



Desenvolvimento e Otimização de Kombucha  
de Chá Verde (*Camellia sinensis* L.)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA - MEC  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - PPGAN

IRAILDO  
FRANCISCO SOARES

## Resumo da Obra

A kombucha é uma bebida funcional produzida pela fermentação do chá verde ou preto, adicionados de carboidratos e uma cultura simbiótica de microrganismos. Reconhecida no mercado de alimentos saudáveis por sua composição, ganha destaque pelos benefícios potenciais à saúde. Este estudo teve como objetivo otimizar o processo de produção da kombucha, considerando dados da literatura, sua composição fenólica e atividade antioxidante. Utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional, foram investigadas 11 condições de fermentação, variando o tempo (3 a 15 dias) e a quantidade de carboidrato (50 a 110 gramas). Os resultados do processo de otimização demonstraram impacto significativo nas variáveis indiretas acidez volátil (34,63 a 107,39), sólidos solúveis totais (5,0 a 10,2), ratio (0,11 a 0,37) e teor alcoólico (0,0 a 1,8), identificando três condições promissoras para investigação adicional. A composição centesimal das três kombuchas analisadas revelou teores adequados de umidade (87,86 a 90,17%) e quantidades mínimas de cinzas (0,04 a 0,05%), proteínas (0,01 a 0,05%) e lipídios (0,03 a 0,06%), com baixa concentração de carboidratos (9,67 a 12,05%) e baixo valor energético total (39,39 a 48,46 kcal/100 mL). Foram identificados quatro compostos fenólicos nas bebidas, incluindo ácido clorogênico, cafeína, rutina e ácido cinâmico, associados a benefícios como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. O estudo sobre o estresse oxidativo e nível de atividade antioxidante das bebidas indicou ausência de toxicidade e atividade pró-oxidante e antioxidante nas kombuchas. Estas descobertas contribuem significativamente para a comunidade científica ao expandir o conhecimento sobre a kombucha, assim como para a indústria alimentícia, fornecendo informações práticas para uma produção otimizada, com potencial de mercado para a garantia de uma fabricação uniforme e segura.

*Tese de Doutorado*

*Desenvolvimento e Otimização  
de Kombucha de Chá Verde  
(*Camellia sinensis* L.)*

2024

Teresina, Piauí. 2024.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE  
KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*Camellia Sinensis*  
L.)**

IRAILDO FRANCISCO SOARES

TERESINA

2024

**IRAILDO FRANCISCO SOARES**

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE KOMBUCHA DE CHÁ VERDE**  
*(Camellia sinensis L.)*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Robson Alves da Silva.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO IRAILDO FRANCISCO  
SOARES E ORIENTADA PELO PROF.  
DR. ROBSON ALVES DA SILVA.**

TERESINA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Divisão de Representação da Informação

S676d Soares, Iraído Francisco.  
Desenvolvimento e otimização de kombucha de chá verde  
(*Camellia sinensis* L.) / Iraído Francisco Soares. -- 2024.  
151 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de  
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Teresina, 2024.  
Orientador: Prof. Dr. Robson Alves da Silva ”.

1. Bebida Funcional. 2. Produção. 3. Compostos Bioativos.  
4. Benefícios. 5. Atividade Antioxidante. I. Silva, Robson Alves da.  
II. Título.

CDD 663.94

**IRAILDO FRANCISCO SOARES**

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE KOMBUCHA DE CHÁ VERDE**  
(*Camellia sinensis* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

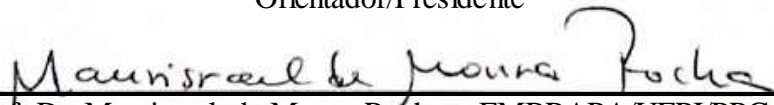
**APROVADO EM: 05/09/2024**

**BANCA EXAMINADORA**



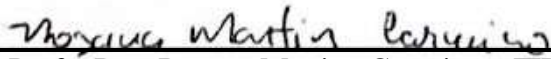
---

Prof. Dr. Robson Alves da Silva – IFPI/UFPI/PPGAN  
Orientador/Presidente



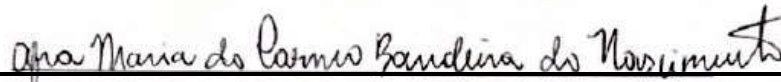
---

Prof. Dr. Maurisrael de Moura Rocha – EMBRAPA/UFPI/PPGAN  
1º Examinador



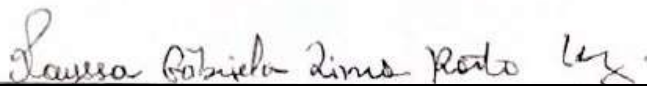
---

Prof. Dra. Rosana Martins Carneiro – IFPI  
2º Examinador



---

Prof. Dra. Afra Maria do Carmo Bandeira do Nascimento – IFPI  
3º Examinador



---

Prof. Dra. Rayssa Gabriela Lima Porto Luz – IFPI  
4º Examinador

---

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo – UFPI/PPGCF  
1º Suplente

---

Prof. Dra. Stella Regina Arcanjo Medeiros – UFPI/PPGAN  
2º Suplente

*Dedico este trabalho aos meus familiares que, sob muito sol, me  
fizeram chegar até aqui, na sombra.*

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desta jornada desperta diversos sentimentos e gratidão. Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e pelo constante apoio que me concedeu ao longo deste caminho.

Expresso também minha profunda gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí (PPGAN/UFPI) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo suporte estrutural e financeiro indispensáveis para a realização desta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), onde desenvolvi grande parte da minha pesquisa, e aos técnicos dos laboratórios, Poliana Sousa e Luíz Henrique, pela constante disponibilidade e assistência.

Meu sincero agradecimento ao professor Dr. Robson Alves da Silva, meu orientador, por seus valiosos ensinamentos ao longo deste ciclo acadêmico.

Agradeço também aos meus pais, Paixão Soares e Francisco Soares, que, mesmo sem entenderem o propósito das minhas escolhas, sempre me apoiaram incondicionalmente, compartilhando meus anseios, preocupações e incertezas.

Aos meus irmãos, especialmente Ivanda Soares e Ivaneide Soares, dedico minha gratidão pelo apoio, amizade, empenho e dedicação demonstrados ao longo dessa jornada, enfrentando comigo os desafios e oferecendo suporte e orações.

Agradeço também à professora Dra. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo e a sua orientanda Ana Karine Soares pela disponibilidade e apoio no uso dos laboratórios da UFPI: Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos, Laboratório de Antioxidantes e Laboratório de Propriedades Funcionais de Alimentos.

À professora Dra. Rosana Martins Carneiro pelo auxílio no processo fermentativo das kombuchas no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal/IFPI.

Ao professor Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo e seu orientando José Moreira, meu sincero agradecimento pela colaboração na pesquisa no Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia/UFPI.

Agradeço ao professor Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior e sua orientanda Maria das Dores Oliveira pelo espaço concedido para a realização da pesquisa no Laboratório de Química de Produtos Naturais/IFPI.

Gratidão aos meus companheiros de vida, Michele Alves, Janaína Carvalho, Lanno Alencar, Talisson Silva, Janaína Sampaio, Breno Feitosa, Muriel Sampaio e Rafael Lustosa, pela acolhida, convivência e pelos momentos de sanidade e descontração compartilhados.

SOARES, Iraído Francisco. **Desenvolvimento e Otimização de Kombucha de Chá Verde** (*Camellia sinensis* L.). 2024. 151 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI.

## RESUMO

A kombucha é uma bebida funcional produzida pela fermentação do chá verde ou preto, adicionados de carboidratos e uma cultura simbiótica de microrganismos. Reconhecida no mercado de alimentos saudáveis por sua composição rica em compostos bioativos, ácidos orgânicos, vitaminas e micronutrientes, a kombucha ganha destaque pelos benefícios potenciais à saúde, como a melhoria da microbiota intestinal, fortalecimento do sistema imunológico e propriedades antioxidantes. No entanto, as variações nos processos de produção da bebida exigem pesquisas para padronizar suas características e assegurar a consistência na qualidade e nos efeitos fisiológicos oferecidos aos consumidores. Este estudo teve como objetivo otimizar o processo de produção da kombucha, considerando dados da literatura, sua composição fenólica e atividade antioxidante. Utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional, foram investigadas 11 condições de fermentação, variando o tempo (3 a 15 dias) e a quantidade de carboidrato (50 a 110 gramas). Os resultados do processo de otimização demonstraram impacto significativo nas variáveis indiretas acidez volátil (34,63 a 107,39), sólidos solúveis totais (5,0 a 10,2), ratio (0,11 a 0,37) e teor alcoólico (0,0 a 1,8), identificando três condições promissoras para investigação adicional. A composição centesimal das três kombuchas analisadas revelou teores adequados de umidade (87,86 a 90,17%) e quantidades mínimas de cinzas (0,04 a 0,05%), proteínas (0,01 a 0,05%) e lipídios (0,03 a 0,06%), com baixa concentração de carboidratos (9,67 a 12,05%) e baixo valor energético total (39,39 a 48,46 kcal/100 mL). Foram identificados quatro compostos fenólicos nas bebidas, incluindo ácido clorogênico, cafeína, rutina e ácido cinâmico, associados a benefícios como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. O estudo sobre o estresse oxidativo e nível de atividade antioxidante das bebidas indicou ausência de toxicidade e atividade pró-oxidante e antioxidante nas kombuchas. Estas descobertas contribuem significativamente para a comunidade científica ao expandir o conhecimento sobre a kombucha, assim como para a indústria alimentícia, fornecendo informações práticas para uma produção otimizada, com potencial de mercado para a garantia de uma fabricação uniforme e segura.

**Palavras-chave:** Bebida Funcional. Produção. Compostos Bioativos. Benefícios. Atividade Antioxidante.

SOARES, Iraído Francisco. **Development and Optimization of Green Tea Kombucha** (*Camellia sinensis* L.). 2024. 151 f. Thesis (Doctorate) – Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina/PI.

### ABSTRACT

Kombucha is a functional beverage produced by fermenting green or black tea, with added carbohydrates and a symbiotic culture of microorganisms. Recognized in the health food market for its composition rich in bioactive compounds, organic acids, vitamins and micronutrients, kombucha stands out for its potential health benefits, such as improving the intestinal microbiota, strengthening the immune system and antioxidant properties. However, variations in the beverage production processes require research to standardize its characteristics and ensure consistency in the quality and physiological effects offered to consumers. This study aimed to optimize the kombucha production process, considering data from the literature, its phenolic composition and antioxidant activity. Using a Central Composite Rotational Design, 11 fermentation conditions were investigated, varying the time (3 to 15 days) and the amount of carbohydrate (50 to 110 grams). The results of the optimization process demonstrated a significant impact on the indirect variables volatile acidity (34.63 to 107.39), total soluble solids (5.0 to 10.2), ratio (0.11 to 0.37) and alcohol content (0.0 to 1.8), identifying three promising conditions for further investigation. The centesimal composition of the three kombuchas analyzed revealed adequate moisture contents (87.86 to 90.17%) and minimal amounts of ash (0.04 to 0.05%), proteins (0.01 to 0.05%) and lipids (0.03 to 0.06%), with low carbohydrate concentration (9.67 to 12.05%) and low total energy value (39.39 to 48.46 kcal/100 mL). Four phenolic compounds were identified in the beverages, including chlorogenic acid, caffeine, rutin and cinnamic acid, associated with benefits such as antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity. The study on oxidative stress and antioxidant activity levels of the beverages indicated absence of toxicity and pro-oxidant and antioxidant activity in kombuchas. These findings contribute significantly to the scientific community by expanding knowledge about kombucha, as well as to the food industry, providing practical information for optimized production, with market potential for ensuring uniform and safe manufacturing.

**Keywords:** Functional Beverage. Production. Bioactive Compounds. Benefits. Antioxidant Activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Kombucha com adição de SCOBY em processo fermentativo .....	18
<b>Figura 2.</b> Estrutura básica de um polifenol.....	22
<b>Figura 3.</b> Exemplo básico de um flavonoide .....	22
<b>Figura 4.</b> Processo de fermentação da kombucha.....	23
<b>Figura 5.</b> Chá com folhas de <i>Camellia sinensis</i> L. ....	25
<b>Figura 6.</b> Estrutura molecular da sacarose .....	26
<b>Figura 7.</b> Consórcio simbiótico SCOBY .....	27
<b>Figura 8.</b> Tamanho do mercado de kombucha .....	34
<b>Figura 9.</b> Etapas da preparação de kombucha .....	38

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Principais componentes identificados em kombuchas entre os anos 2020-2023...20	20
<b>Quadro 2.</b> Benefícios sobre a ingestão de kombuchas de chás verde e preto .....30	30
<b>Quadro 3.</b> Distribuição do número de larvas pelos grupos analisados nos experimentos .....46	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Níveis das variáveis propostas no estudo.....	36
<b>Tabela 2.</b> Matriz completa do delineamento experimental.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of Variance
ATT	Acidez Total Titulável
AV	Acidez Volátil
CCA	Centro de Ciências Agrárias
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
Eq	Equação
GSHNO	Grupamento Sulfídrico Não Proteico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFPI	Instituto Federal do Piauí
IL	Interleucinas
K	Kombucha
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPP	Ministro Petrônio Portella
PDA	Detector de Arranjo de Diodos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPGAN	Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição
PPGCF	Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
PRPG	Pró-Reitoria de Pós-Graduação
SCOBY	Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast
SOD	Superóxido Dismutase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SST	Sólidos Solúveis Totais
UFPI	Universidade Federal do Piauí
VET	Valor Energético Total

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
<b>3.1</b>	<b>Origem e Caracterização da Kombucha</b> .....	18
<b>3.2</b>	<b>Composição Química</b> .....	19
<b>3.3</b>	<b>Fermentação da Kombucha</b> .....	23
<b>3.4</b>	<b>Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)</b> .....	24
<b>3.5</b>	<b>Sacarose</b> .....	26
<b>3.6</b>	<b>Aspectos Microbiológicos da Kombucha</b> .....	27
<b>3.7</b>	<b>Benefícios à Saúde</b> .....	29
<b>3.8</b>	<b>Legislação e Mercado Consumidor</b> .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1</b>	<b>Período do Estudo e Local da Pesquisa</b> .....	36
<b>4.2</b>	<b>Aquisição das Matéria-Prima</b> .....	36
<b>4.3</b>	<b>Protocolo Experimental</b> .....	36
<b>4.4</b>	<b>Preparação da Kombucha</b> .....	37
<b>4.5</b>	<b>Caracterização da Kombucha</b> .....	38
4.5.1	Potencial Hidrogeniônico (pH) .....	38
4.5.2	Acidez Total Titulável (ATT).....	39
4.5.3	Acidez Volátil (AV) .....	39
4.5.4	Sólidos Solúveis Totais (SST) .....	40
4.5.5	Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Volátil .....	40
4.5.6	Teor Alcoólico em Volume a 20°C.....	40
<b>4.6</b>	<b>Composição Centesimal e Valor Energético Total (VET)</b> .....	41
4.6.1	Umidade.....	41
4.6.2	Cinzas .....	42
4.6.3	Lipídios .....	42
4.6.4	Proteínas .....	43
4.6.5	Carboidratos.....	43
4.6.6	Valor Energético Total (VET) .....	43
<b>4.7</b>	<b>Análise de Compostos Fenólicos Totais</b> .....	44
4.7.1	Elaboração dos Extratos .....	44
4.7.2	Determinação de Compostos Fenólicos Totais.....	44
<b>4.8</b>	<b>Identificação dos Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a Arranjo de Diodo (HPLC-PDA)</b> .....	45
<b>4.9</b>	<b>Avaliação da Atividade Antioxidante e Estresse Oxidativo</b> .....	46
4.9.1	Teste de Sobrevivência .....	46
4.9.2	Determinação da Atividade Antioxidante .....	47
4.9.3	Melanina (Pigmentação).....	47
4.9.4	Catalase .....	47
4.9.3	Avaliação dos Grupamentos Sulfídricos Não Proteicos (GSHNP) .....	48
4.11	Análise Estatística.....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>5.1</b>	<b>Artigo Científico I</b> .....	49
<b>5.2</b>	<b>Artigo Científico II</b> .....	59

5.3	Artigo Científico III .....	69
5.4	Artigo Científico IV .....	101
5.5	Artigo Científico V .....	119
6	CONCLUSÕES GERAIS .....	139
7	SUGESTÕES E CONTRIBUIÇÕES .....	140
7.1	Sugestões .....	140
7.2	Contribuições .....	140
	REFERÊNCIAS .....	142
8	ANEXOS .....	147
8.1	Anexo 1 – Tabela de Porcentagem de Álcool em Volume 20°C (%v/v) .....	147
9	APÊNDICES .....	152
9.1	Curva Padrão de Ácido Gálico .....	152

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos saudáveis e/ou funcionais cresce exponencialmente surgindo novas oportunidades de negócios baseando-se em bebidas funcionais e produtos alimentares com baixo valor calórico que forneçam efeitos fisiológicos benéficos ao consumidor (Chen; Liu, 2021; Cardoso *et al.*, 2020).

Nesse seguimento de produtos com propriedades funcionais, destaca-se a kombucha, uma bebida fermentada de origem oriental, tradicionalmente formada a partir da fermentação do chá verde (*Camellia sinensis* L.) ou preto com adição de carboidrato e uma cultura simbiótica de microrganismos denominada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*). O processo de produção da bebida é, em sua grande maioria artesanal, trazendo uma simbiose entre bactérias acéticas, ácido lácticas e leveduras osmofílicas inseridas em uma rede de celulose responsáveis pelo processo de fermentação, resultando assim um produto refrescante, agridoce e levemente carbonatado (Leonarski *et al.*, 2020).

Além dos aspectos sensoriais atrativos, a bebida apresenta uma expressiva composição de compostos bioativos, ácidos orgânicos, etanol, vitaminas hidrossolúveis e uma variedade de micronutrientes produzidos durante a fermentação e que variam de acordo com o tipo de chá, fonte de carboidrato, microrganismos presentes no SCOBY, tempo e temperatura de fermentação utilizados na sua produção (Antolak; Piechota; Kucharska, 2021, Cardoso *et al.*, 2020).

Tendências de mercado têm demonstrado aumento no consumo de kombucha em países ocidentais devido ao *marketing* promovido pelos fabricantes, que reforçam os potenciais benefícios à saúde pelo consumo da bebida (Kapp; Sumner, 2019). Há algumas evidências que descrevem os efeitos da ingestão de kombucha na melhora da microbiota intestinal, sistema imunológico, doenças gastrintestinais, prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e infecções microbianas, além da bebida possuir propriedades hipoglicêmicas e antilipidêmicas, contém expressiva atividade antioxidante e entre outras funcionalidades que variam conforme o seu processo produtivo (Aloulou *et al.*, 2012; Chen, 2006; Chen; Liu, 2021; Chu; Malbasa *et al.*, 2011; Greenwalt *et al.*, 2000; Ilicic *et al.*, 2012; Malbasa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o interesse no consumo de kombucha tem se baseado na busca por um estilo de vida mais saudável, com preferência por produtos minimamente processados, sem aditivos químicos e com alto valor nutricional. Para este propósito, a kombucha se apresenta

como uma bebida natural, onde seus componentes nutricionais são diversos com aplicação na saúde de maneira integral (Villareal-Soto *et al.*, 2018).

As variações no processo de produção da kombucha abrem lacunas e aumentam a necessidade de pesquisas que padronizem as características da bebida durante o seu processamento, uma vez que, a composição e a concentração de metabólitos formados durante a fermentação dependem da fonte de inóculo, da concentração de carboidrato, do tipo de chá, do tempo de fermentação e a temperatura usada. Qualquer mudança nas condições do processo de fermentação pode afetar o produto final. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver e otimizar kombucha de chá verde (*Camellia sinensis* L.).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Desenvolver e otimizar kombucha de chá verde (*Camellia sinensis* L.).

### **2.2 Específicos**

- Mapear dados bibliográficos sobre processamento e efeitos benéficos da kombucha de chá verde;
- Otimizar o processo de produção da kombucha de chá verde;
- Analisar os parâmetros físico-químicos e químicos da kombucha de chá verde;
- Determinar e identificar os compostos fenólicos presentes na kombucha de chá verde;
- Verificar a atividade antioxidante da kombucha de chá verde;
- Avaliar o nível de estresse oxidativo da kombucha de chá verde.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Origem e Caracterização da Kombucha

O surgimento histórico da kombucha é marcado no ano de 200 a.C. na China como uma bebida dos grandes imperadores utilizada para dar vitalidade e tratar doenças gastrintestinais e, desde então, tornou-se um dos mais populares alimentos fermentados consumidos no oriente. A kombucha é uma bebida fermentada elaborada com base no chá verde (*Camellia Sinensis* L.) ou oriundo do chá preto com adição de carboidrato de diversas fontes, sendo o açúcar proveniente da cana-de-açúcar (sacarose) o mais utilizado (Martinez *et al.*, 2018).

Esta bebida fermentada, resulta de um dos métodos mais antigos de conservação de alimentos, bem como é um processo de preservação de energia de baixo custo, essencial para garantir a vida e a segurança dos alimentos. Muitas alterações bioquímicas ocorrem durante a fermentação e podem afetar a composição nutricional e conseqüentemente as propriedades do produto final, como a bioatividade. Esse bioprocessamento é aplicado para a produção e extração de compostos bioativos de vegetais em indústrias de alimentos e bebidas (Hur *et al.*, 2014).

**Figura 1.** Kombucha com adição de SCOBY em processo fermentativo.



Fonte: Soares *et al.* (2023).

Na kombucha é acrescentado um consórcio simbiótico de bactérias acéticas, ácido láctico e leveduras osmofílicas em um biofilme que recebe o nome de SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) que serão responsáveis por consumir o carboidrato do chá transformando-o em uma bebida naturalmente gaseificada repleta de compostos bioativos, ácidos orgânicos e uma expressiva composição de micronutrientes altamente benéficos à saúde (Leonarski *et al.*, 2020).

A produção da kombucha é simples e pode ser feita de forma artesanal ou industrial, levando em considerações os ingredientes base e o processo produtivo. A fermentação da bebida ocorre de forma natural em condições aeróbicas, durante um período de dias que podem variar com influência positiva sobre a sua composição biológica (Primiani *et al.* 2018).

A kombucha ganhou imensa popularidade nos últimos tempos devido aos seus benefícios para a saúde partindo do seu consumo. Os efeitos desta bebida são aplicados, principalmente, pela ação dos ácidos orgânicos, polifenóis e outros metabólitos secundários que são produzidos durante a sua fermentação, com impacto no organismo, observando a interação dos componentes químicos (Watawana *et al.*, 2017).

### **3.2 Composição Química**

O conhecimento da composição e propriedades da kombucha é um ponto fundamental para o entendimento e a aplicação dos seus atributos, seja nos aspectos sensoriais voltados para o consumo ou benefícios em que a bebida fornece à saúde. No entanto, a composição e a concentração de compostos presentes no conteúdo da kombucha dependem de algumas variáveis como: SCOBY, concentração de carboidrato, tipo de chá, tempo de fermentação e a temperatura usada. Qualquer mudança nessas condições do processo de fermentação pode afetar o produto final e, conseqüentemente, alterar a formação dos compostos provenientes da fermentação (Kumar; Joshi, 2016).

Os principais componentes químicos identificados em kombuchas produzidas com chá verde e chá preto entre os anos de 2020 a 2023 oriundos de estudos publicados nas fontes de dados *ScienceDirect* e *Web of Science* podem ser visualizados no Quadro 1.

**Quadro 1.** Principais componentes identificados em kombuchas entre os anos 2020 a 2023.

<b>AUTOR/ANO</b>	<b>ERVA</b>	<b>SACAROSE</b>	<b>TEMPO DE FERMENTAÇÃO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>COMPONENTE</b>
Dartora <i>et al.</i> (2023)	Chá verde	25g/L	14 dias	25°C	Polifenóis, taninos condensados e ácido acético.
Wang <i>et al.</i> (2022)	Chá verde e chá preto	100g/L	04 dias	25°C	Ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico e ácido oxálico.
Noronha <i>et al.</i> (2022)	Chá preto	50g/L	07 dias	25°C	Ácido gálico, ácido acético e epigallocatequina.
Cardoso <i>et al.</i> (2020)	Chá verde e chá preto	50g/L	10 dias	25°C	Polifenóis, flavonóides e ácido acético.

Fonte: ScienceDirect e Scopus (2023)

O tipo de erva condiciona a formação de metabólitos gerados durante a fermentação da bebida. Esse ponto pode apresentar variação durante seu processo produtivo, mostrando-se como uma variável relevante para que o surgimento dos compostos bioativos seja expressivo. Existem outros estudos que trabalham com matérias-primas alternativas além do chá verde e chá preto na elaboração da kombucha e que, dependendo do vegetal, a concentração de determinados metabólitos pode aumentar ou diminuir, tendo influência significativa sobre a composição química da bebida (Khosravi, 2019; Wang *et al.*, 2022).

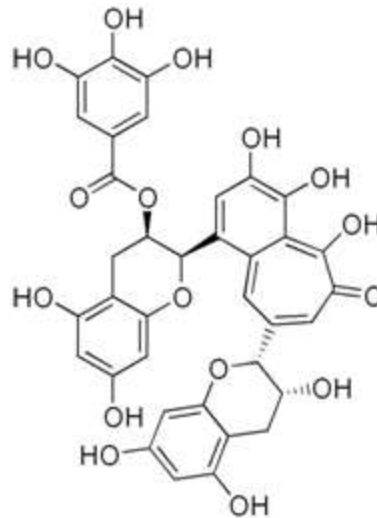
Além disso, a concentração de carboidrato (sacarose), outra variável de influência sobre a kombucha, pode diferir de uma fermentação para outra, o que indica que a via metabólica nem sempre ocorre da mesma forma. A composição química, bem como a concentração de cada metabólito produzido na kombucha, sempre dependerá da fonte de inóculo e assim por diante. Como uma das respostas à concentração de carboidrato, a bebida pode expressar teores de álcool diferentes, fazendo necessário sua observação para a classificação correta de bebida com ou sem teor alcoólico, conforme legislação (Brasil, 2019; Kumar; Joshi, 2016; Wang *et al.*, 2022).

O tempo e a temperatura de fermentação são outros aspectos que apresentam impacto perceptível no processo fermentativo e no surgimento de compostos. Suas influências podem expressar aumento ou diminuição de condições diretas, como a acidez e o pH, afetando para além da composição química, isto é, podendo refletir nos aspectos sensoriais, de qualidade e de estabilidade sobre o produto (Dartora *et al.*, 2023).

Dentro dessas variações, os componentes químicos expressos na kombucha podem ser divididos em classes de polifenóis, flavonóides e de ácidos orgânicos, o que corrobora os resultados que são encontrados na maioria dos estudos que trabalham com a identificação dessas substâncias (Martinez *et al.*, 2018; Villareal-Soto *et al.*, 2018).

Os polifenóis identificados na kombucha são substâncias bioativas, amplamente encontradas através do metabolismo de vegetais e que desempenham funções essenciais, principalmente como agentes antioxidantes. A estrutura dos polifenóis conferem uma poderosa capacidade eliminadora de radicais livres, potencial de quebra de cadeia de radicais livres e quelação de íons metálicos (Del Campo *et al.*, 2023).

**Figura 2.** Estrutura básica de um polifenol.

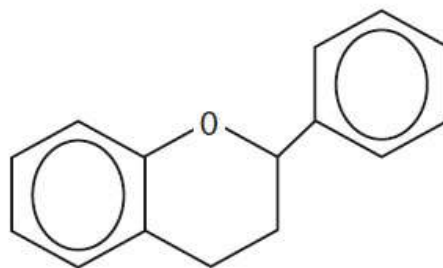


Fonte: Del Campo *et al.* (2023).

Os polifenóis protegem os tecidos e células do corpo contra danos induzidos pelo estresse oxidativo através de vários mecanismos, incluindo aumento das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, prevenção da esteatose hepática, alterações relacionadas ao metabolismo lipídico e modulação da sinalização relacionada ao estresse oxidativo (Videla; Valenzuela, 2022).

A classe dos flavonóides, por sua vez, possuem estrutura básica formada por C6-C3-C6. Dependendo do número de carbono encontrado na sua estrutura química, lugar e combinação dos grupamentos participantes da molécula, os flavonóides podem ser classificados em: antocianinas, flavonas, flavonóis, auronas, cauconas, isoflavonas, flavononas, catequinas e dihidroflavonois (Villareal-Soto *et al.*, 2018).

**Figura 3.** Exemplo básico de um flavonoide.



Fonte: Del Campo *et al.* (2023).

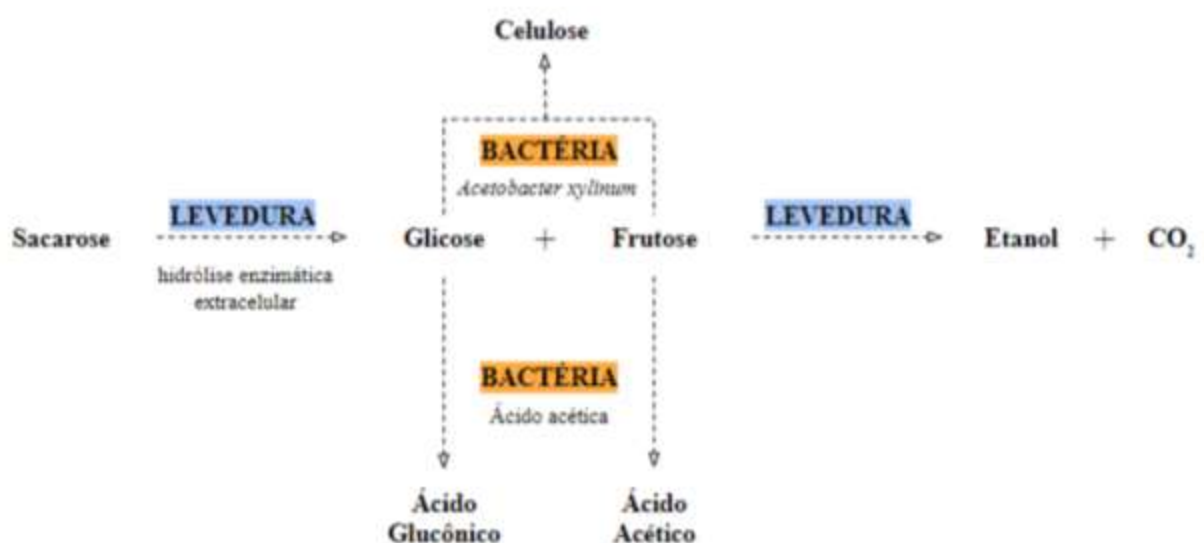
Os flavonóides possuem várias atividades biológicas, como ação anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana, antialérgica e vasodilatadora, e estão associados à prevenção de doenças crônicas, sendo fortes benefícios relatados sobre a ingestão de kombucha (Chen; Liu, 2021; Villareal-Soto *et al.*, 2018).

A produção de ácidos orgânicos por meio da fermentação de kombucha proporciona a formação de ácidos que impactam sobre o sabor da bebida. Dentro do processo fermentativo são formados diversos ácidos como: acético, glucônico, glucurônico, cítrico, L-lático, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico e úsnico, que diminuem o pH e protegem a bebida de contaminações (Jayabalan *et al.*, 2014).

### 3.3 Fermentação da Kombucha

O processo de fermentação da kombucha ocorre de forma natural em condições aeróbicas, durante um período que pode variar de 3 a 60 dias. A enzima invertase, produzida por algumas leveduras, é responsável por clivar a sacarose em glicose e frutose presente nos carboidratos contidos na bebida. As leveduras, por sua vez, convertem a glicose em etanol e dióxido de carbono. O dióxido de carbono reage com a água formando ácido carbônico. Esse mecanismo fermentativo pode ser observado na Figura 4 (Primiani *et al.*, 2018).

**Figura 4.** Processo de fermentação da kombucha.



Fonte: Villareal-Soto *et al.* (2018)

Bactérias e algumas leveduras presentes no processo de fermentação da kombucha oxidam parte do etanol, produzindo ácido acético. Além disso, enquanto uma quantidade substancial de frutose permanece não fermentada, ácido glucônico e glucurônico são produzidos através da oxidação da glicose. Assim, durante a fermentação da kombucha, o pH do chá que inicialmente é em torno de 5 diminui, por conta do aumento da concentração de ácido acético e outros ácidos orgânicos formados pelo processo (May *et al.*, 2019).

O pH é outro parâmetro que está ligado ao crescimento bacteriano, impedindo o desenvolvimento da maioria dos microrganismos patogênicos. Na kombucha, esse valor apresenta-se superior a 3. Além do ácido acético e glucônico, diversos outros metabólitos podem ser produzidos durante a fermentação da kombucha, como ácido lático, tartárico e cítrico na bebida (Villareal-Soto *et al.*, 2018).

Concomitantemente, diversos outros fatores podem influenciar na composição e concentração dos metabólitos produzidos durante a fermentação, como a concentração de carboidrato e chá, temperatura de fermentação, quantidade de oxigênio, CO<sub>2</sub> dissolvido, fornecimento de precursores e taxa de cisalhamento do fermentador. O resultado do processo é uma bebida levemente gaseificada, agridoce e refrescante, composta por diversos ácidos, aminoácidos, vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas (Watawana *et al.*, 2015; Villareal-Soto *et al.*, 2018).

Embora tenha sido relatado um aumento na atividade antioxidante com um maior tempo de incubação, a fermentação prolongada não é recomendada devido ao acúmulo de ácidos orgânicos que podem atingir níveis prejudiciais para o consumo humano, tornando essencial o seu controle conforme o grau de processamento da bebida. A seleção do tempo da duração da fermentação também influencia nos atributos sensoriais do produto final. Um período de fermentação entre 6 a 10 dias dará origem a uma bebida refrescante e frutada, enquanto que fermentações mais prolongadas resultam em uma bebida com sabor de vinagre (Velicanski *et al.*, 2014).

### **3.4 Chá Verde (*Camellia sinensis* L.)**

O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* L. (chá verde) é uma das bebidas não alcoólicas de maior aceitação e a mais consumida no mundo. O chá é utilizado na China há aproximadamente três mil anos sendo considerado pelos orientais uma bebida saudável e revitalizante. Os chás dessa planta são classificados em três tipos básicos:

verde, preto e *oolong*, sendo diferenciados pelo beneficiamento das suas folhas (Tanaka; Kouno, 2003).

**Figura 5.** Chá com folhas de *Camellia sinensis* L.



Fonte: Google Imagens (2024).

O chá verde é produzido a partir de folhas frescas da planta, as quais são apenas escaldadas e fervidas, ocorrendo uma rápida inativação da enzima polifenol oxidase, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas e compostos com atividades funcionais. O chá preto é derivado de folhas envelhecidas pela oxidação aeróbica das catequinas, ocorrendo uma fermentação. Por sua vez, o chá *oolong* é considerado intermediário ou “parcialmente oxidado”, pois é obtido por meio de um processo de fermentação mais brando, em que as folhas ficam em repouso de duas a quatro horas, sendo, depois, aquecidas para que o processo oxidativo seja interrompido, tendo, assim, um aroma menos acentuado que o chá preto (Tanaka; Kouno, 2003).

No ocidente, ao contrário dos países orientais, o chá mais consumido ainda é o preto, embora o consumo de chá verde venha crescendo principalmente devido ao reconhecimento e divulgação de suas propriedades funcionais. Em consequência de seus compostos diferenciais e de seu sabor menos intenso, relacionado ao seu menor teor de inativação enzimática, o chá verde é utilizado como substrato da produção de kombucha (Watawana *et al.*, 2017).

A composição química do chá verde inclui diversas classes de compostos fenólicos ou flavonoides, entre eles os principais presentes são os monômeros de catequinas, além de flavonóis e ácidos fenólicos. Também possui cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e

micronutrientes como vitaminas do complexo B, vitamina E, vitamina C e minerais como cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro (Martinez *et al.*, 2018).

A atividade antioxidante é uma das propriedades mais conhecidas do chá verde e está relacionada à estrutura química das catequinas, sendo apontada como o principal fator contribuinte na prevenção do risco de diversas doenças crônico-degenerativas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (Malbasa *et al.*, 2008; Chu; Chen, 2006).

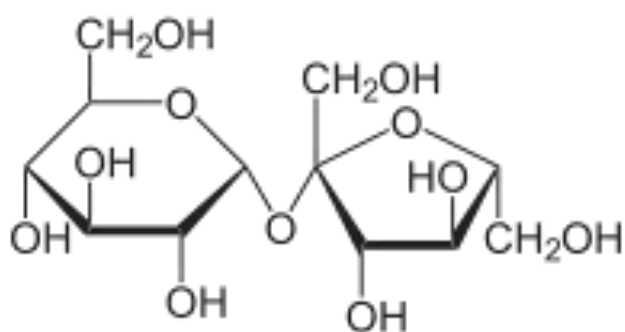
### 3.5 Sacarose

A fonte de carboidrato é essencial no processo fermentativo da kombucha, pois este é o substrato utilizado pela cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). O tipo de carboidrato e a proporção adequada é de fundamental importância, onde a quantidade excessiva pode resultar em uma bebida mais ácida, podendo até resultar em alterações tanto na composição química quanto nas características sensoriais (Jayabalan *et al.*, 2014).

Nesse sentido, a sacarose é a fonte de carboidrato mais tradicional utilizado para a preparação de kombucha e foi investigada por autores que também mapearam as principais vias de conversão da sacarose em componentes químicos presentes na bebida (Watawana *et al.* 2017).

A sacarose é um tipo de açúcar encontrado naturalmente em muitas plantas, sendo uma forma comum de carboidrato. É um dissacarídeo composto por duas moléculas simples de açúcar: glicose e frutose unidas por uma ligação O-glicosídica proveniente da reação entre a hidroxila de uma glicose com o carbono anomérico de outra (Lehninger *et al.*, 2018).

**Figura 6.** Estrutura molecular da sacarose.



Fonte: Lehninger *et al.* (2018).

