e da kombucha, bem como analisar a composição química e a resistência térmica da membrana celulósica microbiana utilizada na elaboração da bebida.

Materiais e métodos

Preparo do chá verde

O chá verde foi adquirido comercialmente na forma de sachê. Todos os recipientes utilizados no preparo foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. O chá foi preparado utilizando 1 L de água e 10 g L⁻¹ de folhas secas, as quais permaneceram em infusão por 7 min em água a 85 °C, e então, coadas em filtro de náilon. O chá foi preparado no momento de uso, tanto para as análises quanto para o preparo da kombucha (Komes et al., 2010).

Preparo da kombucha

O biofilme utilizado para a elaboração da kombucha (Scoby) foi adquirido comercialmente (marca Tao Kombucha®), acondicionado em embalagens plásticas lacradas. Todos os recipientes utilizados no preparo foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. O Scoby, da mesma marca, foi inoculado com seu líquido de partida (100 mL) em chá verde previamente preparado, conforme descrito no item anterior, e adicionado sacarose (80 g L⁻¹). O recipiente foi recoberto com tecido poroso para evitar contaminação, e deixado em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante 14 dias, a 27±1°C (Kallel et al., 2012; Gaggia et al., 2019). Após decorrido os 7 dias, a fermentação foi interrompida, e a kombucha foi envasada em embalagens estéreis e mantidas sob refrigeração a 5 °C. O Scoby foi coletado e armazenado em 300 mL de chá verde e 100 mL de kombucha em recipiente fechado a 5 °C, para futuras análises (Kallel et al., 2012). Os experimentos foram conduzidos em triplicata com três repetições independentes.

Determinação do pH do chá verde e da kombucha

A determinação do valor do pH foi realizada em pHmetro digital QUIMIS®. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

Determinação de acidez do chá verde e da kombucha

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

Teor de sólidos totais (°Brix)

O teor de sólidos totais da kombucha foram medidos pelo refratômetro digital (ATAGO®), e os resultados foram expressos em % de sólidos solúveis.

Quantificação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteau

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada por meio de técnica espectrofotométrica sendo utilizado o método adaptado de Swain e Hillis (1959). Foram homogeneizadas 0,5 mL de chá kombucha e de chá verde em tubos separados e adicionados 20 mL de metanol (Synth®). A amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 15 min. Foram coletados 250 µL do sobrenadante e adicionados à amostra 4 mL de água destilada e 250 µL de Folin-Ciocalteau (Merck®) (1:1). Os tubos foram agitados e após 5 min foi adicionado 0,5 mL de Na₂CO₃ (Sigma®) (7%). Após 2 h, a absorbância foi medida a 725 nm. A quantidade de fenóis totais nas amostras foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico entre as concentrações de 10 a 100 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µg de ácido gálico por g de amostra (µg g⁻¹).

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

A avaliação da atividade biológica dos compostos fenólicos foi realizada por meio da identificação das propriedades antioxidantes, com a utilização de métodos espectrofotométricos de avaliação da capacidade de captar radicais livres e do seu poder redutor. O método DPPH utilizado foi descrito por Brand-Williams et al. (1995), baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH (Sigma®) foi utilizado na concentração de 0,06 mM, dissolvido em álcool metílico (Synth®). A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de amostra de chá verde e de kombucha para cada tubo de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (item solução de DPPH 0,06 mM) e homogeneizada. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em ambiente escuro por 45 min. Foi utilizado 0,1 mL de uma solução controle (solução controle de álcool metílico 50% (40 mL), acetona 70% (Merck®) (40 mL) e água (20 mL) com 3,9 mL do radical DPPH e após, homogeneizado e armazenado no escuro por 45 min. Foi utilizado álcool metílico, como branco para

calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, onde será observada a redução da absorbância até sua estabilização. A curva padrão foi realizada a partir da solução inicial de DPPH (60 µM), variando a concentração de 10 µM a 50 µM. Cada uma destas soluções de DPPH (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM) foi armazenada em ambiente escuro por 45 min, e após, transferidas para cubetas de vidro, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados foram expressos em EC₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Determinação da capacidade antioxidante pelo método de reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

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

Viabilidade celular (MTT)

O ensaio de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] foi realizado de acordo com o método de Mosmann (1983). Em resumo, culturas de células VERO (3×10^5 células mL^{-1}) foram preparadas em placas de 96 poços; em seguida, foram adicionados 200 mL de diluições em

série (0,02 a 2,5 mg.mL⁻¹) do extrato de kombucha neutralizado (pH 7,0), ou 20 mg. mL⁻¹ SDS (controle positivo). E-MEM fresco foi usado como controle negativo. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi retirado de todos os poços por sucção e adicionado a cada poço 50 mL de solução MTT 1 mg. mL⁻¹ (USB Corporation) preparada em meio E-MEM. As placas foram incubadas durante 4 h a 37 °C. A solução de MTT foi removida cuidadosamente, e 100 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazano. As placas foram agitadas suavemente durante 5 min, e os cristais foram completamente dissolvidos. Posteriormente, a absorbância foi lida em um leitor de microplaca 680 (Bio-Rad Laboratories) a 540 nm.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um Espectrômetro do tipo FTIR-ATR da marca Shimadzu modelo IR Prestige 21, que se encontra no Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais (CDC-Bio), localizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). As amostras foram finamente moídas e a mistura foi então comprimida na forma de pastilhas. A leitura foi realizada entre os números de onda 600 - 4000 cm⁻¹.

Análise termogravimétrica

As condições de análise para avaliar a perda de massa em função da temperatura foram realizadas em um analisador termogravimétrico da marca SHIMADZU modelo DTG 60, no qual foram considerados razões de aquecimento: 5, 10 e 20 °C/min; atmosferas: inerte e oxidante: 0,3 e 20% de oxigênio; fluxo de gás: 50 mL/min; massa da amostra: aproximadamente 5 mg; e faixa de temperatura de 30 a 650 °C.

