

Efeitos da Combinação da Bebida Fermentada de Kefir com Extrato Hidroetanólico de Guaraná (*Paullinia cupana*) sobre os Parâmetros Bioquímicos e Histologia de Ratos Diabéticos

Effects of the Combination of Kefir Fermented Drink with Hydroethanolic Extract of Guarana (*Paullinia cupana*) on Biochemical Parameters and Histology of Diabetic Rats

Efectos de la Combinación de Bebida de Kéfir Fermentada con Extracto Hidroetanólico de Guaraná (*Paullinia cupana*) sobre Parámetros Bioquímicos e Histología de Ratas Diabéticas

Walkiria Mendes de Carvalho **STEFFANI**

Discente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-8709-6196>

Damires Carvalho **VEROLA**

Discente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-9197-3064>

Yasmynn Myllena **GONÇALVES**

Discente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-4608-8979>

Aline Emerenciano **ROSA**

Discente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-4346-0923>

Everton Charles Ferreira dos **SANTOS**

Discente do Curso de Medicina da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-6815-1599>

Marcela Rezende **PIERONI**

Discente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-1741-5945>

Aluísio Eustáquio de Freitas **MIRANDA-FILHO**

Discente do Curso de Odontologia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-1348-322X>

Fiorita Gonzales Lopes **MUNDIM**

Docente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-7375-4108>

Bruno Cesar Correia **SALLES**

Docente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-4444-9673>

Gérsika Bitencourt Santos **BARROS**

Docente do Curso de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, 37132-440 Alfenas - MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-0849-2786>

Resumo

A associação do Kefir e o guaraná, ambos reconhecidos pelos seus efeitos convenientes para saúde poderiam resultar em propriedades benéficas para o tratamento da diabetes *mellitus* (DM). O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do Kefir de água e do extrato hidroetanólico de guaraná (*Paullinia Cupana*), utilizados individualmente ou associados, em melhorar os parâmetros bioquímicos e histologia de ratos diabéticos. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais. Grupo 1: ratos sem DM; grupo 2: ratos com DM; grupo 3: ratos com DM tratados com Kefir de água; grupo 4: ratos com DM tratados com extrato hidroetanólico de guaraná; grupo 5: ratos com DM tratados com Kefir de água e extrato hidroetanólico de guaraná. Após o tratamento foram avaliados os efeitos dessas formulações na glicemia de jejum, colesterol, triglicérides, creatinina e as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). As dietas com Kefir, Guaraná e a combinação preveniram a hiperglicemia em ratos diabéticos ($p < 0,05$) em comparação aos animais do grupo controle/diabético. O tratamento com Guaraná e Kefir com guaraná preveniu o aumento dos níveis séricos de AST, e tanto o tratamento com Kefir, guaraná ou a combinação deles preveniu o aumento de ALT, tendo maior significância nos dois últimos grupos. Além disso, os grupos tratados com Kefir e com guaraná apresentaram uma melhora nos níveis de creatinina. Conclui-se que as dietas apresentaram potencial para prevenir algumas complicações do DM, justificando melhores investigações.

Descritores: Diabetes *mellitus*; Kefir; *Paullinia cupana*.

Abstract

The association of kefir and guarana, both recognized for their convenient health effects, could result in beneficial properties for the treatment of diabetes mellitus (DM). The objective of this work was to evaluate the effects of water kefir and the hydroethanolic extract of guarana (*Paullinia Cupana*), used individually or associated, in improving the biochemical parameters and histology of diabetic rats. The animals were divided into 5 experimental groups. Group 1: rats without DM, group 2: rats with DM, group 3: rats with DM treated with water kefir, group 4: rats with DM treated with guarana hydroethanolic extract, group 5: rats with DM treated with water kefir and guarana hydroethanolic extract. After treatment, the effects of these formulations on fasting glucose, cholesterol, triglycerides, creatinine and the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were evaluated. Kefir, Guarana and combination diets prevented hyperglycemia in diabetic rats ($p < 0.05$) compared to the diabetic control group. Treatment with guarana and kefir with guarana prevented the increase in serum AST levels, and either treatment with kefir, guarana or a combination of them prevented the increase in ALT, with greater significance in the last two groups. In addition, the groups treated with kefir and guarana showed an improvement in creatinine levels. It is concluded that diets had the potential to prevent some complications of DM and should be better investigated.

Descriptors: Diabetes *mellitus*; Kefir; *Paullinia cupana*.

Resumen

La asociación de kéfir y guaraná, ambos reconocidos por sus convenientes efectos sobre la salud, podría resultar en propiedades beneficiosas para el tratamiento de la diabetes mellitus (DM). El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del kéfir de agua y el extracto hidroetanólico de guaraná (*Paullinia Cupana*), utilizados individualmente o asociados, en la mejora de los parámetros bioquímicos e histológicos de ratos diabéticos. Los animales se dividieron en 5 grupos experimentales. Grupo 1: ratas sin DM, grupo 2: ratas con DM, grupo 3: ratas con DM tratadas con kéfir de agua, grupo 4: ratas con DM tratadas con extracto hidroetanólico de guaraná, grupo 5: ratas con DM tratadas con kéfir de agua y guaraná hidroetanólico extraer. Después del tratamiento, se evaluaron los efectos de estas formulaciones sobre la glucosa en ayunas, el colesterol, los triglicéridos, la creatinina y las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). El kéfir, el guaraná y las dietas combinadas previnieron la hiperglicemia en ratas diabéticas ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de control diabético. El tratamiento con guaraná y kéfir con guaraná evitó el aumento de los niveles séricos de AST, y bien el tratamiento con kéfir, guaraná o una combinación de ellos evitó el aumento de ALT, con mayor significación en los dos últimos grupos. Además, los grupos tratados con kéfir y guaraná mostraron una mejora en los niveles de creatinina. Se concluye que las dietas tienen el potencial de prevenir algunas complicaciones de la DM y deben ser mejor investigadas.