Na produção de kombucha, a quebra da sacarose em glicose e frutose representa a forma de metabolização do substrato. As leveduras convertem o carboidrato em álcool e dióxido de carbono, enquanto as bactérias acéticas produzem novas camadas de celulose no SCOBY e metabolizam também o álcool produzido pelas leveduras em ácidos orgânicos, aumentando de forma expressiva o teor de ácidos identificados na bebida conforme o tempo de fermentação (Jayabalan *et al.*, 2014).

### 3.6 Aspectos Microbiológicos da Kombucha

A kombucha é obtida a partir da fermentação promovida por um consórcio simbiótico formado por bactérias ácido acéticas como as *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e espécies de *Acetobacter*; bactérias ácido lácticas como as *Lactobacillus* e *Lactococcus*; e leveduras como as *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii* e *Brettanomyces bruxellensis* denominado SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) (Marsh *et al.*, 2014; Watawana *et al.*, 2017).

O SCOBY é uma simbiose de bactérias e leveduras unidas por uma película polimérica de celulose que forma um biofilme flutuante no chá, compondo dois compartimentos não mutuamente exclusivos: um líquido e o outro sólido. Todos os microrganismos deste consórcio alimentam-se do carboidrato adicionado à bebida (preferindo a glicose à frutose).

**Figura 7.** Consórcio simbiótico SCOBY.



Fonte: Leonarski *et al.* (2020).

A composição microbiana do SCOBY pode variar entre as fermentações, de acordo com sua origem, clima, localização geográfica e meio utilizado para o processo de fermentação. Apesar disso, há um certo número de espécies que aparece frequentemente na maioria das culturas de kombucha. O processo de identificação desses agentes é complexo, o que dificulta sua descrição em alguns estudos (Soares *et al.*, 2023; Watawana *et al.*, 2017).

Grande parte desses microrganismos têm papéis bem estabelecidos na fermentação da kombucha. No entanto, a composição da microbiota pode variar entre muitas espécies e suas interações ainda não estão bem caracterizadas. Do ponto de vista da composição microbiana, a bebida parece fornecer uma ampla fonte de bactérias probióticas e leveduras, porém mais pesquisas ainda precisam ser realizadas para apoiar esse e outros benefícios relatados pelos consumidores e comprovar os reais benefícios que a kombucha pode trazer para o organismo de seres humanos (Soares *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2015).

Inicialmente, a fermentação ocorre a partir de microrganismos osmotolerantes e depois é dominada por espécies tolerantes ao ácido. Devido à coexistência de diversas espécies de microrganismos no meio, na kombucha há uma combinação de três tipos de fermentação: alcoólica, láctica e acética (Villareal-Soto *et al.*, 2018).

Como resultado de seu metabolismo, produzem álcool e diversos ácidos em quantidades variáveis, dependendo do tempo de fermentação e de demais condições do cultivo. Com o passar do tempo, o pH do meio é alterado, de aproximadamente 5 para 2,5, o que contribui para inibir o crescimento de bactérias potencialmente contaminantes, garantindo a presença somente das bactérias probióticas e leveduras do consórcio (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

O processo de fermentação leva à formação de um novo biofilme celulósico flutuante na superfície do meio devido à atividade de algumas cepas de bactérias. O desenvolvimento do biofilme continuará até a síntese atingir seu limite, crescimento até aprisionar todas as bactérias, que então se tornarão inativas devido ausência de oxigênio (Nguyen *et al.*, 2015).

Com isso as bactérias que permanecerem na fase líquida do meio de cultura estarão em um estado dormente e poderão ser reativadas e usadas como inóculo em uma nova fermentação. O material formado possui alta cristalinidade, resistência à tração, maleabilidade e pureza, o que o torna interessante para diversas aplicações biotecnológicas (Marsh *et al.*, 2014).

### **3.7 Benefícios à Saúde**

A popularidade do consumo de kombucha ocorre devido aos seus efeitos benéficos à saúde, aumentando o interesse sobre os estudos científicos que indicam os resultados positivos na prevenção e/ou tratamento de diversos tipos de doenças. No entanto, é importante notar que os achados podem variar conforme seu direcionamento. No Quadro 2 é possível visualizar os potenciais benefícios associados à ingestão de kombucha produzidas com chá verde e/ou chá preto na fonte de dados MEDLINE/PubMed.

**Quadro 2.** Benefícios sobre a ingestão de kombuchas de chás verde e preto.

AUTOR/ANO	ERVA	TIPO DE ESTUDO	TEMPO DE INTERVENÇÃO	BENEFÍCIO	PRINCIPAIS RESULTADOS
Mendelson <i>et al.</i> (2023).	Chá verde	Ensaio clínico	56 dias	Ação hipoglicêmica	↓ significativamente os níveis médios de glicose no sangue em jejum em comparação com o valor basal.
Costa <i>et al.</i> (2022)	Chá verde e chá preto	Ensaio clínico	70 dias	Modulação intestinal	↑ da produção de propionato e melhora no crescimento de bactérias benéficas como <i>Adlercreutzia</i>
Moreira <i>et al.</i> (2022)	Chá verde	Ensaio clínico	09 dias	Tolerância à glicose e esteatose hepática	↑ tolerância à glicose, ↓ hiperinsulinemia, ↓ das atividades da enzima citrato sintase e fosfofrutoquinase-1, ↓ negativa do receptor de ácido biliar acoplado à proteína G, também conhecido como TGR5 e expressão do gene do receptor farnesol X e esteatose atenuada e hepática deposição de fibras de colágeno.
Cardoso <i>et al.</i> (2021)	Chá verde e chá preto	Ensaio clínico	56 dias	Estresse oxidativo, inflamação hepática, esteatose hepática e glicemia	Melhora na glicose, capacidade antioxidante total do plasma, na atividade da superóxido dismutase e ↓ a concentração de óxido nítrico; ↓ a inflamação sistêmica ao diminuir a relação neutrófilos/linfócitos, ↓ tecido adiposo total e os triglicerídeos sanguíneos e reverteram a esteatose hepática (de grau 2 para 1), além da modulação de genes relacionados à adipogênese e β-oxidação
Wang <i>et al.</i> (2021)	Chá verde	Ensaio clínico	60 dias	Sepse e atividade antiinflamatória	↓ níveis de fator de necrose tumoral-α e interleucinas (IL)-1β e IL-6, restaurou os níveis de células T e macrófagos em camundongos desafiados com lipopolissacarídeos, aliviou o dano histopatológico e inibiu a sinalização de NF-κB em camundongos com sepsis.
Wang <i>et al.</i> (2014)	Chá preto	Ensaio clínico	35 dias	Atividade hepatoprotetora	Inibiram significativamente o aumento de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, triglicerídeo e malondialdeído.
Aloulou <i>et al.</i> (2012)	Chá preto	Ensaio clínico	30 dias	Atividades hipoglicêmicas e	Inibidor das atividades de α-amilase e lipase no plasma e no pâncreas e um melhor supressor do ↑ dos níveis de glicose no

AUTOR/ANO	ERVA	TIPO DE ESTUDO	TEMPO DE INTERVENÇÃO	BENEFÍCIO	PRINCIPAIS RESULTADOS
				antilipidêmicas	sangue. ↓ colesterol LDL e triglicerídeos e um ↑ significativo no colesterol HDL. ↓ significativas nas atividades da aspartato transaminase, alanina transaminase e gama-glicamil transpeptidase no plasma, bem como em o conteúdo de creatinina e ureia.

Fonte: MEDLINE/PubMed (2024)

As pesquisas que cercam o consumo do kombucha relatam os efeitos e seus principais constituintes na saúde. As mudanças bioquímicas que ocorrem durante a fermentação e afetam a composição nutricional e, conseqüentemente, as propriedades do produto final como a bioatividade (Kumar; Joshi, 2016).

As evidências apresentam positividade sobre a ingestão de kombucha na melhora da microbiota intestinal e com impacto nos diversos sistemas e condições como: sistema imunológico, doenças gastrintestinais, prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e infecções microbianas, além da bebida possuir propriedades hipoglicêmicas e antilipidêmicas, contém expressiva atividade antioxidante e entre outras funcionalidades que variam conforme o seu processo produtivo (Aloulou *et al.*, 2012; Chen, 2006; Chen; Liu, 2021; Chu; Malbasa *et al.*, 2011; Greenwalt *et al.*, 2000; Ilicic *et al.*, 2012; Malbasa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009).

A atividade antimicrobiana e antifúngica da kombucha é atribuída ao pH ácido da bebida, devido a presença de compostos como os ácidos orgânicos, e principalmente do ácido acético e das catequinas, que inibem o crescimento de uma série de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, como *Helicobacter pylori*, causador de úlceras pépticas, e *Escherichia coli*, causador da diarreia comum. Substratos para fermentação de kombucha contém antioxidantes que se originaram das folhas de chá (Villareal-Soto *et al.*, 2018).

Estes são principalmente polifenóis, especialmente catequinas, que pertencem ao grupo dos flavonoides. Além de polifenóis, a bebida de kombucha contém vitamina C, B2, B6 e catalase, que têm uma capacidade de aprisionamento de radicais livres ou podem atuar sinergicamente com antioxidantes como o ácido cítrico (Mohammadsshirazi; Kalhor, 2016).

A presença do ácido glucurônico na kombucha proporciona benefícios à saúde, auxiliando na eliminação de impurezas e toxinas prejudiciais à saúde. A conjugação do ácido glucurônico com compostos indesejáveis aumenta a sua solubilidade e facilita seu transporte e eliminação do corpo. A bebida também fortalece o sistema imunológico, agindo como uma bebida probiótica, equilibrando a microbiota gastrointestinal (Jayabalan *et al.*, 2014).

### **3.8 Legislação e Mercado Consumidor**

O mercado de kombucha está em crescimento, impulsionado pelo aumento da demanda por produtos alimentícios e bebidas saudáveis. O consumo da bebida tem ganhado popularidade em todo o mundo e muitas pessoas produzem a kombucha de forma artesanal

com pouco ou praticamente nenhum tipo de controle sobre as características de qualidade, no que tange padrões físico-químicos e microbiológicos (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

Aliado ao grande interesse em ampliar o processo de fermentação para atender às demandas da indústria de alimentos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou para consulta pública, em junho de 2018, as normas que pretendiam estabelecer os padrões de identidade e qualidade das kombuchas produzidas e comercializadas no país (MAPA, 2018). O resultado foi a Instrução Normativa nº 41/2019, publicada no Diário Oficial da União em setembro de 2019. Dessa forma, o Brasil se tornou o primeiro país do mundo a possuir uma legislação específica referente a kombucha, exigindo dos fabricantes os parâmetros exibidos (Brasil, 2019).

A instrução normativa preconizou alguns critérios inerentes sobre a bebida, apresentando como padrões de identidade e qualidade os parâmetros analíticos de potencial hidrogeniônico (2,5 a 4,2), graduação alcoólica (0 a 0,5% v/v sem álcool; 0,6 a 0,8% v/v com álcool), acidez volátil (30 mEq/L a 130 mEq/L) e pressão (1,1 atm a 3,9 atm). A legislação também autorizou o uso de processos tecnológicos adequados para a produção da kombucha, como pasteurização, filtração e ultracentrifugação e veda a adição de microrganismos após o processo de fermentação (Brasil, 2019).

De acordo com Mordor Intelligence Research & Advisory (2023), que cobre o relatório, análise e receita global do mercado de kombucha, o aumento na comercialização de kombucha deverá crescer de US\$ 2,71 bilhões em 2023 para US\$ 4,26 bilhões até 2028, com um aumento de 9,48% durante o período de previsão (2023-2028).

**Figura 8.** Tamanho do mercado de kombucha.

Fonte: Mordor Intelligence (2023).

Durante o surto da pandemia do COVID-19 ocorreu o fechamento de vários negócios, fábricas e armazéns devido ao isolamento social e bloqueios implementados pelo governo de vários países como medida de segurança. No entanto, o mercado produtor de kombucha registou um aumento significativo na procura, uma vez que as lojas de conveniência e de medicamentos permaneceram em funcionamento para oferecer produtos essenciais de saúde aos consumidores. Conforme o estudo do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), o consumo de kombucha auxilia no apoio ao sistema imunológico devido às suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e redutoras do colesterol, o que impulsionou ainda mais as vendas durante o período pandêmico (Mordor Intelligence, 2023).

O aumento da consciência sobre a saúde entre os consumidores e a preferência por uma hidratação saudável é um fator crucial para impulsionar o mercado. A necessidade de complementar a ingestão nutricional diária de micronutrientes para extrair os componentes perdidos em hábitos alimentares deficientes impulsionou principalmente as vendas de kombucha. Os consumidores estão cada vez mais conscientes das implicações para a saúde associadas às categorias de refrigerantes. Assim, os consumidores preocupados estão migrando para bebidas saudáveis, como a kombucha e outras bebidas funcionais (Mordor Intelligence, 2023).

No Brasil, a kombucha tem conquistado espaço nas prateleiras de supermercados, lojas de produtos naturais e também em estabelecimentos de alimentos e bebidas especializados. Consumidores brasileiros têm demonstrado interesse em opções mais saudáveis e alternativas naturais para substituir bebidas açucaradas e processadas (Soares *et al.*, 2023).

A diversificação de sabores e as propriedades à saúde do consumidor de kombucha têm contribuído para sua aceitação entre diferentes grupos demográficos. Além disso, a crescente preocupação com a saúde intestinal e o aumento da procura por alimentos fermentados têm impulsionado o interesse pelo kombucha no Brasil (Soares *et al.*, 2023).

Nesse panorama, é notável perceber a importância desempenhada pelo consumo de kombucha, seus principais benefícios e a grandiosidade que representa a identificação e padronização das suas etapas de processamento para a promoção de saudabilidade pela ingestão desse alimento, deixando claro a necessidade deste estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Período do Estudo e Local da Pesquisa

O projeto de tese foi desenvolvido durante o quadriênio 2020-2024 nas dependências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí *campus* Teresina Central (IFPI/Central), no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal, Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos e Laboratório de Química de Produtos Naturais; e na Universidade Federal do Piauí *campus* Ministro Petrônio Portella (UFPI/CMPP), no Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos, Laboratório de Compostos Antioxidantes, Laboratório de Propriedades Funcionais de Alimentos e Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia.

### 4.2 Aquisição das Matéria-Prima

Os insumos da produção de kombucha como chá verde e carboidrato (açúcar refinado de cana-de-açúcar/sacarose) foram obtidos no comércio varejista de Teresina, Piauí, Brasil em um único lote. O consórcio de microrganismos de bactérias e leveduras SCOBY foi adquirido em loja virtual do comércio nacional.

### 4.3 Protocolo Experimental

Foram estudadas 11 condições de fermentação, testando diferentes combinações entre quantidade de carboidrato (g) e tempo de fermentação (dias) observados em diferentes referências, sendo o experimento definido por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional 2/2, abrangendo os eixos centrais e axiais (Rodrigues; Iemma, 2014). As Tabelas 1 e 2 mostram o planejamento experimental adotado.

**Tabela 1.** Níveis das variáveis propostas no estudo.

Variáveis	-1	0	+1
<b>Carboidrato (g)</b>	50	75	100
<b>Tempo (dias)</b>	3	9	15

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

**Tabela 2.** Matriz completa do delineamento experimental.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Carboidrato (g)	Tempo (dias)
<b>K1</b>	-1	-1	50	3
<b>K2</b>	1	-1	100	3
<b>K3</b>	-1	1	50	15
<b>K4</b>	1	1	100	15
<b>K5</b>	-1,41	0	39,64	9
<b>K6</b>	1,41	0	110,36	9
<b>K7</b>	0	-1,41	75	0,51
<b>K8</b>	0	1,41	75	17,49
<b>K9</b>	0	0	75	9
<b>K10</b>	0	0	75	9
<b>K11</b>	0	0	75	9

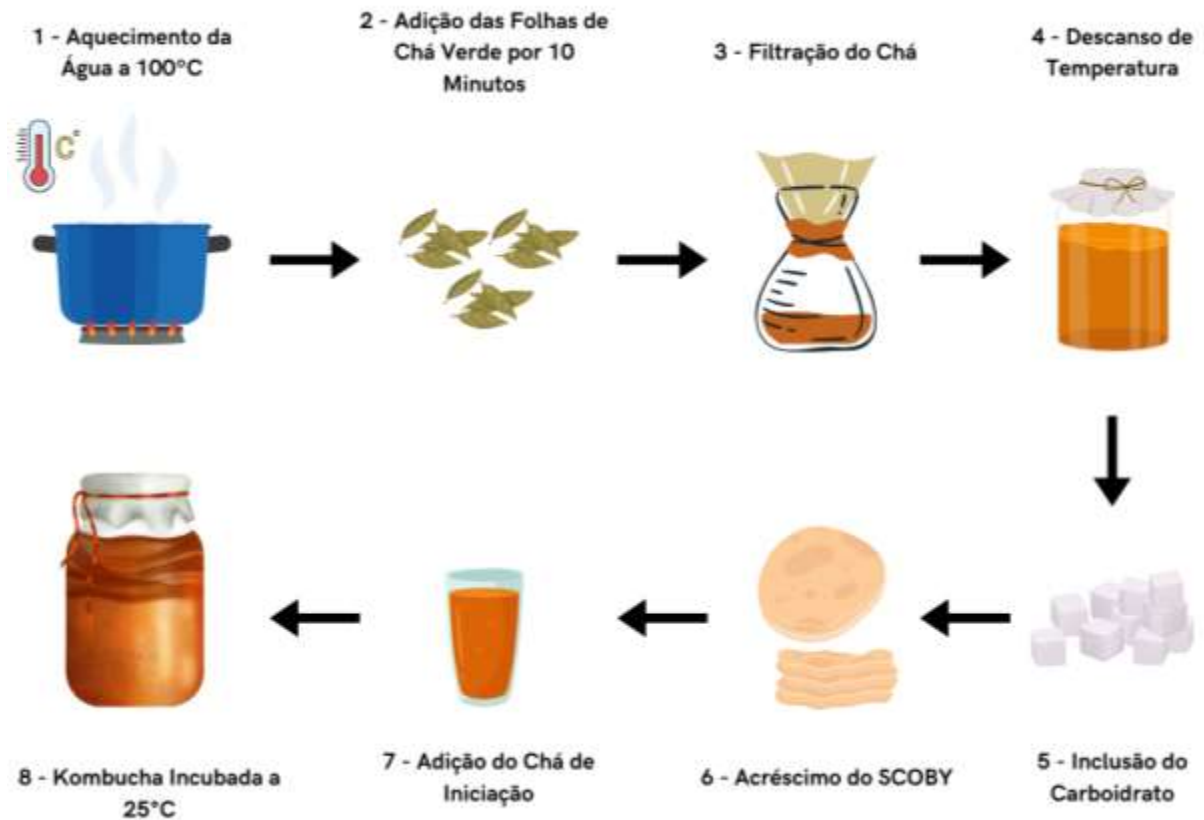
Fonte: Dados da pesquisa (2023).

#### 4.4 Preparação da Kombucha

As bebidas analisadas no estudo foram produzidas conforme a metodologia descrita por Cardoso *et al.* (2020) com algumas modificações. O chá verde das folhas de *Camellia sinensis* L. foi preparado na concentração padrão de 10 gramas de folhas selecionadas infundidas em 1L de água mineral com pH 8,34, aquecida a 100°C e com imersão das folhas durante o tempo de 10 minutos com a chama de aquecimento desligada. Após o período infusão, o chá foi filtrado em papel filtro e alocado em recipiente de vidro até atingir temperatura ambiente.

Com o chá nas condições de temperatura ambiental, adicionou-se o carboidrato conforme os valores descritos na Tabela 02 e o SCOBY simbiótico de bactérias e leveduras como agente de fermentação na quantidade de 9,5% de m/v, juntamente com 100 mL/L do chá de iniciação. O tempo de fermentação das kombuchas variaram conforme o protocolo mostrado na Tabela 2. As bebidas fermentaram em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), marca Quimis, com faixa de trabalho -10°C a 60°C, com temperatura controlada e fixada em 25°C. A Figura 9 demonstra o método adotado para a elaboração da bebida.

**Figura 9.** Etapas da preparação de kombucha.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

#### 4.5 Caracterização da Kombucha

Os aspectos físicos e físico-químicos da caracterização das bebidas ocorreram conforme a metodologia proposta pela AOAC (2005).

##### 4.5.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado utilizando potenciômetro de bancada Mettler-Toledo®. A calibração do potenciômetro foi ajustada com a solução tampão de pH 4,0 e pH 7,0. Foram preparadas amostras em triplicata de kombucha contendo 10 mL. Cada amostra foi diluída em 50 mL de água destilada e, após a homogeneização, feita a leitura do pH no equipamento.

#### 4.5.2 Acidez Total Titulável (ATT)

A acidez total titulável foi determinada por titulação onde 1,0 mL da amostra foi diluída em 50 mL de água destilada, adicionando 0,3 mL de solução de fenolftaleína 1%, prosseguindo com a titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, sob agitação até a viragem de cor, sendo aferido o volume gasto da solução de hidróxido de sódio. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido acético, conforme a Equação 1 (Eq. 1).

Eq. (1)

$$\text{Acidez Total Titulável} = \frac{V \times N \times FC \times 100}{P}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

FC = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

P = peso da amostra em grama.

#### 4.5.3 Acidez Volátil (AV)

A separação dos ácidos voláteis para determinação do teor de ácido volátil das bebidas aconteceu por meio do método arraste do vapor da água, dividido em duas etapas: destilação e titulação. A bebida foi destilada com a temperatura da amostra ajustada a 20°C e medida em 100 mL em um balão volumétrico, previamente lavado com água destilada por aproximadamente 4 vezes. Foram colocados 300 mL de água destilada no segundo balão do aparelho de destilação. Incluiu-se um erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador. Foi aquecido a água destilada e a amostra de kombucha a 100°C.

Os líquidos foram aquecidos no equipamento com a torneira de vapor aberta, para retirar o gás carbônico que se encontrava no aparelho. O vapor gerado da amostra arrastou o destilado da bebida, juntamente com o vapor da água destilada. Foi recolhido o destilado no erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador, anteriormente usado e imerso em banho de água e gelo. Ao destilado, acrescentou-se 0,3 mL fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 N até o aparecimento da cor rosada. Com os valores das reações, calculou-se os resultados expressos em miligramas de ácido acético, conforme a Equação 2 (Eq. 2).

Eq. (2)

$$\text{Acidez Volátil} = \frac{V \times N \times 24 \times 100}{P \times c}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

c = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

P = peso da amostra em grama.

Na fórmula acima o número 24 corresponde ao produto de N do NaOH x Eq. do ácido acético x Fator de conversão de litros para 100 mL x Fator de conversão de g para mg/volume da amostra, ou seja,  $(0,1 \times 60 \times 0,1 \times 1000) / 25$ .

#### 4.5.4 Sólidos Solúveis Totais (SST)

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado utilizando o refratômetro digital da marca Nova DR 500®. Para a determinação, utilizou-se 1 mL das amostras em um bécker. O aparelho foi calibrado com água destilada a 20 °C e em seguida a bebida foi adicionada no prisma do aparelho para a leitura. A análise ocorreu em triplicata com resultados expressos em °Brix.

#### 4.5.5 Relação Sólidos Solúveis Totais (SST) e Acidez Total Titulável (ATT)

A relação SST/ATT foi determinado utilizando os resultados de ambas as análises por meio da Equação 3 (Eq. 3).

Eq. (3)

$$\text{Relação} = \text{SST/ATT}$$

#### 4.5.6 Teor Alcoólico em Volume a 20°C

O teor alcoólico foi determinado pelo método de álcool em volume a 20°C, com verificação no picnômetro. A bebida foi destilada com a temperatura da amostra ajustada a 20°C e medida em 100 mL em um balão volumétrico, previamente lavado com água destilada por aproximadamente 4 vezes. Foi colocado 300 mL de água destilada no segundo balão do aparelho de destilação. Incluiu-se um erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador. Foi aquecido a água destilada e a amostra de kombucha a 100°C.

Os líquidos foram aquecidos no equipamento com a torneira de vapor aberta, para retirar o gás carbônico que se encontrava no aparelho. O vapor gerado da amostra arrastou o destilado da bebida, juntamente com o vapor da água destilada. Foi recolhido o destilado no erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador, anteriormente usado e imerso em banho de água e gelo.

A densidade relativa do destilado a 20°C foi aferida com o uso de picnômetro de vidro com capacidade de 50 mL previamente calibrado com água destilada a 20°C. O resultado foi obtido por meio da Equação 4 (Eq. 4) e expresso em % de álcool em volume por meio de tabela de conversão (Anexo 1).

Eq. (4)

$$\text{Densidade Relativa} = \frac{\text{PA} - \text{PPS}}{\text{PAD} - \text{PPS}}$$

Onde:

PA = peso da amostra;

PPS = peso do picnômetro seco;

PAD = peso da água destilada.

## 4.6 Composição Centesimal e Valor Energético Total (VET)

### 4.6.1 Umidade

A determinação de umidade foi realizada por meio do método gravimétrico. Foram pesados 5 mL da amostra em triplicata, em cápsula de porcelana previamente tarada. A cápsula com a amostra foi submetida a 105 °C em estufa (MODEL-1.2, Ribeirão Preto, Brasil) até peso constante. O teor de umidade (%) foi obtido pela aplicação da Equação 5 (Eq. 5).

Eq. (5)

$$\text{Teor de Umidade} = \frac{\text{N}}{\text{P}} \times 100$$

Onde:

N = número de gramas de umidade;

P = número de gramas da amostra.

#### 4.6.2 Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração em forno mufla (MA38512, São Paulo, Brasil) à temperatura de 550 °C, sendo os resultados obtidos em porcentagem. Foram pesados 3 mL da amostra, em triplicata, em cadinho previamente tarado. As amostras foram incineradas por 6 horas a 550 °C. Ao final, os cadinhos com amostra incinerada foram dessecados, para esfriar, por 60 minutos ou até total resfriamento e em seguida pesados. O teor de cinzas (%) foi obtido pela Equação 6 (Eq. 6).

Eq. (6)

$$\text{Teor de Cinzas} = N/P \times 100$$

Onde:

N = número de gramas de cinzas;

P = número de gramas da amostra.

#### 4.6.3 Lipídios

A determinação dos lipídios foi realizada pelo método de Bligh-Dyer (1959), onde 10 mL de cada amostra foi pesada em um béquer de 250 mL, adicionando 10 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol. Posteriormente, adicionou-se novamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água destilada, agitando a solução no agitador mecânico da marca Nova Técnica (modelo NT 145) por 15 minutos, em capela química.

O material homogeneizado foi filtrado, utilizando funil de vidro com papel filtro contendo sulfato de sódio anidro, em um funil de separação de 500 mL. Após completa separação e clarificação, a camada de clorofórmio (inferior) foi recolhida em balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL previamente tarado.

As amostras foram evaporadas em rotaevaporador até completa remoção do solvente. O balão foi transferido para estufa a 105°C por uma hora e resfriado em dessecador, com posterior aferição de pesos até obtenção de peso constante. Os dados da análise foram aplicados na Equação 7 (Eq. 7).

Eq. (7)

$$\text{Lipídios Totais} = 100 \times N / P$$

Onde:

P = massa da amostra em g;

N = (massa do balão + massa óleo) – massa do balão.

#### 4.6.4 Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de macro *Kjeldahl*, o qual teve como base a destruição da matéria orgânica (digestão) seguida de destilação, sendo o nitrogênio dosado por titulação. Foi utilizado um fator de conversão do teor de nitrogênio total em proteínas, considerando o número 5,75 pela matéria prima ser de origem vegetal.

Para a etapa da digestão, pesou-se de 0,5 mL de amostra em tubos de ensaio previamente tarados, sendo este conjunto colocado em tubo digestor juntamente com 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 4,5g de sulfato de potássio e 0,5g de sulfato de cobre. A digestão foi realizada a 350 °C durante, em média, 4 horas. Em seguida, as amostras foram destiladas e tituladas para determinação do nitrogênio e posterior cálculo do conteúdo de proteínas, utilizando-se a Equação 8 (Eq. 8).

Eq. (8)

$$\text{Proteína Bruta} = (V_a - V_b) \times F \times N \times 5,75 \times 0,014 \times 100 / P$$

Onde:

$V_a$  = volume de HCl 0,1N utilizado na titulação;

$V_b$  = volume de HCl 0,1N consumido pela prova do branco;

$F$  = fator de correção do HCl 0,1N

$N$  = normalidade;

5,75 = fator de transformação do nitrogênio em proteína;

0,014 = miliequivalente grama do nitrogênio;

$P$  = peso da amostra em g.

#### 4.6.5 Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido por diferença dos demais constituintes da composição centesimal (umidade, cinzas, lipídeos e proteínas).

#### 4.6.6 Valor Energético Total (VET)

O valor calórico das bebidas foi calculado utilizando os fatores de conversão de  $Atwater = (\% \text{ proteína} \times 4) + (\% \text{ lipídeos} \times 9) + (\% \text{ carboidratos} \times 4)$  (Watt; Merrill, 1963).

## 4.7 Análise de Compostos Fenólicos Totais

### 4.7.1 Elaboração dos Extratos

Foram preparados kombuchas elaboradas com chá verde em condições de temperatura ambiental, adicionando o SCOBY simbiótico de bactérias e leveduras como agente de fermentação na quantidade de 9,5% de m/v, juntamente com 100 mL/L do chá de iniciação e elaboraram-se três condições de produção de kombuchas, escolhidas em delineamento estatístico. As amostras foram divididas em: K1 comportando 110 gramas de sacarose fermentada por 9 dias; K2 contendo 75 gramas de sacarose fermentada por 7 dias; e K3 com adição de 110 gramas de sacarose fermentada por 7 dias. As bebidas fermentaram em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), marca Quimis, com faixa de trabalho -10°C a 60°C, com temperatura controlada e fixada em 25°C.

Os extratos utilizados nas análises foram elaborados com as amostras puras de kombuchas, seguindo a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2010) com algumas adaptações.

Foram preparados extratos com as amostras de kombucha seguindo a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2010) com algumas adaptações. Os extratos das amostras foram preparados colocando 10g da amostra no tubo falcon de 50 mL e acrescentando em seguida proporções distintas de reagentes: a) amostra + 8 mL de metanol 50%; b) amostra + 4 mL de álcool (70%) + 4 mL de metanol (50%); c) amostra + 2 mL de ácido acético (2,5%) + 6 mL de metanol (100%); d) amostra + 4 mL de etanol (100%) + 4 mL de metanol (100%) (Zhou *et al.*, 2022).

O material foi homogeneizado e levado ao ultrassom (Ultra Cleaner 1600) por 30 minutos, seguindo-se a centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm, com posterior recolhimento do sobrenadante em um balão, reservando-o. Realizou-se a filtração no papel filtro, adicionou-se água destilada para completar 10 mL e foi armazenado a - 6°C na ausência de luz para posterior leitura.

### 4.7.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de compostos fenólicos nos extratos foi determinado por espectrofotometria utilizando o reagente Folin-Ciocalteau (Singleton; Ross, 1965). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato foi misturada com 2 mL de água milli-Q, 0,5 mL do reagente de

Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio 20% em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água milli-Q. Após 2 horas de repouso em ausência de luz e temperatura ambiente, efetuou-se a leitura das absorbâncias a 765 nm em espectrofotômetro (BEL 1102).

Os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra. A concentração de fenólicos totais foi obtida por meio da interpolação das absorbâncias em uma curva padrão de ácido gálico construída previamente.

#### **4.8 Identificação dos Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a Arranjo de Diodo (HPLC-PDA)**

A análise foi realizada em cromatógrafo analítico, Shimadzu modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-visível com arranjo de diodos (PDA), modelo SPD-M20 A, degaseificador DGU-20A3, software de soluções CL (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e coluna Macherey-Nagel Nucleodur® 100-5 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

Os padrões de ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido quínico, apigenina, ácido caféico, crisina, ácido ferúlico, floroglucinal koempferol, luteolina, quercetina e rutina foram obtidos da Sigma Aldrich®. Para os solventes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a Arranjo de Diodo (HPLC-PDA), foram utilizados água ultrapura (sistema 18,2 MΩ cm da Elga Purelab Option-Q), acetonitrila e ácido fórmico, grau HPLC da marca Vetec®.

As amostras K1, K2 e K3 e os padrões foram filtrados em cartucho de extração em fase sólida Chromabond® C18-EC da Macherey-Nagel e disco de filtro de 0,45 µm. A eluição foi realizada com método gradiente de 5-100% em 60 min, e uma fase móvel de uma mistura de água + 0,1% de ácido fórmico (A) + 100% de acetonitrila (B), que foram bombeadas a uma vazão de 1,0 mL/min, injeção de 10 µL das amostras na concentração de 1,0 mg/mL e temperatura do forno da coluna de 40 °C. Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm. A identificação dos compostos químicos nas frações foi realizada comparando o tempo de retenção (Rt) e os espectros de UV com aqueles obtidos pela injeção de padrões preparados nas mesmas condições. As amostras passaram previamente por processo de “clean-up” em cartucho Chromabond® C18-EC (previamente ativado com metanol).

#### 4.9 Avaliação da Atividade Antioxidante e Estresse Oxidativo em Larvas de Tenebrio

As análises realizadas para a determinação da atividade antioxidante e nível de estresse oxidativo das bebidas de kombucha foram conduzidas em modelo experimental de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) como método alternativo na utilização de invertebrados, seguindo a metodologia proposta por Souza *et al.* (2018). Os animais foram doados pelo Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, *campus* Ministro Petrônio Portella (UFPI/CMPP).

Cerca de 104 animais ( $n = 104$ ) foram utilizados nos experimentos, divididos entre os grupos: controle positivo (Dimetilsulfóxido - DMSO), controle negativo (solução salina), chá verde, kombucha 1 (K1), kombucha 2 (K2) e kombucha 3 (K3), observados em dois períodos de tempo (24h e 48h) após a aplicação das soluções, como mostra o Quadro 3.

**Quadro 3.** Distribuição do número de larvas pelos grupos analisados nos experimentos

GRUPOS	INTERVENÇÃO					
	DMSO (n)	Solução Salina (n)	Chá Verde (n)	K1 (n)	K2 (n)	K3 (n)
24h	10	10	8	8	8	8
48h	10	10	8	8	8	8

Fonte: Dados da Pesquisa (2024). N = número de animais por grupo.

##### 4.9.1 Teste de Sobrevivência

As larvas selecionadas foram inoculadas com as substâncias de controle positivo, negativo e as amostras de interesse (kombucha), utilizando uma seringa BD Ultra-Fine™ com capacidade de 10  $\mu$ . A inoculação foi realizada injetando-se o inóculo na hemocele, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas.

Cada larva de cada grupo de animais recebeu 1  $\mu$ L de suspensão contendo a substância de avaliação. As concentrações finais são apresentadas em números quando necessário. As larvas foram então incubadas a 30 °C em placas de Petri contendo dieta de criação e o número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24 e 48h horas. Para estabelecer a morte das larvas, verificamos visualmente a melanização e a resposta aos estímulos físicos tocando-as suavemente. Com os dados foram construídas as curvas de sobrevivência.

#### 4.9.2 Determinação da Atividade Antioxidante

Larvas de cada grupo foram separadas em tubo falcon de 50 mL específicos para cada dia de coleta e eutanasiadas por congelamento em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , procedendo no dia seguinte com a produção do homogenato por maceração em banho de gelo com um homogeneizador de tecido. O tampão fosfato de sódio pH 7,4 (PBS) foi utilizado na produção desse homogenato na proporção de 500  $\mu\text{L}$  de solução para 150 mg de larva. Cada larva foi homogeneizada individualmente e seu respectivo homogenato foi separado e guardado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia da execução dos procedimentos.

#### 4.9.3 Melanina (Pigmentação)

Centrifugou-se a amostra descongelada do homogenato das larvas a 10.000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante obtido, coletou-se 100  $\mu\text{L}$  que foram transferidos para uma cubeta de acrílico. Após a transferência, adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  de PBS na respectiva cubeta. Dada a diluição, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um espectrofotômetro biospectro SP-220. Para a calibração do espectrofotômetro foi utilizado o PBS como o branco.

#### 4.9.4 Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo o método descrito por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pela enzima por meio do decréscimo da densidade óptica a 230 nm a  $37^{\circ}\text{C}$ . Inicialmente, em um eppendorf, foi realizada a diluição do homogenato, que consistiu na adição de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido da centrifugação do homogenato das larvas juntamente com 390  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão denominada Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8. Posteriormente, o comprimento de onda do espectrofotômetro (Biospectro, SP220) foi ajustado para 230 nm e zerado com água destilada, em seguida, realizou-se a leitura do meio de reação (50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 nM, 2,5 mL de tampão Tris HCl 1 M EDTA 5 mM pH 8,0 e 48 mL de água Milli-Q), adicionando 2 mL da solução em uma cubeta de quartzo, observando se a absorvância atingia aproximadamente 0,650.

Em seguida, iniciou-se a leitura das amostras. Foi pipetado, em uma cubeta de quartzo, 10  $\mu\text{L}$  da diluição do sobrenadante e 2000  $\mu\text{L}$  do meio de reação, sendo então submetidas a

leituras da absorbância no tempo 0 e 6 minutos, no espectrofotômetro modelo Bioespectro SP220. Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que permitiu a hidrólise de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $37^\circ\text{C}$  em pH 8,0.

#### 4.9.3 Avaliação dos Grupamentos Sulfídricos Não Proteicos (GSHNP)

A medida da concentração de GSHNP ocorreu pela reação entre o radical sulfidril e a substância DTNB, que reagem estequiometricamente e produzem um composto que apresenta absorbância em 412 nm. Com uma curva de calibração é possível relacionar a absorbância obtida com a concentração de radicais sulfidrilas na amostra.

Inicialmente foram transferidos 60  $\mu\text{L}$  do homogenato obtido para 1,8 mL de uma solução estabilizante e hemolisante composta por 450  $\mu\text{M}$  de EDTA e EGTA. Essa mistura foi acidificada pela adição de 115  $\mu\text{L}$  de TCA 60% (p/v) para precipitação de proteínas presentes na amostra. Após a precipitação dessas proteínas, restaurou-se o pH da amostra pela adição de 250  $\mu\text{L}$  de TRIS a 2M. Após esse processo, deu-se o seguimento com a centrifugação da amostra a 5.000 rpm por 3 minutos.

