



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DISPONIBILIDADE DE 5-METIL-
TETRAIDROFOLATO EM KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*CAMELLIA
SINENSIS*)**

SAMUEL DE SANTANA KHAN

Recife
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SAMUEL DE SANTANA KHAN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DISPONIBILIDADE DE 5-METIL-
TETRAIDROFOLATO EM KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*CAMELLIA
SINESIS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. EMMANUELA PRADO DE PAIVA AZEVEDO.

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA INÊS SUCUPIRA MACIEL.

Recife
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

K45p

Khan, Samuel de Santana
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DISPONIBILIDADE DE 5-METIL-TETRAIDROFOLATO EM KOMBUCHA
DE CHÁ VERDE (CAMELLIA SINENSIS) / Samuel de Santana Khan. - 2020.
64 f. : il.

Orientadora: Emmanuela Prado de Paiva Azevedo.
Coorientadora: Maria Ines Sucupira Maciel.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Recife, 2021.

1. HPLC. 2. Folatos. 3. Antioxidante. 4. Chá. 5. SCOBY. I. Azevedo, Emmanuela Prado de Paiva, orient. II.
Maciel, Maria Ines Sucupira, coorient. III. Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DISPONIBILIDADE DE 5-METIL-
TETRAIDROFOLATO EM KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*CAMELLIA
SINENSIS*)**

Por Samuel de Santana Khan

Esta Dissertação será julgada no exame de qualificação para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos no dia __/__/__ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Vanessa Bordin Viera
Universidade Federal de Campina Grande

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina dos Santos Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Eriane Castro Lima Machado
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que tem me dado e amor demonstrado através de todo o acompanhamento durante os passos dados em minha vida. Agradeço também pela sabedoria que tem me passado para que fosse utilizada para o bem.

Agradeço aos meus pais pelo exemplo dado para moldar meu caráter como ser humano e por todo o suporte que tive quando precisei.

Agradeço também aos outros familiares que me apoiaram em decisões da minha vida. Em especial minha tia Ana que, logo após a minha mãe, seguiu com o mesmo papel maternal na minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco agradeço por todos os anos que passei nela, por todo o aprendizado de qualidade e pelo ambiente de “lar” e conforto que me passou.

À maioria dos membros do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, agradeço pelo trabalho no avanço da ciência e educação e contribuição para minha formação como profissional.

Agradeço à Pr^a. Dr^a. Maria Inês Sucupira Maciel pelo tempo dado para acompanhar o meu trabalho.

Agradeço à Pr^a. Dr^a. Ana Carolina dos Santos Costa, pela ponte criada com a professora Vanessa, pela preocupação comigo durante a viagem para fazer as análises necessárias e por poder acompanhar o andamento do meu trabalho. Sempre serei grato!

Agradeço à Pr^a. Dr^a. Vanessa Bordin Vieira por ter me socorrido nas análises experimentais quando mais precisei. Obrigado pelo seu cuidado, pela ajuda, pelo companheirismo no laboratório e tempo dado. Nada paga a sua boa índole e boa vontade.

Em especial, quero deixar clara a minha gratidão pela presença da Pr^a. Dr^a. Emmanuela Prado de Paiva Azevedo na minha vida. Desde a graduação tem me acompanhado, me auxiliando com instruções e com seu bom exemplo de vida. Obrigado por, mesmo em momentos difíceis, ter sido compreensível comigo. Obrigado por todo o auxílio, pela forma que parava para ensinar sobre os assuntos acadêmicos e também como lidar com a vida em momentos difíceis como os anos de 2019 e 2020. Sigo as diversas formas de equilíbrio que você leva para a sua vida como exemplo e lhe admiro muito como ser humano. Fico admirado como você é capaz de segurar o mundo com seus dois braços,

mas percebi que você nunca está sozinha. Deus ajuda quem faz o bem. Obrigado por sempre me lembrar disso!