Resultados e discussão

Análise físico-química

Na análise físico-química observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para os níveis de pH ($5,63 \pm 0,021^a$ and $2,47 \pm 0,002^b$), acidez ($0,29\% \pm 0,000^b$ and $0,47\% \pm 0,002^a$ de ácido láctico) e teor de sólidos solúveis totais ($0,54\% \pm 0,000^b$ and $8,7\% \pm 0,35^a$) entre as amostras de chá verde e kombucha fermentada por 14 dias, respectivamente. Por meio dos resultados obtidos, foi possível observar que houve redução nos valores de pH e aumento da acidez após a fermentação para obtenção da kombucha.

Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Zou et al. (2021), ocorrendo diminuição no pH da kombucha, sendo encontrados valores iguais a pH 2,60 após 14 dias de fermentação. Jakubczyk et al. (2020) encontraram valores de pH de 5,54 e 2,75, no chá verde e na kombucha, respectivamente, após 14 dias de fermentação. Em contrapartida, na análise de acidez da bebida menores valores foram descritos por Jayabalan et al. (2007) onde a concentração de ácido láctico após 15 dias de fermentação foi de 0,15%. De acordo com Nummer (2013) e Amarasinghe et al. (2018), durante a fermentação da kombucha, o pH do chá, que inicialmente é em torno de 5, diminui devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos produzidos durante o processo. Conforme Maia et al. (2020) as bactérias e leveduras por meio do metabolismo produzem álcool e diversos ácidos em quantidades variáveis, dependendo do tempo de fermentação e demais condições de cultivo.

Quanto a análise de sólidos solúveis totais a maior porcentagem foi observada na kombucha quando comparada ao chá verde. Jakubczyk et al. (2020) observaram valor semelhante no teor de sólidos solúveis totais de 8,75 °Brix na kombucha. No entanto, Kayisoglu e Coskun (2021) descrevem um valor de 7,40 °Brix, porcentagem maior que a encontrada no presente estudo. Segundo Quiao-Won e Teves (2018), a sacarose é a fonte de carbono mais comum na fermentação de kombucha, sendo que uma quantidade considerável não é fermentada durante o processo.

Análise de Compostos Fenólicos

Na análise de compostos fenólicos totais do chá verde e da kombucha, observou-se diferença significativa na concentração de compostos fenólicos totais conforme demonstrado na Figura 1.

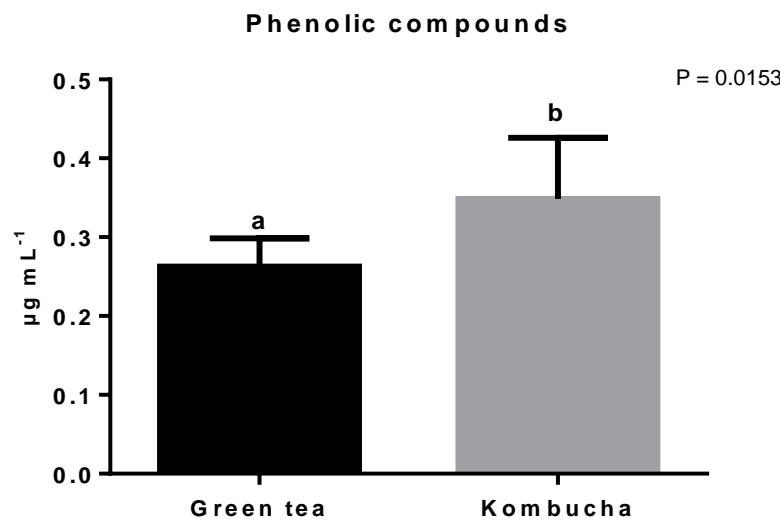


Figura 1. Análise da concentração de compostos fenólicos totais do chá verde e da kombucha durante 14 dias de fermentação pelo método de Folin-Ciocalteu. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão em μg de ácido gálico por mL^{-1} . Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ($p>0,05$).

A kombucha, preparada a partir da fermentação do chá, adicionado de sacarose e da membrana celulósica (Scoby) constituído de bactérias, resulta em uma bebida com propriedades benéficas à saúde (Jakubczyk et al., 2020). Acredita-se que a maioria destas propriedades possam ser atribuídas aos polifenóis, ácidos orgânicos, ácido acético e uma série de outros constituintes das matérias-primas ou produzidos como resultado da fermentação microbiana (Bhattacharya, 2016).

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Zhou et al. (2022), onde foi mencionado um aumento do teor de polifenóis no chá verde fermentado durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias quando comparado ao chá não fermentado. Os autores verificaram que a utilização do chá sem filtração é mais eficaz no aumento destes compostos. Segundo estes, o tempo de extração e o processamento

influenciam na concentração fenólica, pois as folhas de chá verde não são fermentadas durante a etapa de processamento, diferentemente das folhas de chá preto.

Pure e Pure (2016) relataram a baixa concentração de compostos fenólicos no chá preto fermentado ($265,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$) quando comparado ao chá preto não fermentado ($530,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$), resultados diferentes aos encontrados no presente estudo.

O chá é uma das bebidas mais comumente consumidas no mundo, principalmente o chá verde o qual tem sido estudado por suas propriedades promotoras de saúde em várias doenças, como câncer, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Yang et al., 2009; Hayat et al., 2015; Hayakawa et al., 2016). Estudos epidemiológicos sugerem um efeito protetor do consumo de chá para o câncer em humano, sendo esta proteção atribuída aos compostos polifenólicos (catequinas) presentes neste, como exemplo, epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigallocatequina (EGC) e epigallocatequina-3-galato (EGCG) que são os quatro principais derivados polifenólicos presentes no chá verde (Ravindranath et al., 2006; Jayanbalan et al., 2007; Yin et al., 2009; Rao e Pagidas, 2010).