Em cubetas de acrílico adicionou-se 4  $\mu\text{L}$  de uma solução de DTNB a 3 mM em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,2, adicionou-se 1 mL da solução obtida após o processamento da amostra (sobrenadante), permitindo que a reação entre o DTNB e a solução obtida após o processamento permaneça mais que cinco minutos. Realizou-se então a leitura espectrofotométrica a 412 nm em espectrofotômetro modelo Bioespectro SP220 (Ellman, 1959).

#### 4.11 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi criado um banco de dados nas plataformas *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), GraphPad Prisma versão 10 e PROTIMIZA Experimental Desing. Os resultados foram tabulados com análise de média e desvio padrão. Aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey para verificar a existência de diferença significativa entre as médias dos tratamentos. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os experimentos.


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Artigo Científico I

SOARES, Iraído Francisco; LIMA, Michele Alves; SILVA, Robson Alves; COLUSSI, Rosana. Effects of processing on the preparation of kombucha: a systematic review. **Internacional Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 11, p. 5648-5656, nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16718>.

## Review

## Effects of processing on the preparation of kombucha: a systematic review

Iraído Francisco Soares,<sup>1,2</sup> Michele Alves de Lima,<sup>3</sup> Robson Alves da Silva<sup>3</sup> & Rosana Colussi<sup>1\*</sup> 

1 Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64049-550, Brasil

2 Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Químicas, Farmacéuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, Brazil

3 Curso de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Teresina 64000-040, Brasil

(Received 4 July 2023; Accepted in revised form 6 September 2023)

**Summary** The objective of this review study was to carry out a systematic review of the effects of the process in the preparation of kombucha. Scientific articles published between 2017 and 2022 were investigated in the ScienceDirect, Scopus and Web of Science scientific databases. The search was carried out by applying the descriptors 'kombucha', 'tea', 'green tea', 'black tea', 'processing' and 'fermentation'. The work followed the standards of Preferred Reporting Items in Systematic Reviews and Meta-Analyses in its structuring. Among the articles that met the inclusion criteria, ten studies were selected to compose this review. The studies' results showed the effects of the kombucha production process on the variables of type of herb, substrate, fermentation time and temperature. It was possible to conclude that the results of this work provide evidence about the effects of the kombucha process comprising different variables. New studies to optimise kombucha production must be carried out to standardise amounts of herbs, substrates, fermentation time and temperature since these parameters have shown an influence on the final product and, consequently, on its biological activity.

**Keywords** Fermented drink, processing, chemical composition, biological activity.

### Introduction

In recent decades, there has been an increase in society's concern about food, not only the nutritional aspects of food but also its origin and effects on health. As a result, the demand for so-called 'healthy' and 'functional' foods has grown relatively well, so new business opportunities arise based on functional drinks and food products with low calorie value and high nutritional content (Cardoso *et al.*, 2020).

Kombucha is a fermented drink of oriental origin, traditionally formed from the fermentation of green tea (*Camellia sinensis* L.) or black tea with the addition of a biofilm called SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*). Most of the beverage is produced in an artisanal way. Recently, the elaboration on an industrial scale has been made from a symbiosis between acetic bacteria, lactic acid bacteria and osmophilic yeasts inserted in a cellulose network responsible for the fermentation process. The result is a refreshing,

bittersweet and slightly carbonated product (Leonarski *et al.*, 2021). In addition to the attractive sensory aspects, the beverage has an expressive composition of bioactive compounds, organic acids, ethanol, water-soluble vitamins and various micronutrients produced during fermentation, which vary according to the type of tea, raw material and microorganisms present in the tea. SCOBY, fermentation time and temperature are used in its production (Cardoso *et al.*, 2020).

The consumption of kombucha has been increasing in Western countries due to the marketing promoted by the manufacturers, who reinforce the potential health benefits of consuming the drink (Watawana *et al.*, 2015). There is evidence that kombucha can contribute by stimulating the immune system, mitigating gastrointestinal diseases, preventing some types of cancer by binding green tea polyphenols around cancer cells compared to normal cells, controlling cardiovascular diseases, preventing microbial infections, has hypoglycaemic and antilipidemic properties, contains significant antioxidant activity and among other characteristics that vary according to its production process (Chen & Liu, 2000; Greenwalt *et al.*, 2000; Chu &

\*Correspondent: E-mail: rosana\_colussi@yahoo.com.br

Chen, 2006; Yang *et al.*, 2009; Aloulou *et al.*, 2012; Ilicic *et al.*, 2012; Abdolhad *et al.*, 2013).

The health-related benefits of consuming kombucha may change according to processing conditions that promote changes in its nutritional content. Studies elucidate the reflection of these alterations, such as the one by Aloulou *et al.* (2012), who elaborated black tea kombucha with fermentation for 12 days at 28 °C and found positive results on *in vivo* hypoglycaemic and antilipidemic responses conferred by the presence of organic compounds generated by the production process according to time and temperature. Yang *et al.* (2009) showed increased antioxidant activity with kombucha by fermenting black tea at 30 °C for 8 days. Chen (2012) obtained significant responses on the antioxidant activity of beverages made with green tea at a temperature of 24 °C for 14 days.

In this sense, the interest in kombucha consumption has been based on the tendency of consumers to seek a healthier lifestyle, with a preference for minimally processed products without chemical additives and with high nutritional value. For this purpose, kombucha presents itself as a natural drink whose components vary according to its processing. (Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

These variations in the beverage production process open gaps and increase the need for research to standardise the characteristics of kombucha during its processing since the composition and concentration of metabolites depend on the inoculum source, substrate concentration, tea, fermentation time and temperature used. The objective of this systematic literature review was to identify the effects of the process in the preparation of kombucha.

## Material and methods

### Study design

The research carried out is a systematic review of the literature, prepared with a careful selection of scientific articles. The study aimed to find works that addressed the effects of the process of preparing kombucha. The guiding question that led to this review was: 'what are the differences presented by kombucha during its processing?' The study followed the standards established by the Preferred Reporting Items in Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) for its structuring (Liberati *et al.*, 2009).

### Search strategy

The research proposed to analyse articles published in the literature between the years 2017 and 2022. Therefore, the works were searched between August and September 2022 in the ScienceDirect, Scopus and Web of Science data sources using the following search key: 'kombucha', 'tea', 'green tea', 'black tea', 'processing'

and 'fermentation'. The Boolean operators 'AND', 'OR' and 'NOT' were used to establish the relationship between the descriptors in the search key.

### Eligibility criteria

Works that comprised the time frame between 2017 and 2022 were included in this review to obtain recent data from full texts (open access), English language, use of green tea or black tea and scope of descriptors. Articles that presented younger years, incomplete text, other languages, duplicate studies and/or review works were excluded from the selection.

### Data extraction and management

The search and reading of the titles and abstracts of each reference were performed by two researchers independently. After initial screening, the complete articles were read for evaluation. With a detailed reading of the texts, one can identify the relevance of the studies, hypotheses or objectives according to the criteria established for the research.

A critical appraisal of the studies and the definition of potentially eligible articles were linked to searching and reading the titles. Important information was collected from the articles used for this review, including author names, year of publication, herb, substrate, herb and substrate weights, microorganisms, time, temperature and main results.

## Results and discussion

### Selection and eligibility of studies

Figure 1 shows the results of the search in the databases. Initially, 133 articles were identified, thirty-four of which were selected for full-text reading, and at the end of the selection, ten articles met the established criteria. These studies were included in this review, demonstrating the effects of the process on kombucha making. A detailed description of the selected studies is presented in Table 1.

### Characterisation of bibliographic mapping

Table 1 presents the description of the studies included in the review, and it is possible to observe the presence of works that covered the years between 2017 and 2022, bringing research that mainly aimed at the production and characterisation of kombuchas.

### Herb

The herbs researched in the articles were green and black tea, used for kombucha production, and varied between weights from 4 to 30 g/L of the drink.

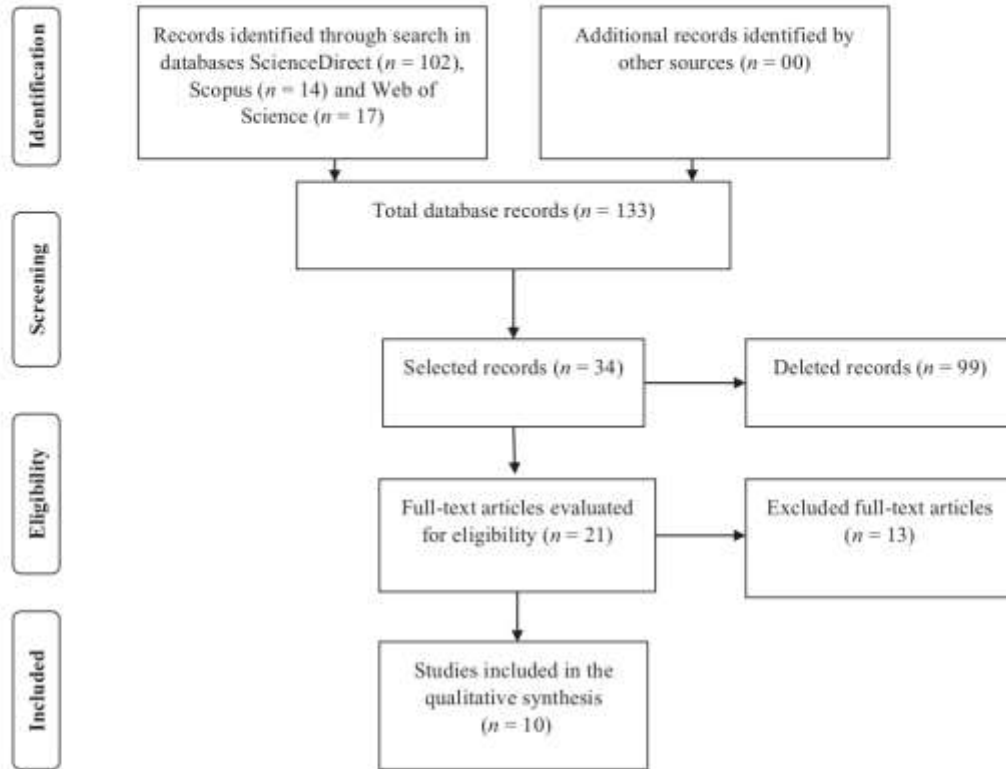


Figure 1 PRISMA diagram of the search and selection process.

The proper choice of the type of tea used for kombucha production reflects on the formation of phenolic compounds since their intensification occurs through interaction with the consortium of microorganisms during the fermentation process and may present higher and lower levels of certain substances (Jung *et al.*, 2018) (Figure 2).

#### Substrate

The substrate used for kombucha preparation in most papers is sucrose, shown in amounts from 7 to 100 g/L. Sucrose is the most used substrate among studies for the production of kombucha. The average concentration of glucose available for fermentation gradually increases due to the breakdown of sucrose according to the days and temperatures of fermentation. This reaction helps in the process of the formation of organic compounds. The gradual release also

controls the formation of alcohol, which, depending on the environment, can quickly reach the highest limit allowed for non-alcoholic beverages according to the fermentative state. Malbaša *et al.* (2008) used molasses as a substrate component for fermentation and showed lower results than studies that used sucrose as a substrate. Due to greater efficiency, most manuscripts use sucrose as a substrate.

#### Microorganisms

The microorganisms used in symbiotic consortiums for fermentation of the beverage in the research analysed showed a lack of this information. Only the most recent studies of Wang *et al.* (2022) and Barbosa *et al.* (2021) identified and described the microorganisms used in the SCOBY for the fermentation of the drink, bringing the interaction between yeasts (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota e Wickerhamomyces*) and

## 4 Preparation of Kombucha: A Systematic Review L. F. Soares et al.

Table 1 Mapping of the influence of the process on the preparation of kombucha

Reference	Study objectives	Type of herb	Amount of herb (g/L)	Substrate amount (g/L)	Sucrose	Microorganism present	Fermentation time (days)	Temperature (°C)	Main results
Wang et al. (2022)	Produce pure cultured kombucha and investigate the change of functional components and flavour substances	Green tea and black tea	30	100	100	Yeasts: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Wickerhamomyces anomalus</i> Bacteria: <i>Lactobacillus plantarum</i>	4	30	† Polyphenols and flavonoids in both teas. Acidity of 12.68 g/L in black tea and 15.02 g/L in green tea. Organic acids found in teas: oxalic acid, tartaric acid, pyruvic acid, malic acid, $\gamma$ -ketoglutaric, lactic acid, acetic acid, succinic acid and citric acid † Antioxidant, antimicrobial, biostatic and fungicidal activity; pH: 3.3; acidity: 3.50 g/L; 4.5-Brix; gallic acid 565 µg GAE/mL. No toxicity in a model of <i>Galleria mellonella</i> larvae. The type of substrate used in the production of kombucha interferes with its bioactive properties
Silva et al. (2021)	Produce unfermented and kombucha beverages with <i>Melaleuca arbuscula</i> and <i>Coriaria sinensis</i> as substrates and assess their physico-chemical characteristics, in vivo toxicities, antioxidant activities and antimicrobial properties	Green tea	5	35	-	-	14	24	
Barbosa et al. (2021)	Assess the microbiota of black and green tea using kombucha as an integrative analysis of fermented tea physicochemical parameters	Green tea and black tea	15	80	-	Yeasts: <i>Saccharomyces</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Torulaportia</i> Acetic bacteria: <i>Komagataeibacter</i> , <i>Acetobacter</i> and <i>Glucobacter</i>	15	28	Predominance of <i>Komagataeibacter</i> and <i>Zygosaccharomyces</i> . Ethanol: 0.7 g/L for both teas. Green tea: pH 3.8; gallic acid 7.6 µg GAE/mL; caffeine 78.2 mg/L; quercetin 0.228 mg/L Black tea: pH 3.1; gallic acid 68.6 µg GAE/mL; caffeine 205 mg/L; quercetin 1.16 mg/L † Free radical scavenging ability and † antimicrobial activity for 14-day drink; bacteriostatic effect; identification of citric acid, chlorogenic acid, malic acid, catechin and gallicolactein
Mizuta et al. (2020)	Produce and characterize a fermented kombucha drink under different times (7 and 14 days) and evaluate its antimicrobial activity <i>in vitro</i> and <i>in situ</i> in the reconstituted orange juice against different	Green tea	4	100	-	-	7 and 14	25	

Table 1 (Continued)

Reference	Study objectives	Type of herb	Amount of herb (g/L)	Substrate amount (g/L)	Microorganism present	Fermentation time (days)	Temperature (°C)	Main results
Cardoso et al. (2020)	strains of <i>Alicyclobacillus</i> spp. and evaluate the structural damage to the microorganism against the applied treatment Investigation of the phenolic compounds profile of kombucha produced with green tea or black tea, characterizing its chemical and microbiological composition, as well as determining its antioxidant capacity, and antibacterial, cytotoxic and antiproliferative activities	Green tea and black tea	12	50	-	10	25	Green tea: <sup>†</sup> bactericidal and antiproliferative activity, pH 3.2; acidity 0.36 g/L; glucuronic acid 1.17 µg/mL; ethanol 7.29 g/L; total phenolics 0.70 mg GAE/mL. Black tea: <sup>†</sup> antioxidant capacity; pH 3.5; acidity 0.32 g/L; glucuronic acid 0.47 g/L; ethanol 4.90 g/L; total phenolics 1.09 mg GAE/mL.
Ahmed et al. (2020)	Cultivate Kombucha on multiple substrates to assess their biological and chemical character and determine their antioxidant activity	Black tea	4	7	-	12	28	Green tea kombucha was <sup>†</sup> efficient in biological properties (count of yeasts and acetic acid bacteria, mushroom dry weight and total protein) and chemical properties (acetic acid and ethanol content), as well as having greater (increase of 3 times more) antioxidant activity against DPPH compared to other types

## 6 Preparation of Kombucha: A Systematic Review L. F. Soares et al.

Table 1 (Continued)

Reference	Study objectives	Type of herb	Amount of herb (g/L)		Substrate amount (g/L)	Microorganism present	Fermentation time (days)	Temperature (°C)	Main results
			L	g/L					
Villarmal-Soto et al. (2018)	Evaluate the impact of the vessel geometry by examining the dynamics and bioactive properties of fermentation products from two vessels with different surface/height ratios but the same surface/volume ratio	Black tea	10	70	-	-	21	25	A higher surface/height (sh) ratio seemed to enhance the anti-inflammatory activity of kombucha tea, resulting in IC50 value of $8.0 \pm 0.1$ µg/mL compared to $24.3 \pm 0.2$ µg/mL with the lowest ratio. Regarding the anticancer activity, the highest inhibition percentage of 95.3% at 50 µg/mL against the HCT-116 human colon carcinoma cell line was obtained with the ethyl acetate extract after 21 days of fermentation compared to the value of 8% obtained with the same extraction solvent using the non-fermented black tea. There was a significant effect on types of herbal tea in kombucha quality measured by pH changes, cream thickness, total acid and antibacterial activity.
Priemini et al. (2018)	To know kombucha quality with pH parameter, cream thickness, total acid thickness and its inhibitory power to <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> bacteria	Green tea	4	30	-	-	08	25	
Amarasinghe et al. (2018)	Evaluate the antioxidant activities, physical, chemical, and qualitative properties at different fermentation times	Black tea	10	15	-	-	32	25	↓ Antioxidant activity due to long fermentation time; pH 4.3. The physicochemical properties indicated increased acidity and turbidity, which might decrease the consumer appeal of the fermented beverage.

Table 1 (Continued)

Reference	Study objectives	Type of herb	Amount of herb (g/L)	Substrate amount (g/L)	Microorganism present	Fermentation time (days)	Temperature (°C)	Main results
Neffe-Skocinska et al. (2017)	To select and optimise conditions of the fermentation process and their influence on microbiological, sensory and physicochemical changes with emphasis placed on determining sugar, alcohol and organic acid content, including healthy glucuronic acid in designed kombucha beverages	Green tea and black tea	6	Sucrose 100	-	10	20, 25 and 30	↑ Glucuronic acid content at all temperatures; ↓ fructose content than glucose; pH from 3.08 to 2.67. Determining optimal time of fermentation and content of starter culture require further research, including possible formation of ingredients beneficial for health during fermentation, such as vitamin C or glucuronic acid



Figure 2 Kombuchas during the fermentation process.

bacteria (*Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Lactobacillus*) forming the osmophilic network responsible for mediating the process.

The fact that other studies did not disclose the microorganisms is that the process of identifying microorganisms is a complex procedure and requires more time for the development of most works. In addition, the variety of microorganisms can change according to the composition of the symbiotic consortium for other biotic and abiotic factors that can interfere with its development.

#### Fermentation time and temperature

For the parameters of time and temperature of the kombucha fermentation process, the mapping of the works presented times from 4 to 32 days of fermentation at temperatures ranging from 24 to 30 °C. Fermentation conditions comprising time and temperature influence the consumption of substrates, impacting the final quality of the drink in terms of the production of organic acids, vitamins and minerals (Neffe-Skocinska et al., 2017; Wang et al., 2022).

During the fermentation process, temperature becomes a key factor in making kombucha and can change the nutritional composition of the beverage. With increasing temperature, biochemical reactions occur more quickly, intensifying the breakdown of the substrate, accelerating processes and bringing about a rapid formation of compounds, which can be beneficial or harmful, punctuating the sensory aspects presented by the drink (Cardoso et al., 2020; Wang et al., 2022).

#### Effects of processing parameters

The physical-chemical parameters found varied according to the kombucha preparation. Positive responses are

reflected in pH, acidity, alcohol content and other physical-chemical points.

#### Hydrogen potential (pH)

For pH, the values of the analysed works showed 2.63–6.4. The pH measurement is the factor that controls the proper course of fermentation and is used to determine the end of the process. In addition, the concentration of hydrogen ions is a factor that can activate or inhibit the development of each species of microorganism in food (Malbaša *et al.*, 2008).

#### Acidity

The acidity in the beverages analysed in this review was between 0.32 and 15.02 g/L. This variation in acid content reflects the proportion of the production process and, consequently, the formation of secondary metabolites due to fermentation. The impact of this is the bioactive content of the drink, being identified in most works, the presence of organic acids, such as glucuronic, gluconic, lactic, malic, citric, tartaric, folic, malonic, oxalic, succinic and pyruvic (Cardoso *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021).

It is noteworthy that, among the acids identified in kombuchas, glucuronic acid deserves special attention. It results from a microbiological process of glucose oxidation and is one of the most valuable and healthy components, exhibiting detoxifying effects in the human body. This acid has the ability to bind to xenobiotics, including phenols present in the liver, allowing these substances to be excreted by the kidneys more efficiently. Glucuronic acid is also a precursor in the biosynthesis of vitamin C (Jayabalan *et al.*, 2008).

#### Antioxidant activity

In tea, it was also possible to observe the presence of compounds that exert antioxidant activity, such as polyphenols and flavonoids. The study by Silva *et al.* (2021) reported an increase in the antioxidant activity of kombucha produced within 14 days of fermentation. Bringing this path of time, the study by Ahmed *et al.* (2020) reports a decrease in the antioxidant activity of the drink as the days of fermentation increase. It shows that the variable time has an influence on the antioxidant content, thus transmitting its activity.

The increase in antioxidant activity can be intensified in the presence of iron ions in green tea, as reported by Akhavan *et al.* (2012).

#### Alcohol content

The works expressed another important condition in the kombucha production process concerning the alcohol content. The levels found ranged from 0.7 to 32.8 g/L of ethanol in the beverages. Ethanol is the product formed as part of the glucose metabolism process. Yeasts ferment glucose and fructose into

ethanol, which is then oxidised by lactic acid bacteria into acetic acid, depending on the period and production conditions (Ahmed *et al.*, 2020). The longer the fermentation period and the sucrose supply, the greater the ethanol production, as observed in the study by Villarreal-Soto *et al.* (2019).

#### Other answers

It was possible to observe the presence of protein concentration expressed in nitrogen content in one of the review studies, demonstrating 3.23 g/L as content. The presence of protein in kombucha cultures is likely due to the release of extracellular protein by yeast and bacteria throughout the fermentation process and/or initially present in the substrate extract (Ahmed *et al.*, 2020).

For toxicity, only the most recent work by Silva *et al.* (2021) evaluated this parameter in a model of *Galleria mellonella* larvae, presenting a drink without toxicity. The toxicity assessment in the development of kombucha may have advantages in implementation and experimental execution.

Regarding all the biological effects, the works expressed an increase in the antioxidant, antimicrobial, biostatic and fungicidal activity in the beverages linked to the identified phenolic content. Furthermore, an important point to be expressed and observed in the review results is that the longer the fermentation time, the lower the biological activity of the drink due to the consumption of substrates by the consortium of microorganisms (Amarasinghe *et al.*, 2018).

#### Conclusions and final remarks

The results of this systematic review provide evidence of the effects of the process in the preparation of kombucha comprising different variables. Therefore, new studies to optimise the production of the drink must be carried out to standardise amounts of herbs, substrates, fermentation time and temperature since these parameters have shown influence on the final product. Also, optimisation studies for the specific production of compounds of interest, such as glucuronic acid, should be considered.

#### Author contributions

**Iraildo Francisco Soares:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Michele Alves de Lima:** Conceptualization (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Robson Alves da Silva:** Conceptualization (equal); investigation (equal); methodology (equal);

supervision (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Rosana Colussi:** Conceptualization (equal); investigation (equal); methodology (equal); project administration (equal); supervision (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal).

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

#### Peer review

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1111/ijfs.16718>.

#### Data availability statement

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

#### References

- Abdollah, M., Janmaleki, M., Mohajezadeh, S., Akhavan, O. & Abbasi, S. (2013). Polyphenols attached graphene nanosheets for high efficiency NIR mediated photodestruction of cancer cells. *Materials Science and Engineering*, **33**, 1498–1505.
- Ahmed, R.F., Hikal, M.S. & Abou-Taleb, K.A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*, **65**, 35–41.
- Akhavan, O., Kalaei, M., Alavi, Z., Ghiasi, S. & Esfandiari, A. (2012). Increasing the antioxidant activity of green tea polyphenols in the presence of iron for the reduction of graphene oxide. *Carbon*, **50**, 3015–3025.
- Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D. et al. (2012). Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha in alloxan-induced diabetic rats. *Complementary and Alternative Medicine*, **12**, 12–63.
- Amarasinghe, H., Weerakkody, N. & Waisundara, V. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha 'tea fungus' during extended periods of fermentation. *Food Science and Nutrition*, **6**, 659–665.
- Barbosa, C.D., Trovatti Uetanabaro, A.P., Rodrigues Santos, W.C. et al. (2021). Microbial-physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. *LWT*, **148**, 111788.
- Cardoso, R.R., Neto, R.O., dos Santos D'Almeida, C.T. et al. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, **128**, 108782.
- Chen, C. & Liu, B.Y.V. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, **89**, 834–839.
- Chen, X. (2012). Study on anti-oxidant capacity of different tea. (Master's thesis). Hunan Agriculture University.
- Chu, S. & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, **98**, 502–507.
- Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H. & Ledford, R.A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, **63**, 976–981.
- Ilicic, M., Kanarić, K., Milanović, S., Djurić, E.L.M. & Malbuša, R. (2012). Lactose fermentation by kombucha-a process to obtain new milk-based beverages. *Romanian Biotechnological Letters*, **17**, 7013–7021.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P. et al. (2008). Preservation of kombucha tea - effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 9064–9071.
- Jung, Y., Kim, I., Manaa, M. et al. (2018). Effect of kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease. *Food Science and Biotechnology*, **28**, 261–267.
- Leonarski, E., Cesca, K., Zanello, E., Stambuk, B.U., de Oliveira, D. & Poletto, P. (2021). Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. *LWT*, **135**, 110075.
- Liberati, A., Altman, D.G., Tetzlaff, J. et al. (2009). The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Journal of Clinical Epidemiology*, **62**, e1–e34.
- Malbuša, R., Lončar, E. & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, **106**, 1039–1045.
- Mizuta, A.G., de Menezes, J.L., Dutra, T.V. et al. (2020). Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. *LWT*, **130**, 109641.
- Nefo-Skocimska, K., Simek, B., Scibisz, I. & Kotozyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *Cyta – Journal of Food*, **15**, 601–607.
- Primiani, C.N., Pujuti, M.M. & Ardhi, W. (2018). Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. *Journal of Physics: Conference Series*, **1025**, 9–18.
- Silva, K.A., Uekane, T.M., Miranda, J.F.D. et al. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **34**, 102052.
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J. et al. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, **83**, 44–54.
- Wang, X., Wang, D., Wang, H. et al. (2022). Chemical profile and antioxidant capacity of kombucha tea by the pure cultured kombucha. *LWT*, **168**, 113931.
- Watawana, M.W., Jayawardena, N., Chamimie, G. & Waisundara, V. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, **12**, 1–12.
- Yang, Z.-W., Ji, B.-P., Zhou, F. et al. (2009). Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 150–156.

## 5.2 Artigo Científico II

SOARES, Iraído Francisco; LIMA, Michele Alves; LUCARINI, Massimo; DURAZZO, Alessandra; ARCANJO, Daniel Dias Rufno; LIM, Simone Kelly Rodrigues Lima; SILVA, Robson Alves. The Kombucha Ingestion Benefits on The Intestinal Microbiota. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 34, p. 833-841, jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12210-023-01178-w>.



## The kombucha ingestion benefits on the intestinal microbiota

Iraildo Francisco Soares<sup>1</sup> · Michele Alves de Lima<sup>2</sup> · Massimo Lucarini<sup>3</sup> · Alessandra Durazzo<sup>3</sup> · Daniel Dias Rufino Arcanjo<sup>4</sup> · Simone Kelly Rodrigues Lima<sup>5</sup> · Robson Alves da Silva<sup>1,2</sup>

Received: 10 March 2023 / Accepted: 10 July 2023  
 © The Author(s), under exclusive licence to Accademia Nazionale dei Lincei 2023

### Abstract

Kombucha is a non-alcoholic fermented vegetable beverage based on green or black tea produced through a symbiotic culture of bacteria and yeast. Some research has demonstrated antioxidant, antimicrobial, antiproliferative, anticancer properties, with an impact on intestinal modulation. This systematic review sought to carry out a scientific mapping of the benefits of kombucha on the intestinal microbiota. The search followed the strategies of Preferred Reporting Items in Systematic Reviews and Meta-Analyses in its structure. The studies were searched in the MEDLINE/PubMed, Web of Science, Scopus, and Science Direct databases without time frame, with the application of the following descriptors: "kombucha" OR "kombucha tea" OR "kombucha teas" OR "tea, kombucha" AND "gut microbiota" NOT "reviews". The results show that kombucha consumption attenuates inflammation and oxidative stress, improves the liver detoxification process, and reduces processes of imbalance in the intestinal microbiota. Further studies should elucidate its application in humans, as well as the microorganisms characterization involved in beverages and the time of ingestion for a beneficial response in intestinal well-being.

**Keywords** Gut health · Phenolic compounds · Fermentation

### 1 Introduction

The formation of the intestinal microbiota since childhood is a key factor in the development of human diseases, such as allergies, neurological disorders, and obesity, which demonstrates that the intestinal microbiota plays a crucial role in the progress of new dietary strategies with an impact on the maintenance of health (Liu et al. 2021).

The intestinal microbiota has a significant influence on the state of human health and on the development or progression of diseases, where only in the last 20 years has this intestinal axis become the focus of intense studies. Their key roles in protecting against pathogens, regulating metabolic, endocrine and immunological functions, influencing drug metabolism and absorption, as well as their nutritional integrations have begun to be elucidated (Liu et al. 2021; Wieërs et al. 2020).

Robson Alves da Silva  
 robson@ifpi.edu.br  
 Iraildo Francisco Soares  
 iraildo.soares@hotmail.com  
 Michele Alves de Lima  
 miches91@hotmail.com  
 Massimo Lucarini  
 massimo.lucarini@crea.gov.it  
 Alessandra Durazzo  
 alessandra.durazzo@crea.gov.it  
 Daniel Dias Rufino Arcanjo  
 daniel.arcanjo@ufpi.edu.br  
 Simone Kelly Rodrigues Lima  
 simone.lima@ifma.edu.br

<sup>1</sup> Program in Food and Nutrition, Graduate Teresina, Federal University of Piauí, Piauí, Brazil  
<sup>2</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Piauí, Food Technology Graduation, Teresina, Piauí, Brazil  
<sup>3</sup> CREA-Research Centre for Food and Nutrition, Via Ardeatina, 546, 00178 Rome, Italy  
<sup>4</sup> Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil  
<sup>5</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, Bacabal, Maranhão, Brazil

Thus, the consumption of fermented foods and beverages with intestinal effects, such as kombucha, a non-alcoholic fermented vegetable drink based on green or black tea produced through a symbiotic culture of bacteria and yeast, stands out for its ability to modulate the intestinal microbiota (Jung et al. 2018; Šanlier et al. 2019; Dimidi et al. 2019; Nazhand et al. 2020; Durazzo et al. 2022; Leeuwendaal et al. 2022).

The beverage is made with the components sugar, tea, and water that are added as raw materials, while the inoculum is mainly composed of acetic acid bacteria (*Komagataeibacter xylinus*, *Acetobacter malorum*, *Gluconacetobacter xylinus*, and others), yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida parapsilosis*, and others), and lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, and others) which participates in the fermentation process. The final product has a refreshing taste and is rich in bioactive components, such as tea-derived polyphenols and organic acids, which are widely reported to have a regulatory effect on the gut microbiota (Kaashyap et al. 2021). There is growing interest in the commercial use of kombucha, as this product can be marketed as a natural beverage containing health-promoting bacteria and a range of nutritional compounds with positive health outcomes, have marked the need for regulatory guidelines and the potential of this product in the market and peoples' health (Antolak et al. 2021; Batista et al. 2022).

The effects of kombucha consumption are reported in several studies, demonstrating antioxidant (Jakubczyk et al. 2020), antimicrobial (Al-Mohammadi et al. 2021; Cardoso et al. 2020), antiproliferative (Cardoso et al. 2020), and anticancer (Rasouli et al. 2021) properties. The inclusion of the consumption of foods with an intestinal impact in the usual diet of individuals and populations represents one of the preventive factors that can bring about behavioral changes in lifestyle and health promotion (Liu et al. 2021). As stated above, the aim of this systematic review was to carry out a scientific mapping on the benefits of kombucha ingestion on the intestinal microbiota (Fig. 1).

## 2 Materials and methods

### 2.1 Research design

The study carried out is a systematic review of the literature, elaborated with a weighted selection of scientific articles. The research aimed to map works that addressed the effects of kombucha on the intestinal microbiota.



**Fig. 1** Kombucha during the fermentation process with a symbiotic consortium of bacteria and yeast

### 2.2 Construction and delimitation of the study

The study sought to collect data addressing *in vivo* research, interventions with kombucha tea and that presented, as a response, the effects in the intestinal microbiota. These elements were fundamental for defining the following guiding question: "what are the effects of kombucha on the intestinal microbiota?" The research followed the methods governed by the Preferred Reporting Items in Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) for its structuring.

Search patterns were defined taking into account the proximity of association factors, including: kombucha, kombucha tea, intestinal microbiota, and intestinal modulation.

### 2.3 Search strategy

These published studies were located in the databases: MEDLINE/PubMed, Web of Science, Scopus, and Science Direct, without a time frame, with the application of the following descriptors: "kombucha", "kombucha tea", "kombucha teas", "tea, kombucha", "gut microbiota", and "reviews", extracted from the Medical Subject Headings (MeSH) and with results in English. The Boolean operators AND, OR, and NOT were used to establish the relationship between the descriptors.

### 2.4 Eligibility criteria

The criteria defined for the inclusion of studies in this review were: (I) *in vivo* studies; (II) original research; (III) works available in full; (IV) interventions with kombucha tea;

(V) response in the intestinal microbiota. Research records involving articles not available in full were excluded, other reviews and works that addressed only the chemical characterization of kombucha. The steps taken in the selection followed the PRISMA diagram for the election of studies and are shown in Fig. 2.

## 2.5 Data extraction and management

The search steps, reading the titles and abstracts of each reference, were carefully performed by two researchers independently. Following this, the complete articles were read for evaluation. With the detailed reading of the texts, one can identify the relevance of the studies, hypotheses, or objectives, according to the pre-established criteria.

Continuously, the critical appreciation of the studies and the definition of the articles considered eligible were carried out. Important information was collected from the articles used for this review, including: study authors, year of publication, location, type of study, microorganism, herb, substrate, and main results, as shown in Table 1.

## 2.6 Evaluation of the methodological quality of studies

To assess the methodological quality of the articles included in this review, a classification tool was used based on the criteria proposed by the systematic inclusion quality assessment manual according to the Cochrane Library. The assessment of the risk of bias predicted the judgment of each study against previously established methodological criteria, aiming to identify the presence of selection, measurement, and

confounding changes. Articles were classified as A: low risk of change; B: high risk of change; and C: uncertain risk of change.

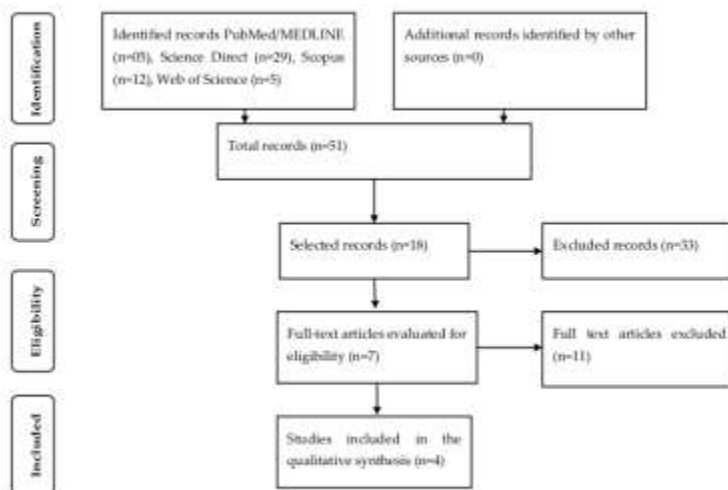
## 3 Results

At the end of the process of collecting the material to integrate the bibliographic mapping for the construction of this research, the selection and eligibility results are described in Fig. 2, showing a total of four selected articles. The details of each study are described in Table 1.

The eligibility process of the articles included in the research described in Fig. 2 followed the PRISMA criteria, presenting as a total number the number of 51 articles in the identification stage. The first screening excluded all studies that addressed only the physicochemical characterization of kombucha, without reporting its biological activity, with the number of excluded being 33, leaving only 18. Among the 18 articles resulting from the first screening, only 7 continued for the second screening, as they met the inclusion criteria mentioned in topic 2.4 of the methodological procedures. After reading and interpreting all the articles resulting from the second screening, four were able to meet all the criteria of the general objective of this review, proceeding to the quality assessment system shown in Chart 1.

As a quality assessment step of each selected study, a classification according to the Cochrane Library platform was applied to each study, visualizing the decrease of any interference in the detailing of results. Its conformation is observed in Chart 1 below.

**Fig. 2** PRISMA diagram of the search and selection process in PubMed/MEDLINE, Science Direct, Scopus, and Web of Science databases



**Chart 1** Methodological quality of the included studies based on the Cochrane Library tool

Domains	Studies			
	Xu et al. (2022)	Jung et al. (2019)	Moreira et al. (2022)	Permatasari et al. (2022)
Selection path	Method used to generate random sequence			
	A	A	A	A
Allocation concealment	Method used to hide the random sequence			
	A	A	A	A
Performance path	Measures used to blind participants and professionals			
	A	A	A	A
Detection path	Measures used to blind outcome assessors to the knowledge of the intervention provided to each participant			
	A	A	A	A
Attrition path	Complete endpoint-related data for each major endpoint, including losses and exclusion from analysis			
	A	A	A	A
Report path	Clinical trial selected outcomes when describing results and what was identified			
	A	A	A	A
Other paths	Another path that does not fit in another previous domain of the tool			
	A	A	A	A

A low risk of change, B high risk of change, and C uncertain risk of change

All the works chosen to participate in this review are described in Chart 1 and showed low error bias, bringing reliability to the data found. Evaluating the methodological content elucidates the information that corroborates the main objective of the research. The details of the findings can be seen in Table 1.