Descritores: Diabetes mellitus; Kéfir; *Paullinia cupana*.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico heterogêneo, que se caracteriza pela presença de hiperglicemia por comprometimento da secreção de insulina, ação deficiente da insulina ou ambas¹. A hiperglicemia crônica do diabetes está relacionada com complicações microvasculares de longo prazo relativamente específicas que afetam olhos, rins e os nervos, bem como o aumento do risco de doença cardiovascular. Os critérios diagnósticos para diabetes são baseados em limiares de glicemia e está associada especialmente a retinopatia².

O estresse oxidativo é a principal causa de complicações do diabetes, origina-se no diabetes *mellitus* como consequência dos altos níveis de glicose no sangue, onde as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a produção de radicais livres (RL) excedem a capacidade de defesa do organismo perturbando o equilíbrio de oxidação- redução celular³.

O manejo eficiente do diabetes *mellitus* requer controle contínuo do nível de açúcar no sangue para minimizar os riscos de complicações diabéticas². Assim, antioxidantes naturais e terapêuticos são uma das estratégias para o tratamento do diabetes⁴. Embora existam várias categorias de drogas antidiabéticas, essas drogas possivelmente possuem efeitos colaterais significativos ou são muito caras⁵. Em comparação com a droga sintética, as plantas naturais têm menor toxicidade e são desprovidas de efeitos colaterais⁶.

O Kefir é uma bebida fermentada conhecida como excelente fonte de probiótico com potenciais benefícios à saúde. É uma bebida tradicional do Oriente Médio originada a milhares de anos, apresentando-se como uma simbiose entre leveduras e bactérias na forma de grãos de Kefir⁷. É uma cultura mista contendo por exemplo, os gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* e várias bactérias do ácido láctico do gênero *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Acetobacter* que são combinados e contidos em uma matriz de proteínas e polissacarídeo chamada de "Kefiran" que se formam durante o crescimento celular sob condições aeróbicas^{7,8}.

Paullinia cupana var. *sorbilis*, conhecido popularmente como Guaraná, tem as suas sementes amplamente utilizadas⁹. No Brasil, o guaraná é largamente consumido por ser uma bebida de alta energia e suplementos alimentares, principalmente devido à sua característica estimulante no sistema nervoso central (SNC). Esse efeito está associado ao

alto teor de cafeína, além de conter outras metilxantinas, incluindo teofilina e teobromina, além de polifenóis, como catequinas e epicatequinas¹⁰. Essa composição tem sido associada às atividades biológicas do guaraná, que incluem atividade antimicrobiana, antioxidante, e quimioprolifática na carcinogênese e efeitos antígenotóxicos^{9,10}.

A associação do Kefir e o guaraná (*Paullinia Cupana*) poderiam resultar em propriedades benéficas combinadas. Sendo assim, este trabalho objetiva avaliar os efeitos do Kefir de água e do extrato hidroetanólico de guaraná (*Paullinia Cupana*), utilizados individualmente ou associados, em melhorar parâmetros bioquímicos e histologia de ratos diabéticos.

MATERIAL E MÉTODO

o Produção do Kefir

Os grãos de Kefir d'água foram multiplicados no laboratório de Nutrição da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) – Câmpus Alfenas, o açúcar mascavo, de um mesmo lote, adquirido em comércio local.

Os grãos de Kefir foram lavados com água destilada e inoculados em uma solução de açúcar mascavo 30g/L, na concentração de 50g/L (50g de grãos de Kefir em 1L de solução de açúcar mascavo) em um erlenmeyer de vidro limpo. Deixou-se em repouso 24 horas à temperatura ambiente para fermentação dos grãos. O recipiente é tampado apenas com papel toalha, devido a produção de gases¹¹.

Após incubação a bebida efervescente foi coada separando os grãos que são lavados e usados em um novo lote¹². O processo de fermentação é repetido até o final do experimento. Os grãos que não estavam sendo utilizados foram preservados em solução de açúcar mascavo. Os animais recebiam o mesmo Kefir (0,2ml/100g) (28) por 48 horas contanto que o pH estivesse ± 4 .

o Preparo do extrato hidroetanólico de Guaraná (*Paullinia Cupana*)

Foi utilizado o Guaraná desidratado fornecido pela Sylvestre Ingredientes Naturais, uma indústria brasileira localizada em Tatuí- SP. Este foi submetido à uma extração hidroalcoólica para obtenção de frações solúveis e também para maior concentração, baseado na metodologia descrita na literatura¹³. O extrato hidroetanólico foi obtido pela maceração de Guaraná em pó em etanol 70^o, na proporção 100g/1L, por 7 dias. Após, este foi filtrado e submetido a evaporação a 50^oC até a eliminação máxima do solvente. O extrato obtido foi mantido em geladeira.

○ Animais

Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética institucional sobre o uso de animais (Parecer N° 18A/2018). Foram utilizados 50 ratos da linhagem wistar, machos, adultos, com peso corporal inicial variando entre 180-300g, fornecidos pelo Biotério da Universidade José do Rosário Vellano. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas contendo cinco indivíduos cada, em temperatura controlada ($25\pm 1^\circ\text{C}$) em ambiente com ciclo claro/escuro de 12h. Receberam alimentação específica para espécie (ração comercial) e água potável *ad libitum*, sendo submetidos a período de adaptação de 10 dias.