Kallel et al. (2012), verificaram um aumento de 39% no teor de compostos fenólicos totais após 15 dias de fermentação da kombucha elaborada com chá verde, resultados que estão de acordo com os encontrados no presente estudo, em que observada diferença significativa. Os principais mecanismos para efeitos benéficos dos polifenóis presentes na kombucha podem estar associados à sua capacidade antioxidante atribuído pelo mecanismo de eliminação de radicais (Ďuračková, 2010). O acúmulo desses radicais livres tem sido indicado como principal responsável pelo envelhecimento, doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares e disfunções cerebrais (Pereira e Cardoso, 2012).

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

Na análise da capacidade antioxidante do chá verde e da kombucha pelo método de captura

do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), observou-se que o chá verde e a kombucha apresentaram capacidade significativa do sequestro do radical DPPH em relação ao controle (Figura 2). Observou-se ainda, que não houve diferença significativa entre as amostras de chá verde e da kombucha fermentada por 14 dias.

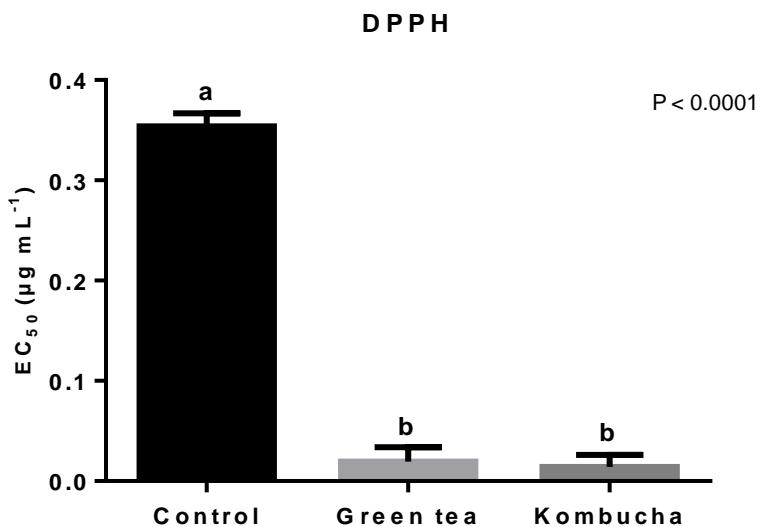


Figura 2. Análise da capacidade antioxidante do chá verde e da kombucha fermentada por 14 dias, pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão em EC₅₀ $\mu\text{g mL}^{-1}$. Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ($p>0,05$).

Gaggia et al. (2019), ao analisar amostras de chá verde e de kombucha fermentada por 7 e 14 dias, obtiveram menor valor de atividade antioxidante no chá verde quando comparado a kombucha. Já a atividade antioxidante na kombucha durante 7 dias foi maior em relação a kombucha fermentada por 14 dias. Estes resultados diferem dos dados encontrados no presente estudo, no qual não houve diferença significativa entre o chá verde e a kombucha.

Já no estudo de Kaewkod et al. (2019) foi observado um aumento máximo da atividade

antioxidante após 15 dias de fermentação de kombucha preparada a partir de chá verde. Resultados semelhantes são descritos por Srihari e Satyanarayana (2012), os quais verificaram um aumento da atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis com o aumento no tempo de fermentação.

Segundo Villarreal-Soto et al. (2018) a composição e concentração de metabólitos da kombucha são dependentes dos micro-organismos inoculados, constituintes do chá, concentração de açúcar, tempo de fermentação e temperatura utilizada. De acordo com Jayabalan et al. (2008), os compostos fenólicos complexos constituintes do chá estão sujeitos a degradação de enzimas de bactérias e de leveduras presentes no Scoby em ambiente ácido aumentando o conteúdo fenólico com o decorrer da fermentação, o que possivelmente pode ter ocorrido na amostra de kombucha no presente estudo.

O ácido glucurônico, um dos constituintes da kombucha originados da glucuronidação, é importante para a biotransformação e proteção de ácidos graxos da peroxidação lipídica. Especialmente, ácidos graxos poliinsaturados, que são compostos essenciais para o corpo, componentes essenciais das membranas celulares e precursores dos eicosanóides. Os ácidos graxos poliinsaturados são suscetíveis a reagirem com espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando reações em cadeia que danificam a molécula de ácido graxo (Leal, 2018).

Análise da capacidade antioxidante pelo método de reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

No presente estudo, foi avaliada a capacidade de inibição da peroxidação lipídica do chá verde e da kombucha, conforme demonstrado na Figura 3. Por meio dos resultados obtidos, observou-se redução significativa da peroxidação lipídica somente no chá verde após 14 dias. Ainda, pode-se observar a bebida kombucha apresentou efeito pró-oxidante. Este fato pode estar relacionado a turbidez do meio e não necessariamente a oxidação promovida pela kombucha.

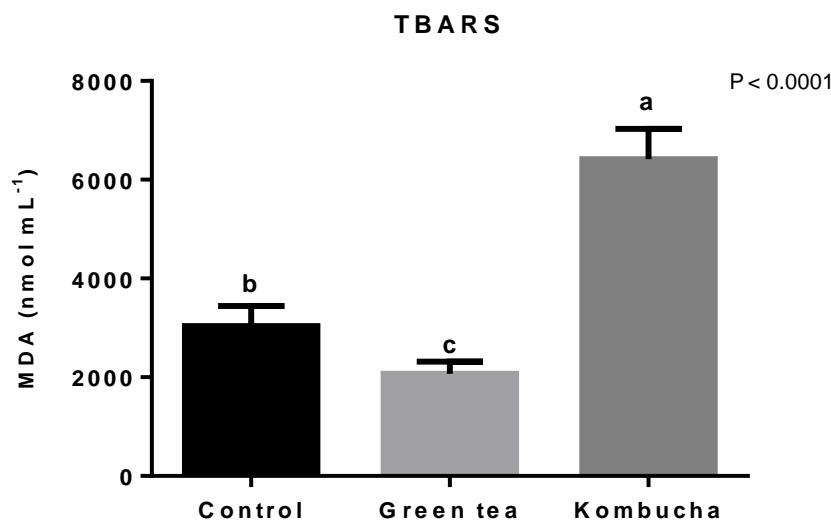


Figura 3. Análise da inibição da peroxidação lipídica do chá verde e kombucha fermentada por 14 dias, pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão em nm de Malonaldeído (MDA) mL^{-1} . Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ($p>0,05$).