According to the results, the literature presents a reduced number of works that evaluate the response of kombucha in the intestinal microbiota, but bring the effects provided by the ingestion of the drink. All the studies that are described in Table 1 were carried out in different regions of the world, using rats or mice (in vivo).

The systematic review by Costa et al. (2021), published in the journal *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* with the same theme, presented 15 articles associating the effects of kombucha on obesity and intestinal microbiota, evaluated its response to variations in the lipid profile, leaving the gap on the topic of intestinal microbiota in open.

In this work, we had four articles that brought data on the effects of kombucha only on the intestinal microbiota. All

**Table 1** Mapping of results based on the articles included in the review

Author/year	Location	Type of study	Microorganisms	Herb	Quantity	substrate	Main results
Moreira et al. (2022)	Brazil	In vivo	-	Green tea	06 g/dL	60 g/L	Improvement in the composition of the intestinal microbiota, ↓ of liver inflammation, lipopolysaccharide levels and anti-inflammatory activity
Permatasari et al. (2022)	Indonesia	In vivo	-	Pea	12 g/dL	150 g/L	↑ levels of bacteria producing short-chain fatty acids, such as Blautia, Bacteroides, Parabacteroides, Pharscolactobacterium, and Proteus
Xu et al. (2022)	China	In vivo	<i>Glaucosarcobacter xylinus</i> , <i>Zygo-saccharomyces</i> s. <i>Lactobacillus plantarum</i>	Green tea	10 g/dL	80 g/L	↓ the damage to the intestinal barrier, ↓ the displacement of lipopolysaccharide and inhibiting the occurrence of inflammation and insulin resistance in vivo, ↑ levels of short-chain fatty acid-producing bacteria. It improved the function of islet β cells, promoting the secretion of gastrointestinal hormones (GLP-1/PPYY)
Jung et al. (2019)	South Korea	In vivo	-	Black tea	10 g/dL	100 g/L	↓ production of Clostridium in the intestinal microbiota, ↑ levels of short-chain fatty acid-producing bacteria, ↓ the incidence of non-fatty alcoholic liver disease

studies that were elected to compose this review underwent methodological evaluation.

Regarding the specific characterization of the microorganisms that make up the symbiotic consortium of bacteria and yeasts used for the fermentation of kombucha tea, only the work of Xu et al. (2022) was able to isolate and work with specific agents; among these microorganisms, we can highlight the *Komagataeibacter xylinus*, *Zygosaccharomyces*, and *Lactobacillus plantarum* in this study, that were part of the symbiotic consortium responsible for the fermentation process of the beverage.

Kombucha is a beverage based on the use of tea, sucrose, and microorganisms in its production. The process of specific determination of microorganisms involved in the fermentation process depends on time and this proves to be one of the limiting factors that can contribute to the reduction of works that detail them, since the magnitude of research on kombucha basically addresses the characterization of the beverage itself, as reported by Kaashyap et al. (2021).

For weed, the quality of weed and substrate used in the production of the drink aimed at the response in the intestinal microbiota, varied. The works by Moreira et al. (2022) and Xu et al. (2022) used green tea leaves as a herb, in the amount of 6 and 10 g per liter of product, with the amount of substrate (sucrose) 60 and 80 g. The study by Jung et al. (2019) evaluated the drink made with black tea, in the amount of 10 g per liter of the product and 100 g of sucrose.

Among the results, only the research by Permatasari et al. (2022) studied the response of butterfly pea tea with 12 g of leaves and 150 g of substrate in its production.

The composition of tea influences strongly the metabolites formed during the fermentation process. The amount of substances generated has its levels altered in the beverage according to the distribution of the components/ingredients in its production, which may increase or decrease the response evaluated according to the application (Wicérs et al. 2020).

As main results, the kombucha reported effects in improving the composition of the intestinal microbiota. For the findings, the emphasis is on the reduction of inflammation and oxidative stress, improving the liver detoxification process and reducing imbalance processes in the intestinal microbiota (Xu et al. 2022; Jung et al. 2019; Moreira et al. 2022; Permatasari et al. 2022).

It was possible to observe an increase in the levels of bacteria that produce short-chain fatty acids (SCFA), i.e., *Blautia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Phascolarctobacterium*, and *Proteus*; decreased intestinal barrier damage, less lipopolysaccharide displacement, and inhibition of the inflammation occurrence and insulin resistance in vivo have been reported (Permatasari et al. 2022).

As an impact of the in vivo intervention, an increase in the levels of SCFA-producing bacteria was found, as well

as an improvement in the function of islet  $\beta$  cells, promoting the secretion of gastrointestinal hormones (GLP-1/PYY) (Xu et al. 2022).

Decreased production of *Clostridium* in the intestinal microbiota has been reported and increased levels of SCFA-producing bacteria, with decreased incidence of non-fatty alcoholic liver disease (Jung et al. 2019).

All these results are part of the beneficial effects of using kombucha for intestinal modulation.

#### 4 Discussion

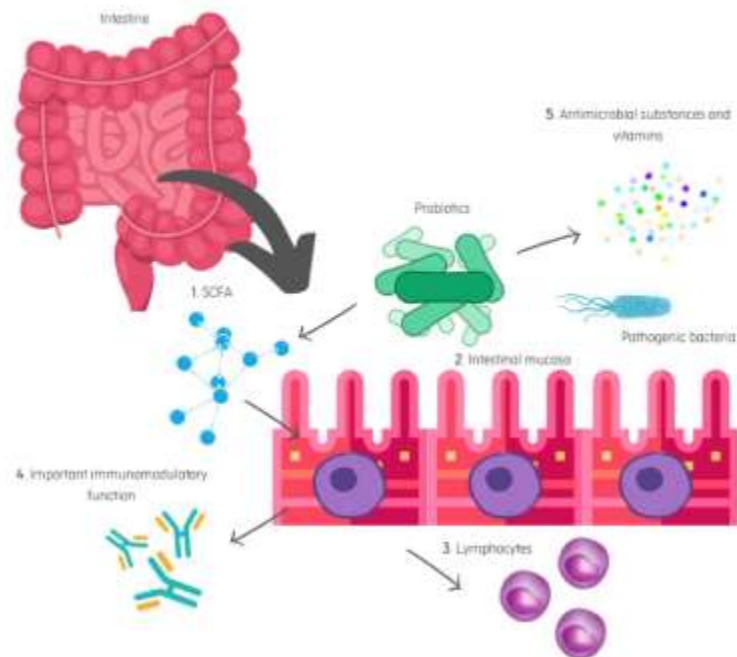
The intestinal microbiota comprises an ecosystem of microorganisms that inhabit the human intestinal tract, being composed of an abundance of microorganisms that interact with each other and with the human host, including bacteria, fungi, archaea, and viruses. The composition of the microbiota mainly includes four categories, including Firmicutes, Bacteroides, actinomycetes, and Proteus. This microbial diversity also suggests the importance of the role that the intestinal microbiota plays in human health, indicating that, contrary to what was thought in the past, microorganisms are not necessarily negative or disease causing. On the contrary, it is increasingly clear that they co-evolved with human hosts and the presence of microorganisms may be important for the maintenance of health (Chen et al. 2021). This article describes the possible mechanisms of kombucha ingestion on the intestinal microbiota.

The regulatory mechanisms of the intestinal microbiota are complex. In recent years, with the rapid development of molecular biology, genomics, bioinformatics analysis technology, and high-throughput sequencing technology, research involving the mechanisms of microbiota regulation has progressed. Studies have produced evidence that disturbance in the intestinal microbiota and its metabolites play a key role in maintaining intestinal host homeostasis and influence the development of many diseases (Liu et al. 2021; Şanlıer et al. 2019).

Food and psychobiotics are the main exogenous factors whose health impacts are mediated by gut bacteria (Dinan and Cryan 2017; Toro-Barbosa et al. 2020). The pathways for bacteria-health two-way communication, while still largely unknown, may involve hormones, metabolites, and, as recently proposed, bioelectric signals; as seen in Fig. 3 (Cuamatzin-García et al. 2022).

The microbiota imbalance causes changes in the structure and function of the intestine, which may cause the appearance or development of some diseases. The underlying repair mechanisms are complex (Kataoka 2016). In recent years, with the rapid development of molecular biology and health technologies, research in the context of intestinal modulation has emerged with alternatives for understanding

**Fig. 3** Mechanism of action of microorganisms in the intestinal microbiota adapted (Rasouli et al. 2021)



and improving these mechanisms (Fan and Pedersen 2021). Studies show that lifestyle, especially people's diet, contribute to minimize the possible damage caused by this deregulation (Liu et al. 2021; Şanlıer et al. 2019; Zmora et al. 2019). (Stiemsma et al. 2020), by carrying out critical review of current human intervention studies analyzing the effect of fermented foods on the composition and/or function of the human gut microbiota, concluded that microbiota as a mediator between fermented food consumption and these health outcomes and future studies should consider analyzing microbiota function (microbial metabolomics, meta-transcriptomics) as a means to elucidate the mechanism linking fermented food consumption with human health (Stiemsma et al. 2020).

This disharmony affects the health of the host in several ways, such as energy absorption and the bioavailability of nutrients such as water-soluble B vitamins, especially choline. When choline (vitamin B8) is metabolized by pathogenic bacteria, trimethylamine (TMA) is produced. In the liver, TMA is converted into trimethylamine-N-oxide (TMAO), a factor that increases the risk of developing cardiovascular diseases. When choline is metabolized by beneficial bacteria, these microorganisms use much of the choline for positive epigenetic changes, reducing weight gain, anxiety, and the risk of atherosclerotic disease. The

microbiota establishes symbiotic communication with its host: commensal microbes benefit from the nutrient-rich environment provided by the intestine, and the microbiota produces hundreds of proteins and metabolites that modulate key functions, including nutrient processing, maintenance of energy homeostasis and immunity system development (Wieërs et al. 2020; Antolak et al. 2021).

Many bacterial-derived metabolites originate from food sources. Among them, an important role has been assigned to metabolites derived from bacterial fermentation of dietary fibers, namely SCFA, which link host nutrition to the maintenance of intestinal homeostasis (Xu et al. 2022; Permatasari et al. 2022).

SCFA are important fuels for intestinal epithelial cells and regulate functions through different mechanisms to modulate their proliferation, differentiation as well as functions of subpopulations such as enteroendocrine cells to impact intestinal motility and strengthen intestinal barrier functions as well as host metabolism. Its metabolites play a key role in maintaining host intestinal homeostasis and influence the development of many diseases, including neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, and gastrointestinal diseases (Antolak et al. 2021).

Short-chain fatty acids are small organic monocarboxylic acids with a chain length of up to six carbon atoms and are

the main products of anaerobic fermentation of indigestible polysaccharides such as dietary fiber and resistant starch produced by the microbiota in the large intestine. After their production, SCFAs are taken up by colonocytes, mainly via H<sup>+</sup>-dependent or sodium-dependent monocarboxylate transporters. SCFAs that are not metabolized in colonocytes are transported to the portal circulation and are used as an energy substrate for hepatocytes. SCFAs improve gut health through a variety of local effects, from maintaining gut barrier integrity, producing mucus and protecting against inflammation, to reducing the risk of colorectal cancer (Chen et al. 2021).

In this universe, kombucha, in turn, has several components that help improve the processes involved in the well-being of the intestinal microbiota. Water-soluble vitamins, minerals, polyphenols, and organic acids are part of the nutritional range present in kombucha and show that the effects of its ingestion corroborate the studies detailed in Table 1 (Xu et al. 2022; Jung et al. 2019; Moreira et al. 2022; Permatasari et al. 2022).

Kombucha is a fermented beverage of oriental origin, traditionally formed from the fermentation of green (*Camellia sinensis L.*) or black tea with the addition of a biofilm called SCOBY (symbiotic culture of bacteria and yeasts), being produced from artisanal way, mostly, but also industrially from a symbiosis between acetic bacteria, lactic acid, and osmophilic yeasts inserted in a cellulose network responsible for the fermentation process, resulting in a refreshing, bittersweet and slightly carbonated product (Leeuwendaal et al. 2022; Xu et al. 2022).

The low pH of kombucha, mainly due to the production of high concentration of acetic acid, has been shown to prevent the growth of pathogenic bacteria such as *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Campylobacter jejuni*. Even at neutral pH and after thermal denaturation, kombucha is capable of inhibiting the growth of pathogens in vitro, suggesting that compounds other than acetic acid exert antimicrobial effects (Dimidi et al. 2019).

Among the organic acids that showed the highest content after kombucha fermentation, the acetic acid content is the highest, followed by citric acid, butyric acid, lactic acid, and formic acid. Acetic acid and citric acid are not only used as sour agents to improve product taste, but also to prevent the growth of various bacteria. Butyric acid, SCFA which is found as a metabolite from the fermentation process of kombucha, is reported to demonstrate anti-inflammatory, hypoglycemic effects, and regulation of the intestinal microbiota, its presence being identified in studies that involved the effects of kombucha in the intestinal microbiota (Şanlıer et al. 2019; Leeuwendaal et al. 2022; Xu et al. 2022).

The improvement in microbial composition stems from all the mechanisms originating from the agents found in kombucha and which brings about a decrease in inflammatory

processes and oxidative stress, improves liver detoxification stages, and reduces processes of imbalance in the intestinal microbiota, thus promoting systemic effects and decrease in the appearance of metabolic diseases.

One of the main mechanisms involved concerns the ability of phenolic compounds, widely found in kombucha, to capture or inhibit reactive oxygen and nitrogen species, transfer electrons to free radicals, and activate antioxidant enzymes. Recent studies have shown that phenolic compounds are also able to modulate gene expression, reversing epigenetic changes associated with inflammation and oxidative stress, and are, therefore, considered important allies in the prevention and/or mitigation of chronic diseases. In addition to these direct effects, phenolic compounds can act indirectly by activating cellular pathways responsible for controlling oxidative stress (Xu et al. 2022; Dimidi et al. 2019).

The presence of these phenolic compounds in kombucha, about 90 to 95%, are not absorbed in the small intestine, so they are metabolized by the local microbiota in the colon. Because of this, phenolic compounds can modulate the intestinal microbiota, exerting an effect similar to prebiotics by favoring the growth of beneficial microorganisms and inhibiting the growth of pathogens (Dimidi et al. 2019).

Fermentation products (mainly SCFA) support the host's cellular metabolism and the colonocytes, neutrophils, and T cells of the gut's immune system, which are components of the intestinal barrier function. Acetate, propionate, and butyrate SCFAs enter colonocytes by simple or facilitated diffusion (Cuamatzin-García et al. 2022).

One of the points also addressed regarding the positive effects on the microbiota was the decrease in intestinal permeability. Intestinal permeability is a component of the intestinal barrier. This barrier is a dynamic interface between the body and the food and pathogens that enter the gastrointestinal tract. Therefore, dietary components can directly affect this interface, and many metabolites produced by host enzymes or by the gut microbiota can act as signaling molecules or exert direct effects on this barrier (Xu et al. 2022).

The normal intestinal barrier consists of multiple components in the lumen, epithelial cell layer, and lamina propria. Some agents are associated with the integrity of this barrier, such as the presence of short-chain fatty acids, bioactive components, and other water-soluble vitamins that participate in this homeostasis (Şanlıer et al. 2019; Kaashyap et al. 2021; Cuamatzin-García et al. 2022).

The inflammatory process is one of the factors that contribute to the loss of the intestinal barrier and, as reported in the studies, there was an improvement in this axis, reducing the expression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, which occurs when there is an imbalance between oxidant and antioxidant compounds, resulting from the excessive production of free radicals and reactive oxygen

species. The excessive accumulation of these substances culminates in the oxidation of biomolecules and consequent homeostatic imbalance, causing damage to various cellular structures, including membranes, proteins, and DNA (Al-Mohammadi et al. 2021; Moreira et al. 2022; Dimidi et al. 2019).

Butyrate is one of the agents that act by decreasing the inflammatory process and intestinal permeability, improving epigenetic efficiency (Xu et al. 2022). Polyphenols that are not absorbed in the small intestine can reach the colon where they can be metabolized by microorganisms and act as a prebiotic metabolite resulting in greater abundance of beneficial microorganisms that contribute to host health. They also modulate the composition of the intestinal microbial community through the inhibition of pathogenic microorganisms (Xu et al. 2022; Moreira et al. 2022).

Modulating the intestinal microbiota can improve health by strengthening intestinal epithelial cell junctions, increasing mucus secretion, and acting on the intestinal immune response. There are great opportunities for studies that can advance the understanding of this complex intestinal ecosystem and its relationship with the ingestion of kombucha, being able to provide new ideas for the treatment of diseases and make the most of the potential of precision medicine evidenced from its ingestion.

## 5 Conclusion

The analysis of main studies that evaluated the effects of kombucha on the intestinal microbiota is given here. Despite extensive *in vivo* studies, there is no research investigating the impact of kombucha on humans. These discoveries are important to improve the commercial value of the beverage and reveal the immense prospects of health effects, as well as encouraging further studies with human application, characterization of the microorganisms involved, and the time of ingestion for a beneficial response in intestinal well-being.

**Acknowledgements** Not applicable.

**Author contributions** IFS: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing—original draft. Michele Alves de Lima: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing—original draft. ML: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing. AD: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing. DDRA: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing. SKRL: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing. RAdS: conceptualization, investigation, writing—review and editing, supervision.

**Funding** Not applicable.

**Data availability** The data presented in this study are available within the article.

## Declarations

**Conflicts of interest** The authors declare no conflict of interest.

**Institutional review board statement** Not applicable.

## References

- Al-Mohammadi AR, Ismaiel AA, Ibrahim RA, Moustafa AH, Zeid AA, Enan G (2021) Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. *Molecules* 16:5026–5032. <https://doi.org/10.3390/molecules16165026>
- Antolak H, Piechota D, Kucharska A (2021) Kombucha tea-A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Antioxidants* 28:1541–1549. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Batista P, Penas MR, Pintado M, Oliveira-Silva P (2022) Kombucha: perceptions and future prospects. *Foods* 11(13):1977–1988. <https://doi.org/10.3390/foods11131977>
- Cardoso RR, Neto RO, D'Almeida CTS, Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L, Martino HSD, Cameron LC, Ferreira MSL, Barros FAR (2020) Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res Int* 8:128–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Chen Y, Zhou J, Wang L (2021) Role and mechanism of gut microbiota in human disease. *Front Cell Infect Microbiol* 11:625–639. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625913>
- Costa MAC, Vilela DLS, Fraiz GM, Lopes IL, Coelho AIM, Castro LCV, Martin JGP (2021) Effect of kombucha intake on the gut microbiota and obesity-related comorbidities: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1:1–16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1995321>
- Cuamatzin-García L, Rugarcía PR, El-Kassab EG, Galicia G, Meza-Jiménez ML, Baños-Lara MDR, Zaragoza-Makdonado DS, Pérez-Armendáriz B (2022) Traditional fermented foods and beverages from around the world and their health effects. *Microorganisms* 2:1151–1162. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061151>
- Del Toro-Barbosa M, Hurtado-Romero A, García-Amezquita LE, García-Cayuela T (2020) Psychobiotics: mechanisms of action, evaluation methods and effectiveness in applications with food products. *Nutrients* 12:3896–3902. <https://doi.org/10.3390/nu12123896>
- Dimidi E, Cox SR, Rossi M, Whelan K (2019) Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients* 11:1806–1814. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- Dinan TG, Cryan JF (2017) The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am* 46:77–89. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>
- Durazzo A, Carochi M, Heleno SA, Pedrosa MC, Ueda JM, Barros L, Souto EB, Santini A, Lucarini M (2022) Fermented food/beverage and health: current perspectives. *Rend Fis Acc Lincei* 33:729–738. <https://doi.org/10.1007/s12210-022-01093-6>
- Fan Y, Pedersen O (2021) Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 19:55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Jakubczyk K, Kalduniska J, Kochman J, Janda K (2020) Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidant* 9:447–453. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Jung Y, Kim I, Manna M, Kim J, Wang S, Park I, Kim J, Seo YS (2018) Effect of Kombucha on gut-microbiota in mouse having

- non-alcoholic fatty liver disease. *Food Sci Biotechnol* 28:261–267. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0433-3>
- Jung Y, Kim I, Mamma M, Kim J, Wang S, Park I, Kim J, Seo YS (2019) Effect of Kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease. *Food Sci Biotechnol* 28:261–267. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0433-y>
- Kaashyap M, Cohen M, Mantri N (2021) Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients* 13:4446–4458. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>
- Kataoka K (2016) The intestinal microbiota and its role in human health and disease. *J Med Invest* 63:27–37. <https://doi.org/10.2152/jmi.63.27>
- Leeuwendaal NK, Stanton C, O'Toole PW, Beresford TP (2022) Fermented foods, health and the gut microbiome. *Nutrients* 14:1527–1533. <https://doi.org/10.3390/nu14071527>
- Liu BN, Liu XT, Liang ZH, Wang JH (2021) Gut microbiota in obesity. *World J Gastroenterol* 27:3837–3850. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i25.3837>
- Moreira GV, Araújo LCC, Murata GM, Matos SL, Carvalho CRO (2022) Kombucha tea improves glucose tolerance and reduces hepatic steatosis in obese mice. *Biomed Pharmacother* 155:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113660>
- Nazhand A, Souto EB, Lucarini M, Souto SB, Durazzo A, Santini A (2020) Ready to use therapeutical beverages: focus on functional beverages containing probiotics. *Prebiotics Synbiotics Beverages* 6:26–35. <https://doi.org/10.3390/beverages6020026>
- Permatasari HK, Nurkolis F, Gumawan WB, Yusuf VM, Yusuf M, Kusuma RJ, Sabrina N, Muharram FR, Taslim NA, Mayulu N, Batubara SC, Samriya M, Hardinsyah H, Tsopmo A (2022) Modulation of gut microbiota and markers of metabolic syndrome in mice on cholesterol and fat enriched diet by butterfly pea flower kombucha. *Curr Res Food Sci* 5:1251–1265. <https://doi.org/10.1016/j.crfb.2022.08.005>
- Rasouli L, Aryaeian N, Gorjian M, Nourbakhsh M, Amiri F (2021) Evaluation of cytotoxicity and anticancer activity of kombucha and doxorubicin combination therapy on colorectal cancer cell line HCT-116. *J Educ Health Promot* 29:376–384. [https://doi.org/10.4103/jehp.jehp\\_1456\\_20](https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_1456_20)
- Şanlıer N, Gökce BB, Sezgin AC (2019) Health effects of fermented foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:506–527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>
- Stiemsma LT, Nakamura RE, Nguyen JG, Michels KB (2020) Does consumption of fermented foods modify the human gut microbiota? *J Nutr* 150:1680–1692. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa077>
- Wieërs D, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart JM, Dequenne FI, Timary P, Cani PD (2020) How probiotics affect the microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 9:454–465. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>
- Xu S, Wang Y, Wang J, Geng W (2022) Kombucha reduces hyperglycemia in type 2 diabetes of mice by regulating gut microbiota and its metabolites. *Foods* 11:754–763. <https://doi.org/10.3390/foods11050754>
- Zmora N, Suez J, Elinav E (2019) You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

### 5.3 Artigo Científico III

O manuscrito “**Otimização do Processo de Produção de Kombucha de Chá Verde** (*Camellia sinensis* L.)” será submetido à revista Applied Science.

Autores: Iraído Francisco Soares, Janaína de Carvalho Alves, Robson Alves da Silva

## OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE KOMBUCHA DE CHÁ VERDE

(*Camellia sinensis* L.)

Iraído Francisco Soares<sup>1</sup>, Janaína de Carvalho Alves<sup>2</sup>, Robson Alves da Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup>Curso de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, Teresina, Piauí, Brasil.

Correspondência: iraildo.soares@hotmail.com

### RESUMO

Kombucha é uma bebida obtida a partir da fermentação de chá verde adoçado e fermentado por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras. O consumo da bebida está atrelado a diversos benefícios na saúde humana. Sua produção ocorre de forma artesanal ou industrial, onde os processos de produção da kombucha abrem lacunas e aumentam a necessidade de pesquisas que padronizem as características da bebida durante o seu processamento, uma vez que, a composição e a concentração de metabólitos formados durante a fermentação dependem da fonte de inóculo, da concentração de carboidrato, do tipo de chá, do tempo de fermentação e a temperatura usada. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver e otimizar kombucha de chá verde (*Camellia sinensis* L.). Para o processo de otimização, foram utilizadas como variáveis indiretas a quantidade de carboidrato e o tempo de fermentação das kombuchas. Um delineamento composto central rotacional com 11 ensaios foi aplicado no estudo, trazendo a produção de bebidas com quantidades de carboidrato entre 50 a 110 gramas por litro e fermentadas entre 3 a 15 dias. Foram analisados dos 11 ensaios os parâmetros de pH, acidez total titulável, acidez volátil, sólidos solúveis totais, relação acidez total/sólidos solúveis, acidez volátil/sólidos solúveis e teor alcoólico. Os testes apontaram resultados satisfatórios nas análises físico-químicas avaliadas como respostas às condições de otimização, sobressaindo com significância às análises de sólidos solúveis totais, relação sólido solúveis totais/acidez volátil e teor alcoólico, conforme a regressão. As condições de fermentação estudadas para a obtenção da kombucha de chá verde com as variáveis independentes de quantidade de carboidrato e tempo de fermentação foram significativas para a definição da melhor bebida. O ensaio que combinou a quantidade de carboidrato de 110 gramas fermentado em 9 dias mostrou-se com as melhores condições sobre o ponto de vista tecnológico para a bebida. A composição centesimal das kombuchas apresentou umidade adequada e quantidades insignificantes para teor de cinzas, proteínas e lipídios, baixa concentração de carboidratos e valor energético total, com a classificação da bebida como baixo valor energético. A partir desse estudo, é possível direcionar a produção de kombucha para uma investigação assertiva sobre o impacto do consumo da bebida na saúde humana.

**Palavras-chave:** Fermentação. Bebida. Composição Centesimal. Kombucha.

## ABSTRACT

Kombucha is a drink obtained from the fermentation of sweetened green tea and fermented by a symbiotic culture of bacteria and yeast. The consumption of the drink is linked to several benefits on human health. Its production occurs in an artisanal or industrial way, where the kombucha production processes open gaps and increase the need for research that standardizes the characteristics of the drink during its processing, since the composition and concentration of metabolites formed during fermentation. They depend on the source of inoculum, the carbohydrate concentration, the type of tea, the fermentation time and the temperature used. Thus, the objective of this research was to develop and optimize green tea kombucha (*Camellia sinensis* L.). For the optimization process, the amount of carbohydrate and the fermentation time of the kombuchas were used as indirect variables. A central rotational composite design with 11 tests was applied in the study, resulting in the production of beverages with carbohydrate amounts between 50 and 110 grams per liter and fermented between 3 and 15 days. The parameters of pH, total titratable acidity, volatile acidity, total soluble solids, total acidity/soluble solids ratio, volatile acidity/soluble solids and alcohol content were analyzed from the 11 tests. The tests showed satisfactory results in the physical-chemical analyzes evaluated as responses to the optimization conditions, standing out significantly in the analyzes of total soluble solids, total soluble solids/volatile acidity ratio and alcohol content, according to the regression. The fermentation conditions studied to obtain green tea kombucha with the independent variables of carbohydrate quantity and fermentation time were significant for defining the best drink. The test that combined the amount of carbohydrate of 110 grams fermented in 9 days proved to be the best conditions from a technological point of view for the drink. The proximate composition of the kombuchas presented adequate humidity and insignificant amounts for ash, protein and lipid content, low concentration of carbohydrates and total energy value, with the drink classified as low energy value. From this study, it is possible to direct the production of kombucha towards an assertive investigation into the impact of drinking the drink on human health.

**Keys words:** Fermentation. Drink. Centesimal Composition. Kombucha.

## 1 INTRODUÇÃO

As bebidas funcionais continuam a ser uma categoria em crescimento no mercado de alimentos e bebidas devido à crescente demanda dos consumidores por produtos que oferecem benefícios adicionais à saúde além de apenas saciar a sede. Nesse nicho, destaca-se as kombuchas com seu grande potencial de consumo (Cardoso *et al.* 2020).

A kombucha é uma bebida fermentada, obtida a partir da fermentação de chá adoçado, por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). A cultura SCOBY é responsável por iniciar a fermentação, transformando o chá adoçado em kombucha por meio de um processo de fermentação aeróbica (Leonarski *et al.*, 2020).

Durante a fermentação, as bactérias e leveduras presentes na cultura SCOBY consomem os açúcares presentes no chá, convertendo-os em ácido acético, ácido glucurônico, ácido lático e gases, como o dióxido de carbono. Esse processo resulta em uma bebida ligeiramente efervescente, com um sabor característico, que pode variar de ácido a levemente adocicado, dependendo do tempo de fermentação e dos ingredientes utilizados (Cardoso *et al.* 2020).

Há algumas evidências que descrevem os efeitos da ingestão de kombucha na melhora da microbiota intestinal, sistema imunológico, doenças gastrintestinais, prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e infecções microbianas, além da bebida possuir propriedades hipoglicêmicas e antilipidêmicas, contém expressiva atividade antioxidante e entre outras funcionalidades que variam conforme o seu processo produtivo (Aloulou *et al.*, 2012; Chen, 2006; Chen; Liu, 2000; Greenwalt *et al.*, 2000; Ilicic *et al.*, 2012; Malbasa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o interesse no consumo de kombucha tem se baseado na busca por um estilo de vida mais saudável, com preferência por produtos minimamente processados, sem aditivos químicos e com alto valor nutricional. Para este propósito, a kombucha se apresenta como uma bebida natural, onde seus componentes nutricionais são diversos com aplicação na saúde de maneira integral (Villareal-Soto *et al.*, 2018).

As variações no processo de produção da kombucha abrem lacunas e aumentam a necessidade de pesquisas que padronizem as características da bebida durante o seu processamento, uma vez que, a composição e a concentração de metabólitos formados durante a fermentação dependem da fonte de inóculo, da concentração de carboidrato, do tipo de chá, do tempo de fermentação e a temperatura usada. Qualquer mudança nas condições do processo de fermentação pode afetar o produto final. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi

desenvolver e otimizar o processo de produção da kombucha de chá verde (*Camellia sinensis* L.).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produção de Kombucha de Chá Verde

O processo de desenvolvimento e otimização da kombucha abrangeu a análise de 11 condições de fermentação, testando diferentes combinações entre quantidade de carboidrato (g) e tempo de fermentação (dias), sendo o experimento definido por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional 2/2, abrangendo os eixos centrais e axiais. A Tabela 1 mostra o planejamento experimental adotado.

**Tabela 1** – Matriz completa do delineamento experimental.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Carboidrato (g)	Tempo (dias)
<b>K1</b>	-1	-1	50	3
<b>K2</b>	1	-1	100	3
<b>K3</b>	-1	1	50	15
<b>K4</b>	1	1	100	15
<b>K5</b>	-1,41	0	39,64	9
<b>K6</b>	1,41	0	110,36	9
<b>K7</b>	0	-1,41	75	0,51
<b>K8</b>	0	1,41	75	17,49
<b>K9</b>	0	0	75	9
<b>K10</b>	0	0	75	9
<b>K11</b>	0	0	75	9

Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

As bebidas analisadas foram produzidas conforme a metodologia descrita por Cardoso *et al.* (2020) com algumas modificações. O chá verde das folhas de *Camellia sinensis* L. foi preparado na concentração padrão de 10 gramas de folhas (Comércio Varejista, Teresina, PI, Brasil) selecionadas e infundidas em 1L de água mineral com pH 8,34, aquecida a 100°C e com imersão das folhas durante o tempo de 10 minutos com a chama de aquecimento desligada. Após o período infusão, o chá foi filtrado em papel filtro e alocado em recipiente de vidro até atingir temperatura ambiente.

Com o chá nas condições de temperatura ambiente, adicionou-se o carboidrato conforme os valores descritos na Tabela 1 e o SCOBY simbiótico de bactérias e leveduras como agente de fermentação na quantidade de 9,5% de m/v, juntamente com 100 ml/L do chá de iniciação. O tempo de fermentação das kombuchas variou conforme o protocolo mostrado na Tabela 1. As bebidas fermentaram em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), marca Quimis, com temperatura controlada e fixada em 25°C.

## 2.2 Análises Fisico-Químicas

### 2.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado utilizando potenciômetro de bancada Mettler-Toledo®. A calibração do potenciômetro foi ajustada com a solução tampão de pH 4,0 e pH 7,0. Foram preparadas amostras em triplicata de kombucha com 10 mL, as quais foram diluída em 50 mL de água destilada e, após a homogeneização, feita a leitura do pH no equipamento.

### 2.2.2 Acidez Total Titulável

A acidez total titulável foi determinada por titulação onde 1,0 mL da amostra foi diluída em 50 mL de água destilada, adicionando 0,3 mL de solução de fenolftaleína 1%, prosseguindo com a titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, sob agitação até a viragem de cor, sendo aferido o volume gasto da solução de hidróxido de sódio. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido acético, conforme a Equação 1 (Eq. 1).

Eq. (1)

$$\text{Acidez Total Titulável} = \frac{V \times N \times FC}{P} \times 100$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

FC = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

P = peso da amostra em grama.

### 2.2.3 Acidez Volátil

A separação dos ácidos voláteis para determinação do teor de ácido volátil das bebidas aconteceu por meio do método arraste do vapor da água, dividido em duas etapas: destilação e titulação. A bebida foi destilada com a temperatura da amostra ajustada a 20°C e medida em 100 mL em um balão volumétrico, previamente lavado com água destilada por aproximadamente 4 vezes. Foi colocado 300 mL de água destilada no segundo balão do

aparelho de destilação. Incluiu-se um erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador. Foi aquecido a água destilada e a amostra de kombucha a 100°C.

Os líquidos foram aquecidos no equipamento com a torneira de vapor aberta, para retirar o gás carbônico que se encontrava no aparelho. O vapor gerado da amostra arrastou o destilado da bebida, juntamente com o vapor da água destilada. Foi recolhido o destilado no erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador, anteriormente usado e imerso em banho de água e gelo. No destilado, acrescentou-se 0,3 mL fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 N até o aparecimento da cor rosada. Com os valores das reações, calculou-se os resultados expressos em miligramas de ácido acético, conforme a Equação 2 (Eq. 2).

Eq. (2)

$$\text{Acidez Volátil} = \frac{V \times N \times 24 \times 100}{P \times c}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

c = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

P = peso da amostra em grama.

Na fórmula acima o número 24 corresponde ao produto de N do NaOH x Eq. do ácido acético x Fator de conversão de litros para 100 mL x Fator de conversão de g para mg/volume da amostra, ou seja,  $(0,1 \times 60 \times 0,1 \times 1000) / 25$ .

#### 2.2.4 Sólidos Solúveis Totais (SST)

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado utilizando o refratômetro digital da marca Nova DR 500®. Para a determinação, utilizou-se 1 mL das amostras em um bécker. O aparelho foi calibrado com água destilada a 20 °C e em seguida a bebida foi adicionada no prisma do aparelho para a leitura. A análise ocorreu em triplicata com resultados expressos em °Brix.

#### 2.2.5 Relação Sólidos Solúveis Totais (SST) e Acidez Total Titulável (ATT)

A relação SST/ATT foi determinado utilizando os resultados de ambas as análises por meio da Equação 3 (Eq. 3).

Eq. (3)

$$\text{Relação} = \text{SST/ATT}$$

### 2.2.6 Teor Alcoólico

O teor alcoólico foi determinado pelo método de álcool em volume a 20°C, com verificação no picnômetro. A bebida foi destilada com a temperatura da amostra ajustada a 20°C e medida em 100 mL em um balão volumétrico, previamente lavado com água destilada por aproximadamente 4 vezes. Foi colocado 300 mL de água destilada no segundo balão do aparelho de destilação. Incluiu-se um erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador. Foi aquecido a água destilada e a amostra de kombucha a 100°C.

Os líquidos foram aquecidos no equipamento com a torneira de vapor aberta, para retirar o gás carbônico que se encontrava no aparelho. O vapor gerado da amostra arrastou o destilado da bebida, juntamente com o vapor da água destilada. Foi recolhido o destilado no erlenmeyer de 250 mL na saída do condensador, anteriormente usado e imerso em banho de água e gelo.

A densidade relativa do destilado a 20°C foi aferida com o uso de picnômetro de vidro com capacidade de 50 mL previamente calibrado com água destilada a 20°C. O resultado foi obtido por meio da Equação 4 (Eq. 4) e expresso em % de álcool em volume por meio de tabela de conversão.

Eq. (4)

$$\text{Densidade Relativa} = \text{PA} - \text{PPS} / \text{PAD} - \text{PPS}$$

Onde:

PA = peso da amostra;

PPS = peso do picnômetro seco;

PAD = peso da água destilada.

## 2.3 Composição Centesimal e Valor Energético Total (VET)

### 2.3.1 Umidade

A determinação de umidade foi realizada por meio do método gravimétrico. Foram pesados 5 mL da amostra em triplicata, em cápsula de porcelana previamente tarada. A cápsula com a amostra foi submetida a 105 °C em estufa (MODEL-1.2, Ribeirão Preto,

Brasil) até peso constante. O teor de umidade (%) foi obtido pela aplicação da Equação 5 (Eq. 5).

Eq. (5)

$$\text{Teor de Umidade} = N/P \times 100$$

Onde:

N = número de gramas de umidade;

P = número de gramas da amostra.

### 2.3.2 Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração em forno mufla (MA38512, São Paulo, Brasil) à temperatura de 550 °C, sendo os resultados obtidos em porcentagem. Foram pesados 3 mL da amostra, em triplicata, em cadinho previamente tarado. As amostras foram incineradas por 6 horas a 550 °C. Ao final, os cadinhos com amostra incinerada serão dessecados, para esfriar, por 60 minutos ou até total resfriamento e em seguida pesados. O teor de cinzas (%) foi obtido pela Equação 6 (Eq. 6).