Aos meus amigos mais próximos que me acompanharam da graduação para a vida, obrigado pela amizade sempre disponível e inquestionável. Aos colegas do mestrado, obrigado pela boa companhia durante o decorrer do curso. Obrigado por serem como são.

Desejo também agradecer a José Carlos e Angela, técnicos dos laboratórios do programa da pós, por todo seu bom serviço prestado e pela ajuda nas análises.

Por fim, agradeço ao órgão CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Kombucha é uma bebida probiótica à base de chá das folhas de *Camellia sinensis*, promissora e com crescente consumo mundial. No entanto, conhecimento acerca da sua composição química varia em função das condições ambientais de cultivo. Diante do exposto, o presente estudo avaliou o potencial antioxidante, disponibilidade de 5-metil-tetrahidrofolato, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides totais e a composição físico-química de kombucha de chá verde (*Camellia sinensis*) durante o período de fermentação estudado. Kombucha de chá verde foi fermentada por 21 dias, sendo analisada nos tempos 1, 3, 7, 14 e 21 dias. A análise do 5-metiltetrahidrofolato foi realizada em cromatógrafo HPLC-DAD (Shimadzu LC20AT), compostos bioativos e atividade antioxidante total (ABTS) foram avaliadas utilizando método colorimétrico em espectrofotômetro. Também foi avaliada umidade, cinzas, lipídios, pH, Aw, sólidos solúveis, acidez titulável e açúcares totais. A kombucha apresentou teores de 5-metiltetrahidrofolato de $39,12 \pm 1,32 \mu\text{g/ mL}$ no líquido e $45,78 \pm 8,42 \mu\text{g/ mL}$ no disco de celulose no terceiro dia de fermentação e $50,87 \pm 3,56 \mu\text{g/ mL}$ no líquido e $54,88 \pm 3,89 \mu\text{g/ mL}$ no disco no vigésimo primeiro dia de fermentação. Teores de compostos fenólicos totais na faixa de $1,05 \pm 0 \text{ mg EAG/ mL}$ (dia 1) até $1,94 \pm 0,01 \text{ mg EAG/ mL}$ (dia 21) foram encontrados na kombucha, com aumento de acordo com a prolongação da fermentação até o dia 21. O disco de celulose apresentou valores não significativos para fenólicos $0,09 \pm 0 \text{ mg EAG/ mL}$. Flavonoides totais não apresentaram diferenças significativas ao longo da fermentação, mantendo-se em torno de $0,07 \pm 0,00 \text{ mg EC/mL}$ durante todo o processo fermentativo. Carotenoides totais presentes tiveram uma queda significativa com a progressão da fermentação de $53,80 \pm 0,36 \mu\text{g/100 mL}$ no início para $24,69 \pm 0,70 \mu\text{g/100 mL}$ no final da fermentação. Os valores de umidade foram similares durante o processo fermentativo com média do líquido e SCOBY de $93,06\% \pm 0,57$ e $92,33 \pm 0,59$ respectivamente. A Aw para o líquido e SCOBY se manteve em $0,99 \pm 0,00$ e cinzas abaixo de 0,1% para o líquido e para o SCOBY sem diferenças significativas durante o processo de fermentação. Valores de sólidos solúveis para o líquido ficaram entre 6,5 – 7,5 e os lipídios apresentados tiveram uma média igual a $0,3\% \pm 0,12$ e $0,6\% \pm 0,19$ para o líquido e SCOBY respectivamente, ambos sem variação ao longo da fermentação. No presente estudo, a acidez titulável aumentou com o decorrer da fermentação e os valores de pH caíram de $3,34 \pm 0,01$ no primeiro dia até $2,06 \pm 0,10$ no último dia de fermentação. Os dados sobre 5-metiltetrahidrofolato encontrados no estudo são inéditos e de extrema relevância para diretrizes alimentares, ciência e tecnologia de alimentos, bem como para o consumo geral da população uma vez que a kombucha agora pode ser considerada fonte da vitamina. O estudo concluiu que o melhor tempo para consumir a kombucha e obter 5-metiltetrahidrofolato e os bioativos encontrados, é consumir o líquido entre os dias de fermentação 7 a 14 e sem adição de outros ingredientes possivelmente oxidantes ou redutores.