○ Indução de diabetes mellitus

Para indução do diabetes foi embasado em Abdullah et al., 2018¹. Os animais foram previamente mantidos em jejum por 12 horas, com água fornecida *ad libitum*. Após, os animais receberam uma dose intraperitoneal (140mg/Kg de peso) de solução de aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, USA). Após uma semana foi coletado sangue da veia da cauda e verificado o nível de glicose no sangue pelo glicosímetro G-TECH Lite (Accumed Prod. Med. Hosp. Ltda). Os animais que obtiveram e sustentaram uma glicemia superior a 200 mg/dl foram considerados diabéticos. Os animais cujos valores glicêmicos foram intermediários entre 120 e 200 mg/dl foram novamente submetidos ao protocolo de indução. Uma vez que o diabetes foi desenvolvido, os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos.

○ Desenho experimental

Os animais foram mantidos com dieta padrão e água *ad libitum*, distribuídos em 5 grupos (n=10), conforme descritos na tabela 1, e tratados com água, Kefir, extrato hidroetanólico de guaraná ou a combinação de Kefir + extrato hidroetanólico de guaraná durante 30 dias. O peso e o consumo de água e ração dos diferentes grupos experimentais foram avaliados durante todo o tratamento.

○ Obtenção das amostras biológicas

Ao final de 30 dias, após jejum de 10h, os animais foram anestesiados com isoflurano 2%, o sangue foi coletado por punção cardíaca. As amostras de sangue dos animais foram coletadas em tubos siliconizados (sem aditivos) para obtenção do soro. Foram centrifugados a 1500g por 10 minutos, em temperatura ambiente, e o soro foi separado para determinação da glicemia de jejum, função renal, função hepática e perfil lipídico.

○ Avaliação da glicemia de jejum, colesterol total, triglicerídeos, creatinina, TGO e TGP:

A determinação de glicose de jejum, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina sérica foram determinados no soro por método enzimático colorimétrico. Os seus níveis foram medidos através de um Analisador Bioquímico automatizado, da marca Mindray (Addlife) com Kits de ensaio (Kovalent).

○ Preparo Histológico

Realizada a eutanásia, as amostras obtidas dos órgãos (coração, fígado, pâncreas e rins) foram fixadas em formol neutro a 10% durante 24h e, na sequência, após a fixação, as amostras foram preparadas no Laboratório de Patologia, onde foram realizados os seguintes passos: 1) Coleta, 2) identificação do material (avaliação Macroscópica), 3) fixação/clivagem, 4) desidratação (uso do álcool etílico em concentrações progressivas: 70%, 80%, 95%, 100%, com tempo de permanência de 60 minutos em cada fase. Foram realizados dois banhos no álcool a 100% para afastar de moléculas de água residuais; 5) Diafanização com xilol I, xilol II e xilol III, 6) Impregnação (Banhos de parafina / estufa), 7) inclusão (caixas de acrílico), 8) Microtomia, cortes semi-seriados com espessura de 5 μm no sentido longitudinal das peças, 9) montagem da lâmina com coloração de Tricrômico de Masson, verniz e identificação das lâminas (número prévio da amostra). Posteriormente, estas lâminas foram submetidas às avaliações microscópicas de luz binocular (Nikon E200) por um examinador, sendo que este desconhecia a qual grupo os cortes histológicos analisados pertenciam.

○ Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão, submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Scott-Knott (1974) ao nível de significância de 5%¹⁴. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico de análise de variância (SISVAR).

Tabela 1. Detalhamento dos grupos experimentais utilizados no estudo

Grupo Experimental	Nº animais	Trtamento	Injeção administrada/ Indução DM
1 Controle sem diabetes	10	Água	Salina
2 Controle diabético	10	Água	Aloxana (140 mg/kg)
3 Diabéticos + solução de Kefir 0,2mL/100g	10	Kefir (0,2mL/100g)	Aloxana (140 mg/kg)
4 Diabéticos + extrato hidroetanólico de guaraná 300 mg/kg	10	Extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg)	Aloxana (140 mg/kg)
5 Diabéticos + solução de Kefir 0,2mL/100g combinada com extrato hidroetanólico de guaraná 300 mg/kg	10	Kefir (0,2mL/100g) e Extrato hidroetanólico de guaraná 300mg/Kg	Aloxana (140 mg/kg)

RESULTADOS

O tratamento dos animais com aloxana (140mg/Kg de peso) induziu a hiperglicemia nos animais dos grupos 2, 3, 4 e 5, e os tratamentos com Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e Kefir (0,2mL/100g) combinado com extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) demonstraram alterações no perfil glicêmico dos animais do estudo (Figura 1).

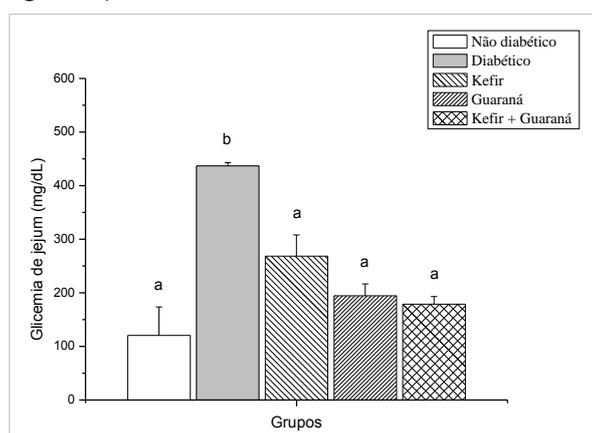


Figura 1: Efeito anti-hiperglicêmico do Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e da combinação em ratos com DM tipo 1.

Legenda: Os dados representam a média ± EP para cada grupo com n de 10 animais. As letras diferentes acima de cada coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com o Scott Knott a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Com relação aos pesos dos animais, pode-se observar na (Tabela 2) que na primeira quinzena de tratamento os ratos não diabéticos, apresentaram em média maior peso do que os diabéticos e não houve diferença significativa entre os grupos de ratos diabéticos e os diabéticos tratados. Na segunda quinzena de tratamento os grupos não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos com Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e a combinação dos dois sobre o peso dos ratos, e relação entre os consumos de água e ração nos grupos experimentais durante 30 dias de tratamento.