O aumento da turbidez no chá, após a primeira semana de fermentação, também foi relatado por Amarasinghe et al. (2018), indicando a liberação de maior quantidade de celulose e outras matérias fibrosas por bactérias ácido acéticas presentes no Scoby para o meio líquido. Os autores ainda sugerem como possível causa as mudanças bioquímicas do próprio chá, por meio da exposição ao ar, embora minimizada essa condição.

Além disso, o aumento da absorbância pode ainda estar relacionada com o aumento do ácido acético originado durante o período de fermentação. Doudi et al. (2020), compararam a absorção óptica de diferentes concentrações de ácido acético químico e ácido acético obtido do chá verde fermentado. Os autores observaram que o ácido acético obtido por fermentação de chá verde possui poder ácido superior devido à sua maior absorção de luz. É possível, segundo Amorati et al. (2006), que alguns ácidos fenólicos e ésteres em pH ácido se comportem como inibidores da peroxidação, enquanto que com o aumento do pH a atividade antioxidante pode aumentar.

Bellassoued et al. (2015) ao analisarem a capacidade antioxidante da kombucha e do chá verde em animais com hipercolesterolemia observaram que os níveis de colesterol reduziram significativamente após o tratamento com ambos. Em estudo semelhante, realizado por Ofori et al. (2015) os quais investigaram o efeito da kombucha elaborada com chá preto fermentada durante duas semanas (14 dias), observaram redução dos níveis de MDA abaixo de 40% do nível basal. Estes estudos mencionados, diferem dos resultados encontrados no presente estudo, onde a kombucha não demonstrou capacidade em inibir os produtos da reação de TBARS quando fermentada por 14 dias.

Apesar dos resultados encontrados, o consumo da bebida apresenta benefícios à saúde tanto pela presença de fitoquímicos quanto pela presença de bactérias com potencial probiótico.

Análise de viabilidade celular

Na análise de viabilidade celular realizado com células VERO os resultados revelaram que as maiores concentrações de kombucha (0,010 e 0,100) diminuíram a viabilidade celular e a menor concentração de kombucha (0,001) aumentou significativamente a quantidade de células (Figura 4).

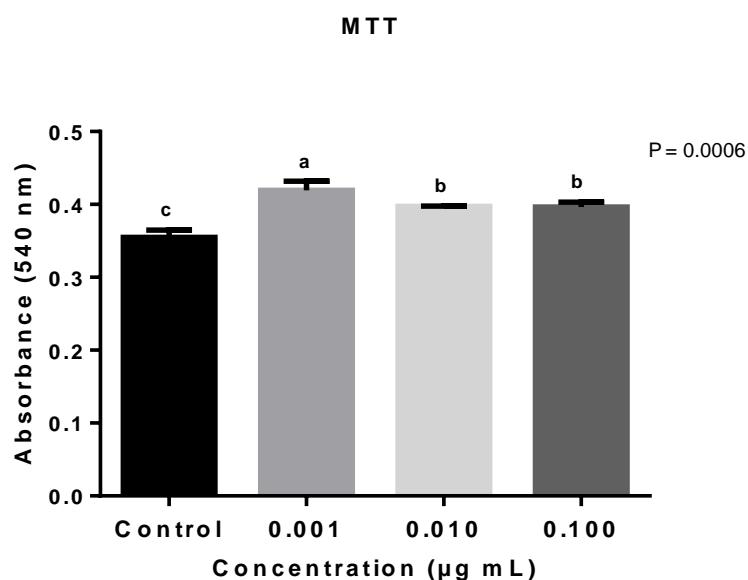


Figura 4. Análise da citotoxicidade da kombucha fermentada por 14 dias, pelo método de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Os dados foram expressos em média \pm

desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ($p>0,05$).

Resultados semelhantes foram descritos por Cardoso et al. (2020) em que os extratos de kombucha tiveram baixa citotoxicidade e ação antiproliferativa contra células não cancerosas e efeitos anticancerígenos nas linhagens de células estudadas. Os autores sugerem a alta atividade antiproliferativa pelo maior número de catequinas presentes na kombucha produzida a partir de chá verde. Da mesma forma, Kaewkod et al. (2019) demonstraram também eficácia dos efeitos da kombucha na toxicidade de células de câncer colorretal ao comparar kombucha de chá preto, chá *oolong* e chá verde.

Musial et al. (2020) explicam que a EGCG, uma das catequinas mais abundante no chá verde, é a que apresenta o potencial anti-inflamatório e anticancerígeno mais potente. Notavelmente, as catequinas do chá verde são amplamente descritas como eficientes na prevenção de câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de esôfago, câncer de estômago, câncer de fígado e câncer de próstata.

O mecanismo de restrição da carcinogênese, conforme Chen et al. (2007), atua na inibição de proteínas quinases ativadas por mitógenos, na sinalização celular relacionada ao fator de crescimento, ativação da proteína ativadora 1 e fator nuclear β , topoisomerase I e metaloproteinases juntamente com outros alvos potenciais.

As informações sobre citotoxicidade em relação a kombucha podem ser utilizadas posteriormente em estudos *in vivo*. Segundo Yamaguchi et al. (2013), a avaliação da citotoxicidade fornece um parâmetro de segurança na utilização de compostos com potencial atividade terapêutica.

Análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Ao investigar o espectro completo de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹ (Figura 5A) foram fornecidas informações sobre a estrutura molecular do material celulósico derivado da kombucha. Buscando melhor entendimento,

as Figuras 5B, 5C e 5D apresentam faixas distintas de número de onda para melhor visualização dos picos de interesse.

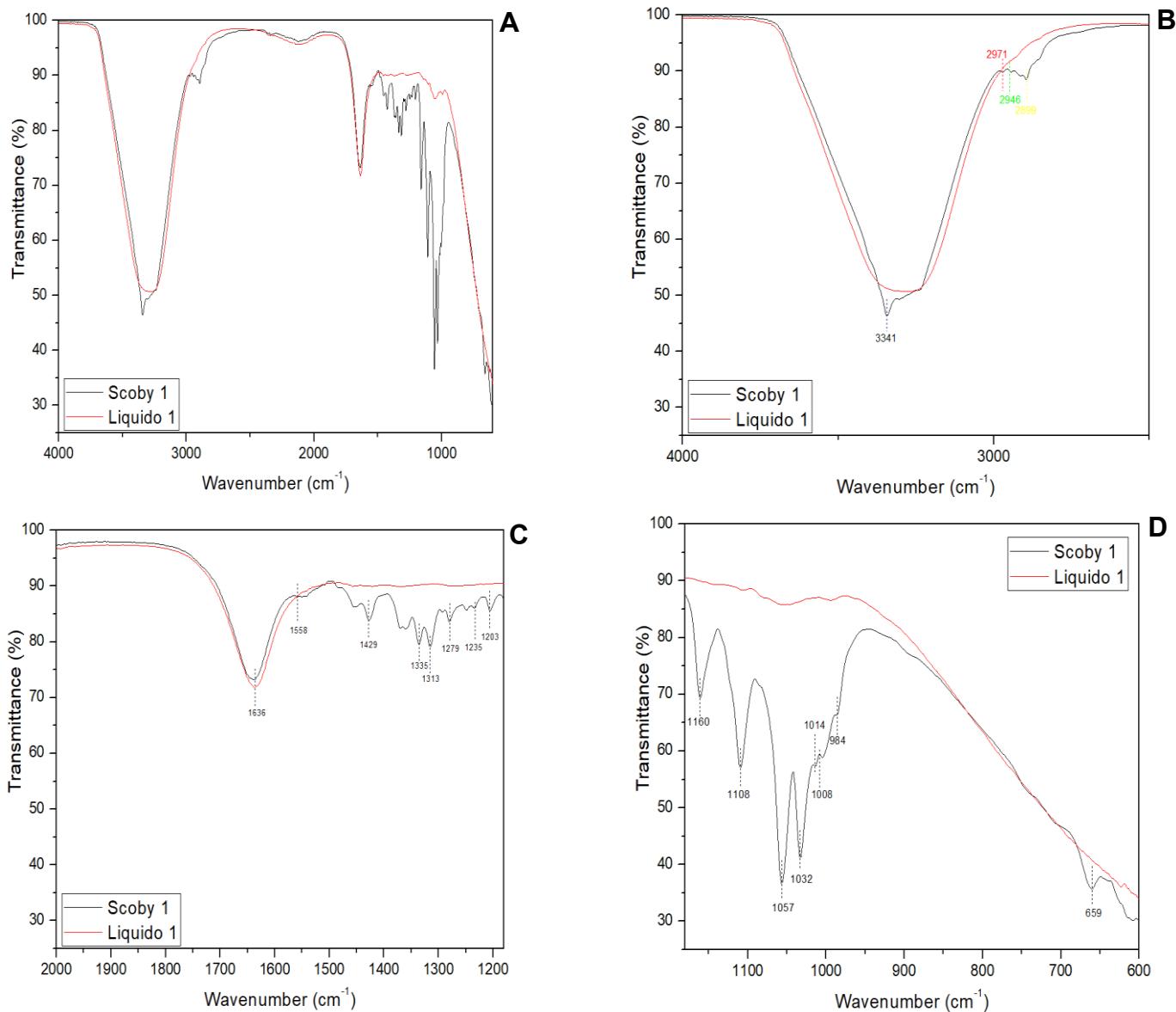


Figura 5. Estrutura molecular celulósico derivado de Kombucha. A) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 600 a 4000 cm^{-1} . B) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 4000 a 2500 cm^{-1} . C) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 2000 a 1180 cm^{-1} . D) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de 1180 a 600 cm^{-1} .

A Figura 5B apresenta o resultado de FTIR de 4000 a 2500 cm⁻¹. O pico em 3341 cm⁻¹ é atribuído ao estiramento radical hidroxila (-OH) envolvido em ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (Dima et al., 2017). Os picos de menor intensidade em 2971, 2946 e 2899 cm⁻¹ são atribuídos ao estiramento C-H do alcadieno CH3 (Pavia et al., 2015). A Figura 5C apresenta o resultado de FTIR de 2000 a 1180 cm⁻¹. O pico em 1636 cm⁻¹ é típico da presença de carbonila (C=O) presentes em amidas (Pavia et al., 2015). A presença de amida também é sugerida pela observação do pico em 1558 cm⁻¹, relativo a deformação angular N-H de amidas primárias e secundárias (Pavia et al., 2015). O pico localizado em 1429 cm⁻¹ é relativo a deformação simétrica do CH2 (Hong, Wei e Shen, 2015), enquanto que os picos 1335 e 1313 cm⁻¹ são atribuídos ao estiramento C-H dos grupos CH2 e CH3 e deformação simétrica do CH2, respectivamente (Hong, Wei e Shen, 2015; Oliveira et al., 2015). Os demais picos localizados em 1279, 1235 e 1203 são designados como sendo devido ao estiramento simétrico da ligação C-O-C, a deformação no plano do OH e vibrações da ligação C-O-C presentes na molécula de piranose, respectivamente (Stoica-Guzun et al., 2016; Dima et al., 2017). Tomando em conjunto esses resultados, é possível sugerir a presença do grupo funcional amida através de ligações C=O e grupos NH, evidenciando, dessa forma, a presença de proteínas nas amostras.