Palavras-chave: SCOBY, Chá, Folatos, HPLC, Valor Nutricional, Antioxidante.

LISTA DE FIGURAS:

REVISÃO DE LITERATURA:

Figura 1: Fermentação de kombucha. Líquido e disco de celulose (SCOBY).....14

Figura 2: Estrutura do tetraidrofolato poliglutamil e suas formas em função do radical....25

ARTIGO:

Figura 1: Cromatograma da kombucha de chá verde fermentada por 3 dias.....50

Figura 2: Cromatograma do disco de celulose da kombucha de chá verde fermentada por 3 dias.....51

Figura 3: Cromatograma da kombucha de chá verde fermentada por 21 dias.....51

Figura 4: Cromatograma do disco de celulose da kombucha de chá verde fermentada por 21 dias.....52

Figura 5: Valores de atividade antioxidante por dia de fermentação.....57

Figura 6: Valores de extrato seco por dia de fermentação.....58

Figura 7: Valores de lipídios por dia de fermentação.....59

Figura 8: Valores de cinzas por dia de fermentação.....60

LISTA DE TABELAS:

ARTIGO

Tabela 1 – Teor de 5-metiltetraidrofolato no líquido e disco de celulose de kombucha nos dias de fermentação 3 e 21.....52

Tabela 2: Teor de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides totais em líquido de kombucha fermentadas nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 e dia 21 no disco de celulose.....54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	12
3.	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1.	kombucha.....	13
3.1.1.	Bebida.....	13
3.1.2.	Cultivo da kombucha.....	15
3.2.	Métodos de fermentação.....	17
3.2.1.	Microorganismos na fermentação.....	19
3.3.	Alegações de Saúde.....	21
3.4.	Principais metabólitos e bioativos reconhecidamente disponíveis.....	22
3.4.1.	Antioxidantes.....	23
3.4.2.	Folatos.....	24
3.5.	Análises em kombucha.....	27
3.5.1.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	27
3.5.2.	Composição físico-química.....	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
	ARTIGO 1 – <i>Composição físico-química, potencial antioxidante e disponibilidade de 5-metil-tetraidrofolato em kombucha de chá verde (Camellia sinensis)</i>	40
	RESUMO.....	41
	ABSTRACT.....	42
1.	INTRODUÇÃO	43
2.	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1.	Materiais.....	44
2.1.1.	Amostras.....	44
2.1.2.	Reagentes e padrão.....	44
2.2.	Métodos.....	45
2.2.1.	Preparo da kombucha para fermentação.....	45
2.2.2.	Análise de 5-metiltetraidrofolato por CLAE.....	45

2.2.3. Preparo das soluções padrão.....	46
2.2.4. Protocolo de extração para análise cromatográfica.....	46
2.2.5. Identificação e Quantificação.....	47
2.3. Preparo do material para determinação da atividade antioxidante.....	47
2.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	47
2.3.2. Determinação de flavonoides totais.....	48
2.3.3. Determinação de carotenoides totais.....	48
2.3.4. Atividade antioxidante total por ABTS.....	49
2.4. Caracterização físico-química.....	49
2.5. Análises estatísticas.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1. Teor de 5-metiltetraidrofolato.....	50
3.2. Fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides totais.....	54
3.3. Antioxidantes.....	56
3.4. Análises físico-químicas.....	57
4. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida à base de chá das folhas de *Camellia sinensis* fermentada por bactérias acéticas e leveduras. Esta fermentação usa comumente o chá verde ou preto como meio, açúcar como fonte de energia e tem como produto e subprodutos da fermentação a energia, álcool, ácido acético, compostos nutricionais e bioativos (LIU et al., 2020).