	Não diabéticos	Diabéticos	DM Kefir	DM Guaraná	DM K+G
1ª quinzena					
Peso (g)	304,6±14,12 ^b	282,2±7,81 ^a	260,2±7,92 ^a	269,7±6,91 ^a	261,9±8,86 ^a
Consumo de ração (g)	102,09±6,49 ^a	151,2±6,93 ^a	113,8±22,29 ^a	126,1±16,22 ^a	112,5±13,34 ^a
Consumo de água (ml)	224,86±3,71 ^a	722,2±10,01 ^d	675,9±9,8 ^c	642,9±41,48 ^c	552,6±20,35 ^b
2ª quinzena					
Peso (g)	335,6±9,09 ^a	280,25±12,28 ^a	302,5±15,67 ^a	316,04±13,02 ^a	305,65±9,14 ^a
Consumo de ração (g)	104,58±2,89 ^a	132,09±5,33 ^b	129,2±6,53 ^b	142,62±6,16 ^b	127,47±5,69 ^b
Consumo de água (ml)	237,5±6,64 ^a	560,87±29,29 ^c	540,8±19,54 ^c	502,94±20,82 ^b	473±16,42 ^b

Legenda: Os dados representam a média ± EP de até 10 ratos por grupo experimental, avaliados por quinzena de tratamento. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o Scott Knott a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

O consumo de ração dos grupos não foi influenciado na primeira quinzena de tratamento, já na segunda quinzena os grupos com DM consumiram maior quantidade de

ração. O consumo de água na primeira quinzena foi significativamente diferente entre os grupos avaliados. Na segunda quinzena os grupos com DM tratados com guaraná e DM tratados com a combinação Kefir + guaraná demonstraram semelhança no consumo de água, sendo estes menores que os grupos diabéticos e DM tratado com Kefir.

Foram observadas alterações dos biomarcadores hepáticos nos animais. Ao investigar os níveis séricos de AST (Figura 2), os grupos tratados com Guaraná e a combinação Kefir com guaraná apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle diabético, aproximando-se mais dos valores do controle não diabético. Em relação aos valores de ALT (Figura 3), houve diferença significativa para os grupos tratados com Kefir, guaraná e a combinação de Kefir com guaraná, sendo que nos dois últimos grupos houve valores mais semelhantes ao grupo controle não diabético.

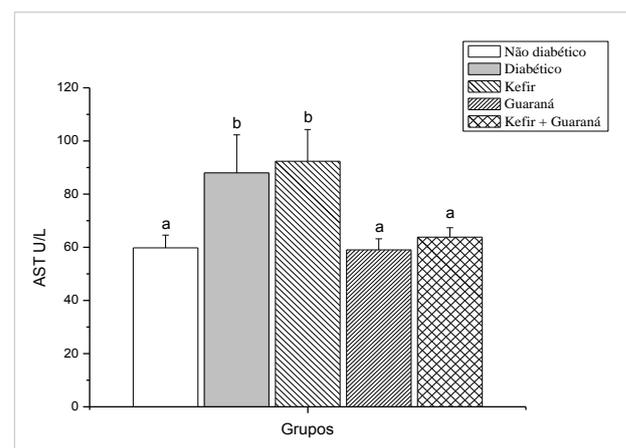


Figura 2: Efeito do Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e da combinação dos dois sobre os níveis séricos de AST em ratos com DM tipo 1.

Legenda: As letras diferentes acima de cada coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com o Scott Knott a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

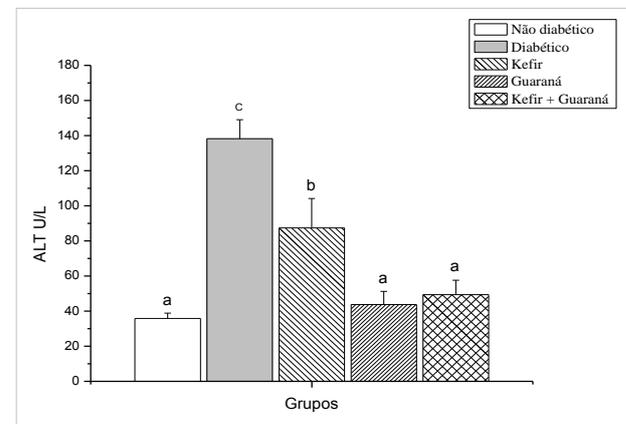


Figura 3: Efeito do Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e da combinação dos dois sobre os níveis séricos de ALT em ratos com DM tipo 1.

Legenda: As letras diferentes acima de cada coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com o Scott Knott a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Tais tratamentos poderiam estar promovendo uma melhora nos níveis destes biomarcadores hepáticos.

A dislipidemia é uma complicação comum no DM tipo 1 não controlado, podendo estar relacionado aos hábitos do paciente. De acordo com os resultados apresentados (Tabela 3), observa-se o aumento de colesterol total e triglicérides nos animais diabéticos quando comparados com os animais não diabéticos, porém os tratamentos não promoveram diferença significativa sobre o aumento destes valores.

Tabela 3. Efeito dos tratamentos com Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e a combinação dos dois sobre o perfil lipídico de ratos com DM tipo 1, após 30 dias de tratamento.

Grupos	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)
Não diabéticos	42 ± 3,01 ^a	29,8 ± 4,55 ^a
Diabéticos	61,75 ± 4,4 ^b	54,75 ± 12,34 ^b
DM Kefir	58,66 ± 4,8 ^b	64,66 ± 6,77 ^b
DM Guaraná	54 ± 4,3 ^b	54,14 ± 7,7 ^b
DM K+G	59,7 ± 4,8 ^b	54,14 ± 7,68 ^b

Legenda: Os dados representam a média ± EP de até 10 ratos por grupo experimental. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o Scott Knott a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Quando analisada a função renal (Figura 4) através dos níveis de creatinina, foi visualizado um aumento do valor nos animais diabéticos quando comparado aos sem diabetes, os grupos tratados DM Kefir e DM guaraná apresentaram uma melhora se assemelhando aos valores do grupo sem diabetes. Quanto a combinação no grupo DM Kefir + guaraná, o tratamento não promoveu uma melhora e o valor apresentou-se próximo do grupo diabético.