Eq. (6)

$$\text{Teor de Cinzas} = N/P \times 100$$

Onde:

N = número de gramas de cinzas;

P = número de gramas da amostra.

### 2.3.3 Lipídios

A determinação dos lipídios foi realizada pelo método de Bligh-Dyer (1959), onde 10 mL de cada amostra foi pesada em um béquer de 250 mL, adicionando 10 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol. Posteriormente, adicionou-se novamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água destilada, agitando a solução no agitador mecânico da marca Nova Técnica (modelo NT 145) por 15 minutos, em capela química.

O material homogeneizado foi filtrado, utilizando funil de vidro com papel filtro contendo sulfato de sódio anidro, em um funil de separação de 500 mL. Após completa separação e clarificação, a camada de clorofórmio (inferior) foi recolhida em balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL previamente tarado.

As amostras foram evaporadas em rotaevaporador até completa remoção do solvente. O balão foi transferido para estufa a 105°C por uma hora e resfriado em dessecador, com posterior aferição de pesos até obtenção de peso constante. Os dados da análise foram aplicados na Equação 7 (Eq. 7).

Eq. (7)

$$\text{Lipídios Totais} = 100 \times N / P$$

Onde:

P = massa da amostra em g;

N = (massa do balão + massa óleo) – massa do balão.

#### 2.3.4 Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de macro *Kjeldahl*, o qual teve como base a destruição da matéria orgânica (digestão) seguida de destilação, sendo o nitrogênio dosado por titulação. Foi utilizado um fator de conversão do teor de nitrogênio total em proteínas, considerando o número 5,75 pela matéria prima ser de origem vegetal.

Para a etapa da digestão, pesou-se de 0,5 mL de amostra em tubos de ensaio previamente tarados, sendo este conjunto colocado em tubo digestor juntamente com 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 4,5g de sulfato de potássio e 0,5g de sulfato de cobre. A digestão foi realizada a 350 °C durante, em média, 4 horas. Em seguida, as amostras foram destiladas e tituladas para determinação do nitrogênio e posterior cálculo do conteúdo de proteínas, utilizando-se a Equação 8 (Eq. 8).

Eq. (8)

$$\text{Proteína Bruta} = (V_a - V_b) \times F \times N \times 5,75 \times 0,014 \times 100 / P$$

Onde:

V<sub>a</sub> = volume de HCl 0,1N utilizado na titulação;

V<sub>b</sub> = volume de HCl 0,1N consumido pela prova do branco;

F = fator de correção do HCl 0,1N

N = normalidade;

5,75 = fator de transformação do nitrogênio em proteína;

0,014 = miliequivalente grama do nitrogênio;

P = peso da amostra em g.

### 2.3.5 Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido por diferença dos demais constituintes da composição centesimal (umidade, cinzas, lipídeos e proteínas).

### 2.3.6 Valor Energético Total (VET)

O valor calórico das bebidas foi calculado utilizando os fatores de conversão de  $Atwater = (\% \text{ proteína} \times 4) + (\% \text{ lipídeos} \times 9) + (\% \text{ carboidratos} \times 4)$  (Watt; Merrill, 1963).

## 2.3 Análise Estatística

As respostas dos parâmetros analisados foram submetidas à análise de regressão, análise de variância (ANOVA) e análise da superfície de resposta pelo programa PROTIMIZA e STATISTIC com nível de variância a 5% ( $p < 0,05$ ). As análises de composição centesimal e valor calórico total foram interpretadas pelo teste Tukey. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os experimentos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise dos Parâmetros Físico-Químicos de Kombuchas de Chá Verde (*Camellia sinensis* L.)

As kombuchas analisadas apresentaram características organolépticas satisfatórias como cor, odor e sabor, quando comparadas ao estudo de Datora *et al.* (2023), durante todo o período de fermentação, compreendendo o intervalo de tempo entre 3 a 15 dias. Foram utilizados nos ensaios a quantidade de carboidrato/sacarose de 50 a 110 gramas por litro da bebida. Esses parâmetros de tempo e quantidade de carboidrato foram definidos como variáveis de influência sobre o processo de otimização.

**Figura 1** – Kombuchas em processo de fermentação.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

O efeito das variáveis independentes no processo de fermentação das kombucha foram avaliadas por meios das respostas físico-químicas como pH, acidez total titulável, acidez volátil, sólidos solúveis totais, ratio e teor alcóólico, os quais influenciam no padrão final das bebidas e possuem forte apelo sobre as características funcionais da kombucha.

Os valores médios das análises físico-químicas realizadas nos onze ensaios da fermentação das kombuchas de chá verde estão expostos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Valores médios das análises físico-químicas das kombuchas de chá verde.

ENSAIO	PARÂMETRO							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	pH	ATT	AV	SST	RT	TA
<b>K1</b>	-1	-1	3,73	5,20	38,87	5,0	0,13	0,0
<b>K2</b>	1	-1	3,58	6,24	56,52	7,5	0,11	0,0
<b>K3</b>	-1	1	3,55	18,03	49,77	7,5	0,36	0,2
<b>K4</b>	1	1	3,46	27,05	73,58	8,0	0,37	1,06
<b>K5</b>	- $\alpha$	0	3,53	8,32	58,35	4,3	0,14	0,0
<b>K6</b>	+ $\alpha$	0	3,76	9,02	30,13	10,2	0,32	0,3
<b>K7</b>	0	- $\alpha$	3,77	6,24	58,27	7,4	0,11	0
<b>K8</b>	0	+ $\alpha$	3,64	10,41	107,39	8,3	0,10	1,8
<b>K9</b>	0	0	3,63	9,02	34,63	7,5	0,26	1,1
<b>K10</b>	0	0	3,63	9,02	34,63	7,5	0,26	1,1
<b>K11</b>	0	0	3,63	9,02	34,63	7,5	0,26	1,1

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Legenda: X<sub>1</sub>: carboidrato; X<sub>2</sub>: tempo; pH: potencial hidrogeniônico; ATT: acidez total titulável; AV: acidez volátil; SST: sólidos solúveis totais; RT: relação sólidos solúveis totais/acidez volátil; TA: teor alcóolico.

### 3.1.1 pH

Conforme demonstrado na tabela acima, foram estudadas 11 formulações com quantidades de carboidrato e tempos de fermentação distintos, trazendo o pH das bebidas com valores entre 3,46 a 3,77 ( $p < 0,05$ ). Os valores de pH encontrados no estudo estão em conformidade com os padrões propostos pela legislação brasileira para kombucha, entre 2,5 a 4,2 (BRASIL, 2019) e dentro da faixa considerada segura para consumo humano. Valores de pH abaixo de 2,5 apresentam alta concentração de ácido acético, representando risco à saúde dos consumidores, enquanto que valores de pH  $> 4,2$  podem comprometer a segurança microbiológica da bebida (Cardoso *et al.*, 2020).

Datora *et al.* (2023), ao analisarem o pH de kombuchas de chá verde, produzidas com 25 gramas de sacarose e fermentadas por 7 dias em temperatura constante de 25°C, encontraram valores de pH inferiores aos encontrados nesse estudo, cerca de 2,92. Cardoso *et al.* (2020) observaram valores de pH de 3,2 para kombuchas de chá verde produzidas com 50 gramas de sacarose após fermentação por 10 dias a 25°C, resultado semelhante ao encontrado nesse estudo.

O pH em kombucha mostra-se como uma resposta dependente das condições do processo de fermentação, uma vez que as condições da biotransformação da bebida modificam esse parâmetro, apresentando importância no quesito de estabilidade do produto. Nas formulações das kombuchas, é possível perceber que somente a variável tempo

influenciou sobre os valores de pH, como pode-se observar na Tabela 3 com os dados de regressão.

**Tabela 3** – Coeficiente de regressão para a resposta pH.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	3,60	0,02	165,29	0,0000
X <sub>1</sub>				
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>				
X <sub>2</sub>	-0,12	0,03	-4,62	0,0012
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>				
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>				

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Legenda: X<sub>1</sub>: carboidrato; X<sub>2</sub>: tempo de fermentação.

O resultado mostra que modelo parametrizado é significativo (p<0,05) para otimização das respostas a partir dos coeficientes de regressão conforme Equação 9 (Eq. 9).

Eq. (9)

$$Y_2 = 3,60 - 0,12 X_2$$

Pela ANOVA (Tabela 4), verificou-se que para pH, o F<sub>calc</sub> (F calculado) da regressão (21,4) em relação ao resíduo é superior ao F<sub>tab</sub> (F tabelado), indicando que o modelo é válido e o coeficiente de correlação é aceitável, com modelo explicando 70,36% dos resultados.

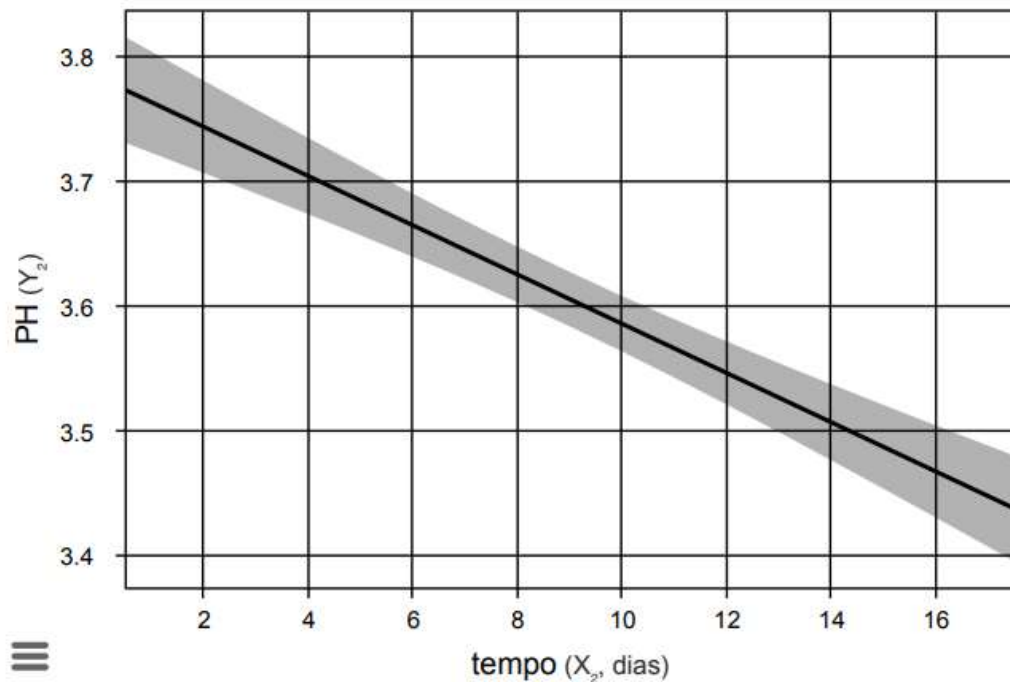
**Tabela 4** - Análise de variância ANOVA para o parâmetro pH.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Regressão	0,1	1	0,1	21,4	0,00125
Resíduos	0,0	9	0,0		
Falta de Ajuste	0,0	7	0,0	201,5	0,00495
Erro Puro	0,0	2	0,0		
Total	0,2	10			

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). R<sup>2</sup> = 70,36%.

A falta de ajuste do modelo na Tabela 4 apresentou p=0,00125 e, portanto, significativo, elucidando que o pH durante o processo de fermentação das kombuchas sofreu influência somente do tempo, sem alterações pelas diferenças de carboidrato (Figura 2).

**Figura 2** – Relação entre pH e tempo de fermentação.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

Com o passar do tempo de fermentação, o pH das bebidas declina, como mostra a Figura 2. Essa diminuição acontece de forma paralela ao aumento dos ácidos orgânicos que são formados no decorrer do tempo de fermentação e pode ser observado na Figura 3 e na Figura 4.

### 3.1.2 Acidez Volátil

Os resultados para acidez volátil identificados nos ensaios de kombucha foram de 30,13 a 107,39 ( $p < 0,05$ ), mostrando que os valores estão dentro dos parâmetros propostos pela legislação brasileira para acidez volátil, entre 30 a 130 mEq/L (BRASIL, 2019).

Esses dados estão em sintonia com os achados de Datora *et al.* (2023) que analisaram a acidez volátil de kombuchas de chá verde produzidas com 25 gramas de carboidrato e fermentadas por 10 dias na temperatura de 25°C, encontrando cerca de 78,1 mEq/L.

O aumento da acidez durante a fermentação da kombucha ocorre geralmente devido à produção de ácidos orgânicos, como os ácidos glucurônico, glucônico, láctico, málico, cítrico, tartárico, fólico, malônico, oxálico e pirúvico (Jayabalan *et al.*, 2014).

A acidez volátil foi uma das respostas que sofreu influência do tempo de forma linear e quadrática. É possível observar os valores da análise de regressão na Tabela 5.

**Tabela 5** – Coeficiente de regressão para a resposta acidez volátil.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	36,60	5,38	6,81	0,0011
<b>X<sub>1</sub></b>				
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>				
<b>X<sub>2</sub></b>	12,43	4,52	2,75	0,0252
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	21,27	5,15	4,13	0,0033
<b>X<sub>1</sub>. X<sub>2</sub></b>				

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Legenda: X<sub>1</sub>: carboidrato; X<sub>2</sub>: tempo de fermentação

O modelo experimental foi significativo ( $p < 0,05$ ), e excluindo o parâmetro sem significância sobre os resultados, foi estabelecido o modelo parametrizado Equação 10 (Eq. 10).

Eq. (10)

$$Y_4 = 36,60 + 12,43 x_2 + 21,27 x_2^2$$

Pela ANOVA (Tabela 6), verificou-se que para a acidez volátil, o F<sub>calc</sub> (F calculado) da regressão (12,3) em relação ao resíduo é superior ao F<sub>tab</sub> (F tabelado), indicando que o modelo é válido e o coeficiente de correlação aceitável, explicando 75,48% dos resultados.

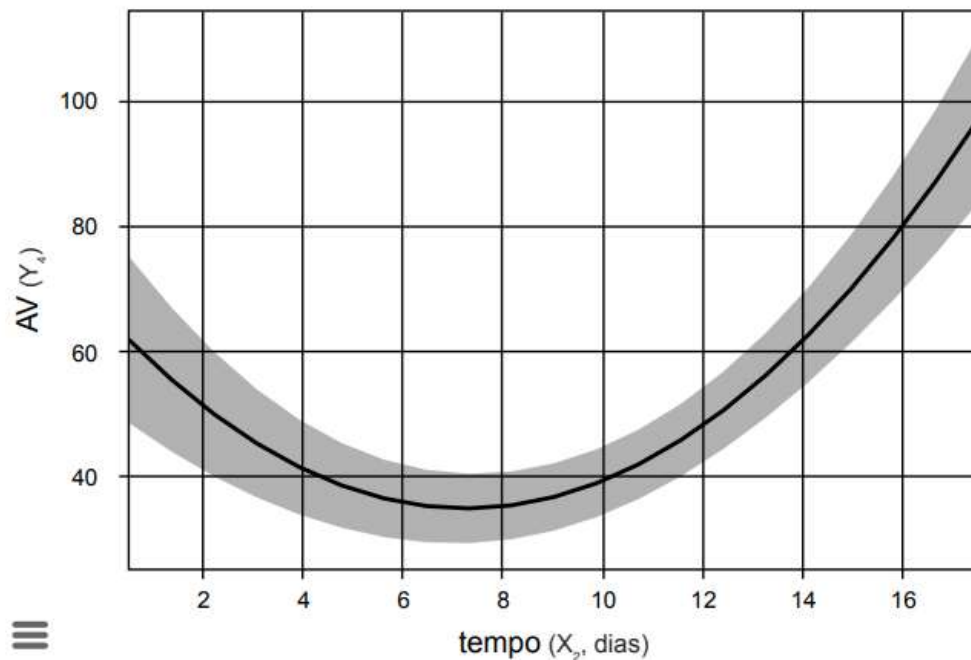
**Tabela 6** - Análise de variância ANOVA para o parâmetro acidez volátil

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	4032,5	1	2016,3	12,3	0,00361
<b>Resíduos</b>	1309,9	8	163,7		
<b>Falta de Ajuste</b>	1309,9	6	218,3	∞	
<b>Erro Puro</b>	0,0	2	0,0		
<b>Total</b>	5342,4	10			

Fonte: Dados da Pesquisa (2023).  $R^2 = 75,48\%$ .

A falta de ajuste do modelo na Tabela 8 apresentou  $p=0,00361$  e, portanto, significativo, elucidando que a acidez volátil durante o processo de fermentação das kombuchas sofreu influência do tempo de fermentação, de forma linear e quadrático, sem alterações pelas diferenças de carboidrato (Figura 3).

**Figura 3** – Relação entre tempo e acidez volátil.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

Conforme a Figura 3, percebeu-se que a acidez volátil da kombucha declina até o 8º dia de fermentação, tendo pico de crescimento constante a partir do 9º dia. Esse fato pode ser elucidado pela forma como o processo de biotransformação da bebida acontece. Inicialmente a formação de ácidos orgânicos apresenta-se baixa, tendo aumento sobre a ação bioquímica da conversão de compostos em ácidos. Os componentes que contribuem para essa formação são o teor de açúcares e a quebra do álcool, convertidos em ácidos, predominando o ácido acético (Jayabalan *et al.*, 2014).

### 3.1.3 Sólidos Solúveis Totais

O teor de sólidos solúveis totais encontrados nos 11 ensaios de kombucha variou entre 4,3 a 10,2 ( $p < 0,05$ ). Esses dados são expressos principalmente por açúcares e ácidos orgânicos e medidos em °Brix na bebida.

São poucos os estudos que analisam a aceitação sensorial de kombuchas de chá verde, mesmo a literatura apresentando uma quantidade significativa de trabalhos sobre a produção da bebida. Sensorialmente, grande parte dos consumidores de bebidas optam por opções mais adoçadas, principalmente no que se referem as kombuchas.

Datora *et al.* (2023) analisaram o mapa sensorial das preferências de consumidores em kombuchas de chá verde elaboradas com adição de 50 gramas de carboidrato e fermentadas

por 10 dias a 25°C e relatam que a kombucha ideal foi caracterizada e preferida pelos consumidores como doce apresentando cerca de 5 °Brix na opção escolhida, com sabor suave e cheiro suave. A indicação pelos consumidores de sabor suave e doçura no produto ideal resultou em aumento de 1,8 no escore de preferência durante a investigação, quando comparado com bebidas de teor menor de carboidrato.

Nesse contexto, é perceptível que o teor de sólidos solúveis totais das kombuchas representa uma variável de influência sobre o seu processo de otimização, levando em consideração a preferência do sabor doce. Nisso, observamos que estatisticamente esse parâmetro apresentou significância, sofrendo influência do tempo e da quantidade de carboidrato inserida na fermentação da bebida durante o seu processo produtivo. Os dados da regressão sobre os sólidos solúveis podem ser visualizados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Coeficiente de regressão para a resposta sólidos solúveis totais.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	7,32	0,10	72,68	0,0000
<b>X<sub>1</sub></b>	2,08	0,12	17,64	0,0000
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>				
<b>X<sub>2</sub></b>	0,34	0,12	2,85	0,0216
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>				
<b>X<sub>1</sub>. X<sub>2</sub></b>				

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Legenda: X<sub>1</sub>: carboidrato; X<sub>2</sub>: tempo de fermentação.

O modelo experimental foi significativo ( $p < 0,05$ ), e excluindo o parâmetro sem significância sobre os resultados do ajuste final, foi estabelecido o modelo parametrizado Equação 11 (Eq. 11).

Eq. (11)

$$Y_1 = 7,32 + 2,08 x_1 + 0,34 x_2$$

Para a análise do modelo pela ANOVA (Tabela 8), verificou-se que para os sólidos solúveis totais, o F<sub>calc</sub> (F calculado) da regressão (159,7) em relação ao resíduo é superior ao F<sub>tab</sub> (F tabelado), indicando que o modelo é válido e o coeficiente de correlação ótimo, com modelo explicando 97,56% dos resultados.

**Tabela 8** – Análise de variância ANOVA para o parâmetro sólidos solúveis totais.

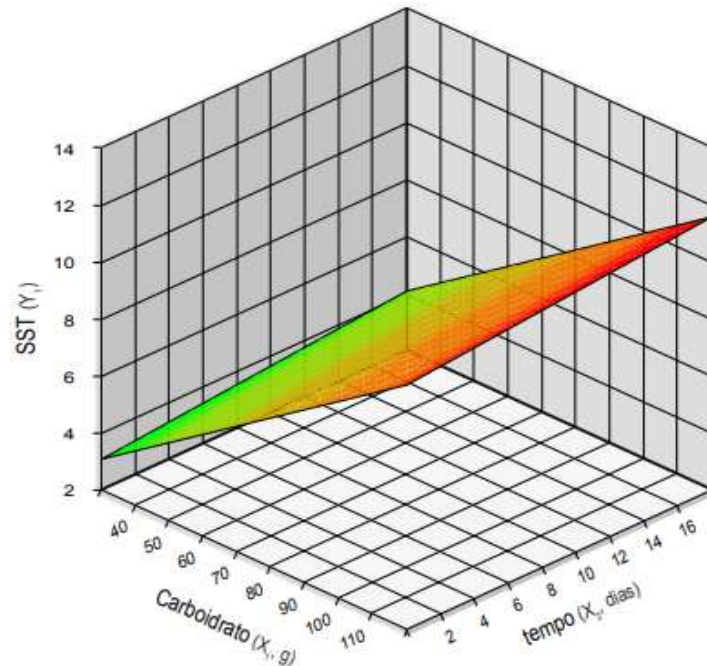
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	P-valor
-------------------	--------------------	--------------------	----------------	-------------------	---------

<b>Regressão</b>	35,7	2	17,8	159,7	0,0000
<b>Resíduos</b>	0,9	8	0,1		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,9	6	0,1	$\infty$	
<b>Erro Puro</b>	0,0	2	0,0		
<b>Total</b>	36,6	10			

Fonte: Dados da Pesquisa (2023).  $R^2 = 97,56\%$

A falta de ajuste do modelo na Tabela 8 apresentou  $p < 0,05$  e, portanto, significativo, o que pode ocorrer quando a falta de ajuste é baixa, mas o erro puro tende a zero. Aceitando-se a hipótese de que a equação do modelo é adequada para descrever os dados, permitindo gerar as superfícies de resposta (Figura 4).

**Figura 4** – Superfície resposta do parâmetro sólidos solúveis totais.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

Conforme observado no gráfico de superfície resposta do parâmetro sólidos solúveis totais (Figura 4), é possível perceber que as zonas de coloração mais quente (vermelho-alaranjado) representam as maiores quantidades de sólidos solúveis identificados nas bebidas, enquanto nas zonas menos quentes (verde-amarelado) visualiza-se as menores quantidades.

Assim, ao analisar a superfície de resposta para sólidos solúveis, observa-se que não há interação entre as variáveis independentes (tempo e quantidade de carboidrato) e o que o efeito é linear, ou seja, quanto maior o tempo de fermentação e/ou a quantidade de carboidrato, maior será o teor de sólidos solúveis. Isso permite inferir que para obter

kombucha mais doces o processo poderia ser otimizado com as maiores quantidades de carboidrato e tempo de fermentação entre 7 a 15 dias.

### 3.1.4 Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Volátil

A relação sólidos solúveis pela acidez volátil apresentou valores de 0,7 a 0,36 sobre a relação do índice de açúcar/ácido ( $p < 0,05$ ), observando sua análise na Tabela 11.

**Tabela 9** – Coeficiente de regressão para a resposta ratio.

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	0,21	0,02	9,83	0,0000
<b>X<sub>1</sub></b>	0,06	0,02	3,11	0,0144
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>				
<b>X<sub>2</sub></b>				
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	-0,06	0,02	-3,12	0,0143
<b>X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub></b>				

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Legenda: X<sub>1</sub>: carboidrato; X<sub>2</sub>: tempo de fermentação.

Conforme a Tabela 9, o modelo experimental foi significativo ( $p < 0,05$ ) com dados parametrizados, excluindo o parâmetro sem significância sobre os resultados do ajuste final, estabelecendo a Equação 13 (Eq. 13).

Eq. (13)

$$Y_6 = 0,21 + 0,06 x_1 - 0,06 x_2^2$$

Para a análise do modelo pela ANOVA (Tabela 10), verificou-se que para os sólidos solúveis totais, o F<sub>calc</sub> (F calculado) da regressão (9,7) em relação ao resíduo é superior ao F<sub>tab</sub> (F tabelado), indicando que o modelo é válido e o coeficiente de correlação aceitável, com modelo explicando 70,79% dos resultados.

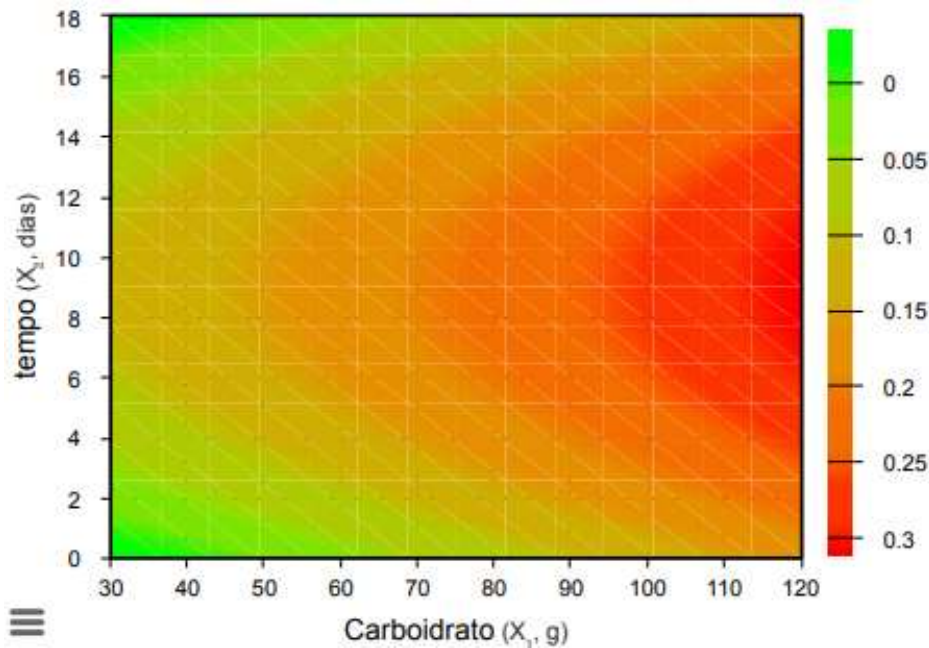
**Tabela 10** – Análise de variância ANOVA para o parâmetro ratio.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	0,1	2	0,0	9,7	0,00728
<b>Resíduos</b>	0,0	8	0,0		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,0	6	0,0	∞	
<b>Erro Puro</b>	0,0	2	0,0		
<b>Total</b>	0,0	10			

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). R<sup>2</sup> = 70,79%.

A falta de ajuste do modelo na Tabela 10 apresentou  $p < 0,05$  e, portanto, significativo, o que pode ocorrer quando a falta de ajuste é baixa, mas o erro puro tende a zero. Aceitando-se a hipótese de que a equação do modelo é adequada para descrever os dados, permitindo gerar as superfícies de resposta (Figura 5).

**Figura 5** – Superfície resposta para o parâmetro relação SST/AV.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

Observando o gráfico de superfície resposta do ratio (relação sólidos solúveis e acidez volátil), é possível perceber que as melhores respostas encontram-se na faixa entre 100 a 120 gramas de carboidrato em um tempo a partir de 4 a 7 dias. O ratio apresenta-se como relação de significativa importância onde a relação entre a doçura (proveniente dos açúcares) e a acidez (proveniente de ácidos orgânicos) afeta o sabor percebido, influenciando a escolha e o consumo do produto.

### 3.1.5 Teor Alcólico

O teor alcólico encontrado nas kombuchas de chá verde desse estudo expressou valores entre 0,0 a 1,1 %v/v. Estes teores configuram a bebida sem e com álcool, dependendo da formulação escolhida, conforme a legislação brasileira que preconiza entre 0,0% a 0,5% para kombucha sem álcool e 0,6% a 0,8% para kombucha com álcool (BRASIL, 2019). Conhecer o teor alcólico da bebida pode determinar a aceitação e o direcionamento de

público para consumo do produto e frequência, bem como sua influência sobre as características sensoriais da bebida.

O estudo de Yan *et al.* (2024) analisou kombuchas de chá verde produzidas com 150 gramas de carboidrato/sacarose, fermentadas por 7 dias na temperatura de 25°C e obteve teor alcóolico de 1,83%v/v, valor superior aos teores encontrados nesse estudo. Eles evidenciaram que a relação entre maiores quantidades de carboidrato proporcionam formação de maiores teores alcóolicos em kombuchas.

Os resultados das análises das bebidas para a resposta teor alcóolico descrevem uma resposta significativa sobre o olhar estatístico, podendo ser observado na Tabela 11 com o coeficiente de regressão.

**Tabela 11** – Coeficiente de regressão para a resposta teor alcóolico.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	0,95	0,14	7,01	0,0001
<b>X<sub>1</sub></b>				
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	-0,48	0,13	-3,68	0,0062
<b>X<sub>2</sub></b>	0,48	0,11	4,17	0,0031
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>				
<b>X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub></b>				

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Legenda: X<sub>1</sub>: carboidrato; X<sub>2</sub>: tempo de fermentação.

Conforme a Tabela 11 a resposta para teor alcóolico sofreu influência de forma quadrática da quantidade de carboidrato e de forma linear do tempo, o modelo experimental foi significativo ( $p < 0,05$ ) trazendo para otimização das respostas a partir dos coeficientes de regressão, estabelecendo a Equação 14 (Eq. 14).

Eq. (14)

$$Y_5 = 0,95 - 0,48 x_1^2 + 0,48 x_2$$

Para a análise do modelo pela ANOVA (Tabela 12), verificou-se que para teor alcóolico o Fcal (F calculado) da regressão (15,5) em relação ao resíduo é superior ao Ftab (F tabelado), indicando que o modelo é válido e o coeficiente de correlação aceitável, com modelo explicando 79,48% dos resultados.

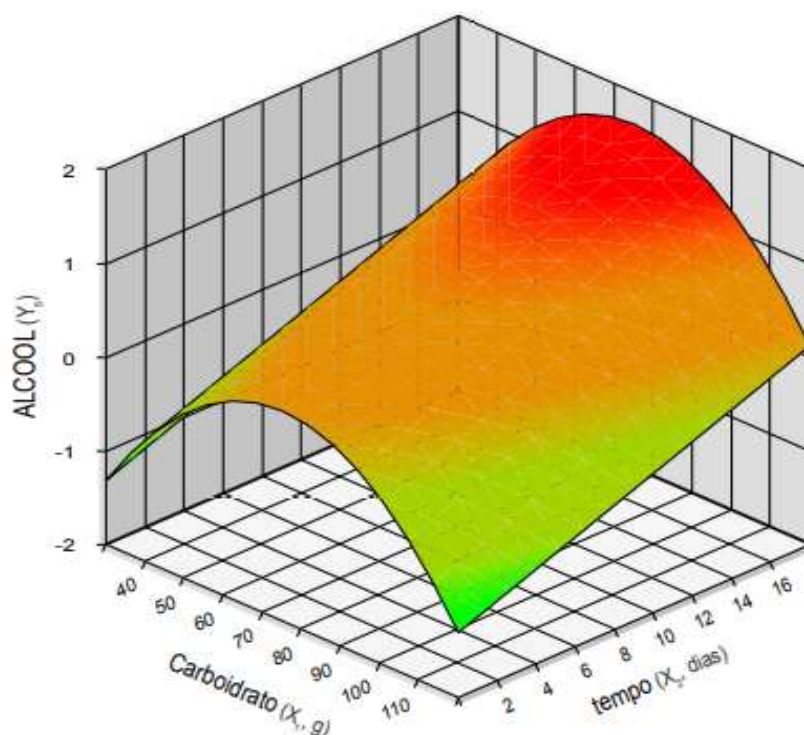
**Tabela 12** – Análise de variância ANOVA para o parâmetro teor alcóolico.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	3,2	2	1,6	15,5	0,00177
<b>Resíduos</b>	0,8	8	0,1		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,8	6	0,1	463,8	0,00215
<b>Erro Puro</b>	0,0	2	0,0		
<b>Total</b>	4,1	10			

Fonte: Dados da Pesquisa (2023).  $R^2 = 79,48$ .

A falta de ajuste do modelo na Tabela 12 apresentou  $p < 0,05$  e, portanto, significativo, o que pode ocorrer quando a falta de ajuste é baixa, mas o erro puro tende a zero. Aceitando-se a hipótese de que a equação do modelo é adequada para descrever os dados, permitindo gerar as superfícies de resposta (Figura 6).

**Figura 6** – Superfície resposta para o parâmetro teor alcóólico.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

É possível observar pela Figura 6 que a variação do teor alcóólico concentrou os maiores valores entre as quantidades médias de carboidrato cruzando os maiores tempos (dias) de fermentação, podendo ter preferência conforme o grau de doçura da bebida.

Considerando que as análises realizadas nas kombuchas apresentaram resultados significantes ( $p < 0,05$ ), na compilação dos dados, é perceptível a influência que as variáveis independentes quantidade de carboidrato e tempo de fermentação representam sobre o processo de preparação de kombucha.

### 3.2 Otimização das Bebidas de Kombucha

Os parâmetros de influência direta investigados na produção das kombuchas foram o tempo de fermentação e a quantidade de carboidrato. Esses parâmetros influenciaram de forma significativa ( $p < 0,05\%$ ) as variáveis indiretas, tais como os sólidos solúveis totais, a relação entre sólidos solúveis totais/acidez volátil e o teor alcoólico.

Os resultados das análises das bebidas orientaram a escolha da melhor formulação entre os 11 ensaios estudados. De acordo com a Instrução Normativa nº 41 (BRASIL, 2019), juntamente com as respostas das variáveis indiretas, a formulação K06 foi indicada como o melhor ensaio. Esta formulação utilizou um tempo central empregado no delineamento de 9 dias com a maior quantidade de carboidratos, sendo 110 gramas, alcançando condições tecnológicas favoráveis.

Levando em consideração a redução no tempo de fermentação como fator que apresenta impacto sobre a viabilidade econômica e de mercado, otimizou-se o processo e apresentou-se, como comparação à melhor formulação apontada pelas análises dos 11 ensaios, uma nova bebida, dispondo da maior concentração de carboidrato estudada no delineamento (110 gramas) em um período de tempo de 7 dias, denominada K12.

Após a otimização das bebidas, foi feita uma análise comparativa entre a formulação eleita K06, o ensaio do ponto central do delineamento (K09) e uma sugestão de bebida otimizada apontada com as respostas do delineamento para um melhor custo-benefício aproximando-se dos valores de eleição. Alinhados a esses parâmetros, os ensaios K06 (110 gramas de carboidrato em 9 dias de fermentação), K09 (75 gramas de carboidrato em 9 dias de fermentação) como ponto central e K12 (110 gramas de carboidrato em 7 dias de fermentação) foram direcionados para as análises de composição centesimal das bebidas para análise e caracterização físico-química das kombuchas.

### 3.3 Composição Centesimal e Valor Energético Total de Kombuchas de Chá Verde (*Camellia sinensis* L.)

Os melhores ensaios definidos pelo delineamento experimental mostraram uma bebida com aspecto indicativo para uma boa aceitação pelo mercado consumidor. A imagem do envase da bebida pode ser visualizado na Figura 8.

**Figura 7** – Kombucha envasada durante análises.



Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

As formulações escolhidas foram submetidas a análise de sua composição centesimal e determinação do valor energético total, tendo seus dados mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13** – Composição centesimal e valor energético total das kombuchas.

PARÂMETRO	ENSAIO		
	K6	K9	K12
<b>UMIDADE</b>	87,92 ± 0,04 <sup>b</sup>	87,86 ± 0,04 <sup>b</sup>	90,17 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>CINZAS</b>	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>PROTEÍNAS</b>	0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>LIPÍDIOS</b>	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>CARBOIDRATOS</b>	12,00 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,05 ± 0,05 <sup>a</sup>	9,67 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>VET*</b>	48,24 ± 0,14 <sup>a</sup>	48,46 ± 0,19 <sup>a</sup>	39,39 ± 0,10 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). Média ± Desvio-padrão. Letras distintas diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Legenda: \*VET - valor energético total.

Conforme a Tabela 13, o teor de umidade das kombuchas variaram entre 87,86% a 90,17% nas bebidas ( $p < 0,05$ ). Estudo como o de Cabral e Paula (2021) analisaram kombuchas de chá verde produzidas com concentrações de carboidrato entre 50 a 100 gramas por litro,

fermentadas por 10 dias e apresentaram teores entre 90,2% a 96,8%, valores semelhantes aos encontrados nas kombuchas analisadas nesse estudo.

Para Silva *et al.* (2024) em análise do teor de umidade de kombucha fermentada com 100 gramas de sacarose por litro no período de 10 dias, encontraram o valor de 95,35, superior aos teores encontrados em todos os ensaios analisados nessa pesquisa.

O teor de umidade na kombucha pode alterar dependendo de fatores como o processo de produção e os ingredientes utilizados. No entanto, a kombucha é geralmente composta principalmente de água, uma vez que é feita através da fermentação do chá verde, apresentando um teor de umidade mais elevado.

Fazendo um comparativo entre bebidas populares, observamos que o teor de umidade variável. A água pura tem um teor de umidade de 100%, pois não contém nenhum outro componente além de H<sub>2</sub>O. Refrigerantes comuns podem ter um teor de umidade de aproximadamente 90 a 95%, já que contêm água como ingrediente principal, juntamente com açúcar, aromatizantes e outros aditivos (Darkwah *et al.*, 2020).

O teor de umidade em sucos de frutas geralmente está na faixa de 85 a 95%, dependendo do tipo de fruta e de como o suco é processado. Alguns sucos podem ter um teor de umidade mais alto se não forem concentrados (Darkwah *et al.*, 2020).