A Figura 5D apresenta o resultado de FTIR de 1180 a 600 cm⁻¹. O pico observado em 1160 cm⁻¹ é devido ao estiramento assimétrico C-O-C do anel glicosídico (Hong, Wei e Shen, 2015). A presença de outras ligações glicosídicas é evidenciada através dos sinais em 1108, 1057 e 1032 cm⁻¹, relacionados ao C2O2, C3O3, C6O6, respectivamente (Yan et al., 2008; Hong, Wei e Shen, 2015). Os demais sinais (1014, 984 e 659 cm⁻¹) também têm sido atribuídos a ligações glicosídicas, embora a presença deles varie entre diferentes amostras analisadas (Yan et al., 2008; Hong, Wei e Shen, 2015; Stoica-Guzun et al., 2016; Dima et al., 2017).

Análise termogravimétrica

Conforme mostrado na Figura 6a que mostra a curva termogravimétrica (TGA) observa-se que a maior perda de massa ocorre a 106 °C, chegando a 10% da massa total, sobretudo devido a volatização da água do material. Esse resultado é confirmado pela presença do intenso pico endotérmico mostrado na curva do resultado obtido pela termogravimetria derivada (DTG) (Figura 6b). Esse resultado é típico de materiais celulósicos, devido a interação entre a água e grupos hidroxila (Oliveira et al., 2015). Além disso, tem-se atribuído que a adsorção física da água nesses materiais está associada a regiões amorfas, uma vez que regiões cristalinas dificilmente absorvem água (Mohite e Patil, 2014). Com o aumento da temperatura, observa-se a continuidade da perda de massa do material (Figura 6a), e corroborado com outro evento endotérmico em 250°C (Figura 6b), sendo atribuído a decomposição da celulose.

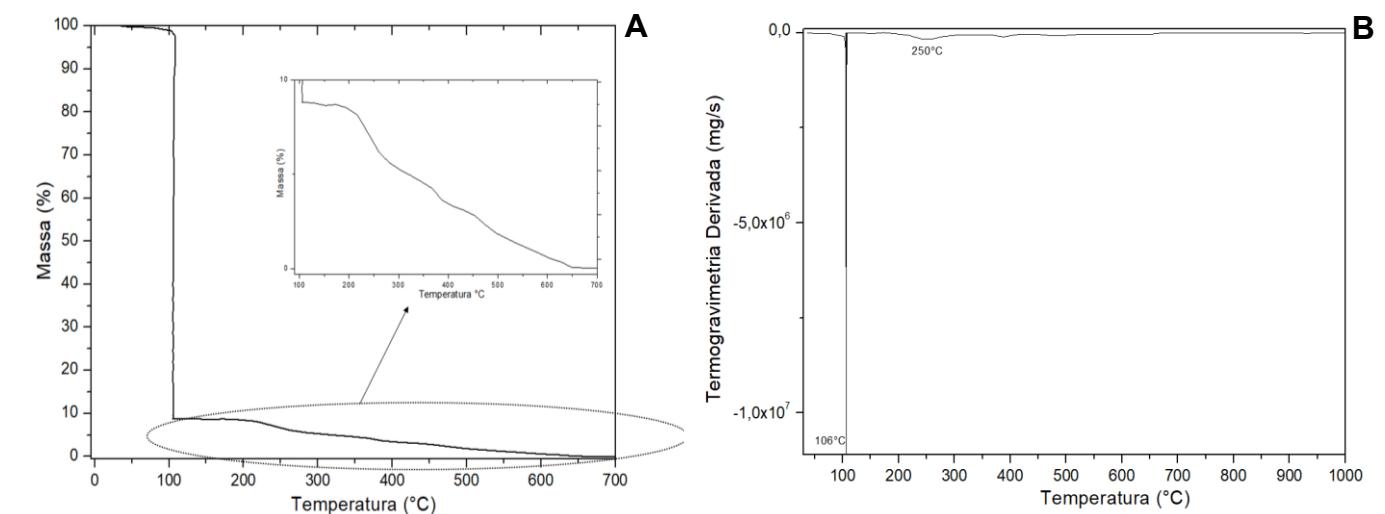


Figura 6. Curva da decomposição térmica do material celulósico da kombucha: a) Curva termogravimétrica (TGA); b) Curva termogravimetria derivada (DTG).

De maneira geral, os resultados de TGA e DTG sugerem um material com baixa estabilidade

térmica em comparação a outros encontrados na literatura (Oliveira et al., 2015; Stoica-Guzun, 2016; Dima et al., 2017; Li et al., 2018). Isso pode ser devido os resíduos de melanoidinas termicamente lábeis e outros produtos não celulósicos embutidos nas películas de kombucha (Dima et al., 2017). Importante ressaltar também que estudos têm sugerido as cadeias de celulose cristalizada são vias eficientes para a transferência de calor, produzindo materiais com melhores condutividades térmicas e diminuindo a estabilidade térmica (Yildrim e Shaler, 2017).

Conclusão

Por meio dos resultados obtidos foi possível concluir que a fermentação do chá influenciou no aumento da concentração de compostos fenólicos totais. Em relação a atividade antioxidante, o chá verde e a kombucha apresentaram capacidade de sequestro de radicais livres comparados ao controle, no entanto, sem diferença significativa entre si. O chá verde apresentou inibição da peroxidação lipídica, porém a kombucha apresentou efeito pró-oxidante, fato este que pode ser atribuído ao aumento da turbidez durante a fermentação. Quanto a análise de viabilidade celular na kombucha não foram observados efeitos tóxicos nas células estudadas.