O chá de *Camellia sinensis*, possui benefícios para a saúde humana, como sua reconhecida ação antioxidante (CARDOSO et al., 2020). Porém a inserção dos microrganismos encontrados na kombucha permitem que novas propriedades, probióticas e de consumo de metabólitos secundários benéficos, sejam agregadas ao produto. Os microrganismos probióticos encontrados em alguns produtos fermentados, ao serem ingeridos, se desenvolvem no trato intestinal se tornando parte da microbiota local. Desta forma, fortalecem o sistema imunológico e auxiliam em diversos processos fisiológicos (AL-RAWAF et al., 2020).

Além do benefício de possuir microrganismos probióticos, a kombucha possui compostos fenólicos com potencial antioxidante já presentes no chá, além de outros compostos bioativos sintetizados pelos microrganismos como alguns ácidos orgânicos, flavonoides e carotenoides que têm potenciais anti-inflamatórios, e micronutrientes (KAPP et al., 2019; CARDOSO et al., 2020; LI et al., 2020²; LIU et al., 2020).

Com a popularização do consumo de kombucha nas últimas décadas do século XX, muitos cultivos domésticos passaram a ser realizados, porém nem sempre elaborados em condições controladas e adequadas para uma boa produção. Essas fermentações artesanais resultam em produtos com teores diferentes de álcool, ácido acético, dióxido de carbono e outros componentes. Além de ter impacto nas características sensoriais do produto final, as diferentes formas de cultivo, por vezes, permite que as bebidas possam ser contaminadas, levando um risco para a saúde das pessoas que a consomem. No início do século XXI, a indústria alimentícia já obteve sucesso em padronizar a kombucha a fim de entregar ao consumidor um produto confiável que possua teores conhecidos de substâncias benéficas e ainda mantenha os microrganismos probióticos (TROITINO, 2017; MAPA, 2019).

Ainda que a produção atual esteja dividida entre a artesanal e a padronizada pela indústria, ainda não há legislações vigentes acerca da caracterização da kombucha em todos os países. No Brasil, por exemplo, a primeira instrução normativa (IN) que trata

especificamente do controle de qualidade da kombucha foi publicada em setembro de 2019, mas a mesma ainda não traz menção da caracterização microbiológica da bebida, do tempo adequado para fermentação ou até mesmo das concentrações dos substratos utilizados na produção da bebida. Quanto aos parâmetros analíticos, a IN se restringe a definir faixas adequadas para pH, acidez volátil, pressão atmosférica a 20 °C e graduação alcoólica (MAPA, 2019).

Levando em consideração a localização geográfica do Brasil, bem como toda a sua diversidade de clima, é razoável afirmar que a produção artesanal de kombucha no Norte do país não ocorre da mesma forma que a fermentação da kombucha no Sul. Além do clima, outros fatores como o tempo de fermentação não são considerados. Estudos como os de Villarreal-Soto e colaboradores mostram que o pico de síntese de compostos bioativos acontece entre os dias 7 e 10 de fermentação, porém é a partir da primeira semana de fermentação que o gosto azedo se torna mais perceptível, podendo causar rejeição aos consumidores, que irão preferir consumir a bebida antes da formação perceptível de ácido acético (FILIPPIS et al., 2018, VILLARREAL-SOTO et al., 2019).

Outro aspecto pouco estudado é o teor de micronutrientes encontrados na bebida fermentada. Há estudos que relatam a presença de vitamina do complexo B em kombucha, porém há carência de informações sobre a síntese de micronutrientes realizada pelos microrganismos, em qual etapa acontece, com quais meios de cultura, entre outros (REVA et al., 2015; VITAS et al., 2018; KAPP et al., 2019; SHARMA & BHARDWAJ, 2019; XIA et al., 2019).