Outro ponto analisado nas bebidas foi o teor de cinzas, compreendendo entre 0,04% a 0,05%. A cinza é o resíduo mineral que resta após a queima completa de um material orgânico. Em kombucha, os minerais são provenientes dos ingredientes utilizados no chá, como as folhas de chá e o açúcar, bem como de qualquer adição de frutas, ervas ou outros ingredientes durante a fermentação (Silva *et al.*, 2024).

O estudo de Silva *et al.* (2024), analisou uma kombucha elaborada com 100 gramas de carboidrato e fermentada por 10 dias apresentou teor de cinzas referente à 0,04%. Esse valor está em sintonia com os dados apresentados pelas kombuchas analisadas nesse estudo.

Em geral, o teor de cinzas em kombucha tende a ser relativamente baixo, uma vez que a maior parte dos sólidos minerais é consumida durante o processo de fermentação pelas bactérias e leveduras presentes na cultura simbiótica de bactérias e leveduras. No entanto, pequenas quantidades de minerais podem permanecer na bebida final, contribuindo para seu perfil nutricional (Silva *et al.* 2024). Os valores médios de cinzas em chá verde varia entre 0,22% a 1,15% (Silva; Silva; Michelin, 2013).

Na análise de determinação de proteínas das kombuchas encontrou-se valores entre 0,01% a 0,05%, mostrando diferença significativa entre os ensaios analisados. É possível observar que, no estudo de Cabral e Paula (2021) foram analisadas kombuchas de chá verde e

obteve-se teores de proteínas entre 0,1% a 0,2%, acima do encontrado nesse estudo. O autor relata que os teores de proteínas foram influenciados pela adição de frutas na fermentação das bebidas, o que alterou essa composição.

A quantidade de proteínas na kombucha geralmente é muito baixa, muitas vezes insignificante. A maior parte dos nutrientes presentes na kombucha é proveniente do chá e do açúcar que são fermentados durante o processo de fermentação. No entanto, é possível que traços mínimos de proteínas possam estar presentes devido à presença de resíduos de matéria orgânica ou bactérias presentes no SCOBY.

O teor de lipídeos ou extrato etéreo das bebidas analisadas nesse estudo variaram entre 0,03% a 0,06% ( $p < 0,05$ ) nos ensaios analisados. O teor de lipídios em kombuchas é baixo. Como resultado do processo de fermentação, que geralmente dura de 7 a 14 dias na grande maioria dos estudos, o teor de lipídios tende a ser mínimo. Os lipídios são geralmente encontrados em quantidades muito pequenas ou ausentes em bebidas fermentadas como o kombucha.

No entanto, a composição exata do kombucha pode variar dependendo dos ingredientes utilizados, do tempo de fermentação, das condições de fermentação e de outros fatores. Algumas marcas comerciais de kombucha podem adicionar ingredientes adicionais, como sucos de frutas ou óleos essenciais, que podem afetar a composição nutricional, incluindo o teor de lipídios. Recomenda-se sempre verificar os rótulos nutricionais para obter informações específicas sobre os teores de nutrientes em uma marca específica de kombucha.

Os carboidratos totais das bebidas de kombucha analisadas nesta pesquisa variaram entre 9,67% na kombucha com 7 dias de fermentação; e 12-12,05% nas kombuchas com 9 dias de fermentação, sendo o nutriente com a maior concentração na composição da bebida. Isso ocorre porque o açúcar, especificamente a sacarose, é um dos principais ingredientes na produção da kombucha, e seus níveis variam conforme o tempo de fermentação, apresentando pico de maior consumo no 7 dia para a produção de ácidos orgânicos (Datora *et al.*, 2023).

Durante o processo de fermentação, as bactérias e leveduras presentes na cultura SCOBY consomem uma parte do açúcar adicionado inicialmente ao chá. Isso resulta na produção de ácido acético, ácido glucurônico, ácido láctico e gás carbônico, entre outros compostos, e reduz o teor de açúcar na bebida final. No entanto, uma certa quantidade de açúcar ainda pode permanecer, dependendo de quanto foi consumido durante a fermentação (Cardoso *et al.* 2020).

O valor energético total das kombuchas mostraram valores entre 39,39 kcal a 48,46 kcal, conforme 100 mL do produto. Esses resultados mostram que kombucha é uma bebida

conhecida por ter um valor energético relativamente baixo em comparação com muitas outras bebidas açucaradas. Isso ocorre porque a fermentação do chá reduz significativamente o teor de açúcar, resultando em menos calorias na bebida final. No entanto, o valor energético exato pode variar dependendo dos ingredientes específicos e do processo de fabricação de cada marca de kombucha.

Nesse sentido, processo de otimização do kombucha envolve várias etapas e considerações para garantir a produção de uma bebida de alta qualidade. Entender as variáveis que afetam o processo influencia de forma positiva a determinação das melhores condições de produção. Ao otimizar esses aspectos do processo de produção de kombucha, os produtores podem garantir uma bebida de alta qualidade, com sabores consistentes e características desejáveis. A experimentação e o ajuste contínuo são muitas vezes necessários para atender às preferências do consumidor e às demandas do mercado.

Como aparato de escolha sobre o olhar da composição centesimal, a formulação K12 sobressaiu-se entre as demais, apresentando as melhores respostas sobre essas análises.

## CONCLUSÕES

As condições de fermentação estudadas para a obtenção da kombucha de chá verde com as variáveis diretas de quantidade de carboidrato e tempo de fermentação foram significativas para a definição da melhor bebida.

Todos os ensaios apresentaram resultados satisfatórios nas análises físico-químicas avaliadas como respostas às condições de otimização, sobressaindo com significância às análises de sólidos solúveis totais, relação sólido solúveis totais/acidez volátil e teor alcoólico, conforme a regressão.

O ensaio K6, combinou a quantidade de carboidrato de 110 gramas fermentado em 9 dias, mostrou-se com as melhores condições sobre o ponto de vista tecnológico para a bebida.

A composição centesimal das kombuchas apresentou umidade adequada e quantidades insignificantes para teor de cinzas, proteínas e lipídios, baixa concentração de carboidratos e valor energético total para classificação de bebida com baixo valor energético, podendo apresentar que a nova formulação apontada pelo delineamento, K12 elaborada com 110 gramas de carboidrato e fermentada por 7 dias, sobressaiu-se como a melhor sobre o processo de otimização.

O estudo apresenta grande relevância por direcionar a produção de kombucha para uma investigação assertiva sobre o impacto do consumo da bebida na saúde humana e valor comercial do produto.

## REFERÊNCIAS

- ALLOULOU, Arian *et al.* Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha in alloxan-induced diabetic rats. **Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 12-63, set. 2012.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *In:* (Ed.). Official methods of analysis. Washington: AOAC, 2005. **Cap. Appendix D:** guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. Edição 181, **Diário Oficial da União**, Brasília/DF.
- CABRAL, Eliane Dutra; PAULA, Sara Mendonça Pinto. **Elaboração de kombuchas artesanais à base de chá verde: análise físico-química e microbiológica**. 2020. 22 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Nutrição), Recife/Pernambuco – 2021.
- CARDOSO, Rodrigo Resende *et al.* Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, n. 1, p. 108-129, feb. 2020.
- CHEN, Chen; LIU, Bo Yang Victor. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Filipinas, v. 89, n. 5, p. 834-839, dec. 2000.
- CHITARRA, Maria Isabel Fernandes; CHITARRA, Adimilson Bosco. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.
- CHU, Sue; CHEN, Crat. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, New York, v. 98, n. 3, p. 502-507, may. 2006.
- DARKWAH, Gerardette *et al.* Quality assessment of some selected locally produced and marketed soft drinks in Ghana. **Scientific African**, v. 8, n. 41, p. 341-360, mar. 2020.
- DARTORA, Bruna *et al.* Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, v. 174, n. 1, p. 1-11, oct. 2023.
- GREENWALT, Curt *et al.* Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, Oxford, v. 63, n. 7, p. 976-981, ago. 2000.
- JAYABALAN, Raul *et al.* A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, New York, v. 13, n. 4, p. 538-550, aug. 2014.
- SILVA, Maria Eduarda Turman *et al.* Avaliação do potencial de utilização de casca de uva no desenvolvimento de kombucha. **Nutrivisa**, v. 11, n. 1, p. 1-12, jan. 2024.

LEONARSKI, Eduardo *et al.* Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola by product as raw material. **Food Science and Technology**, Nova Delhi, v. 135, n. 22, p. 1-8, aug. 2020.

MALBASA, Radomir *et al.* Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, New York, v. 106, n. 3, p. 1039-1045, ago. 2008.

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra *et al.* Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, Washington, v. 83, n. 3, p. 580-588, marc. 2018.

YAN, Zheng *et al.* Comprehensive evaluation of quality and bioactivity of kombucha from six major tea types in China. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 36, jan. 2024.

YANG, Zeep. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 89, n.1, p. 150-156, jun. 2009.

#### **5.4 Artigo Científico IV**

O manuscrito “**Identificação de Compostos Fenólicos em Kombuchas de Chá Verde (*Camellia sinensis* L.) Produzidas em Diferentes Condições**” será submetido à revista Antioxidants.

Autores: Iraído Francisco Soares, Maria das Dores Alves de Oliveira, Ana Karine de Oliveira Soares, Joaquim Soares da Costa Júnior, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo, Robson Alves da Silva

## IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM KOMBUCHAS DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis* L.) PRODUZIDAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Iraíldo Francisco Soares<sup>1</sup>, Maria das Dores Alves de Oliveira<sup>2</sup>, Ana Karine de Oliveira Soares<sup>1</sup>, Joaquim Soares da Costa Júnior<sup>3</sup>, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo<sup>1</sup>, Robson Alves da Silva<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>3</sup>Curso de Licenciatura em Química, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>4</sup>Curso de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, Teresina, Piauí, Brasil.

Autor para correspondência: iraildo.soares@hotmail.com

### RESUMO

A kombucha é uma bebida milenar fermentada por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, resultando em uma bebida ácida e levemente gaseificada com fitoconstituintes nutricionais importantes, especialmente compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Esses compostos reduzem os riscos de doenças e são de grande interesse para os consumidores. O conteúdo da kombucha varia conforme as espécies microbianas e as condições de fermentação, como tempo e temperatura, tipo de chá e quantidade de carboidrato. A identificação precisa dos compostos fenólicos é crucial para garantir a qualidade e a aceitação do produto, além de atender às exigências regulatórias e promover segurança para o consumidor. O estudo objetivou identificar compostos fenólicos em três kombuchas de chá verde produzidas em diferentes condições. Foram analisados quatro extratos das bebidas para a determinação do melhor solvente de extração de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu. A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta performance. Como resultado, o conteúdo de compostos fenólicos totais não diferiu entre os quatro extratos analisados, sendo escolhida como melhor condição a combinação de etanol 100% + metanol 100%, por sua melhor estabilidade para a kombucha. Na análise cromatográfica, foram identificados quatro componentes com propriedades bioativas: ácido clorogênico, cafeína, rutina e ácido cinâmico. Esses compostos desempenham um papel crucial na garantia da qualidade e aceitação do produto, além de atender às exigências regulatórias e promover a confiança do consumidor. São necessários outros estudos complementares para analisar a quantificação dos compostos nas bebidas estudadas, proporcionando assim uma investigação completa do conteúdo alvo.

**Palavras-chave:** Bebida Funcional. Composição. Fenólicos. Bioatividade.

## ABSTRACT

Kombucha is an ancient drink fermented by a symbiotic culture of bacteria and yeast, resulting in an acidic and lightly carbonated drink with important nutritional phytoconstituents, especially phenolic compounds with antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties. These compounds reduce the risk of disease and are of great interest to consumers. The content of kombucha varies depending on the microbial species and fermentation conditions, such as time and temperature, type of tea and amount of carbohydrate. The accurate identification of phenolic compounds is crucial to ensure product quality and acceptance, in addition to meeting regulatory requirements and promoting consumer safety. The study aimed to identify phenolic compounds in three green tea kombuchas produced under different conditions. Four beverage extracts were analyzed to determine the best solvent for extracting total phenolic compounds using the Folin-Ciocalteu method. The identification of compounds was carried out by high-performance liquid chromatography. As a result, the content of total phenolic compounds did not differ between the four extracts analyzed, with the combination of 100% ethanol + 100% methanol being chosen as the best condition, due to its better stability for kombucha. In the chromatographic analysis, four components with bioactive properties were identified: chlorogenic acid, caffeine, rutin and cinnamic acid. These compounds play a crucial role in ensuring product quality and acceptance, as well as meeting regulatory requirements and promoting consumer confidence. Other complementary studies are needed to analyze the quantification of compounds in the studied drinks, thus providing a complete investigation of the target content.

**Keywords:** Functional Beverage. Composition. Phenolics. Bioactivity.

## 1 INTRODUÇÃO

A kombucha é uma bebida milenar com grande potencial devido às suas propriedades funcionais. A infusão de folhas de chá verde (*Camellia sinensis* L.) adicionada de açúcar é fermentada por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY), resultando em uma bebida ácida e levemente gaseificada. A bebida contém fitoconstituintes com relevante valor nutricional, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, conhecidos por suas características antioxidantes, anti-inflamatórias e sua associação com a diminuição dos riscos de diversas doenças (Silva-Júnior *et al.*, 2022).

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários derivados de plantas, bem reconhecidos por reduzirem os riscos de doenças. Assim, há grande interesse em descobrir novas fontes de antioxidantes fenólicos naturais para aplicação na rotina alimentar como suplementos dietéticos pelos consumidores e/ou como ingredientes nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Silva *et al.*, 2019).

Pesquisas mostraram que o conteúdo de compostos do chá de kombucha variam em termos de espécies microbianas e concentração de metabólitos, como ácidos orgânicos, etanol e açúcares, vitaminas e componentes bioativos. Além disso, diversas variáveis têm sido utilizadas em pesquisas recentes para avaliar os perfis das kombuchas, sendo o tempo e a temperatura os parâmetros mais críticos para os bioprocessos (Fabricio *et al.*, 2022; Neffe-Skocińska *et al.*, 2017).

Nesse sentido, a identificação de compostos fenólicos apresenta grande importância em kombuchas, devido às suas reconhecidas propriedades funcionais, que contribuem significativamente para a promoção da saúde e a prevenção de doenças. Esses compostos também são responsáveis por diversas características sensoriais, incluindo sabor, aroma e cor, influenciando diretamente a qualidade e a aceitação dos produtos pelos consumidores. Além disso, o controle dos níveis de fenólicos é essencial para a indústria alimentícia, pois permite a padronização e a garantia da estabilidade dos produtos, atendendo às exigências regulatórias e de mercado da instrução normativa nº 43/19 (Brasil, 2019; Datora *et al.*, 2023).

Portanto, a análise precisa do conteúdo desses componentes é crucial para a indústria alimentícia, servindo como um parâmetro de autenticidade e pureza, promovendo a confiança do consumidor e permitindo uma rotulagem mais precisa sobre os benefícios nutricionais da bebida. Neste contexto, o estudo teve como objetivo identificar compostos fenólicos em kombuchas de chá verde produzidas em diferentes condições.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Elaboração das Kombuchas

Os insumos da produção de kombucha como chá verde e carboidrato (açúcar refinado de cana-de-açúcar/sacarose) foram obtidos no comércio varejista de Teresina, Piauí, Brasil em um único lote. O consórcio de microrganismos de bactérias e leveduras (SCOBY) foi adquirido em loja virtual do comércio nacional.

As bebidas analisadas no estudo foram produzidas conforme a metodologia descrita por Cardoso *et al.* (2020) com algumas modificações. O chá verde das folhas de *Camellia sinensis* L. foi preparado na concentração padrão de 10 gramas de folhas selecionadas infundidas em 1L de água mineral com pH 8,34, aquecida a 100°C e com imersão das folhas durante o tempo de 10 minutos com a chama de aquecimento desligada. Após o período infusão, o chá foi filtrado em papel filtro e alocado em recipiente de vidro até atingir temperatura ambiente.

Com o chá nas condições de temperatura ambiental adicionou-se o SCOBY simbiótico de bactérias e leveduras como agente de fermentação na quantidade de 9,5% de m/v, juntamente com 100 mL/L do chá de iniciação e elaboraram-se três condições de produção de kombuchas, escolhidas em delineamento estatístico. As amostras foram divididas em: K1 comportando 110 gramas de sacarose fermentada por 9 dias; K2 contendo 75 gramas de sacarose fermentada por 9 dias; e K3 com adição de 110 gramas de sacarose fermentada por 7 dias. As bebidas fermentaram em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), marca Quimis, com faixa de trabalho -10°C a 60°C, com temperatura controlada e fixada em 25°C.

### 2.2 Preparação dos Extratos

Foram preparados extratos com as amostras de kombucha seguindo a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2010) com algumas adaptações. Os extratos das amostras foram preparados colocando 10g da amostra no tubo falcon de 50 mL e acrescentando em seguida proporções distintas de reagentes: a) amostra + 8 mL de metanol 50%; b) amostra + 4 mL de álcool (70%) + 4 mL de metanol (50%); c) amostra + 2 mL de ácido acético (2,5%) + 6 mL de metanol (100%); d) amostra + 4 mL de etanol (100%) + 4 mL de metanol (100%) (Zhou *et al.*, 2022).

O material foi homogeneizado e levado ao ultrassom (Ultra Cleaner 1600) por 30 minutos, seguindo-se a centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm, com posterior recolhimento do sobrenadante em um balão, reservando-o. Realizou-se a filtração no papel filtro, adicionou-se água destilada para completar 10 mL e foi armazenado a - 6°C na ausência de luz para posterior leitura.

### **2.3 Determinação de Fenólicos Totais**

O conteúdo de compostos fenólicos nos extratos foi determinado por espectrofotometria utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSS, 1965). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato foi misturada com 2 mL de água milli-Q, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio 20% em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água milli-Q. Após 2 horas de repouso em ausência de luz e temperatura ambiente, efetuou-se a leitura das absorvâncias a 765 nm em espectrofotômetro (BEL 1102).

Os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra. A concentração de fenólicos totais foi obtida por meio da interpolação das absorvâncias em uma curva padrão de ácido gálico construída previamente.

### **2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a Arranjo de Diodo (HPLC-PDA)**

A análise foi realizada em cromatógrafo analítico, Shimadzu modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-visível com arranjo de diodos (PDA), modelo SPD-M20 A, degaseificador DGU-20A3, software de soluções CL (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e coluna Macherey-Nagel Nucleodur® 100-5 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

Os padrões de ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido quínico, apigenina, ácido caféico, crisina, ácido ferúlico, floroglucinal koempferol, luteolina, quercetina e rutina foram obtidos da Sigma Aldrich®. Para os solventes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a Arranjo de Diodo (HPLC-PDA), foram utilizados água ultrapura (sistema 18,2 MΩ cm da Elga Purelab Option-Q), acetonitrila e ácido fórmico, grau HPLC da marca Vetec®.

As amostras K1, K2 e K3 e os padrões foram filtrados em cartucho de extração em fase sólida Chromabond® C18-EC da Macherey-Nagel e disco de filtro de 0,45 µm. A eluição foi realizada com método gradiente de 5-100% em 60 min, e uma fase móvel de uma mistura de água + 0,1% de ácido fórmico (A) + 100% de acetonitrila (B), que foram bombeadas a uma vazão de 1,0 mL/min, injeção de 10 µL das amostras na concentração de 1,0 mg/mL e temperatura do forno da coluna de 40 °C. Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm. A identificação dos compostos químicos nas frações foi realizada comparando o tempo de retenção (Rt) e os espectros de UV com aqueles obtidos pela injeção de padrões preparados nas mesmas condições. As amostras passaram previamente por processo de “clean-up” em cartucho Chromabond® C18-EC (previamente ativado com metanol).

## **2.5 Análise Estatística**

Os dados de compostos fenólicos nos extratos foram analisados pelo método Fatorial, analisando as relações entre variáveis para identificar grupos de variáveis que formam dimensões latentes (fatores) no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de determinação de fenólicos totais e a identificação dos compostos das bebidas de kombucha estão descritos a seguir.

#### 3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Os fenólicos totais são uma ampla classe de metabólitos secundários encontrados em vegetais, caracterizados por conter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente. Esses compostos podem contribuir para a cor, sabor e propriedades antioxidantes dos alimentos de origem vegetal. O conteúdo fenólico encontrado nos extratos de diferentes kombuchas estão expostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Análise do perfil de fenólicos totais dos extratos de kombuchas

AMOSTRA	EXTRATO (GAE/mg)			
	M (100%)	A (70%) + M (50%)	Aa (2,5%) + M (100%)	E (100%) + M (100%)
K1	11,12 <sup>aA</sup>	10,06 <sup>aA</sup>	11,71 <sup>aA</sup>	12,68 <sup>aA</sup>
K2	10,79 <sup>aA</sup>	8,87 <sup>aA</sup>	11,82 <sup>aA</sup>	11,46 <sup>aA</sup>
K3	11,45 <sup>aA</sup>	6,95 <sup>aA</sup>	11,13 <sup>aA</sup>	11,43 <sup>aA</sup>

Fonte: Dados da pesquisa (2024). Legenda: M = metanol; A = álcool; Aa = ácido acético; E = etanol. Letras maiúscula comparam linhas e letras minúsculas comparam colunas.

Observando a Tabela 1, os resultados dos extratos das bebidas de kombucha apresentaram valores entre 10,06 a 12,68 na K1, 8,87 a 11,82 na K2 e 6,95 a 11,45 na amostra K3, respectivamente. Estatisticamente os resultados encontrados não mostraram diferença significativas ( $p < 0,05\%$ ) quando comparados sobre os seus fatores.

Os achados de Datora *et al.* (2023) com a análise de kombuchas elaboradas com adição de 25 gramas de sacarose e fermentadas por 7 dias mostraram resultados maiores, cerca de 417,21 (GAE/mg), quando comparados com os valores descritos neste estudo.

Nos dados de Zheng *et al.* (2024) em pesquisa com kombuchas produzidas com adição de 150 gramas de sacarose e incubadas por 7 dias, foi possível observar teores elevados da composição fenólica presente nas bebidas, trazendo o valor de 365,16 (GAE/mg) quando comparadas com as identificadas neste estudo.

Essas diferenças na composição fenólica da kombucha é altamente influenciada pelo tipo de chá utilizado como substrato, que pode variar em termos de origem geográfica, método de processamento e variedade da erva (Leal *et al.*, 2018). Além disso, o tempo e as

condições de fermentação, como temperatura, pH e a concentração inicial de açúcares, podem afetar significativamente a produção de compostos fenólicos (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

A microbiota específica das culturas de kombucha, que pode diferir entre estudos, também desempenha um papel crucial, uma vez que diferentes cepas de bactérias e leveduras têm capacidades distintas de biossíntese e degradação de compostos fenólicos (Jayabalan *et al.*, 2014).

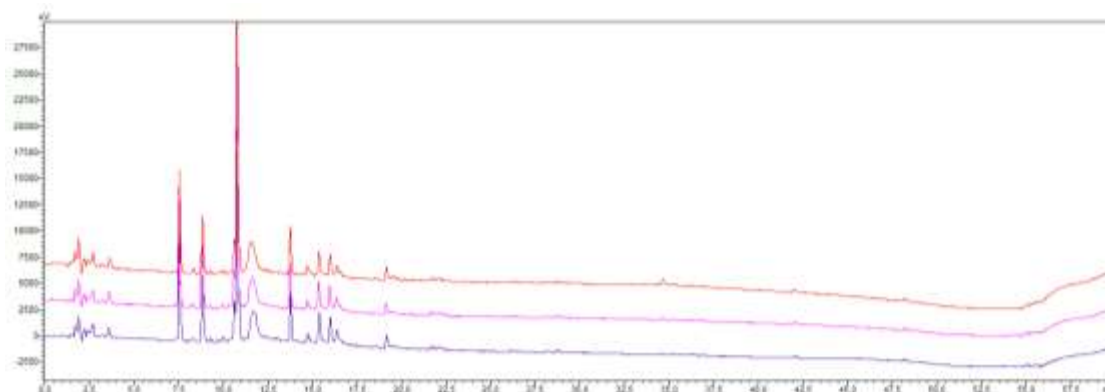
As técnicas analíticas utilizadas para quantificação dos compostos fenólicos, incluindo o tipo de solvente de extração e os métodos de detecção e quantificação, podem introduzir variações nos resultados obtidos (Jayabalan *et al.*, 2014).

Neste contexto, essas diferenças de teores puderam mostrar que, os dados contidos deste estudo não apresentaram diferença significativa quanto ao tipo de extrato elaborado. O extrato escolhido para o seguimento da análise de identificação das amostras foi o que comportou etanol 100% + metanol 100%. A composição deste extrato entre kombucha e reagentes representa maior estabilidade por ser um componente hidroalcolico polar na resposta de extração, quando comparado com os demais solventes, equilibra a polaridade e a capacidade de dissolução, maximizando a extração de uma ampla gama de compostos fenólicos (Datora *et al.*, 2023).

### **3.2 Identificação de Compostos Fenólicos por HPLC-PDA**

Os compostos fenólicos identificados nas amostras de kombuchas mostraram a presença de alguns componentes. Os extratos analisados obtiveram respostas sobre os mesmos compostos, como mostra a Figura 1. Nesta análise, foi possível identificar quatro compostos fenólicos no canal de 254 nm, sendo estes a cafeína, a rutina, ácido cinâmico e ácido clorogênico.

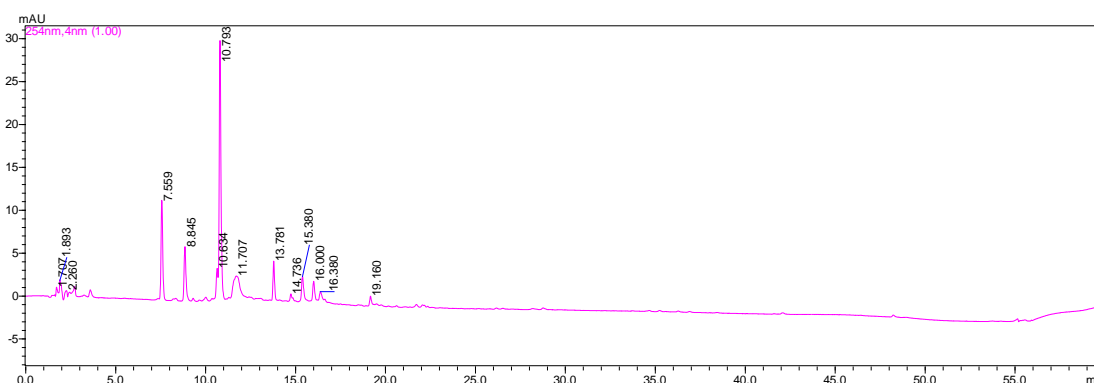
**Figura 1.** Cromatograma das kombuchas de chá verde.



Fonte: Dadas da pesquisa (2024). Legenda: vermelho: K1; rosa: K2; lilás: K3.

O tempo de retenção e a localização de cada componente pode ser visualizado nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6.

**Figura 2.** Identificação de compostos em kombuchas no canal 254 nm.

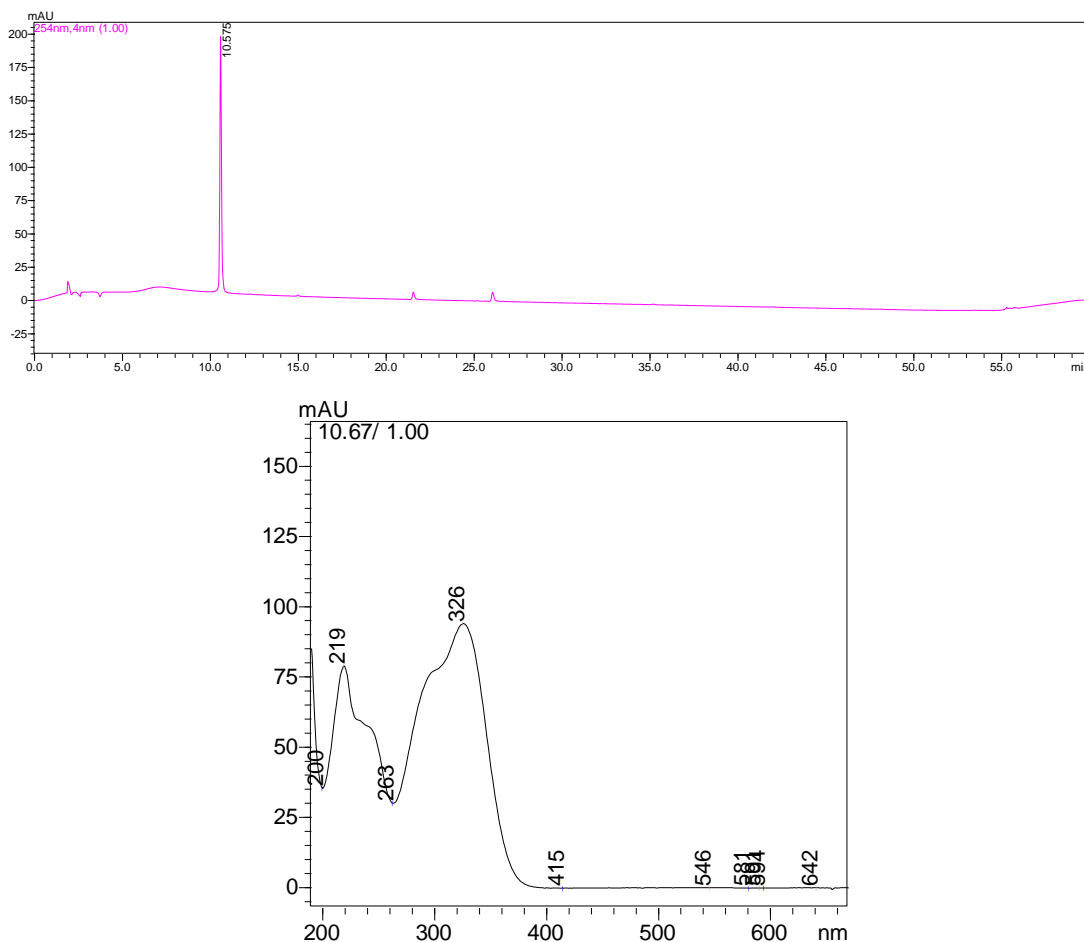


Fonte: Dadas da pesquisa (2024).

Conforme a Figura 2, todos os componentes identificados na corrida da coluna no canal 245 nm foram expressos até o tempo de 20 minutos. Esses dados foram sobrepostos sobre os padrões de cada composto para sua efetiva confirmação.

O primeiro composto a ser identificado na cromatografia líquida de alta performance foi o ácido clorogênico, expresso no tempo de retenção em 10.6 minutos. Sua visualização pode ser mostrada na Figura 3.

**Figura 3.** Retenção do composto ácido clorogênico.

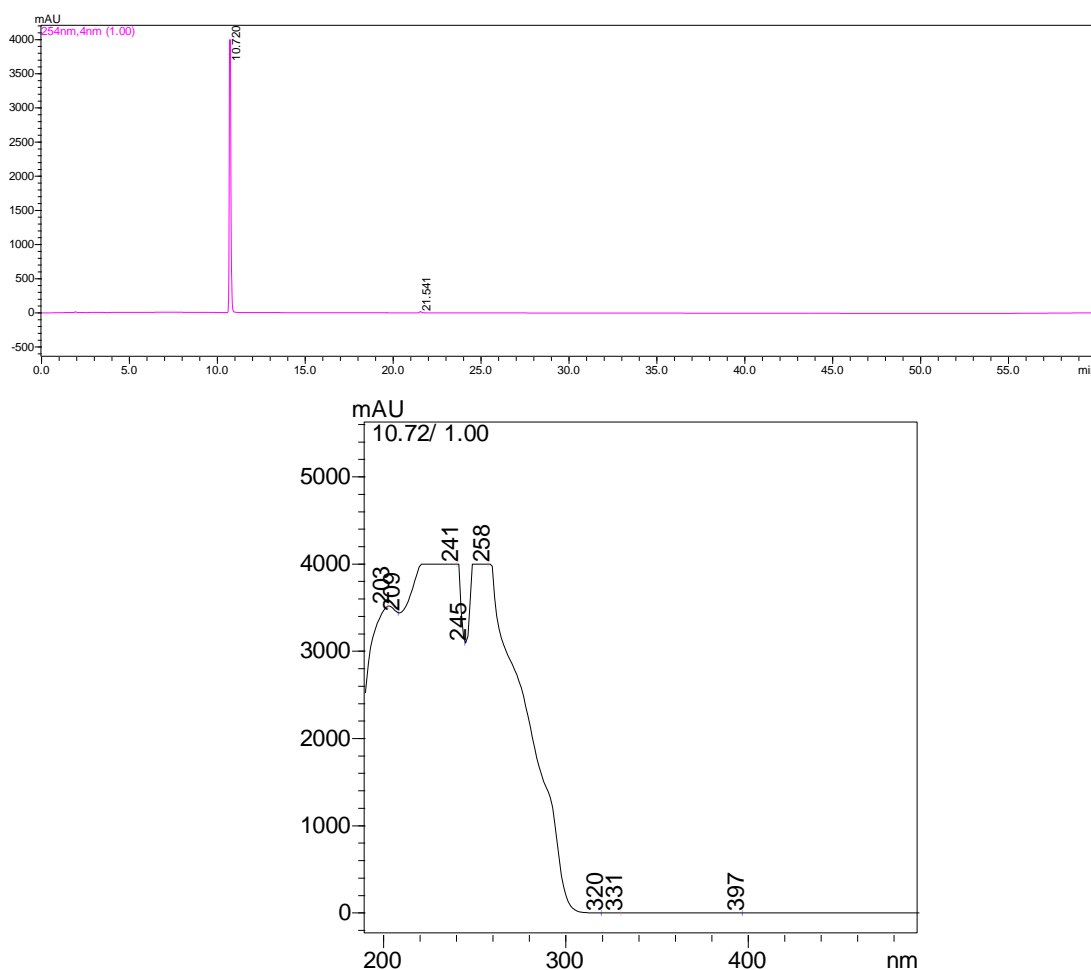


Fonte: Dadas da pesquisa (2024).

O ácido clorogênico é um composto fenólico amplamente distribuído em plantas, especialmente em café, frutas e vegetais. Ele é um éster do ácido cafeico e do ácido quínico e é conhecido por suas propriedades antioxidantes e potenciais benefícios para a saúde. Possui como fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_9$  e desempenha efeitos como propriedades antioxidantes, ação antiinflamatória, controle glicêmico e saúde cardiometabólica (Matsui *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2006).

O segundo composto identificado na análise foi a cafeína, com tempo de retenção em 10,7 minutos. A visualização da sua identificação pode ser observada na Figura 4.

**Figura 4.** Retenção do composto cafeína.

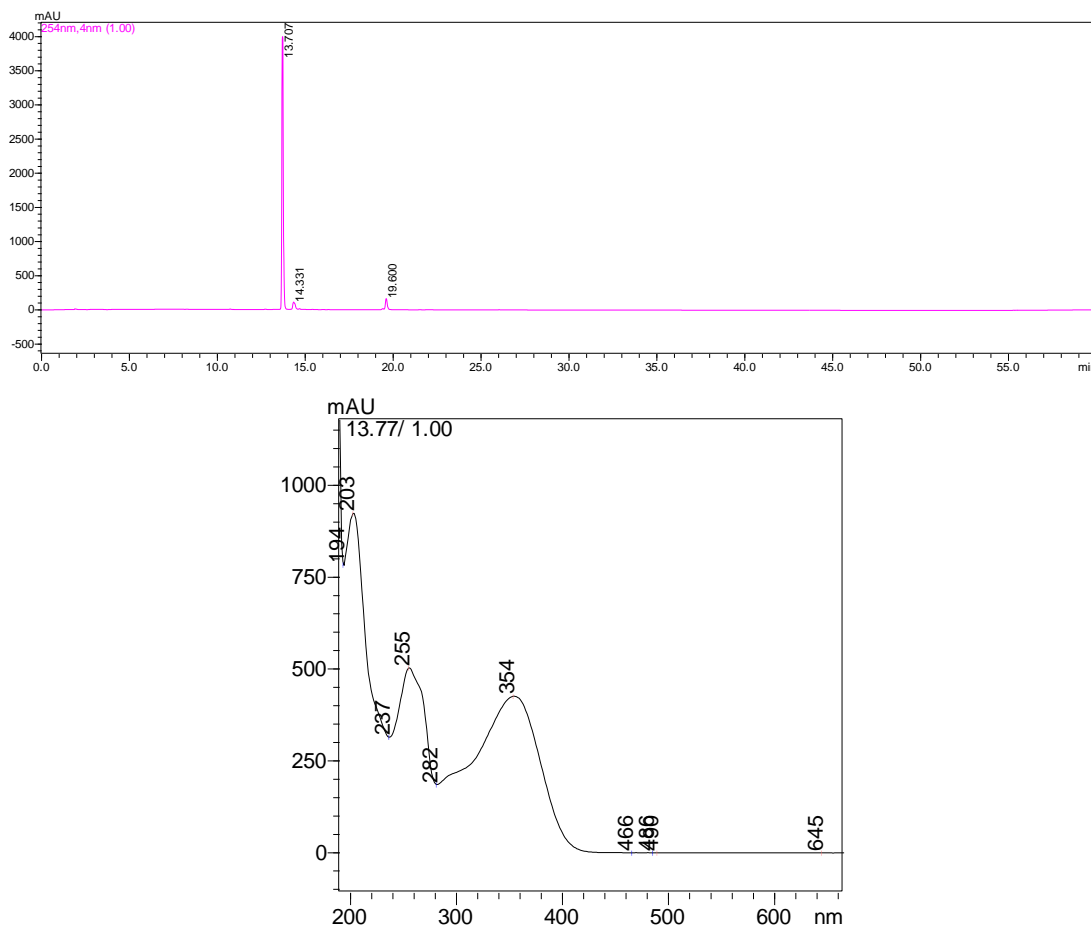


Fonte: Dadas da pesquisa (2024).