Na análise de FTIR a presença do radical hidroxila (-OH) envolvido em ligações de hidrogênio inter e intra-moleculares, alcadieno, presença de carbonila (C=O) presentes em amidas, evidenciou, dessa forma, a presença de proteínas nas amostras, além da presença de outras ligações glicosídicas. Quanto aos resultados de TGA, observou-se maior perda de massa na temperatura de 106°C, resultado este confirmado pela análise de DTG. Com o aumento da temperatura (250°C), observou-se a continuidade da perda de massa do material, sendo atribuída a decomposição da celulose. Os resultados deste estudo sugerem que o Scoby é um material proteico e de baixa estabilidade térmica.

Em resumo, enfatiza-se que a kombucha possui propriedades benéficas a saúde, resultantes dos fitoquímicos presentes na bebida e também dos produtos originados na fermentação. No entanto, evidenciamos que a concentração destes fitoquímicos analisados durante este período de fermentação

é atribuída principalmente ao chá verde.

Referências

- Al-Kalifawi EJ, Hassan IA (2014) Factors influence on the yield of bacterial cellulose of Kombucha (*Khubdat humza*). *Baghdad Sci J* 11(3):1420-1428. <https://doi.org/10.21123/bsj.11.3.1420-1428>
- Amarasinghe H, Weerakkody NS, Waisundara VY (2018) Evaluation of 257 physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during 258 extended periods of fermentation. *Food Sci Nutr* 6(3):659-665. [10.1002/fsn3.605](https://doi.org/10.1002/fsn3.605)
- Amorati R, Pedulli GF, Cabrine L, Zambonin L, Landi L. (2006). Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. *J Agric Food Chem* 54:2932–2937. [10.1021/jf053159+](https://doi.org/10.1021/jf053159+)
- Bellassoued K, Ghrab F, Makni-Ayadi F, Van Pelt J, Elfeki A, Ammar E (2015) Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharm Biol* 53(11):1699-1709. [10.3109/13880209.2014.1001408](https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1001408)
- Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra MM., Chakravorty S, Sarkar S, Chakraborty W, Hemanta K, Gachhui R (2016) Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Curr Microbiol* 73(6):885–896. [10.1007/s00284-016-1136-3](https://doi.org/10.1007/s00284-016-1136-3)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28(1): 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cardoso RR, Neto RO, D’Almeida CT dos S, do Nascimento TP do, Pressete CG, Azevedo L, Martino HSD, Cameron LC, Ferreira MSL, de Barros FAR (2020) Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res J* 128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Chen L, Zhang HY (2007) Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin3-gallate Molecules 12: 946–957. [10.3390/12050946](https://doi.org/10.3390/12050946)

De Roos J, De Vuyst L (2018) Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. Curr Opin Biotechnol 49:115–119. [10.1016/j.copbio.2017.08.007](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007)

Dickmann M, Schneider R, Armando S, Seehusen K, Hager P, Strauss MJ, Mann FM (2017) Analysis of the role of acidity and tea substrate on the inhibition of α-amylase by kombucha. J Nutr Food Technol 0(0): 1–5. [10.30881/jnfrt.00001](https://doi.org/10.30881/jnfrt.00001)

Dima SO, Panaitescu DM, Orban C, Ghiurea M, Doncea SM, Fierascu RC, Nistor CL., Alexandrescu E, Nicolae CA., Trică B, Moraru A, Oancea F (2017). Bacterial nanocellulose from Side-Streams of kombucha beverages production: preparation and physical-chemical properties. Polymers 9(8): 374. <https://doi.org/10.3390/polym9080374>

Doudi M, Hooshmandi Z, Saedi S, Setorki M (2020) Effects of kombucha tea on side effects of high cholesterol diet in rabbits. Pharm Biom Res 6(2):123-132. [10.18502/pbr.v6i2.3804](https://doi.org/10.18502/pbr.v6i2.3804)

Ďuračková Z (2010) Some current insights into oxidative stress. Physiol Res 59(4):459–469. [10.33549/physiolres.931844](https://doi.org/10.33549/physiolres.931844)

Emiljanowicz KE, Malinowska-Pańczyk E (2019) Kombucha from alternative raw materials – The review. Crit Rev Food Sci Nutr 60(19):1–10. [10.1080/10408398.2019.1679714](https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714)

Gaggia F, Baffoni LL, Galiano M, Nielsen DS Jakobsen RR, Castro-Mejia JL, Bosi S, Truzzi F, Musumeci F, Dinelli G, Gioia D. (2018). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. Nutrients 11(1):1-22. [10.3390/nu11010001](https://doi.org/10.3390/nu11010001)

Hajiaghaalipour F, Kanthimathi M, Sanusi J, Rajarajeswaran J (2015) White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. Food Chem 169:401–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.005>

Hayakawa S, Saito K, Miyoshi N, Ohishi T, Oishi Y, Isemura M, Nakamura Y (2016) Anti-cancer effects of green tea by either anti- or pro-oxidative mechanisms. *Asian Pac J Cancer Prev* 17(4):1649-1654. [10.7314/apjcp.2016.17.4.1649](https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.4.1649)

Hayat k, Iqbal H, Malik U, Bilal U, Mushtaq S (2015) Tea and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55(7):939–954. [10.1080/10408398.2012.678949](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.678949)

Hong F, Wei B, Chen L. (2015) Preliminary Study on Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose Tubes in a Novel Double-Silicone-Tube Bioreactor for Potential Vascular Prosthesis. *BioMed Res Int* 1-9. [10.1155/2015/560365](https://doi.org/10.1155/2015/560365)

Jakubczyk K, Kaldunska J, Kochman J, Janda K (2020) Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*, 9(5):447. [10.3390/antiox9050447](https://doi.org/10.3390/antiox9050447)

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

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K (2008) Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* 109(1): 227-234.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>

Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr. Rev Food Sci Food Saf* 13(4):538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Jonas R, Farah LF(1998) Production & Application of Microbial cellulose. *Polym Degrad Stab* 59:101-106. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00197-3)