A kombucha chegou ao século XXI impulsionada pelo atual consumo consciente e alimentação saudável, porém ainda há muito a ser elucidado sobre a bebida e tudo que impacta o produto final. Neste contexto, o presente estudo buscou elaborar kombucha a partir de chá verde e avaliar o teor de 5-metiltetraidrofolato e atividade antioxidantes durante a vida de prateleira (dias 1, 3, 7, 14 e 21).

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

Há escassez de pesquisas que avaliem a composição de folatos, bem como o potencial antioxidante e a composição centesimal de kombucha produzida no Nordeste brasileiro de forma artesanal ao longo do processo de fermentação. Será que o líquido e o

disco de celulose da kombucha têm folatos? E ainda, a composição centesimal e possível potencial antioxidante da kombucha é interessante para o consumo humano?

Hipótese: O líquido e o disco de celulose da kombucha produzida a partir de chá verde possuem elevado valor nutritivo, atividade antioxidante e disponibilidade de 5-metil-terahidrofolato.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Kombucha

3.1.1 Bebida

Kombucha é o termo utilizado para definir a cultura da bebida probiótica cultivada em chá fermentado. O chá das folhas de *Camellia sinensis* é uma das bebidas não-alcóolicas mais consumidas do mundo e que, devido aos seus compostos bioativos, possuem diversos benefícios à saúde (BASU et al., 2013; CABRAL et al., 2017; SUN et al., 2020). Por sua vez, o consumo do líquido de kombucha, chá de *Camellia sinensis* fermentado, oferece propriedades benéficas ao homem devido a teores significativos de compostos nutricionais e bioativos já presentes no chá, aliados à presença de microrganismos benéficos à microbiota intestinal do corpo humano e seus produtos metabólicos (PANGHAL et al., 2018; KAPP et al., 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2019; YAN et al., 2020).

A depender do processo tecnológico aplicado na produção do chá, podem ser obtidos tipos diferentes de chás, sendo três tipos os mais consumidos: chá verde, chá *Oolong* e chá preto. O chá verde se caracteriza pela secagem das partes da planta, seguida pela vaporização que inativa a polifenoloxidase, diminuindo a oxidação do produto. O chá *Oolong*, é fermentado parcialmente, seguido pela secagem. Enquanto o chá preto sofre fermentação completa antes da secagem para utilização (ZENG et al., 2017; LIU et al., 2020).

Para obtenção do chá, são utilizados folhas, flores e botões da planta *Camellia sinensis*. As partes das plantas são secas e então utilizadas. Apesar de todos os tipos serem utilizados na produção de kombucha, cada tipo de chá produzido possui um sabor

característico e o seu teor de compostos bioativos pode variar um pouco de acordo com o processamento tecnológico (CARDOSO et al., 2020; LIU et al., 2020).

A coloração da kombucha, caramelo claro até o âmbar mais acentuado, varia de acordo com o chá utilizado (verde, *Oolong* ou preto), porém o açúcar e outros fatores da produção também influenciam as características sensoriais da bebida. Outro ponto em consideração é que durante a fermentação, alguns microrganismos produzem uma película de celulose em forma de disco, chamada em inglês de “SCOBY” (cultura simbiótica de bactérias e leveduras), que flutua no líquido e pode ser reutilizada para produzir mais kombucha a partir de um novo meio de cultura (SHARMA et al., 2019; AHMED et al., 2020).

Figura 1: Fermentação de kombucha. Líquido e disco de celulose (SCOBY).



Fonte: Autora própria.

