

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM FEZES DE CAMUNDONGOS COLÍTICOS TRATADOS COM KOMBUCHA E/OU CHÁ VERDE

FERNANDA MACHADO DA COSTA¹; JORDAN TEIXEIRA OLIVEIRA²; TAICIANE
GONÇALVES DA SILVA³; SIMONE PIENIZ⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – fernandynhanut@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – jordan_teixeira@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - ta.ici@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal abrange uma variedade de microrganismos incluindo fungos, vírus, arqueias e bactérias. Essa grande quantidade de microrganismos presentes no trato gastrointestinal humano exerce um papel fundamental para o funcionamento do metabolismo de polissacarídeos não digeríveis, para a produção de vitaminas essenciais e diferenciação do epitélio intestinal e do sistema imunológico, é responsável por atividades bioquímicas e metabólicas essenciais (SMITH et al., 2007).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são alterações inflamatórias crônicas envolvendo o trato gastrointestinal (LEMBERG e DAY, 2015). A colite ulcerativa é caracterizada por inflamação no cólon, estando associada a alterações funcionais, como na motilidade e trânsito intestinal, que podem contribuir para dor abdominal e diarreia relatada pelos pacientes (DEROCHE et al., 2014). Por isso, vêm sendo estudadas alternativas, como é o caso da bebida kombucha vem ganhando destaque na modulação de doenças pelos efeitos benéficos atribuídos ao seu consumo. Kombucha é uma bebida fermentada de origem asiática que possui sabor adocicado, ligeiramente ácido e levemente gaseificado. É resultado de uma fermentação do chá preto ou chá verde açucarado ao qual é adicionado um biofilme composto pela associação simbiótica de bactérias (prioritariamente produtoras de ácido acético) e leveduras, denominadas de scoby (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), que realizam diversas reações bioquímicas durante o período de fermentação, dentre estas, a produção de ácidos orgânicos, etanol, vitaminas hidrossolúveis e uma diversidade de micronutrientes (JAYABALAN, 2016; SANTOS, 2018).

Já o chá verde, uma bebida milenar muito consumida mundialmente, produzida a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis*, vem apresentando diversos benefícios à saúde. Por ser rico em compostos bioativos, possui alto poder antioxidante e anti-inflamatório, apresenta efeito protetor em várias doenças crônicas, como nas cardiovasculares, respiratórias, câncer, diabetes e hipertensão arterial sistêmica. Também há evidências de que o chá possa apresentar benefícios como atividade antibacteriana e antiviral, em DII, doenças cognitivas, doenças periodontais, entre outras (CABRERA et al., 2006; BARBALHO et al., 2019).

Tendo em vista a importância da microbiota intestinal para saúde humana neste estudo objetivou-se analisar e quantificar em fezes de camundongos induzidos a colite ulcerativa por ácido acético os impactos do consumo de kombucha e de chá verde na viabilidade de bactérias ácido lácticas (BAL), fungos e leveduras, mesófilos, *Escherichia coli* e *Sthaphylococcus*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados modelos biológicos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da UFPEL. Foram utilizados 72 animais, divididos em seis grupos compostos 12 animais cada ($n=12$), com 60 dias de idade, mantidos em gaiolas, em ambiente com controle de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (12:12 horas ciclo escuro/claro). O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental, da Faculdade de Nutrição (UFPEL), onde os animais permaneceram em adaptação ao ambiente do laboratório, a dieta padrão (Nuvilab®) e a água *ad libitum* por uma semana. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Guia para cuidados e uso de animais de laboratório” do *National Research Council* (NRC, 2011) (CEEA nº3689/2021-15).

Colite experimental induzida por Ácido Acético (AA)

Após lavagem colônica com água destilada autoclavada, os camundongos foram tratados com enema contendo 0,1ml de ácido acético a 4%, através de uma cânula de polipropileno que foi inserida no cólon pelo ânus. Os animais foram mantidos em posição pronada por 15 segundos com ácido acético, depois lavados água autoclavada (Sanei et al., 2014)

Coleta de amostra

Durante a eutanásia de 72 camundongos linhagem C57BL/6 foram coletadas amostras de fezes por meio do uso de um *Swab* estéril o qual foi submerso em tubos contendo 9mL de solução salina 0,85%, as amostras foram imediatamente analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Nutrição, UFPEL.