Kaewkod T, Bovonsombut S, Tragoonruang Y (2019) Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*, 12(7): p. 1-18. [10.3390/microorganisms 7120700](https://doi.org/10.3390/microorganisms7120700)

Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P, Ajandouz EH (2012) Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. Food Res Int 49(1):226-232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>

Kapp JM, Sumner W (2019) Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. Ann Epidemiol 30:66–70. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>

Kayisoglu S, Coskun F (2021) Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. Food Sci Technol 41(supl 1):393-397. <https://doi.org/10.1590/fst.12720>

Keshk S, Sameshima K (2005) Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. Afr J Biotechnol 4(6):478-482. [10.5897/AJB](https://doi.org/10.5897/AJB)

Lamarão R da C, Fialho E (2009) Functional aspects of green tea catechins on cellular metabolism and their relationship with body fat reduction. Nutr Mag 22(2):257-269. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000200008>

Leal JM, Suárez LV, Jayabalan R, Oros JH, Escalante-Aburto A (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. CYTA – J Food 16(1): 390-399.

<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

Maia Y LM, Correia ML de S, Neto JV da S, Castro BN (2020) Kombucha: características e aspectos biológicos. RRS-FESGO, 03(1):114-123.

Mohite BV, Patil SV (2014) Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by G. hansenii NCIM 2529. Carbohydr Polym 106(1):132–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.012>

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65(1-2):55-63. [10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M (2020) Beneficial properties of green tea catechins Int J MolSci 21(5):1744. [10.3390/ijms21051744](https://doi.org/10.3390/ijms21051744)

Nummer BA (2013) Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model 292 Food Code: risk analysis and processing guidance. J Environ Health, 76(4): 8-11.

Ofori Ja, Ocloo A, Ofori M, Dorleku WP, Gbewonyo WSK. (2015) Kombucha protects against arsenic-induced protein peroxidation in rats. J Ghana Sci Assoc 16(2): 27-35.

<http://hdl.handle.net/123456789/2270>

Ohkawa H., Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95(2): 351-358. [10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Oliveira RL, Vieira J, Barud HS, Assunção RMN, Filho GR (2015) Synthesis and Characterization of Methylcellulose Produced from Bacterial Cellulose under Heterogeneous Condition. J Brazi Chem Soc 26(9): 1861-1870. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150163>

Pavia DL, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J (2015) Introdução à espectroscopia. 5 ed. São Paulo: Cengage Learning.

Pereira RJ, Cardoso MG (2012) Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. J Biotechnol Biodivers 3(4): 146-152.

Phisalaphong M, Jatupaiboon N (2008). Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose–chitosan film. Carbohydr Polym 74(3):482-488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.004>

Pure AE, Pure ME (2016) Antioxidant and antibacterial activity of Kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. Appl Food Biotechnol 3(2):125-130. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i2.11138>

Quiao-Won ME, Teves FG (2018) Characteristics of kombucha fermentation from different substrates and cytotoxicity of tea broth. Sustain Food Product 4:11-19. [10.18052/www.scipress.com/SFP.4.11](https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/SFP.4.11)

- Rao SD, Pagidas K (2010) Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 30(7): 2519–23.
- Ravindranath MH, Saravanan TS, Monteclaro CC, Presser N, YE X, Selvan SR, et al. (2006) Epicatechins purified from green tea (*Camellia sinensis*) differentially suppress growth of gender-dependent human cancer cell lines. *Evid Based Complement Altern Medicine* 3(2):237–47. [10.1093/ecam/nel003](https://doi.org/10.1093/ecam/nel003)
- Salgado JM (2009) Functional guide: when food is the best medicine. São Paulo: Ediouro.
- Shirakami Y, Shimizu M (2018) Possible mechanisms of green tea and its constituents against câncer. *Molecules* 23(9):2284-2298. [10.3390/molecules23092284](https://doi.org/10.3390/molecules23092284)
- Srihari T, Satyanarayana U (2012) Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation. *J Pharm Sci Res* 4(11): 1978-1981.
- Stoica-Guzun A, Stroescu, M, Sorin Ion J, Nicoleta M, Botez A, Matei C, Berger D, Damian CM, Ionita V (2016) Box-Behnken experimental design for chromium (VI) ions removal by bacterial cellulose-magnetite composites. *J Biol Macromol* 91: 1062-1072 [10.1016/j.jbiomac.2016.06.070](https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.06.070)
- Swain T, Hillis WE (1959) The phenolic constituents of prunus domestica. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10:63-68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard J, Taillandier P (2018) Kombucha tea fermentation: A Review *J Food Sci* 83(3): 580-588. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Yamaguchi, K. K. L., et al. (2013) Biological activities of essential oils from Endlicheria citriodora, a Lauraceae rich in methyl geranate. *Quimica Nova*, 36(6):826-830. [10.1590/S0100-40422013000600015](https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600015)
- Yan Z, Chen S, Wang H, Wang B, Jiang J (2008) Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. *Carbohydr Polym*, 74(3): 659-665. [10.1016/j.carbpol.2008.04.028](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.028)
- Yildirim N, Shaler SA (2017) Study on thermal and nanomechanical performance of cellulose

nanomaterials (CNs). Materials, 10(7): 1-12. <https://doi.org/10.3390/ma10070718>

Yin Z, Henry EC, Gasiewicz TA (2009) Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor. Biochemistry, 48(2):336–45. [10.1021/bi801637q](https://doi.org/10.1021/bi801637q)

Zhou DD, Saimaiti A, Luo M., Huang SH, Xiong RG, Shang A, Gan RY, Li HB (2022) Fermentation with tea residues enhances antioxidant activities and polyphenol contents in kombucha beverages. Antioxidants 11: 155. [10.3390/antiox11010155](https://doi.org/10.3390/antiox11010155)

Zou C, Li RY, Chen JX., Wang, F, Gao Y, Fu YQ, Xu YQ, Yin J.F (2021) Zijuan tea-based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. Food Chem 363(9): 130322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130322>