A cafeína é um alcaloide natural, pertencente ao grupo das xantinas. É conhecida principalmente por sua presença no café, mas também é encontrada em chá verde, chocolate, bebidas energéticas e alguns medicamentos. Possui como fórmula molecular  $C_8H_{10}N_4O_2$  e apresenta alguns benefícios relacionados ao seu uso, como melhora no desempenho cognitivo (Einöther; Giesbrecht, 2013), aumento da capacidade física (Guest *et al.*, 2021), propriedade antioxidante e redução do risco de doenças neurodegenerativas (Sun; Shahrajabian, 2023).

O terceiro componente identificado na análise foi a rutina, com tempo de retenção em 13,7 minutos. A visualização da sua identificação pode ser observada na Figura 5.

**Figura 5.** Retenção do composto rutina.



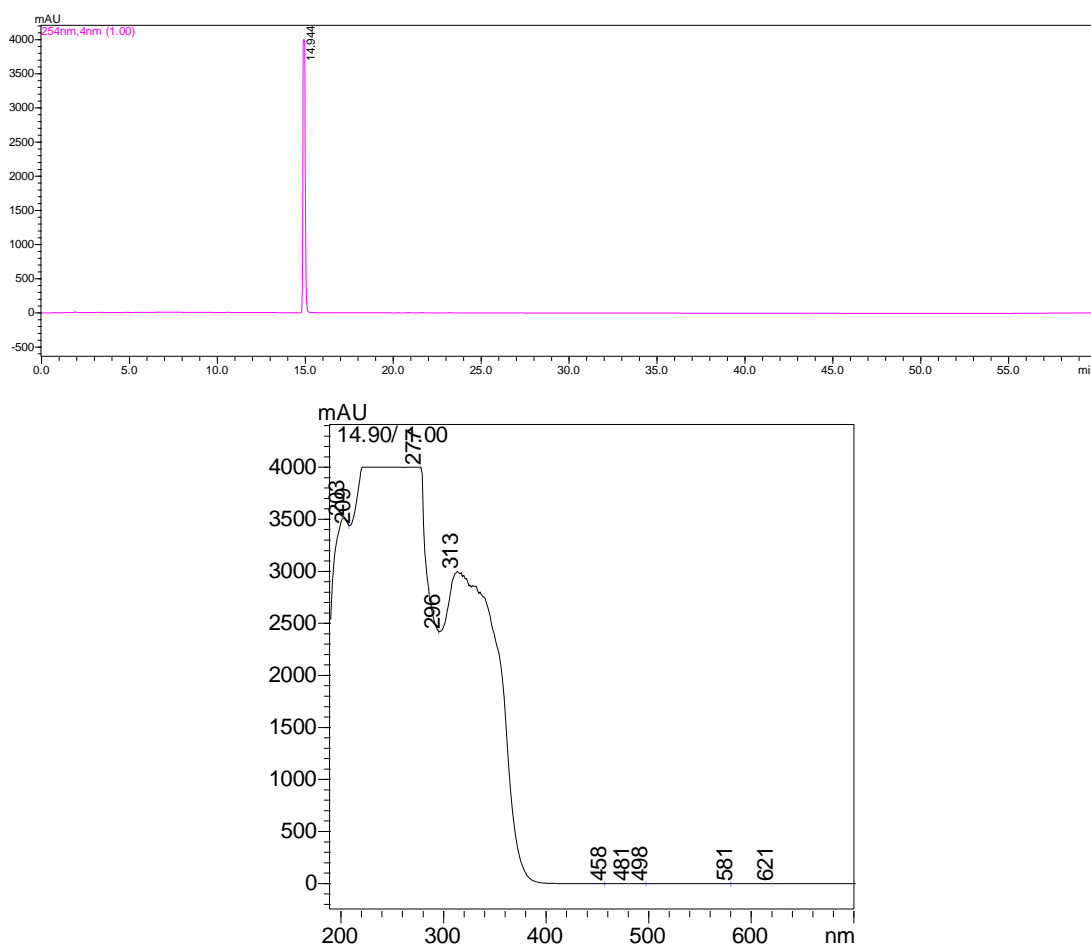
Fonte: Dadas da pesquisa (2024).

A rutina, também conhecida como vitamina P, rutosídeo ou quercetina-3-O-rutinósido, é um bioflavonóide glicosídeo que é encontrado em várias plantas, chás, trigo sarraceno, frutas cítricas e folhas de eucalipto, tem fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{16}$ . É um composto químico conhecido por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatória, com ação sobre a saúde cardiovascular e prevenção das desordens neurodegenerativas (Pandey *et al.*, 2021).

A rutina pode ser considerada um agente anticancerígeno seguro, com poucos ou limitados efeitos colaterais (como MDR (resistência a múltiplos medicamentos)) em comparação com outras terapias contra o câncer, incluindo cirurgia, terapia com células-tronco, radioterapia, quimioterapia/imunoterapia, e terapia fotodinâmica (Pandey *et al.*, 2021).

O quarto componente identificado na análise foi o ácido cinâmico, com tempo de retenção em 14,9 minutos. A visualização da sua identificação pode ser observada na Figura 6.

**Figura 6.** Retenção do composto ácido cinâmico.



Fonte: Dadas da pesquisa (2024).

O ácido cinâmico é um composto químico presente em diversos vegetais. É conhecido por seu aroma característico que lembra a canela e possui propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. O ácido cinâmico é um composto versátil com múltiplas aplicações, principalmente devido à sua estrutura química que permite uma variedade de reações químicas e sua presença natural em várias plantas aromáticas (Lakshmi *et al.*, 2009).

O componente possui efeitos secretagógicos de insulina. Esta dupla atividade do ácido cinâmico na sinalização e secreção da insulina revela-o como um composto prototípico ideal para estudos estruturais e funcionais. Em conclusão, levantamos a hipótese de que o ácido cinâmico ativa o transporte de glicose mediado por insulina através do envolvimento do GLUT4, mas através de uma via independente de PI3-K, em miotubos L6 (Lakshmi *et al.*, 2009).

Os componentes identificados nas bebidas de kombucha relacionam-se sobre diversos aspectos que tangem a saúde, tendo grande aplicabilidade sobre atividade antioxidante,

antimicrobiana e antiinflamatória, podendo assim ter seu consumo regulado à saúde e a prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis.

#### **4 CONCLUSÃO**

Foi possível notar que o conteúdo de compostos fenólicos totais não diferiu entre os extratos das três bebidas analisadas. A cromatografia líquida de alta performance identificou quatro tipos diferentes de compostos fenólicos com propriedades bioativas e aplicação na saúde, desempenhando neste trabalho um papel crucial para garantir a qualidade e a aceitação do produto, além de atender às exigências regulatórias e promover a confiança do consumidor. É necessário outros estudos complementares para analisar a quantificação dos compostos nas bebidas analisadas, fazendo assim uma completa investigação no conteúdo alvo.

## REFERÊNCIAS

- CARDOSO, Rodrigo Resende *et al.* Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 128-143, feb. 2020.
- DARTORA, Bruna *et al.* Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, v. 174, n. 1, p. 1-11, oct. 2023.
- EINÖTHER, Suzane; GIESBRECHT, Timo. Caffeine as an attention enhancer: Reviewing existing assumptions. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 2, p. 251-274, jan. 2013.
- FABRICIO, Mariana Fensterseifer *et al.* Effect of freeze-dried kombucha culture on microbial composition and assessment of metabolic dynamics during fermentation. **Food Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 103889, feb. 2022.
- GUEST, Nanci *et al.* International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 18, n.2, p. 383-344, jan. 2021.
- JAYABALAN, Rasu *et al.* 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, aug. 2014.
- LAKSHMI, Baddireddi Subhadra *et al.* Cinnamic acid, from the bark of *Cinnamomum cassia*, regulates glucose transport via activation of GLUT4 on L6 myotubes in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent manner. **Journal of Diabetes**, v. 1, n. 2, p. 99-106, jun. 2009.
- MATSUI, Neuza *et al.* Inhibitory effects of chlorogenic acid on neutrophil infiltration in mice with carrageenan-induced acute inflammation. **Life Sciences**, v. 81, n. 11, p. 1064-1069, aug. 2007.
- NEFFE-SKOCIŃSKA, Katarzyna *et al.* Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **CyTA Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601-607, jan. 2017.
- PANDEY, Pratibha *et al.* Rutin (Bioflavonoid) as Cell Signaling Pathway Modulator: Prospects in Treatment and Chemoprevention. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 11, p. 1069, 2021.
- RUFINO, Maria do Socorro *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, aug. 2010.
- SILVA, Livia Beatriz Aparecida *et al.* Bioactive food compounds, epigenetics and chronic disease prevention: Focus on early-life interventions with polyphenols. **Food Research International**, v. 125, n. 12, p. 648-670, nov. 2019.
- SILVA-JÚNIOR, Jayme César *et al.* Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. **Current Research in Food Science**, v. 5, n. 1, p. 360-365, feb. 2022.

SUN, Wenli; SHAHRAJABIAN, Hesam. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1845-1853, jan. 2023.

SUZUKI, Ang *et al.* Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 6, p. 1065-1073, out. 2006.

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra *et al.* Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, Washington, v. 83, n. 3, p. 580-588, marc. 2018.

ZHENG, Yan *et al.* Comprehensive evaluation of quality and bioactivity of kombucha from six major tea types in China. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 36, jan. 2024.

ZHOU, Dan-Dan *et al.* Fermentation with Tea Residues Enhances Antioxidant Activities and Polyphenol Contents in Kombucha Beverages. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 155-172, jan., 2022.

### 5.5 Artigo Científico V

O manuscrito “**Atividade Antioxidante e Estresse Oxidativo de Chá Verde (*Camellia Sinensis* L.) e Kombuchas de Chá Verde em Modelo Pré-Clínico de Larvas de *Tenebrio Molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)**” será submetido à revista *Nutrients*.

Autores: Iraíldo Francisco Soares, José Moreira Tavares Neto, Joyce Lopes Macedo, Daniel Dias Rufino Arcanjo, Robson Alves da Silva

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO DE CHÁ VERDE  
(*Camellia sinensis* L.) E KOMBUCHAS DE CHÁ VERDE EM MODELO PRÉ-  
CLÍNICO DE LARVAS DE TENEBRIO MOLITOR (*Coleoptera: Tenebrionidae*)**

Iraíldo Francisco Soares<sup>1</sup>, José Moreira Tavares Neto<sup>2</sup>, Joyce Lopes Macedo<sup>3</sup>, Daniel Dias  
Rufino Arcanjo<sup>2,3</sup>, Robson Alves da Silva<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>4</sup>Curso de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, Teresina, Piauí, Brasil.

Correspondência: iraildo.soares@hotmail.com

## **RESUMO**

O chá verde é uma das bebidas mais populares em todo o mundo, conhecido por seus potenciais benefícios à saúde e sua expressiva capacidade antioxidante. A kombucha, bebida fermentada derivada do chá verde, apresenta uma diversidade de funcionalidades, despertando interesse em pesquisas que investiguem a interação de seu consumo na saúde. Com isso, este trabalho propôs analisar a atividade antioxidante e o estresse oxidativo do chá verde e de kombuchas de chá verde em um modelo pré-clínico usando larvas de *Tenebrio molitor*. Foram investigados o chá verde e três bebidas de kombucha produzidas em diferentes condições, utilizando como controle positivo o dimetilsulfóxido e como controle negativo a solução salina, observando suas respostas em relação à taxa de sobrevivência, produção de melanina, atividade da catalase e grupamento sulfídrico não proteico. Utilizaram-se 104 animais, divididos em quatro grupos, analisando seus resultados em dois períodos distintos, 24 horas e 48 horas após a aplicação. Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência superior a 50% nos grupos de chá verde e kombucha, confirmando a ausência de toxicidade nas bebidas. Além disso, foram observadas a produção de melanina, a atividade da enzima catalase e a avaliação dos grupamentos sulfídricos não proteicos com respostas pró-oxidante e antioxidante. Os resultados obtidos auxiliaram no desenvolvimento da pesquisa, fornecendo informações valiosas sobre os potenciais benefícios antioxidantes dessas substâncias e como elas podem afetar organismos vivos. Esses dados podem ajudar no compartilhamento de informações para outros estudos sobre a segurança e eficácia dessas bebidas.

**Palavras-chave:** Chá verde. Kombucha. Bebida. Pró-oxidante. Antioxidante.

## ABSTRACT

Green tea is one of the most popular drinks around the world, known for its potential health benefits and significant antioxidant capacity. Kombucha, a fermented drink derived from green tea, has a variety of functionalities, arousing interest in research that investigates the interaction of its consumption on health. Therefore, this work proposed to analyze the antioxidant activity and oxidative stress of green tea and green tea kombuchas in a pre-clinical model using *Tenebrio molitor* larvae. Green tea and three kombucha drinks produced under different conditions were investigated, using dimethyl sulfoxide as a positive control and saline solution as a negative control, observing their responses in relation to survival rate, melanin production, catalase activity and non-hydrogen sulfide group. protein. 104 animals were used, divided into four groups, analyzing their results in two different periods, 24 hours and 48 hours after application. The results showed a survival rate of more than 50% in the green tea and kombucha groups, confirming the absence of toxicity in the drinks. Furthermore, the production of melanin, the activity of the catalase enzyme and the evaluation of non-protein hydrogen sulfide groups with pro-oxidant and antioxidant responses were observed. The results obtained helped in the development of research, providing valuable information about the potential antioxidant benefits of these substances and how they can affect living organisms. This data can help share information for other studies on the safety and effectiveness of these drinks.

**Keywords:** Green tea. Kombucha. Drink. Pro-oxidant. Antioxidant.

## 1 INTRODUÇÃO

O chá verde é uma das bebidas com maior popularidade em todo o mundo, conhecido por seus potenciais benefícios à saúde e sua expressiva propriedade antioxidante. É uma bebida originária da China, sendo feita a partir das folhas não fermentadas da planta *Camellia sinensis* L. Com o chá verde, é possível elaborar outros produtos, como a kombucha, que possui essa matéria prima na sua elaboração (Zhou *et al.*, 2024).

A kombucha de chá verde é produzida através da fermentação do chá verde adoçado por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). Durante o processo de fermentação, as bactérias e leveduras presentes na SCOBY consomem o açúcar e os compostos presentes no chá verde, produzindo ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e uma pequena quantidade de álcool (Cardoso *et al.*, 2020).

A bebida tem sido objeto de interesse crescente por vários consumidores devido aos seus efeitos benéficos na saúde, que combinam os benefícios do chá verde com as propriedades encontradas da kombucha. Um dos pontos de interesse sobre a análise dessa bebida é a sua atividade antioxidante e a diminuição sobre o estresse oxidativo proveniente da kombucha e que agregam seus efeitos na diminuição da prevalência de várias doenças (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2024).

Como critério de avaliação, a análise dos efeitos toxicológicos da bebida torna-se essencial para sua indicação e consumo. Uma das formas de avaliar essa variável é a utilização de insetos como alternativa valiosa para analisar preliminarmente a toxicidade *in vivo* e mapear resultados sobre a sua interação. Os insetos são prolíficos, baratos e podem ser manipulados por pessoal não treinado. Além disso, a sua utilização é menos suscetível a preocupações éticas e não é regulamentada pela legislação nacional (Machona *et al.*, 2024).

Um dos animais utilizados na avaliação dessa análise são as larvas de *Tenebrio*, que são consideradas como um modelo pré-clínico, usado na fase inicial de pesquisa para entender a eficácia, segurança e toxicidade de substâncias em desenvolvimento antes que sejam testadas em seres humanos. As larvas de *Tenebrio* podem ser utilizadas em uma variedade de estudos, incluindo aqueles relacionados à toxicologia, farmacologia, biologia celular e molecular, alimentação humana e entre outros campos (Souza *et al.*, 2018).

Nesse contexto, observando que a necessidade da investigação sobre a interação da ingestão de kombucha na saúde é de grande importância para a indicação de consumo da bebida, o objetivo desse trabalho foi analisar a atividade antioxidante e estresse oxidativo de chá verde e kombuchas de chá verde em modelo pré-clínico de larvas de *Tenebrio Molitor*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aquisição da Matéria-Prima**

Os insumos da produção de kombucha como chá verde e carboidrato (açúcar refinado de cana-de-açúcar/sacarose) foram obtidos no comércio varejista de Teresina, Piauí, Brasil em um único lote. O consórcio de microrganismos de bactérias e leveduras (SCOBY) utilizado para mediar o processo de fermentação das kombuchas foi adquirido em loja virtual do comércio nacional.

### **2.2 Produção do Chá Verde**

O chá verde das folhas de *Camellia sinensis* L. foi preparado na concentração padrão de 10 gramas de folhas selecionadas infundidas em 1L de água mineral com pH 8,34, aquecida a 100°C e com imersão das folhas durante o tempo de 10 minutos com a chama de aquecimento desligada. Após o período de infusão, o chá foi filtrado em papel filtro e alocado em recipiente de vidro para equilíbrio da temperatura ambiente.

### **2.3 Preparação das Kombuchas de Chá Verde**

Foram produzidas três kombuchas com diferentes condições de fermentação, apresentando como diferenças a quantidade de carboidrato e o tempo de fermentação, parâmetros definidos em estudo anterior. As bebidas foram divididas em três grupos, K1: 110 gramas de carboidrato fermentada por 09 dias; K2: 75 gramas de carboidrato fermentada por 09 dias; e K3: 110 gramas de carboidrato fermentada por 07 dias.

Com o chá produzido, adicionou-se o carboidrato conforme as concentrações descritas e o SCOBY simbiótico de bactérias e leveduras como agente de fermentação na quantidade de 9,5% de m/v, juntamente com 100 mL/L do chá de iniciação. O tempo de fermentação das kombuchas variaram conforme o protocolo. As bebidas fermentaram em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), marca Quimis, com faixa de trabalho -10°C a 60°C, com temperatura controlada e fixada em 25°C.

## 2.4 Avaliação da Atividade Antioxidante e Estresse Oxidativo em Larvas de Tenebrio

As análises realizadas para a determinação da atividade antioxidante e nível de estresse oxidativo das bebidas de kombucha foram conduzidas em modelo experimental de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) como método alternativo na utilização de invertebrados (Souza *et al.*, 2018). Os animais foram doados pelo Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, *campus* Ministro Petrônio Portella (UFPI/CMPP).

Cerca de 104 animais ( $n = 104$ ) foram utilizados nos experimentos, divididos entre os grupos: controle positivo (Dimetilsulfóxido - DMSO), controle negativo (solução salina), chá verde, kombucha 1 (K1), kombucha 2 (K2) e kombucha 3 (K3), observados em dois períodos de tempo (24h e 48h) após a aplicação das soluções, como mostra o Quadro 1.

**Quadro 1** – Distribuição do número de larvas pelos grupos analisados.

GRUPOS	INTERVENÇÃO					
	DMSO (n)	Solução Salina (n)	Chá Verde (n)	K1 (n)	K2 (n)	K3 (n)
24h	10	10	8	8	8	8
48h	10	10	8	8	8	8

Fonte: Dados da Pesquisa (2024). N = número de animais por grupo.

Com as amostras, foram analisadas a taxa de sobrevivência, a produção de melanina, atividade da enzima catalase e a avaliação dos grupamentos sulfídricos não proteicos.

### 2.4.1 Teste de Sobrevivência

As larvas selecionadas foram inoculadas com as substâncias de controle positivo, negativo e as amostras de interesse (chá verde e kombuchas), utilizando uma seringa BD Ultra-Fine™ com capacidade de 10  $\mu$ . A inoculação foi realizada injetando-se o inóculo na hemocele, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas.

Cada larva de cada grupo de animais recebeu 1  $\mu$ L de suspensão contendo a substância de avaliação. As concentrações finais são apresentadas em números quando necessário. As larvas foram então incubadas a 30 °C em placas de Petri contendo dieta de criação e o número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24 e 48h horas. Para estabelecer a morte das larvas, verificaram-se visualmente a melanização e a resposta aos estímulos físicos tocando-as suavemente. Com os dados, foram construídas as curvas de sobrevivência.

#### 2.4.2 Determinação da Atividade Antioxidante

Larvas de cada grupo foram separadas em tubo falcon de 50 mL específicos para cada dia de coleta e eutanasiadas por congelamento em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , procedendo no dia seguinte com a produção do homogenato por maceração, em banho de gelo, com um homogeneizador de tecido. O tampão fosfato de sódio pH 7,4 (PBS) foi utilizado na produção desse homogenato na proporção de 500  $\mu\text{L}$  de solução para 150 mg de larva. Cada larva foi homogeneizada individualmente e seu respectivo homogenato foi separado e guardado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da execução dos procedimentos.

#### 2.4.3 Melanina (Pigmentação)

Centrifugou-se a amostra descongelada do homogenato das larvas a 10.000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante obtido, coletou-se 100  $\mu\text{L}$  que foram transferidos para uma cubeta de acrílico. Após a transferência, adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  de PBS na respectiva cubeta. Dada a diluição, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um espectrofotômetro biospectro SP-220. Para a calibração do espectrofotômetro foi utilizado o PBS como o branco.

#### 2.4.4 Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo o método descrito por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pela enzima por meio do decréscimo da densidade óptica a 230 nm a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Inicialmente, em um eppendorf, foi realizada a diluição do homogenato, que consistiu na adição de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido da centrifugação do homogenato das larvas juntamente com 390  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão denominada Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8. Posteriormente, o comprimento de onda do espectrofotômetro (Bioespectro, SP 220) foi ajustado para 230 nm e zerado com água destilada, em seguida, realizou-se a leitura do meio de reação (50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM, 2,5 mL de tampão Tris HCl 1 M EDTA 5 mM pH 8,0 e 48 mL de água Milli-Q), adicionando 2 mL da solução em uma cubeta de quartzo, observando se a absorbância atingia aproximadamente 0,650.

Após, iniciou-se a leitura das amostras. Foi pipetado, em uma cubeta de quartzo, 10  $\mu\text{L}$  da diluição do sobrenadante e 2000  $\mu\text{L}$  do meio de reação, sendo então submetidas a

leituras da absorbância no tempo 0 e 6 minutos, no espectrofotômetro modelo Bioespectro SP 220. Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que permitiu a hidrólise de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $37^\circ\text{C}$  em pH 8,0.

#### 2.4.5 Avaliação dos Grupamentos Sulfídricos Não Proteicos (GSHNP)

A medida da concentração de GSHNP ocorreu pela reação entre o radical sulfidril e a substância DTNB, que reagem estequiometricamente e produzem um composto que apresenta absorbância em 412 nm. Com uma curva de calibração é possível relacionar a absorbância obtida com a concentração de radicais sulfidrilas na amostra.

Inicialmente foram transferidos 60  $\mu\text{L}$  do homogenato obtido para 1,8 mL de uma solução estabilizante e hemolisante composta por 450  $\mu\text{M}$  de EDTA e EGTA. Essa mistura foi acidificada pela adição de 115  $\mu\text{L}$  de TCA 60% (p/v) para precipitação de proteínas presentes na amostra. Após a precipitação dessas proteínas, restaurou-se o pH da amostra pela adição de 250  $\mu\text{L}$  de TRIS a 2M. Após esse processo, deu-se o seguimento com a centrifugação da amostra a 5.000 rpm por 3 minutos.

Em cubetas de acrílico adiciona-se 4  $\mu\text{L}$  de uma solução de DTNB a 3 mM em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,2, adicionou-se 1 mL da solução obtida após o processamento da amostra (sobrenadante), permitindo que a reação entre o DTNB e a solução obtida após o processamento permaneça mais que cinco minutos. Realizou-se então a leitura espectrofotométrica a 412 nm em espectrofotômetro modelo Bioespectro SP220 (ELLMAN, 1959).

## 2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados no software GraphPad Prisma versão 10. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os experimentos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises referentes à avaliação da atividade antioxidante e nível de estresse oxidativo medidos do chá verde e de kombuchas de chá verde em modelo pré-clínico de larvas de *Tenebrio* estão descritas nos tópicos seguintes e trazem o mapeamento dos efeitos da sua ingestão.

**Figura 1** – Aplicação das substâncias chá e kombuchas nas larvas de *Tenebrio*.

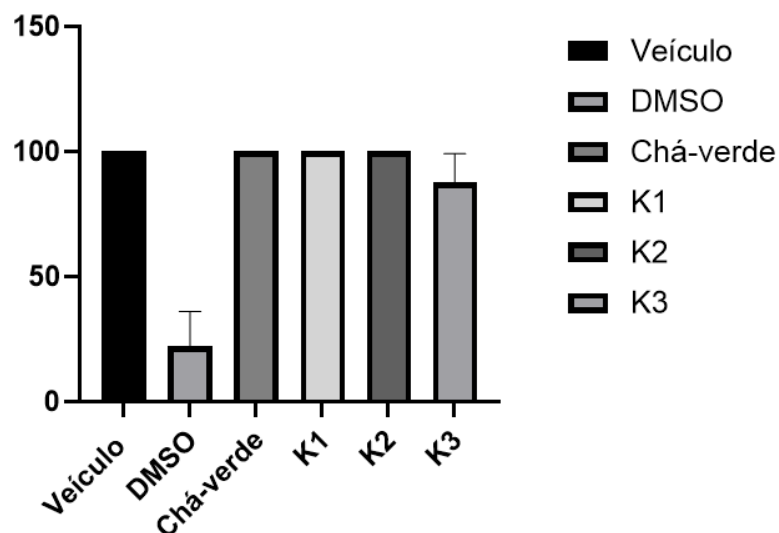


Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

#### 3.1 Teste de Sobrevivência

O teste de sobrevivência aplicado nas larvas é frequentemente utilizado para avaliar a toxicidade de substâncias em organismos vivos. Neste teste, as larvas foram expostas a diferentes substâncias em estudo e a sua sobrevivência foi monitorada ao longo do tempo intercalado entre 24 horas e 48 horas após a aplicação. É possível visualizar a sua resposta nas Figuras 2 e 3.

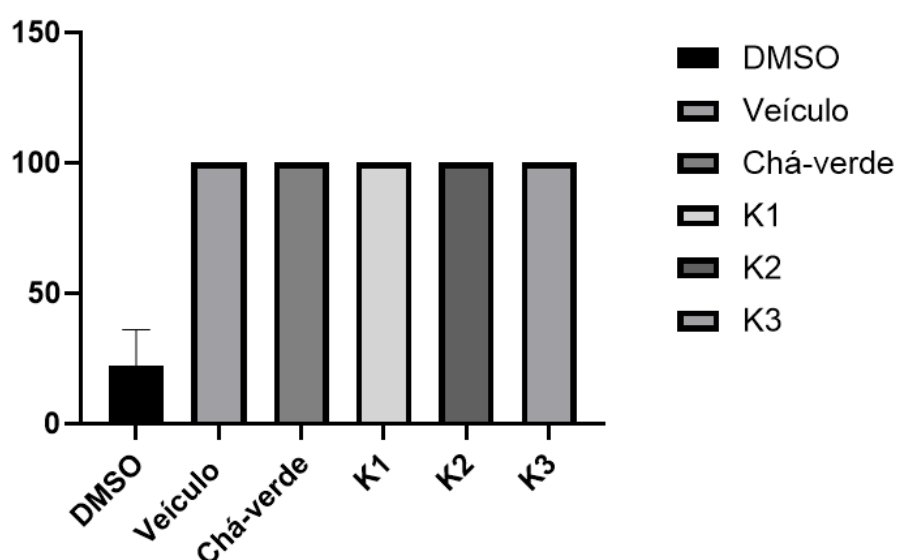
**Figura 2** – Teste de sobrevivência no período de 24 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

No decorrer do tempo das primeiras 24 horas após a aplicação das substâncias, é possível observar que, entre os grupos analisados na Figura 2, apenas as larvas expostas ao controle positivo (DMSO) teve perda superior à 50% da amostra analisada. O grupo K3 apresentou uma perda discreta na sobrevivência das larvas, podendo ser explicado em decorrência de um possível erro durante o manuseio da aplicação da substância no animal.

**Figura 3** – Teste de sobrevivência no período de 48 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

Quando a resposta da sobrevivência das larvas é observada após 48 horas da aplicação (Figura 3), nota-se que apenas o grupo DMSO apresenta perda superior a 50% e os demais expressam resistência sobre as outras substâncias analisadas. Esse fato ocorre devido à alta toxicidade do composto DMSO sobre o organismo avaliado. Ambos os tempos de 24 horas e 48 horas apresentaram diferenças significativas.

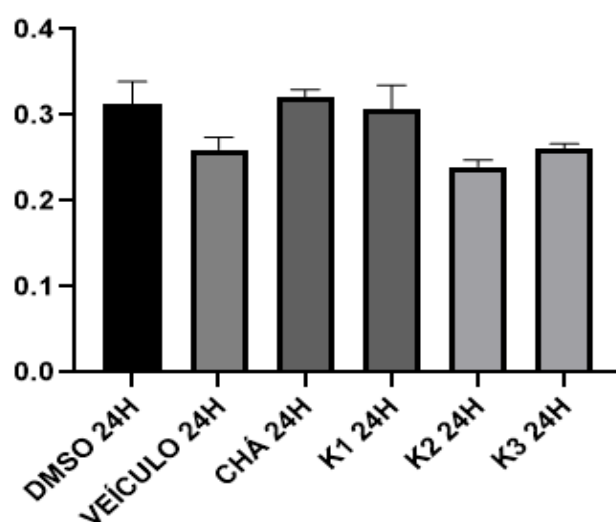
Associando o teste de sobrevivência das larvas às substâncias alvo, chá verde e kombuchas, nota-se a ausência de toxicidade exposta pela sua interação com taxa total de sobrevivência. A relação entre o teste de sobrevivência de larvas e toxicidade reside no fato de que a sobrevivência das larvas é afetada pela presença e concentração de substâncias tóxicas. Quanto mais tóxica for a substância em contato com o animal, menor será a sobrevivência das larvas expostas a ela. Isso permite determinar a concentração letal, que é a concentração na qual 50% das larvas expostas morrem (Machona *et al.*, 2024).

Esse teste de sobrevivência é valioso na avaliação dos efeitos potenciais de diferentes substâncias na saúde dos organismos. Eles podem ser usados em diversos contextos, em especial na avaliação de produtos alimentares, contribuindo para a tomada de decisões em relação ao uso e regulamentação desses componentes e elucidando a segurança no consumo das kombuchas a partir dos resultados obtidos (Machona *et al.*, 2024).

### 3.2 Atividade da Melanina (Pigmentação)

Os dados referentes à atividade da produção de melanina ou pigmentação nas larvas de *Tenebrio* nos períodos de 24h e 48h podem ser observadas nas Figuras 4 e 5.

**Figura 4** – Resposta do parâmetro melanina no período de 24 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

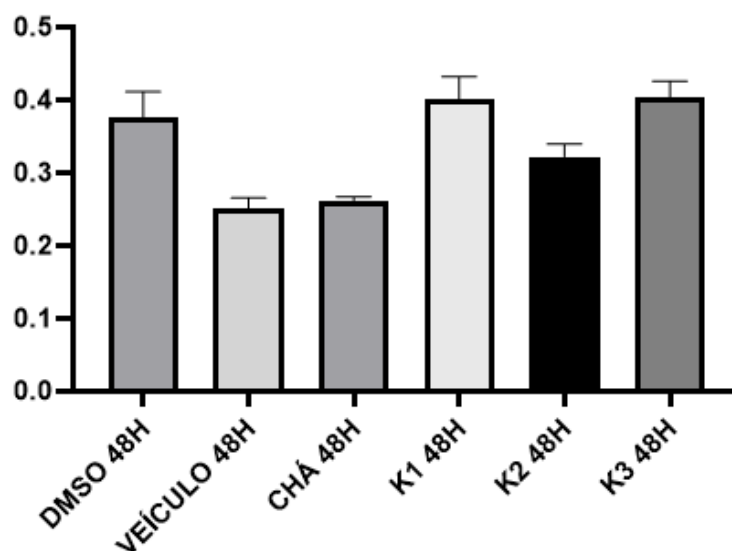
A melanina encontrada nos ensaios mostrou diferenças entre as amostras analisadas ( $p < 0,05$ ). Nota-se, na Figura 4, que os grupos chá, K1 e DMSO sobressaíram-se nos níveis de produção de melanina nesse intervalo de tempo quando comparado aos demais, apresentando resposta ao estresse oxidativo.

A melanina é um pigmento escuro encontrado em muitos organismos, incluindo larvas de *Tenebrio*. Nesses insetos, a melanina expressa várias funções importantes e benéficas como efeito antimicrobiano e ativação da bioquímica imunológica (Dobson *et al.*, 2012; Noonin *et al.*, 2010).

A atividade antimicrobiana apresentada pela melanização nas larvas de *Tenebrio* corrobora com estudos anteriores que puderam identificar a presença de ácido cinâmico, agente que, dentre as suas funções, fornece ação antimicrobiana (Lakshmi *et al.*, 2009).

Avaliando a produção de melanina no período de 48 horas após a exposição das larvas sobre as substâncias de investigação, a Figura 5 mostra diferença de resposta no nível de visualização da melanina nas larvas de *Tenebrio*, apresentando os grupos K1, K3 e DMSO com as maiores concentrações quando comparados aos demais grupos analisados neste estudo.

**Figura 5** – Resposta do parâmetro melanina no período de 48 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

Observa-se que, com o passar do tempo, os ensaios comportam-se de maneiras distintas com reflexo na produção de melanina. Os diferentes compostos presentes nas

bebidas podem ter sofrido alteração, colaborando com o surgimento de outros grupos, afetando de forma direta o processo metabólico das reações.

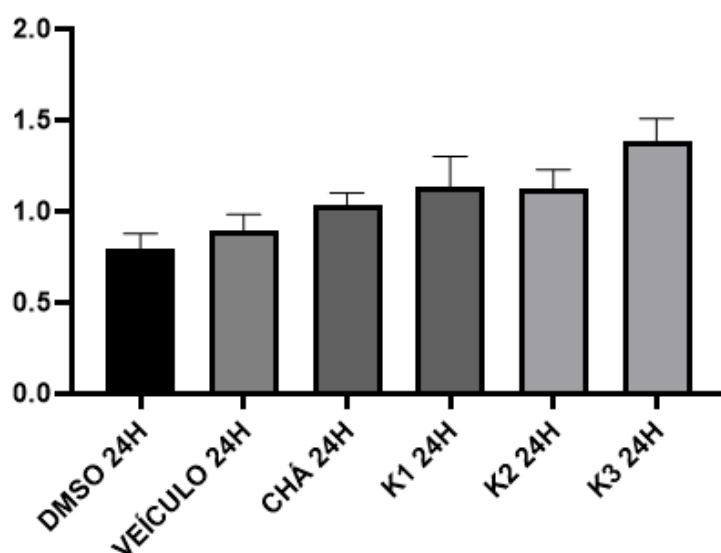
A melanina é produzida através de uma série de reações bioquímicas envolvendo enzimas específicas. É sintetizada a partir do aminoácido tirosina, que é convertido em dopaquinona, o precursor imediato da melanina. A dopaquinona é então transformada em diferentes formas de melanina, incluindo eumelanina (responsável pela coloração escura) e feomelanina (responsável pela coloração clara) (Lee *et al.*, 2000).

Estudos sugerem que o estresse oxidativo pode afetar a produção de melanina de várias maneiras, entre essas, a ativação de vias de sinalização celular, onde o estresse oxidativo pode ativar vias de sinalização celular que afetam a produção de melanina, como o fator de transcrição nuclear Nrf2, que regula a resposta antioxidante, podendo regular a síntese de melanina (Lee *et al.*, 2000).

### 3.3 Análise de Catalase

Os resultados sobre a resposta da produção de catalase nas larvas de *Tenebrio* após a aplicação das substâncias de investigação estão expostos nas Figuras 6 e 7.

**Figura 6** – Resposta do parâmetro catalase no período de 24 horas.

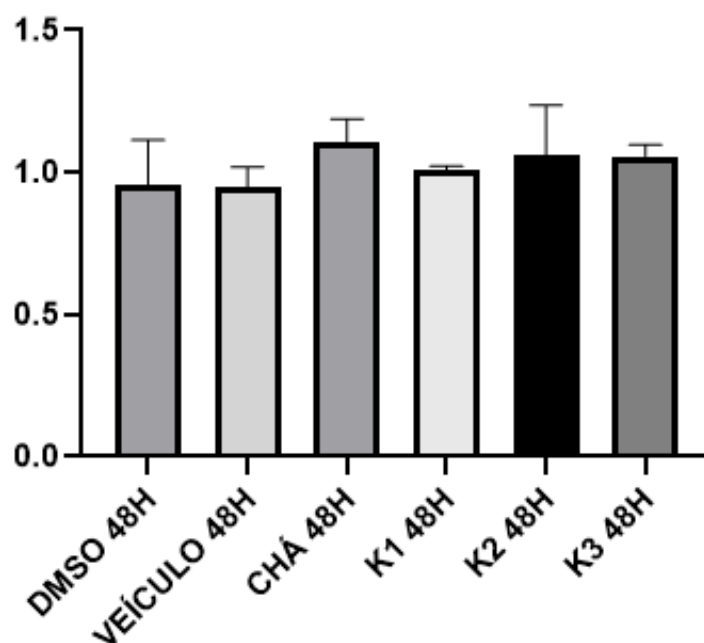


Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

No período de 24 horas, observa-se na Figura 6, a produção de catalase nos ensaios analisados trouxe a kombucha 3 com sua maior concentração, quando comparado aos demais

grupos analisados no estudo. A catalase é uma enzima encontrada em praticamente todos os organismos vivos expostos ao oxigênio (aeróbicos). Ela é especialmente abundante em células que estão expostas a altas concentrações de oxigênio, como as células do fígado, onde desempenha um papel crucial na defesa contra o estresse oxidativo (Glorieux; Calderón, 2017).

**Figura 7** – Resposta do parâmetro catalase no período de 48 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

A mesma resposta da produção de catalase no período de 48 horas mostrou significância nos grupos ao identificados no período de 24 horas, trazendo os grupos chá e kombucha 2 com os maiores níveis de surgimento da enzima nas larvas analisadas.