Análises microbiológicas

As amostras oriundas dos tubos contendo o *Swab* e solução salina 0,85% foram homogeneizadas em um vortex e posteriormente foram submetidos a uma diluição em série até a diluição de 10^{-7} . Cem microlitros de amostras oriundas das diluições foram cultivadas em placas de ágar Man Rogosa Sharpe (MRS) para o isolamento e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), Ágar Eosina azul de metileno(EMB) para o isolamento e contagem de *Escherichia coli*; ágar batata dextrose (BDA) para isolamento e contagem de fungos e leveduras; ágar de contagem padrão (PCA) para micro-organismos mesófilos; ágar Bair-Parker para *Staphylococcus* e ágar Hektoen Entérico (HE) para de *Salmonella*. Placas de ágar MRS contendo amostras foram incubadas a 37°C durante 48h anaerobicamente; EMB, BP e HE foram incubadas a 37°C durante 48h aerobicamente, e as de PCA e BDA durante 24h a 28°C . O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. (APHA,1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas de fezes de camundongos tratados com kombucha e chá verde.

	Bactérias ácido lácticas	Fungos e leveduras	Mesófilos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i>
	---- Log Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mg^{-1} ----				
G1*	6,52 \pm 0,069 ^{b**}	6,30 \pm 0,000 ^{b**}	6,20 \pm 0,950 ^{b**}	6,10 \pm 0,755 ^{b**}	6,80 \pm 0,040 ^{b**}
G2	6,50 \pm 0,127 ^b	6,40 \pm 0,188 ^b	6,30 \pm 0,247 ^b	7,10 \pm 0,057 ^b	7,50 \pm 0,041 ^b

G3	6,50±0,242 ^b	5,30±0,085 ^b	6,30±0,642 ^b	6,60±0,155 ^b	6,90±0,216 ^b
G4	6,80±0,100 ^b	7,50±0,130 ^b	7,10±0,453 ^b	7,80±0,483 ^b	6,90±0,090 ^b
G5	7,88±0,057 ^a	7,40±0,168 ^a	7,70±0,689 ^a	8,60±0,066 ^a	8,70±0,069 ^a
G6	7,90±0,346 ^a	7,30±0,086 ^a	7,60±0,635 ^a	8,30±0,529 ^a	8,40±0,539 ^a

*G1-controle; G2-controle+chá verde; G3-controle+kombucha; G4-colite; G5-colite+chá verde; G6-colite+kombucha

Na análise de viabilidade de BAL nota-se que tanto nos grupos tratados com chá verde e/ou kombucha induzidos a colite ulcerativa apresentou um aumento significativo na contagem de Log UFC, aumentando a proteção e o aumento de bactérias benéficas na microbiota. No estudo de Coton et al. (2017) utilizando chá verde como substrato, a viabilidade BAL encontradas no 8º dia de fermentação foi 8 log UFC/mL, superiores ao presente estudo. Bactérias ácido lácticas são importantes na produção de kombucha por apresentarem potencial probiótico (VARGAS, FABRICIO, AYUB, 2021). Na análise microbiológica de fungos e leveduras observou-se redução da viabilidade no grupo controle+kombucha e, conseqüentemente, um aumento significativo nos grupos colite, colite+chá verde e colite+kombucha. Este aumento pode ser explicado devido as variedades de chás utilizados, concentrações iniciais de substrato (açúcares), origem do SCOBY, tempo de fermentação (SANTOS, 2020). Da mesma forma, na análise da viabilidade de mesófilos, observou um aumento nos grupos colite, colite+chá verde e colite+kombucha em relação aos demais grupos. Já ao analisar a viabilidade de *E. coli*, observou-se um aumento significativo no grupo controle+chá verde em relação ao grupo controle, bem como nos grupos colite, colite+chá verde e colite+kombucha. Ao analisar a viabilidade de *Staphylococcus* observou-se um aumento significativo nos grupos controle+chá verde, colite+chá verde e colite+kombucha em relação aos demais grupos analisados, semelhante ao estudo de Silva et al. (2021) em que não foi observada atividade antimicrobiana de kombucha de chá verde (*C. sinensis*) frente à *E. coli* e *S. aureus*. Estes resultados obtidos podem estar relacionadas ao tipo de chá e a concentração utilizados, concentração de açúcar e de tempo de fermentação (VALIYAN; KOOHSARI; FADAVI, 2021).

4. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos pode-se inferir que tanto o chá verde quanto a kombucha contribuíram para um aumento significativo na viabilidade dos microrganismos analisados nos grupos induzidos a colite ulcerativa, porém, este resultado torna-se benéfico somente na análise de BAL, pois estas são microrganismos que beneficiam a saúde do hospedeiro. É fato que diversos fatores influenciam de acordo com a composição do chá, logo, as variações encontradas no presente estudo em relação aos demais são aceitáveis, sendo essas variações resultado dos diferentes fatores que influenciam a composição da kombucha.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SMITH K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunology* ;19:59-69,2007
- DEROCHE, T. C.; XIAO, S.; LIU, X. Histological evaluation in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 2, n. 3, p. 178-192, 2014.
- 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.
- JAYABALAN, R.; MALBASA, R. V.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha tea: metabolites. In: MERILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. (Eds.). *Fungal metabolites: reference series in phytochemistry*. Switzerland: Springer International Publishing; (p. 1-14), 2016
- SANTOS, Y. M et al. Caracterização química de Kombucha a base de chás de hibisco e preto. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*. Ipameri, v. 8, n. 3, p. 32- 37, 2018.
- CABRERA, C.; ARTACHO, R., GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.
- BARBALHO S.; BOSSO, H.; SALZEDAS-PESCININI, L.; GOULART, R. Green tea: A possibility in the therapeutic approach of inflammatory bowel diseases?: Green tea and inflammatory bowel diseases. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 43, p. 148-153, 2019.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for care and use of laboratory animals**. 8ª ed.. Washington: The National Academies Press, 2011.
- SANEI, M. H.; HADIZADEH, F.; ADIBI, P.; ALAVI, S. A. Inflammatory cells' role in acetic acid-induced colitis. *Advanced biomedical research*, v. 3, 193, 2014.
- SASAKI, S. et al. Thymic involution correlates with severe ulcerative colitis induced by oral administration of dextran sulphate sodium in C57BL/6 mice but not in BALB/c mice. *Inflammation*, v. 31, n. 5, p. 319-28, Oct 2008.
- COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE.; FALL, A.; DAUBE, G.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 93, n. 5, 2017.
- VARGAS, B.K; FABRICIO, M.F; AYUB, M.A.Z. Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: A bibliometric and systematic review. *Food Bioscience*, v. 44, Part A, 2021.
- SANTOS, A. R. DOS. Avaliação cinética da fermentação de chá de erva-mate tostada por SCOBY de kombucha. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.
- SILVA, K.A; UEKANE, T.M; MIRANDA, J.F; RUIZ, L.F; MOTTA, J.C.B; SILVA, C. B.; PITANGUI, N. S.; GONZALEZ, A.G.M; FERNANDES, F.F.; LIMA, A.R. Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.34, 2021.
- VALIYAN, F.; KOOHSARI, H.; FADAVI, A. Use of response surface methodology to invstigate the effect of several fermentation conditions on the antibacterial Brazilian *Journal of Food Research*, Campo Mourão, v. 11 n. 4, p. 1-14, out./dez. 2020.
- Página | 14 activity of several kombucha beverages. *Journal of Food Science Technology*, v. 58, p. 1877-1891, 2021.
- American Public Health Association. *Standard methods for the examination of dairy products*. 16ed. Washington, p-546, 1992.