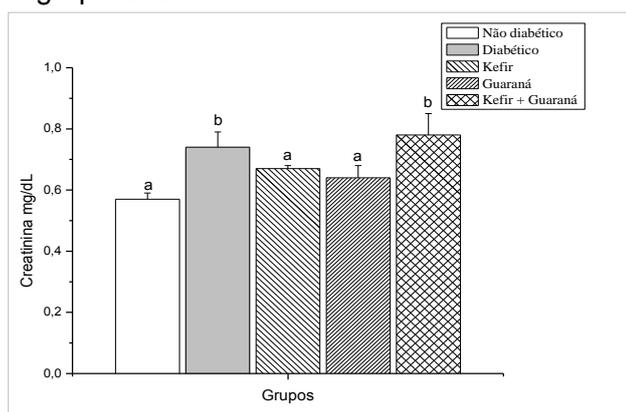


Figura 4: Efeito dos tratamentos com Kefir (0,2mL/100g), extrato hidroetanólico de guaraná (300mg/Kg) e a combinação dos dois sobre a função renal de ratos com DM tipo 1, após 30 dias de tratamento.

Legenda: Os dados representam a média ± EP de até 10 ratos por grupo experimental. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o Scott Knott a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

○ **Análise histológica**
Coração

A coloração por Tricrômico de Masson permitiu uma evidência nítida e uniforme das

características histológicas teciduais como hiperemia (todas as amostras) (Figura 5), além de um acúmulo anormal de colágeno (fibrose) nas áreas viáveis do miocárdio (Figura 6). Utilizando como parâmetros: o escore de fibrose foi 0 para ausência ou menos que 1% da área, 1 (entre 1 e 5% da área, 2 (entre 5 e 20% da área) e 3 (acima de 20% da área).

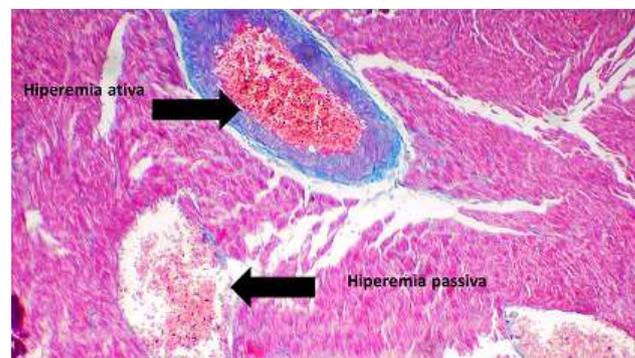


Figura 5: Grupo tratamento guaraná (coração) com hiperemias ativa e passiva (100x).

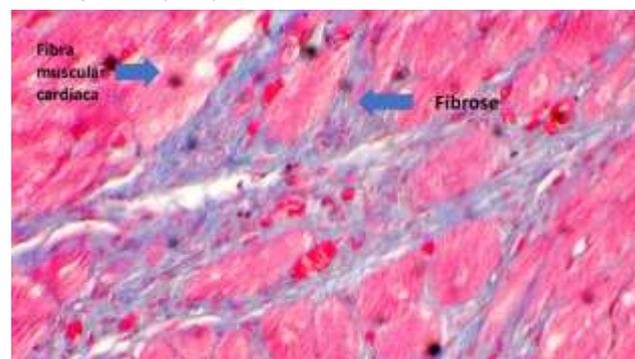


Figura 6: Grupo tratamento Kefir (coração) com fibrose discreta (400x).

○ **Fígado**

A coloração por Tricrômico de Masson proporcionou análise nítida e uniforme das características morfológicas das amostras como hiperemia (todas as amostras) e atrofia, além de fibroses periportal e perilobular (Figura 7). Utilizando como parâmetros: o escore de fibrose foi 0 para ausência ou menos que 1% da área, 1 (entre 1 e 5% da área, 2 (entre 5 e 20% da área) e 3 (acima de 20% da área).



Figura 7. Grupo controle sem DM (Fígado) com fibrose discreta periportal (100x).

○ **Pâncreas**

Para a análise histopatológica, foram

utilizadas as lâminas coradas com Tricrômico de Masson que permitiu uma evidenciação nítida e uniforme das características histológicas teciduais como hiperemia (todas as amostras) e fibroses periductal (Figura 8) e perilobular.

Utilizando como parâmetros: o escore de fibrose foi 0 para ausência ou menos que 1% da área, 1 (entre 1 e 5% da área, 2 (entre 5 e 20% da área) e 3 (acima de 20% da área).

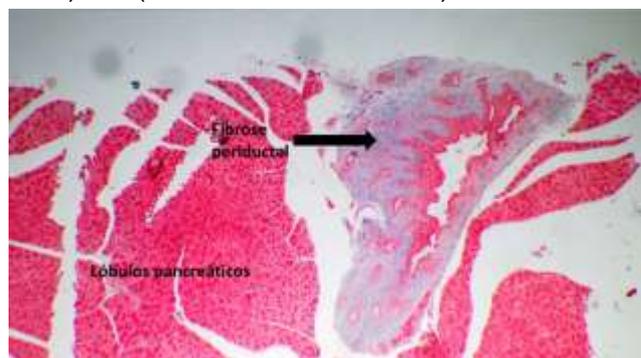


Figura 8. Grupo tratamento Kefir + Guaraná (Pâncreas) com fibrose periductal discreta (100x)

o Rins

Para a análise histomorfológica foram utilizadas as lâminas coradas com Tricrômico de Masson que permitiu uma evidenciação nítida e uniforme das características histológicas teciduais como hiperemia (todas as amostras), inflamação crônica, com presença de células mononucleares, atrofia leve e fibroses peritubular e periglomerular (Figura 9). Utilizando como parâmetros: o escore de fibrose foi 0 para ausência ou menos que 1% da área, 1 (entre 1 e 5% da área, 2 (entre 5 e 20% da área) e 3 (acima de 20% da área).