A bebida fermentada possui gosto ácido como o mais marcante e o doce ainda presente, porém este diminui à medida que é deixada para fermentar por mais tempo, assim levando os microrganismos a consumirem mais do carboidrato adicionado ao meio de cultura (sacarose). Neste processo fermentativo que dura no mínimo uma semana, os

microrganismos produzem álcool, ácidos orgânicos e gás. Como produto final, é obtida uma bebida de cor caramelada, translúcida, ácida, gaseificada e com aroma de produto fermentado. Essas dão as características básicas para o sabor da bebida funcional após a primeira fermentação. Devido à marcante presença do gosto ácido, as pessoas costumam fazer ainda uma segunda fermentação da kombucha, onde o líquido é inserido em um novo meio de cultura com sabor (ex: suco de frutas). Após a segunda fermentação, é obtida uma bebida fermentada com sabor mais aceito para o paladar comum (PIRES et al., 2014; ZENG et al., 2017; VITAS et al., 2018; ZUBAIDAH et al., 2018).

A origem da kombucha é desconhecida e relatos mostram que o seu consumo já era realizado em diferentes países orientais, porém com nomes diferentes do atual. Apesar disso, a sua origem mais aceita é datada de 220 a.c. no nordeste da China, na região de Manchúria, onde a mesma era muito apreciada pelas suas, até então acreditadas, propriedades desintoxicantes e energizantes (STANDAGE, 2005; TROITINO, 2017; KAPP et al., 2019).

Atualmente já possível encontrar bebida de kombucha de diversas marcas nos grandes mercados de cidades urbanas, e em mercados “naturais” como os empórios cerealistas. Estas, por sua vez, já buscam seguir as leis que definem a rotulagem e conteúdo dos produtos, bem como padronização operacional para obtenção de produtos similares (CHAKRAVORTY et al., 2016; PANGHAL et al., 2018; MAPA, 2019; SHARMA & BHARDWAJ, 2019).

3.1.2 Cultivo da kombucha

Para obtenção de um novo chá de kombucha, é necessário ter SCOBY (inteiro ou parte) ou o líquido de outra fermentação, chá (*Camellia sinensis*) e sacarose. A metodologia é similar a de outros produtos fermentados, onde há os microrganismos, o meio de cultura e a fonte de energia. Os fatores ambientais interferem na fermentação do produto e, com isso, as proporções podem variar, mas o padrão é seguir com 1 L de chá, 50 – 100 g de sacarose e, após resfriado à temperatura ambiente, adicionado do SCOBY com 200 mL do líquido. A adição deste líquido ácido que já contém microrganismos tem finalidade de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. Se o disco de celulose

não for adicionado, os microrganismos farão um novo biofilme neste meio de cultura (CABRAL et al., 2017; MAPELLI-BRAHM et al., 2020).

O recipiente utilizado para o cultivo dos microrganismos é mantido em temperatura ambiente (20 – 30 °C), com ausência de luz e coberto por um filtro que previna a contaminação por agentes externos, mas que permita a troca de gases. Esta troca de gases permite que os microrganismos sintetizem um novo disco de celulose. Há dois estágios de fermentação, alcohólica e acética. Na fermentação alcohólica, as leveduras oxidam a glicose presente no meio e têm como produto o etanol. Esta é seguida pela fermentação acética, onde as bactérias acéticas fazem uso do etanol para produzir ácido acético. Nos primeiros dias da fermentação, há uma estabilidade na acidez, porém a mesma é modificada a partir do terceiro dia, que depois volta à estabilidade. As leveduras produzem dióxido de carbono que é dissociado na água, produzindo o ânion anfiprótico hidrogenocarbonato (HCO_3^-). Este interage com o H^+ liberado pelos ácidos orgânicos. Esta reação permite a formação de ácidos orgânicos sem a diminuição de pH. À proporção que a fermentação continua, a atividade das bactérias acéticas se torna mais presente e, por consequência, a oxidação do álcool etílico, dando espaço para uma maior formação de ácido acético. (PIRES et al., 2014; WALKER & STEWART, 2016; VILLARREAL-SOTO et al., 2019; MAPELLI-BRAHM et al., 2020).