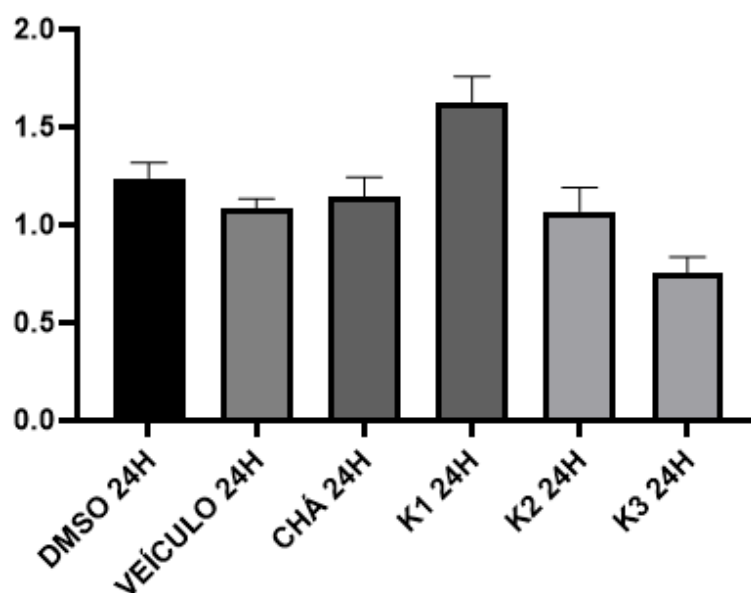
Esses dados mostram a capacidade pró-oxidante dos componentes como resposta ao contato com as substâncias de análise, trazendo a catalase como o agente responsável por esse efeito após a aplicação nos animais.

A função principal da catalase é decompor peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio que é tóxica para as células em altas concentrações. O peróxido de hidrogênio é um subproduto comum de várias reações bioquímicas e pode se acumular nas células, causando danos às estruturas celulares, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Glorieux; Calderón, 2017).

### 3.4 Avaliação dos Grupamentos Sulfídricos Não Proteicos

Os dados relacionados sobre a avaliação da presença dos grupamentos sulfídricos não proteicos (GSH) nos grupos analisados após a exposição nos períodos de 24 horas e 48 horas podem ser visualizados nas Figuras 8 e 9.

**Figura 8** – Resposta do parâmetro GSH no período de 24 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

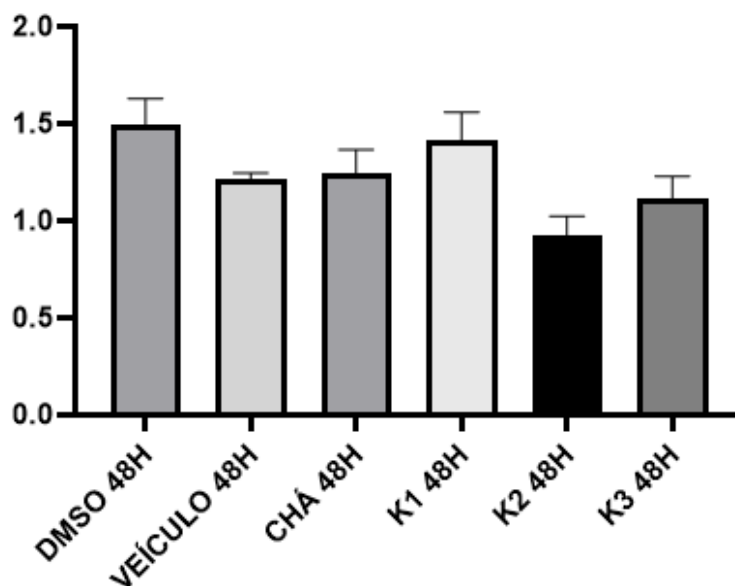
Conforme a Figura 8, é possível notar os níveis de produção de GSH nos grupos investigados. O grupo da kombucha 1 apresentou, no período de 24 horas, o maior pico de produção e a kombucha 3 mostrou o menor nível da presença do agrupamento quando comparada com os demais grupos analisados.

Observando o nível de GSH nas larvas de *Tenebrio*, é possível entender a relação entre o potencial pró-oxidante e antioxidante apresentado nos animais após a exposição às substâncias de investigação desse estudo, uma vez que o componente K3 apresentou efeito inferior ao controle positivo e negativo, abordando dessa forma uma ação reduzida com abordagem antioxidante.

Essas reações observadas no chá, K1, K2 e K3 decorrem das diferenças na composição de cada componente durante a sua elaboração, podendo apresentar diferentes níveis de resposta, em especial a capacidade antioxidante, que vai de acordo com estudos anteriores que puderam identificar compostos com ação antioxidante, como o ácido clorogênico, rutina, cafeína e ácido cinâmico.

Analisando a mesma resposta de produção de GSH nas larvas de *Tenebrio* no período de 48 horas após a exposição dos animais sobre as substâncias de investigação (Figura 9), é possível notar uma modificação sobre o desempenho.

**Figura 9** – Resposta do parâmetro GSH no período de 48 horas.



Fonte: Dados da Pesquisa (2024).

Nesse intervalo de tempo, o grupo DMSO apresentou o maior pico de produção, enquanto o grupo da kombucha 2 revelou o menor índice dessa avaliação, o que mostra diversificação sobre o comportamento com o passar do tempo.

O nível de GSH está ligado à presença de compostos sulfídricos, como o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e sua capacidade de influenciar processos oxidativos no organismo. A presença excessiva de H<sub>2</sub>S pode levar a uma condição conhecida como estresse oxidativo (Georgiou-Siafis; Tsiftoglou, 2023).

### 3.5 Aparato Geral

Os testes empregados puderam demonstrar os efeitos da bebida em larvas de *Tenebrio*, demonstrando ação pró-oxidante e antioxidante. Embora esse termo pró-oxidante tenha uma conotação negativa por induzir o estresse, algumas substâncias com ação pró-oxidante podem realmente ter benefícios em determinadas circunstâncias, podendo apresentar diversos efeitos quando aplicados sobre a saúde.

Certas substâncias pró-oxidantes podem induzir apoptose (morte celular programada) em células cancerosas. Isso é explorado na terapia de câncer, onde compostos pró-oxidantes são utilizados para induzir a morte seletiva das células cancerosas, enquanto minimizam os danos às células saudáveis (Martin-Cordero *et al.*, 2012).

Em algumas situações, a exposição controlada a substâncias pró-oxidantes podem também estimular os sistemas de defesa antioxidante do corpo, como a produção de enzimas antioxidantes endógenas. Isso pode fortalecer a capacidade do organismo de combater o estresse oxidativo em geral. Alguns processos fisiológicos, como a sinalização celular, dependem de reações redox. Substâncias pró-oxidantes podem desempenhar um papel importante nesses processos, ajudando a regular a atividade celular e a comunicação entre as células (György, 2019).

O conceito de hormese sugere que a exposição a baixas doses de agentes estressores, como substâncias pró-oxidantes, pode ativar respostas adaptativas que conferem resistência a estresses subsequentes. Isso pode resultar em melhorias na saúde e na longevidade, impactando entre os seus grandes sistemas, a imunidade (György, 2019).

Vale ressaltar que, uma das características mais notáveis do chá verde e das kombuchas elaboradas com chá verde são seu alto teor de compostos antioxidantes, como os polifenóis, especialmente as catequinas, que incluem epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e epicatequina (EC). Esses compostos têm sido associados a uma variedade de benefícios à saúde, incluindo a redução do risco de doenças cardiovasculares, melhoria da saúde cerebral, auxílio na perda de peso e potencial proteção contra certos tipos de câncer (Hayakawa *et al.*, 2020).

No entanto, é importante ressaltar que a dose e o contexto são críticos ao considerar os efeitos de substâncias pró-oxidante e antioxidantes quando traça-se uma avaliação mais detalhada. Enquanto pequenas doses podem ter efeitos benéficos, doses excessivas podem causar danos significativos às células e aos tecidos, sendo necessário a avaliação da dose. Portanto, o uso e a exposição a substâncias pró-oxidantes devem ser cuidadosamente controlados e monitorados para garantir que os benefícios superem os riscos potenciais, possibilitando assim demais estudos de investigação sobre a interação desses componentes sobre os diversos sistemas do organismo.

#### **4 CONCLUSÃO**

Esse estudo conseguiu mostrar a resposta da interação do chá verde e de kombuchas de chá verde sobre o estresse oxidativo em modelo pré-clínico de larvas de *Tenebrio*, demonstrando ausência de toxicidade e ação pró-oxidante e antioxidante nos testes analisados. Os resultados mostraram os potenciais benefícios antioxidantes dessas substâncias e como elas podem afetar organismos vivos. Esses dados podem ajudar no compartilhamento de informações para outros estudos sobre a segurança e eficácia potencial desses componentes antes de serem estudadas em modelos mais complexos.

## REFERÊNCIAS

- CARDOSO, Rodrigo Resende *et al.* Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, n. 1, p. 108-129, feb. 2020.
- DOBSON, Adam *et al.* Identification of immunological expressed sequence tags in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 12, p. 1556-1561, dec. 2012.
- GYÖRGY, Csaba. Hormesis and immunity: A review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 2, p. 155-168, jun. 2019.
- GLORIEUX, Christophe; CALDERÓN, Pedro Buc. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1095-1108, sep. 2017.
- HAYAKAWA, Sumio *et al.* Anti-Cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate and Coffee Chlorogenic Acid. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4553-4562, oct. 2020.
- LAKSHMI, Baddireddi Subhadra *et al.* Cinnamic acid, from the bark of *Cinnamomum cassia*, regulates glucose transport via activation of GLUT4 on L6 myotubes in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent manner. **Journal of Diabetes**, v. 1, n. 2, p. 99-106, jun. 2009.
- LEE, Karen *et al.* Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. **European Journal of Biochemistry**, 267, n. 12, p. 695-703, jun. 2000.
- MACHONA, Oleen *et al.* Sub-chronic toxicity determination of powdered *Tenebrio molitor* larvae as a novel food source. **Toxicology Reports**, v. 12, n. 1, p. 111-116, jun. 2024.
- MARTIN-CORDERO, Carmen *et al.* Pro-oxidant natural products as anticancer agents. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 8, p. 1006-1028, jul. 2012.
- GEORGIU-SIAFIS, Sofia; TSIFTSOGLU, Asterios. The Key Role of GSH in Keeping the Redox Balance in Mammalian Cells: Mechanisms and Significance of GSH in Detoxification via Formation of Conjugates. **Antioxidants**, v. 12, n. 11, p. 1953-1964, nov. 2023.
- SOUZA, Patrícia Canteri *et al.* An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125-132, nov. 2018.
- NOONIN, Chadanat *et al.* Melanization and pathogenicity in the insect, *Tenebrio molitor*, and the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, by *Aeromonas hydrophila* AH-3. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. 157-172, dec. 2010.
- VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra *et al.* Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, Washington, v. 83, n. 3, p. 580-588, marc. 2018.

ZHENG, Yan *et al.* Comprehensive evaluation of quality and bioactivity of kombucha from six major tea types in China. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 36, jan. 2024.

ZHOU, Hanchen *et al.* The manufacturing process provides green teas with differentiated nonvolatile profiles and influences the deterioration of flavor during storage at room temperature. **Food Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 101-117, abr. 2024.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

- Conforme os dados bibliográficos levantados, foi possível perceber e elucidar a influência do processo de produção de kombucha sobre seus parâmetros físico-químicos e nutricionais, bem como seu impacto positivo sobre a microbiota intestinal;
- Os parâmetros físico-químicos de influência analisados nas kombuchas foram: tempo e quantidade de açúcar com resposta no teor alcoólico, acidez volátil, sólidos solúveis totais e r tio (rela o sólidos solúveis totais e acidez volátil);
- Foram identificados 04 compostos fenólicos nas bebidas, sendo estes:  cido clorogênico, cafeína, rutina e ácido cinâmico, com benefícios sobre a atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e com resposta positiva na saúde humana;
- O teste de sobrevivência apontou ausência de toxicidade e o nível de estresse oxidativo das bebidas mostrou atividade pr -oxidante e antioxidante.

## 7 SUGESTÕES E CONTRIBUIÇÕES

### 7.1 Sugestões

Para melhorar a pesquisa apresentada, é possível implementar as seguintes sugestões:

- **Detalhamento do Processo de Produção:** fornecer uma descrição mais detalhada do processo de produção de kombucha, incluindo as condições específicas utilizadas (culturas de SCOBY).
- **Composição Fenólica:** quantificar os níveis dos compostos fenólicos identificados e discutir suas concentrações em relação aos benefícios relatados.
- **Ensaio Biológico:** incluir ensaios biológicos adicionais para corroborar os efeitos antioxidantes, antimicrobianos e anti-inflamatórios observados *in vitro* com estudos *in vivo* ou *ex vivo*, se possível.
- **Sugestões para Estudos Futuros:** mostrar direções para pesquisas futuras, como a análise sensorial da bebida e a determinação de minerais e vitaminas; investigar outros compostos bioativos na kombucha; analisar as respostas em estudos clínicos para avaliar os efeitos na saúde humana a longo prazo.

Implementando essas sugestões, a pesquisa poderá fornecer uma visão mais completa e robusta sobre a produção e os benefícios da kombucha, além de aumentar a sua relevância e aplicabilidade prática.

### 7.2 Contribuições

A pesquisa sobre a produção de kombucha apresentou diversas contribuições significativas, tanto no entendimento dos processos de produção quanto nos impactos nutricionais e de saúde. As principais contribuições incluem:

- **Influência do Processo de Produção:** a pesquisa elucidou como diferentes aspectos do processo de produção de kombucha afetam seus parâmetros físico-químicos e nutricionais, demonstrando o impacto positivo da kombucha sobre a microbiota intestinal, sugerindo benefícios potenciais para a saúde digestiva.

- Otimização da Bebida: o estudo propôs um processo de otimização da produção de kombucha, focando em três condições específicas.
- Análise de Parâmetros Físico-Químicos: foram analisados parâmetros críticos como tempo de fermentação e quantidade de açúcar, e sua influência em fatores como teor alcoólico, acidez volátil, sólidos solúveis totais e a relação entre sólidos solúveis totais e acidez volátil (rácio). Esses insights são valiosos para ajustar e controlar a qualidade da kombucha durante a produção.
- Identificação de Compostos Fenólicos: identificaram-se quatro compostos fenólicos nas amostras de kombucha: ácido clorogênico, cafeína, rutina e ácido cinâmico. Esses compostos são conhecidos por suas atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, além de contribuírem positivamente para a saúde humana.
- Atividade Pró-Oxidante: a pesquisa também indicou que as bebidas apresentaram atividade pró-oxidante, sugerindo que, em determinadas circunstâncias, a kombucha pode ter benefícios na saúde e na prevenção de doenças. Isso aponta para a necessidade de um consumo equilibrado, levando em conta os contextos em que os efeitos pró-oxidantes podem ser benéficos.

Essas contribuições são relevantes tanto para a comunidade científica, ao avançar o conhecimento sobre a kombucha, quanto para a indústria alimentícia, fornecendo dados práticos para a produção otimizada e segura da bebida. Além disso, os consumidores finais podem se beneficiar do melhor entendimento dos efeitos da kombucha sobre a saúde.

## REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023:2018. **Informação e documentação — Referências — Elaboração**. 2018.
- ALOULOU, Arian *et al.* Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha in alloxan-induced diabetic rats. **Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 12-63, set. 2012.
- ANDREWS, Washington *et al.* Salmonella. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4. ed. Washington DC. **American Public Health Association**. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), p.357-380, 2001.
- ANTOLAK, Hubert; PIECHOTA, Dominik; KUCHARSKA, Aleksandra. Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). **Antioxidants**, New York, v. 28, n. 10, p. 1541-1549, 2021.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *In:* (Ed.). Official methods of analysis. Washington: AOAC, 2005. **Cap. Appendix D**: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 2005.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, aug. 1959.
- BLIGH, Edward G.; DYER, Walther J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 4, p. 911-917, aug. 1959.
- BRAND-WILLIAMS, Williams; CUVELIER, Mary; BERSET, Chloe. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 25-30, ago. 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. Edição 181, **Diário Oficial da União**, Brasília/DF.
- CARDOSO, Rodrigo Resende *et al.* Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 128-143, feb. 2020.
- CARDOSO, Rodrigo Resende *et al.* Kombuchas from green and black teas reduce oxidative stress, liver steatosis and inflammation, and improve glucose metabolism in Wistar rats fed a high-fat high-fructose diet. **Food Functional**, v. 12, n. 21, p. 10813-10827, nov. 2021.
- CHEN, Chen; LIU, Bo Yang Victor. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Filipinas, v. 89, n. 5, p. 834-839, dec. 2000.
- CHU, Sue; CHEN, Crat. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, New York, v. 98, n. 3, p. 502-507, may. 2006.

COSTA, Mirian Aparecida de Campos *et al.* Kombuchas from Green and Black Tea Modulate the Gut Microbiota and Improve the Intestinal Health of Wistar Rats Fed a High-Fat High-Fructose Diet. **Nutrients**, v. 14, n. 24, p. 523-545, dec. 2022.

DARTORA, Bruna *et al.* Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, v. 174, n. 1, p. 1-11, oct. 2023.

DEL CAMPO, Andrea *et al.* Cellular functional, protective or damaging responses associated with different redox imbalance intensities: a comprehensive review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 34, p. 3927-3939, aug. 2023.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 82, p. 70–77, 1959.

FOGLIANO Valéria *et al.* In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. **Molecular Nutrition & Food Research**. New York, v. 55, n. 3, p. 1-12, out. 2011.

GREENWALT, Curt *et al.* Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, Oxford, v. 63, n. 7, p. 976-981, ago. 2000.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, Maria José. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. 1. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191 p.

HUR, Sun Jin *et al.* Efeito da fermentação na atividade antioxidante em alimentos à base de plantas. **Food Chemistry**, v. 1, n. 160, p. 346-356m apr. 2014.

ILICIC, Malbasa *et al.* Lactose fermentation by Kombucha-a process to obtain new milk-based beverages. **Romanian Biotechnological Letters**, New York, v. 17, n.1, p. 7013-7021, ago. 2012.

JAYABALAN, Rasu *et al.* 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, aug. 2014.

JAYABALAN, Raul *et al.* A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, New York, v. 13, n. 4, p. 538-550, aug. 2014.

KHOSRAVI, Saul *et al.* Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 1–10, aug. 2019.

KUMAR, Vikas; JOSHI, Vin. Kombucha: Technology, microbiology, production, composition and therapeutic value. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 13-23, nov. 2016.

LEHNINGER, David *et al.* **Princípios de Bioquímica**. 7. ed. Editora Artmed, São Paulo, 2018.

LEONARSKI, Eduardo *et al.* Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola by product as raw material. **Food Science and Technology**, Nova Delhi, v. 135, n. 22, p. 1-8, aug. 2020.

LIU, Bing-Nan *et al.* Gut microbiota in obesity. **World Journal of Gastroenterol**, v. 25, n. 25, p. 3837-3850, 2021.

MALBASA, Radomir *et al.* Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, New York, v. 106, n. 3, p. 1039-1045, ago. 2008.

MALBASA, Radomir *et al.* Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, New York, v. 127, n. 4, p. 1727-1731, oct. 2011.

MARSH, Alan *et al.* Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 171-178, apr. 2014.

MARTINEZ, Jéssica *et al.* A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites, **Journal of Food Science**, Washington, v. 16, n. 1, p. 390-399, jan. 2018.

MAY, Alexander *et al.* Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, Indonésia, v. 3, n. 1, p. 65-75, sep. 2019.

MENDELSON, Chagai *et al.* Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes – a randomized controlled pilot investigation. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 1119-1126, oct. 2023.

MOHAMMADSSHIRAZI, Ahmad; KALHOR, Elnaz Bagheri. Energy and cost analyses of kombucha beverage production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 668-673, mar. 2016.

MORDOR INTELLIGENCE RESEARCH & ADVISORY. (2023, September). **Tamanho do mercado de Kombuchá e análise de ações – Tendências e previsões de crescimento (2023 – 2028)**. Mordor Intelligence. Retrieved January 31, 2023. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/kombucha-market>>.

MOREIRA, Gabriela *et al.* Kombucha tea improves glucose tolerance and reduces hepatic steatosis in obese mice. **Biomed Pharmacother**, v. 155, n. 39, p. 113-126, nov. 2022.

NGUYEN, Khoi Nguyen *et al.* Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **Food Science and Technology**, Nova Delhi, v. 64, n. 2, p. 1149– 1155, out. 2015.

NORONHA, Marcel Cardoso *et al.* Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and comprehensive phenolic profile changes during fermentation, and antimalarial activity. **Food Chemistry**, v. 384, n. 1, p. 132-145, aug. 2022.

POHL, Paul *et al.* Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, Oxford, v. 134, n. 1, p. 392-396, out. 2012.

PRIMIANI, Novi *et al.* Kombucha fermentation test used 295 for various types of herbal tea. **Journal of Physics: Conference Series**, Indonésia, v. 1025, n. 1, p.120-127, may. 2018.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antônio Francisco. **Experimental design and process optimization**. CRC Press, 2014.

SAINZ, Ricardo Lemos; FERRI, Valdeci Carlos. Shelf-life of clarified juices from the peach varieties eldorado and jubileu. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 239-249, jul./set. 2015.

SCHULZ, Mayara *et al.* Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 125-131, may. 2015.

SILVA, Bruna Cristina; SILVA, Fernanda; MICHELIN, Daniele Carvalho. Avaliação da qualidade de amostras de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) comercializadas no município de Araras – SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 245-250, ago. 2013.

TAKAHARA, S; HAMILTON, B. H; NELL, J. V; OGURA, Y; NISHIMURA, E. T. Hypocatalasemia, a new genetic carrier states. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 29, p. 610–619, 1960.

TANAKA, Takashi; KOUNO, Isao. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. **Food Science Technology Research**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 128-133, aug. 2003.

TRAUTVETTER, Sophie; KOELLING-SPEER, Isabelle; SPEER, Karl. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie**, Washington, v. 40, n. 2, p. 140-150, mar. 2009.

VELICANSKI, Aleksandra Soul *et al.* Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. **Food Technology Biotechnology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 420-429, dec. 2014.

VIDELA, Luiz; VALENZUELA, Rodrigo. Perspectives in liver redox imbalance: toxicological and pharmacological aspects underlying iron overloading, nonalcoholic fatty liver disease, and thyroid hormone action. **Biofactors**, v. 48, n. 2, p. 400-415, may. 2022.

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra *et al.* Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, Washington, v. 83, n. 3, p. 580-588, marc. 2018.

WANG, Penghui *et al.* Kombucha ameliorates LPS-induced sepsis in a mouse model. **Food Funct**, v. 19, n. 12, p. 20-32, oct. 2021.

WANG, Xiaotong *et al.* Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Kombucha Tea by the Pure Cultured Kombucha. **LWT**, v. 168, n. 1, p. 1192-1204, oct. 2022.

WANG, Yong *et al.* Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 265-272, jan. 2014.

WATAWANA, Minudai In. *et al.* Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of kombucha. **Journal of Food Processing and Preservation**, Lincoln, v. 41, n. 1, p. 24-33, ago. 2017.

WATT, Bang; MERRILL, August L. **Composition of foods: raw, processed, prepared**. DC: Consumer and Food Economics Research. Divison (USDA), Washington, (Agriculture Handbook). 1963.

YANG, Zeep. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 89, n.1, p. 150-156, jun. 2009.

YONEKURA, Lina *et al.* Bioavailability of catechins from guaraná (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food & Function**, New York, v. 7, n.7, p. 2970-2978, jul. 2016.

## 8 ANEXOS

## 8.1 Anexo 1 – Tabela de Porcentagem de Álcool em Volume 20°C (%v/v)

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
1,00000	0,0	0,99632	2,5	0,99281	5,0	0,98956	7,5
0,99985	0,1	0,99618	2,6	0,99268	5,1	0,98944	7,6
0,99970	0,2	0,99603	2,7	0,99255	5,2	0,98931	7,7
0,99955	0,3	0,99589	2,8	0,99241	5,3	0,98919	7,8
0,99939	0,4	0,99574	2,9	0,99228	5,4	0,98906	7,9
0,99924	0,5	0,99560	3,0	0,99215	5,5	0,98893	8,0
0,99910	0,6	0,99546	3,1	0,99201	5,6	0,98881	8,1
0,99895	0,7	0,99531	3,2	0,99188	5,7	0,98869	8,2
0,99880	0,8	0,99517	3,3	0,99174	5,8	0,98857	8,3
0,99866	0,9	0,99503	3,4	0,99161	5,9	0,98845	8,4
0,99851	1,0	0,99489	3,5	0,99148	6,0	0,98833	8,5
0,99836	1,1	0,99475	3,6	0,99135	6,1	0,98820	8,6
0,99821	1,2	0,99461	3,7	0,99122	6,2	0,98807	8,7
0,99807	1,3	0,99447	3,8	0,99109	6,3	0,98794	8,8
0,99792	1,4	0,99433	3,9	0,99096	6,4	0,98782	8,9
0,99777	1,5	0,99419	4,0	0,99083	6,5	0,98770	9,0
0,99763	1,6	0,99405	4,1	0,99070	6,6	0,98758	9,1
0,99748	1,7	0,99391	4,2	0,99057	6,7	0,98746	9,2
0,99733	1,8	0,99377	4,3	0,99045	6,8	0,98734	9,3
0,99719	1,9	0,99363	4,4	0,99032	6,9	0,98722	9,4
0,99704	2,0	0,99349	4,5	0,99020	7,0	0,98710	9,5
0,99689	2,1	0,99336	4,6	0,99007	7,1	0,98698	9,6
0,99675	2,2	0,99322	4,7	0,98994	7,2	0,98686	9,7
0,99661	2,3	0,99308	4,8	0,98981	7,3	0,98674	9,8
0,99646	2,4	0,99295	4,9	0,98969	7,4	0,98662	9,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,98650	10,0	0,98239	13,5	0,97851	17,0	0,97478	20,5
0,98637	10,1	0,98227	13,6	0,97840	17,1	0,97467	20,6
0,98626	10,2	0,98216	13,7	0,97829	17,2	0,97456	20,7
0,98614	10,3	0,98204	13,8	0,97818	17,3	0,97445	20,8
0,98602	10,4	0,98193	13,9	0,97807	17,4	0,97435	20,9
0,98590	10,5	0,98182	14,0	0,97797	17,5	0,97424	21,0
0,98578	10,6	0,98171	14,1	0,97786	17,6	0,97414	21,1
0,98566	10,7	0,98159	14,2	0,97775	17,7	0,97404	21,2
0,98554	10,8	0,98148	14,3	0,97764	17,8	0,97393	21,3
0,98542	10,9	0,98137	14,4	0,97754	17,9	0,97382	21,4
0,98530	11,0	0,98126	14,5	0,97743	18,0	0,97371	21,5
0,98518	11,1	0,98115	14,6	0,97732	18,1	0,97360	21,6
0,98506	11,2	0,98103	14,7	0,97721	18,2	0,97350	21,7
0,98494	11,3	0,98092	14,8	0,97711	18,3	0,97339	21,8
0,98482	11,4	0,98081	14,9	0,97700	18,4	0,97328	21,9
0,98470	11,5	0,98070	15,0	0,97690	18,5	0,97317	22,0
0,98459	11,6	0,98058	15,1	0,97679	18,6	0,97306	22,1
0,98447	11,7	0,98047	15,2	0,97668	18,7	0,97295	22,2
0,98435	11,8	0,98036	15,3	0,97657	18,8	0,97285	22,3
0,98424	11,9	0,98025	15,4	0,97646	18,9	0,97274	22,4
0,98412	12,0	0,98014	15,5	0,97636	19,0	0,97263	22,5
0,98400	12,1	0,98003	15,6	0,97626	19,1	0,97252	22,6
0,98388	12,2	0,97992	15,7	0,97616	19,2	0,97241	22,7
0,98377	12,3	0,97981	15,8	0,97605	19,3	0,97230	22,8
0,98365	12,4	0,97970	15,9	0,97595	19,4	0,97219	22,9
0,98354	12,5	0,97959	16,0	0,97584	19,5	0,97208	23,0
0,98342	12,6	0,97948	16,1	0,97574	19,6	0,97197	23,1
0,98330	12,7	0,97937	16,2	0,97563	19,7	0,97185	23,2
0,98318	12,8	0,97926	16,3	0,97553	19,8	0,97174	23,3
0,98307	12,9	0,97915	16,4	0,97542	19,9	0,97163	23,4
0,98296	13,0	0,97905	16,5	0,97531	20,0	0,97152	23,5
0,98285	13,1	0,97894	16,6	0,97521	20,1	0,97141	23,6
0,98274	13,2	0,97883	16,7	0,97511	20,2	0,97130	23,7
0,98263	13,3	0,97872	16,8	0,97500	20,3	0,97118	23,8
0,98251	13,4	0,97862	16,9	0,97489	20,4	0,97107	23,9

<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>	<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>	<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>	<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>
0,97096	24,0	0,96695	27,5	0,96270	31,0	0,95802	34,5
0,97084	24,1	0,96683	27,6	0,96257	31,1	0,95788	34,6
0,97073	24,2	0,96671	27,7	0,96244	31,2	0,95774	34,7
0,97062	24,3	0,96660	27,8	0,96231	31,3	0,95759	34,8
0,97051	24,4	0,96648	27,9	0,96218	31,4	0,95745	34,9
0,97040	24,5	0,96636	28,0	0,96206	31,5	0,95731	35,0
0,97028	24,6	0,96624	28,1	0,96193	31,6	0,95717	35,1
0,97017	24,7	0,96612	28,2	0,96180	31,7	0,95702	35,2
0,97006	24,8	0,96601	28,3	0,96167	31,8	0,95688	35,3
0,96994	24,9	0,96588	28,4	0,96154	31,9	0,95673	35,4
0,96984	25,0	0,96576	28,5	0,96141	32,0	0,95659	35,5
0,96974	25,1	0,96565	28,6	0,96128	32,1	0,95645	35,6
0,96961	25,2	0,96553	28,7	0,96115	32,2	0,95630	35,7
0,96950	25,3	0,96541	28,8	0,96101	32,3	0,95616	35,8
0,96938	25,4	0,96529	28,9	0,96088	32,4	0,95601	35,9
0,96927	25,5	0,96517	29,0	0,96075	32,5	0,95587	36,0
0,96916	25,6	0,96505	29,1	0,96062	32,6	0,95572	36,1
0,96904	25,7	0,96493	29,2	0,96049	32,7	0,95558	36,2
0,96893	25,8	0,96480	29,3	0,96035	32,8	0,95543	36,3
0,96881	25,9	0,96468	29,4	0,96022	32,9	0,95528	36,4
0,96870	26,0	0,96456	29,5	0,96009	33,0	0,95513	36,5
0,96858	26,1	0,96444	29,6	0,95995	33,1	0,95499	36,6
0,96847	26,2	0,96432	29,7	0,95982	33,2	0,95484	36,7
0,96835	26,3	0,96419	29,8	0,95968	33,3	0,95469	36,8
0,96824	26,4	0,96407	29,9	0,95955	33,4	0,95455	36,9
0,96812	26,5	0,96395	30,0	0,95941	33,5	0,95440	37,0
0,96800	26,6	0,96383	30,1	0,95927	33,6	0,95425	37,1
0,96789	26,7	0,96370	30,2	0,95914	33,7	0,95410	37,2
0,96777	26,8	0,96357	30,3	0,95900	33,8	0,95394	37,3
0,96766	26,9	0,96345	30,4	0,95887	33,9	0,95379	37,4
0,96754	27,0	0,96333	30,5	0,95873	34,0	0,95364	37,5
0,96742	27,1	0,96320	30,6	0,95859	34,1	0,95349	37,6
0,96730	27,2	0,96308	30,7	0,95845	34,2	0,95334	37,7
0,96719	27,3	0,96295	30,8	0,95830	34,3	0,95318	37,8
0,96707	27,4	0,96283	30,9	0,95816	34,4	0,95303	37,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,95288	38,0	0,94728	41,5	0,94124	45,0	0,93472	48,5
0,95272	38,1	0,94711	41,6	0,94106	45,1	0,93453	48,6
0,95257	38,2	0,94695	41,7	0,94088	45,2	0,93434	48,7
0,95241	38,3	0,94678	41,8	0,94070	45,3	0,93414	48,8
0,95226	38,4	0,94662	41,9	0,94052	45,4	0,93395	48,9
0,95210	38,5	0,94645	42,0	0,94034	45,5	0,93376	49,0
0,95194	38,6	0,94628	42,1	0,94015	45,6	0,93357	49,1
0,95179	38,7	0,94611	42,2	0,93997	45,7	0,93337	49,2
0,95163	38,8	0,94594	42,3	0,93979	45,8	0,93318	49,3
0,95148	38,9	0,94577	42,4	0,93961	45,9	0,93298	49,4
0,95132	39,0	0,94560	42,5	0,93943	46,0	0,93279	49,5
0,95116	39,1	0,94543	42,6	0,93924	46,1	0,93260	49,6
0,95100	39,2	0,94526	42,7	0,93906	46,2	0,93240	49,7
0,95084	39,3	0,94509	42,8	0,93887	46,3	0,93221	49,8
0,95068	39,4	0,94492	42,9	0,93869	46,4	0,93201	49,9
0,95052	39,5	0,94475	43,0	0,93850	46,5	0,93182	50,0
0,95037	39,6	0,94458	43,1	0,93831	46,6	0,93162	50,1
0,95021	39,7	0,94440	43,2	0,93813	46,7	0,93142	50,2
0,95005	39,8	0,94423	43,3	0,93794	46,8	0,93122	50,3
0,94989	39,9	0,94405	43,4	0,93776	46,9	0,93102	50,4
0,94973	40,0	0,94388	43,5	0,93757	47,0	0,93082	50,5
0,94957	40,1	0,94371	43,6	0,93738	47,1	0,93063	50,6
0,94941	40,2	0,94353	43,7	0,93719	47,2	0,93043	50,7
0,94924	40,3	0,94336	43,8	0,93701	47,3	0,93023	50,8
0,94908	40,4	0,94318	43,9	0,93682	47,4	0,93003	50,9
0,94892	40,5	0,94301	44,0	0,93663	47,5	0,92983	51,0
0,94876	40,6	0,94283	44,1	0,93644	47,6	0,92963	51,1
0,94860	40,7	0,94266	44,2	0,93625	47,7	0,92943	51,2
0,94843	40,8	0,94248	44,3	0,93606	47,8	0,92922	51,3
0,94827	40,9	0,94230	44,4	0,93587	47,9	0,92902	51,4
0,94811	41,0	0,94213	44,5	0,93568	48,0	0,92882	51,5
0,94794	41,1	0,94195	44,6	0,93549	48,1	0,92862	51,6
0,94778	41,2	0,94177	44,7	0,93530	48,2	0,92842	51,7
0,94761	41,3	0,94159	44,8	0,93510	48,3	0,92821	51,8
0,94745	41,4	0,94142	44,9	0,93491	48,4	0,92801	51,9

<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>	<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>	<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>	<b>D</b> <b>20°C/20°C</b>	<b>% v/v</b>
0,92781	52,0	0,92057	55,5	0,91300	59,0	0,90507	62,5
0,92761	52,1	0,92036	55,6	0,91278	59,1	0,90484	62,6
0,92740	52,2	0,92015	55,7	0,91255	59,2	0,90461	62,7
0,92720	52,3	0,91993	55,8	0,91233	59,3	0,90438	62,8
0,92700	52,4	0,91972	55,9	0,91210	59,4	0,90415	62,9
0,92679	52,5	0,91951	56,0	0,91188	59,5	0,90392	63,0
0,92659	52,6	0,91930	56,1	0,91166	59,6	0,90369	63,1
0,92639	52,7	0,91908	56,2	0,91143	59,7	0,90346	63,2
0,92619	52,8	0,91887	56,3	0,91121	59,8	0,90323	63,3
0,92598	52,9	0,91865	56,4	0,91098	59,9	0,90300	63,4
0,92578	53,0	0,91844	56,5	0,91076	60,0	0,90276	63,5
0,92557	53,1	0,91823	56,6	0,91053	60,1	0,90253	63,6
0,92536	53,2	0,91801	56,7	0,91031	60,2	0,90230	63,7
0,92516	53,3	0,91780	56,8	0,91008	60,3	0,90207	63,8
0,92496	53,4	0,91758	56,9	0,90986	60,4	0,90184	63,9
0,92475	53,5	0,91737	57,0	0,90963	60,5	0,90161	64,0
0,92454	53,6	0,91715	57,1	0,90941	60,6	0,90137	64,1
0,92434	53,7	0,91694	57,2	0,90918	60,7	0,90114	64,2
0,92413	53,8	0,91672	57,3	0,90896	60,8	0,90091	64,3
0,92393	53,9	0,91651	57,4	0,90873	60,9	0,90067	64,4
0,92372	54,0	0,91629	57,5	0,90851	61,0	0,90043	64,5
0,92351	54,1	0,91607	57,6	0,90828	61,1	0,90020	64,6
0,92330	54,2	0,91586	57,7	0,90805	61,2	0,89997	64,7
0,92309	54,3	0,91564	57,8	0,90782	61,3	0,89973	64,8
0,92288	54,4	0,91543	57,9	0,90759	61,4	0,89950	64,9
0,92267	54,5	0,91521	58,0	0,90736	61,5	0,89926	65,0
0,92247	54,6	0,91499	58,1	0,90714	61,6	0,89902	65,1
0,92226	54,7	0,91477	58,2	0,90691	61,7	0,89879	65,2
0,92205	54,8	0,91455	58,3	0,90666	61,8	0,89855	65,3
0,92184	54,9	0,91433	58,4	0,90645	61,9	0,89831	65,4
0,92163	55,0	0,91410	58,5	0,90622	62,0	0,89807	65,5
0,92142	55,1	0,91388	58,6	0,90599	62,1	0,89784	65,6
0,92121	55,2	0,91366	58,7	0,90576	62,2	0,89760	65,7
0,92099	55,3	0,91344	58,8	0,90553	62,3	0,89736	65,8
0,92078	55,4	0,91322	58,9	0,90530	62,4	0,89713	65,9

## 9 APÊNDICES

### 9.1 Curva Padrão de Ácido Gálico



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI  
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE A - Curva padrão de ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais.