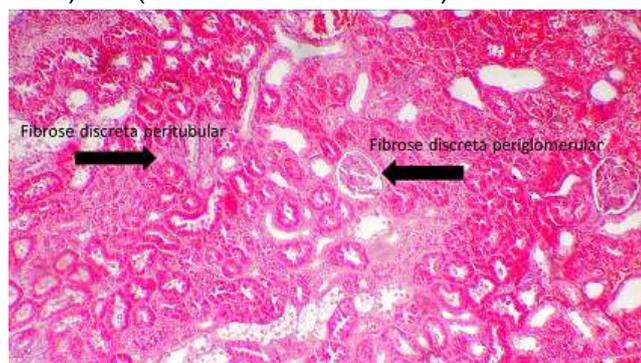


Figura 9. Grupo tratamento Kefir + Guaraná (Rim) com fibrose discreta peritubular e periglomerular (100x).

DISCUSSÃO

Este estudo revelou que as dietas com Kefir de água e do extrato hidroalcolico de guaraná (*Paullinia Cupana*) utilizados individualmente ou associados preveniu a hiperglicemia em ratos diabéticos em comparação com o grupo controle de ratos, estando de acordo com os objetivos propostos no trabalho. O tratamento associado preveniu o aumento dos níveis séricos de aspartato aminotransferase, e tanto o tratamento com

Kefir, guaraná ou a combinação deles preveniram o aumento de alanina aminotransferase, tendo maior significância nos dois últimos grupos, e os grupos tratados com Kefir e com guaraná apresentaram uma melhora nos níveis de creatinina.

A escolha do extrato hidroetanólico de guaraná (*Paullinia cupana*) se baseou em propriedades relatadas na literatura científica, um estudo mostrou que quatorze compostos fenólicos foram caracterizados em amostras de pó de guaraná, entre eles a catequina, epicatequina, além de derivados de flavonóides oligômeros conhecidos como procianidinas, como dímero de procianidina do tipo B, trímero de procianidina do tipo A e dímero de procianidina do tipo A²¹. Além disso, já está evidenciado que a co-administração de *Paullinia cupana* retardou o ganho de peso corporal, aumentou a glicemia e diminuiu os níveis de triglicerídeos²². Em uma avaliação in vitro do extrato hidroetanólico de guaraná sobre a viabilidade e proliferação celular de células mononucleares do sangue periférico expostas a altos níveis de glicose, os resultados indicaram que o extrato apresentou atividade positiva estatisticamente significativa aumentando a proliferação celular e diminuindo os níveis de dsDNA extracelular mesmo quando combinado com um alto nível de glicose, indicando que poderia ser usado para melhorar o funcionamento do organismo de pessoas saudáveis, bem como pacientes com diabetes tipo 2²³.

A literatura mostra que os polifenóis possuem potenciais benefícios para a saúde devido as suas propriedades, entre elas as antioxidantes e antiinflamatórias, sugerindo que estes podem ser importante na dieta como terapia dietética para prevenção e controle do diabetes e suas complicações¹⁵. Além disso, os polifenóis na dieta podem inibir a α -amilase e a α -glicosidase, a absorção de glicose no intestino pelo co-transportador de glicose juntamente com íons sódio (SGLT), estimular a secreção de insulina e reduzir a produção de glicose hepática, ou seja, eles têm sido associados à diminuição da digestão de carboidratos no nível intestinal e à regulação e alteração do transporte da glicose, o que auxilia no controle do açúcar no sangue¹. Recentemente, os polifenóis também foram introduzidos como potenciais agentes neuroprotetores no diabetes além de atuar no combate de outras doenças e suas complicações¹⁵. Esses dados estão em concordância com os dados desse estudo, visto que o tratamento dos animais diabéticos com

extrato hidroetanólico de guaraná sozinho ou combinado demonstraram alterações no perfil glicêmico dos animais.

Os probióticos contêm bactérias vivas, que podem ser úteis para a saúde. Em outras palavras, um probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo que é benéfico para o hospedeiro, visto que melhora o equilíbrio microbiano²⁵. A Organização Mundial da Saúde (OMS), define os probióticos como “microrganismos vivos, conferindo benefício para a saúde do hospedeiro quando administrado de forma adequada”²⁵. Kefir é um tipo de probiótico ácido, parcialmente efervescente, ligeiramente alcoólico, leite espumoso e bebida viscosa com uma cremosa uniforme e consistência elástica e sabor azedo, que podem ser facilmente digeridos^{1,7,25}, por essas características ele foi escolhido para ser testado nesse experimento.

Os alimentos funcionais desempenham um papel importante na proteção do corpo contra os danos oxidativos. Um estudo comparou o efeito protetor do Kefir contra danos da oxidação de Tetracloro de Carbono (CCL4) em camundongos, com a já conhecida por seus efeitos antioxidantes a vitamina E. Os resultados indicaram que tanto a vitamina E quanto o Kefir têm capacidade de proteger os tecidos contra o CCL4, sendo que o Kefir confere maior proteção em comparação a vitamina E²⁴.