Em estudos prévios foi percebido que o pico de síntese de compostos bioativos é atingido em 10 dias de fermentação. Não sendo mais necessário continuar com a fermentação após esse período. A continuação do processo fermentativo em condições favoráveis causa o aumento de acidez da bebida a tal ponto que a torna “avinagrada” e intragável. O processo é interrompido por refrigeração para não haver perda dos microrganismos e este diminui drasticamente a atividade dos microrganismos sem eliminá-los. Assim, a bebida final contém os compostos nutricionais e bioativos sintetizados, mas possui também os microrganismos que desempenham suas funções benéficas ao corpo humano (VITAS et al., 2018; MAPELLI-BRAHM et al., 2020).

Evidências mostraram que fatores como diferença de clima das regiões, proporções e tipos de ingredientes utilizados no meio de cultura, exposição do chá à luz e oxigênio interferem na fermentação e, por consequência, na produção de compostos bioativos,

compostos nutricionais, biofilme e gás. (REVA et al., 2015; FILLIPS, et al., 2018; VILLARREAL-SOTO et al., 2019; AHMED et al., 2020).

As características da bebida vêm sendo modificadas desde o início da fermentação até o momento em que o processo é interrompido. A partir dos primeiros 3 – 4 dias a formação do biofilme transparente, uma nova membrana (cultura “filha”), na superfície do líquido é visível. Isto é explicado pela presença das substâncias no meio. A presença de etanol e de ácidos orgânicos favorece a produção do biofilme. O acetato é formado pela oxidação do etanol e é depois metabolizado em ácido tricarbóxico para gerar ATP para utilização dos microrganismos no crescimento celular e na formação de celulose. Neste momento já é perceptível acidificação, produção de etanol, de compostos aromáticos particulares de produtos fermentados e produção de gás (SHARMA & BHARDWAJ, 2019).

Ao longo dos dias de fermentação, mais camadas de película de SCOBY são formadas até que seja perceptível um disco que cobre todo o diâmetro da superfície do recipiente. Estudos mostram que o pico da formação dos compostos nutricionais e bioativos é encontrado no décimo dia de fermentação. A partir deste dia é feita a escolha de continuar a fermentação, tornando o produto cada vez mais acético, interromper a fermentação e consumir a bebida ou fazer uma segunda fermentação com um novo meio saborizante utilizando o líquido da kombucha ou o SCOBY, que possui os microrganismos aprisionados (FILLIPS et al., 2018; SHARMA & BHARDWAJ, 2019).

3.2 Métodos de Fermentação

O processo fermentativo se dá pela utilização de um substrato, por microrganismos, para obtenção de energia para o seu desenvolvimento. A glicose, monossacarídeo produzido principalmente nas plantas através do processo de fotossíntese, é a substância principal utilizada no processo de fermentação. Esta substância é utilizada pelo organismo dos seres vivos, através do processo de respiração celular, e fermentação onde ela passa pelo processo de glicólise. Com o auxílio de fosfatos e coenzimas atuando na molécula de glicose, este fragmenta o carboidrato em duas moléculas de ácido pirúvico e consequentemente energia (CHEN et al., 2020). Neste processo há produção de substâncias como etanol, ácido acético, gás, água, compostos bioativos, compostos aromáticos, entre

outros. Há dois processos na produção de energia utilizada pelos microrganismos em diversos processos metabólicos. A primeira é a respiração celular, seguida pela fermentação (DASHKO et al., 2014; AZHAR et al., 2017; VILLARREAL-SOTO et al., 2019; HIKMETOGLU et al., 2020; MAPELLI-BRAHM et al., 2020).

Na respiração celular, processo aeróbio que acontece no hialoplasma e mitocôndria, a glicose ($C_6H_{12}O_6$) disponível no meio de cultura é degradada de forma completa. As ligações de carbono do carboidrato são quebradas através de glicólise e a alguns dos átomos são utilizados para produção de energia utilizável pelo microrganismo, adenosina trifosfato (ATP) (PEREIRA et al., 2015; RAMOZ-MARTINEZ, 2017; ROWLEY IV et al., 2017; BAE et al., 2019).