Estudos mostram que farmacoterapias não resolvem completamente o problema do aumento do nível de espécies reativas de oxigênio e o progresso das patologias diabéticas secundárias¹⁶. Além disso, o acesso a medicamentos padrão às vezes são limitados por altos custos de cuidados de saúde, status socioeconômico ou inacessibilidade territorial¹⁶. Logo, alternativas terapêuticas mais acessíveis através de suplementos de plantas e/ou alimentos funcionais vem sendo estudadas para serem implementadas na dieta diária como mostrou Miranda-Filho et al.⁴ que testaram a atividade do extrato hidroetanólico de *Raphanus sativus* (rabanete) na redução da glicemia e do estresse oxidativo em glândulas submandibulares de ratos diabéticos, o extrato testado apresentou resultados positivos, atuando na diminuição da glicemia e do estresse oxidativo, reduzindo a lipoperoxidação e oxidação proteica nas glândulas submandibulares dos ratos com diabetes. O extrato utilizado nesse estudo, também reduziu a glicemia de ratos diabéticos, como no estudo citado.

O estresse oxidativo é uma das

principais complicações associadas a patogênese da diabetes¹⁹. Estudos mostram que há um aumento do nível de marcadores de estresse oxidativo em indivíduos diabéticos¹⁹, e isso pode levar complicações como disfunções endoteliais, anormalidades estruturais e inflamação nos vasos sanguíneos²⁰, além de levar disfunções das mitocôndrias dos hepatócitos causando disfunções hepáticas. Uma pesquisa verificou que a hiperglicemia estava relacionada a apoptose de hepatócitos induzida por radicais hidroxilas em ratos diabéticos tipo 1¹⁷. A nefropatia diabética acomete de 30% a 40% dos indivíduos com DM tipo 1 e de 10% a 40% daqueles com DM tipo 2, representando a principal complicação microvascular do diabetes e a maior causa de insuficiência renal terminal no mundo. O controle da pressão arterial e do nível glicêmico exerce papel-chave na redução de risco e na progressão da nefropatia diabética^{2,3,21}. Existe uma relação complexa e bidirecional entre o fígado e a diabetes, visto que a diabetes é frequentemente acompanhada por doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)¹⁶, e evidências científicas demonstram que danos hepáticos em pacientes com DM tipo 1 não controlado é uma complicação comum causada pela hiperglicemia^{16,17}. A incidência de DHGNA e hepatocarcinoma é consideravelmente superior em diabéticos quando comparado com não diabéticos¹⁸. O fígado é um órgão metabólico essencial para a conservação da homeostase metabólica do corpo, porém o seu mecanismo de distúrbio metabólico induzido pelo diabetes no fígado ainda não é inteiramente conhecido¹⁷. Nesse trabalho, foram avaliados os biomarcadores hepáticos dos animais, e o tratamento com Guaraná e Kefir com guaraná preveniu o aumento dos níveis séricos de AST, e tanto o tratamento com Kefir, guaraná ou a combinação deles preveniu o aumento de ALT, tendo maior significância nos dois últimos grupos, mostrando que os testes diminuíram a lesão hepática em ratos diabéticos.

O kefir vem sendo investigado por possuir efeitos terapêuticos significativos para algumas patologias e entre elas a diabetes. Um estudo foi desenhado para determinar o efeito protetor do kefir sobre o dano oxidativo, bem como as alterações histológicas e bioquímicas que ocorrem nos tecidos renais de ratos diabéticos. O Kefir diminuiu os danos renais causados pelo diabetes, e com isso concluíram que a suplementação com kefir pode contribuir para melhor controle do estresse oxidativo, e conseqüentemente à melhora das funções

renais, sugerindo seu uso para retardar a progressão da nefropatia diabética²⁶, corroborando com os dados do presente estudo. Outros pesquisadores observaram que em ratos diabéticos suplementados com kefir ocorreu um aumento da atividade enzimática intestinal e da absorção de D-galactose por vesículas de membrana com bordas em escova, e que os ratos desse grupo apresentaram a glicemia significativamente menor, indicando que o suplemento poderia beneficiar na digestão de proteínas e reduzir o índice glicêmico²⁷. Resultados parecidos foram observados em outros experimentos com redução significativa estatisticamente da glicemia em ratos diabéticos tratados com kefir, além de observar outros efeitos protetores como diminuição do estresse oxidativo retardando a progressão das complicações da diabetes^{1,8}, e esses resultados podem ser comparados com os achados desse trabalho, mostrando essa característica desse probiótico quando utilizado sozinho ou associado.

As dietas com Kefir isolado e associado ao guaraná preveniram a hiperglicemia em ratos diabéticos nesse estudo, impediu o aumento dos níveis séricos de AST e ALT e os grupos tratados com Kefir associado ao guaraná apresentaram uma melhora nos níveis de creatinina. E esses resultados se devem ao fato de que a ingestão de kefir aumenta o nível de glutathione peroxidase e diminui o nível de malondialdeído que está envolvido no controle do estresse oxidativo. Por outro lado, kefir pode se ligar a radicais superóxido e também inibem a peroxidação do ácido linoléico, e como resultado, o kefir exerce até mesmo um efeito anticancerígeno por meio de uma propriedade antioxidante e reduzindo os danos ao DNA^{17,25}.

Assim, consideramos que tanto o extrato hidroetanólico de guaraná (*Paullinia cupana*) quanto a bebida fermentada de kefir, utilizados isoladamente ou, como novidade na literatura científica, associados, possuem efeitos terapêuticos importantes para pacientes diabéticos. Devido às propriedades dessa dieta, esses compostos devem continuar sendo investigados quanto aos potenciais efeitos protetores nas complicações secundárias da DM.

CONCLUSÃO

O guaraná, já reconhecido por seus efeitos antioxidantes na literatura, neste estudo demonstrou redução na glicemia. Os resultados indicaram que o tratamento com o guaraná, o tratamento com o Kefir e a associação deles possuem efeito anti-hiperglicêmico, podendo

auxiliar no controle do nível glicêmico e assim minimizar os riscos de complicações na DM. Quanto as enzimas hepáticas (AST e ALT), dados preliminares demonstraram uma melhora nos níveis de biomarcadores hepáticos.

REFERÊNCIAS

1. Abdullah KM, Alam MM, Iqbal Z, Naseem I. Therapeutic effect of vitamin B3 on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced diabetic rat model. *Biomed Pharmacother*. 2018;105:1223-31.
2. Goldenberg R, Punthakee Z. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Can J diabetes*. 2013;37:S8-11.
3. Maritim AC, Sanders A, Watkins Iii JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.
4. Miranda Filho AEF, Silva AB, Apolcauto E, Lopes GD, Rodrigues PR, Neves TV et al. Atividade do extrato hidroetanólico das folhas de *Raphanus Sativus* em glândulas submandibulares de ratos com diabetes mellitus. *RSD*. 2021;10(2).
5. Lee TW, Lee TI, Lin YK, Chen YC, Kao YH, Chen YJ. Effect of antidiabetic drugs on the risk of atrial fibrillation: mechanistic insights from clinical evidence and translational studies. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(3):923-34.
6. Abdelrazek H, Kilany OE, Muhammad MA, Tag HM, Abdelazim AM. Black seed thymoquinone improved insulin secretion, hepatic glycogen storage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic male wistar rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;810465.
7. Bourrie BC, Richard C, Willing BP. Kefir in the Prevention and Treatment of Obesity and Metabolic Disorders. *Curr Nutr Rep*. 2020;9(3):184-92.
8. Punaro GR, Maciel FR, Rodrigues AM, Rogero MM, Bogsan CS, Oliveira MN et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide*. 2014;37:53-60.
9. Boasquívís PF, Silva GM, Paiva FA, Cavalcanti RM, Nunez CV, de Paula Oliveira R. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxi Med Cell Longev*. 2018;9241308.
10. Zamberlan DC, Arantes LP, Machado ML, da Silveira TL, da Silva AF, da Cruz IB et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) protects against amyloid- β toxicity in *Caenorhabditis elegans* through heat shock protein response activation. *Nutr Neurosci* 2020;23(6):444-54.

11. Jascolka TL. Efeitos do Quefir no perfil lipídico, estresse oxidativo e aterosclerose de camundongos deficientes de apolipoproteína E. 2010;102.
12. Anfiteatro DN. Kefir, a probiotic gem cultured with probiotic jewels. South Australia:Tranmere North Post Office; 2000.
13. Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, Dos Santos GF, Algarve TD, Marinowic DR et al.. The protective effects of guaraná extract (Paullinia cupana) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. Food Chem Toxicol. 2013;53:119-25.
14. Scott AJ, Knott M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics. 1974;30:507-12.
15. Naseri R, Farzaei F, Fakhri S, El-Senduny FF, Altouhamy M, Bahramsoltani R et al. Polyphenols for diabetes associated neuropathy: Pharmacological targets and clinical perspective. DARU J Pharm Sci. 2019; 27(2):781-98.
16. Madić V, Petrović A, Jušković M, Jugović D, Djordjević L, Stojanović G et al. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. J Ethnopharmacol. 2021;265: 113210.
17. Chen M, Zheng H, Xu M, Zhao L, Zhang Q, Song J et al. Changes in hepatic metabolic profile during the evolution of STZ-induced diabetic rats via an ¹H NMR-based metabonomic investigation. Biosci rep. 2019;39(4).
18. Fujita K, Iwama H, Miyoshi H, Tani J, Oura K, Tadokoro T et al. Diabetes mellitus and metformin in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2016;22(27):6100.
19. Victor P, Umapathy D, George L, Juttada U, Ganesh GV, Amin KN et al. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the progression of diabetic nephropathy. Cell Stress Chaperones. 2021;26(2):311-21.
20. Kapucu A. Crocin ameliorates oxidative stress and suppresses renal damage in streptozotocin induced diabetic male rats. Biotech Histochem. 2021;96(2):153-60.
21. Silva GS, Canuto KM, Ribeiro PR, de Brito ES, Nascimento MM, Zocolo GJ et al. Chemical profiling of guarana seeds (Paullinia cupana) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. Food Res Int. 2017;102:700-9.
22. Ventura S, Rodrigues M, Falcão A, Alves G. Effects of Paullinia cupana extract on lamotrigine pharmacokinetics in rats: A herb-drug interaction on the gastrointestinal tract with potential clinical impact. Food Chem Toxicol. 2018;115:170-77.
23. Anversa AM, Rogalski F, Barbisan F, Assman CE, Azzolin VF, Seehaber AD et al. The in vitro effect of guaraná (Paullinia cupana) extract on human peripheral blood mononuclear cells exposed to a high glucose level. Diabetol Metab Syndr. 2015;7(1):A227.
24. Güven A, Güven A, Gülmez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health . 2003;50(8):412-16.
25. Sharifi M, Moridnia A, Mortazavi D, Salehi M, Bagheri M, Sheikhi A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. Med Oncol. 2017;34(11):1-7.
26. Kahraman M, Ertekin YH, Satman İ. The effects of kefir on kidney tissues and functions in diabetic rats. Probiotics Antimicrob Proteins. 2020;13(2):375-82.
27. Urdaneta E, Barrenetxe J, Aranguren P, Irigoyen A, Marzo F, Ibáñez FC. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. Nutr Res. 2007;27(10):653-58.
28. Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. J Transl Med. 2015;13:390.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Aluísio Eustáquio de Freitas Miranda Filho

Curso de Odontologia,
Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas,
37132-440 Alfenas – MG, Brasil
Email: aluisiomiranda@hotmail.com.br

Submetido em 27/08/2021

Aceito em 04/11/2021