A fermentação que acontece no hialoplasma dos organismos, não realiza a oxidação completa do carboidrato. A primeira quebra da molécula de glicose tem como moléculas menores o piruvato ($C_3H_4O_3$). Estas, por sua vez, sem a presença do oxigênio, sofrem transformações tendo como resultado outras substâncias como ácido acético, ácido lático, entre outros produtos. Dividida em três tipos, láctica, alcoólica e acética, a diferenciação das fermentações é feita basicamente pelos produtos finais obtidos, ácido lático ($C_3H_6O_3$), etanol ou álcool etílico (C_2H_6O) ou ácido acético (CH_3COOH) (WALKER & STEWART, 2016; VILLARREAL-SOTO et al., 2019; HIKMETOGLU et al., 2020).

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico realizado por leveduras (fungos) que utilizam o carboidrato encontrado no meio para sua multiplicação, e tem como produto ATP, álcool etílico e CO_2 . Para cada molécula de glicose, além do etanol, 2 ATP são produzidos (DASHKO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; VASSILEV et al., 2015).

A fermentação acética é normalmente seguida pela fermentação alcoólica. Ao contrário das leveduras que utilizam o carboidrato para produzir ATP, etanol e gás, as acetobactérias são microrganismos que vão utilizar o etanol presente no meio (normalmente produzido pelas leveduras) e, a partir dele, produzir ácido acético. Bem como na fermentação láctica e alcoólica, a fermentação acética tem como resultado 2 ATP (HO et al., 2018; LI et al., 2019; LI et al., 2020).

Além da formação de etanol, água, gás, ácido acético e outros compostos comuns à fermentação, há também a síntese de compostos nutricionais e bioativos. O perfil químico

encontrado na kombucha, bebida probiótica, é majoritariamente composto por ácidos orgânicos como o ácido acético, ácido glucônico e ácido glucurônico e polifenóis. Ainda assim, estudos mais recentes analisaram a presença de compostos nutricionais como vitaminas do complexo B (JAYABALAN et al., 2014; VITAS et al., 2018; SHARMA & BHARDWAJ, 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2019; , XIA et al., 2019; KAPP et al., 2020).

3.2.1 Microrganismos na fermentação

A colônia ou cultura simbiótica de leveduras e bactérias (*Symbiotic Colony/Culture of Bacteria and Yeasts*) chamada de SCOBY é composta por acetobactérias com predominância do gênero *Gluconobacter* e *Komagataeibacter* e muitas espécies de leveduras osmofílicas, sendo as principais *Brettanomyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (JAYABALAN et al., 2014; MARSH et al., 2014; FILLIPIS et al., 2018; ZHOU et al., 2019; AHMED et al., 2020).

Leveduras são microrganismos unicelulares, eucariotas, comumente arredondados, ovais ou elípticos. Cerca de cinco vezes maior que as bactérias, elas têm o seu desenvolvimento influenciado pela presença de nutrientes no meio onde se encontram. Com parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, ribossomas e mitocôndria, este microrganismo utiliza glicose encontrada no meio para a sua respiração celular e também aminoácidos para os processos fermentativos (MIGL et al., 2020). Além dos produtos comuns aos processos fermentativos dos microrganismos (ATP, álcool etílico, ácido acético e ácido lático) que podem variar a depender de fatores do meio de cultura (oxigênio, temperatura, estresse osmótico, concentração de carboidrato...), as leveduras também produzem compostos menos comuns, porém também importantes para o meio onde se encontra (fenóis, glicerol, ésteres, cetonas, compostos sulfurados e compostos nutricionais) (VILARREAL-SOTO et al., 2019).

Dada a complexidade de resposta das diferentes espécies de leveduras expostas ao meio, com todos os fatores de variância (temperatura, pH, oxigênio disponível, incidência a luz, concentração de CO₂, entre outros), bem como os substratos oferecidos, diferentes substâncias podem ser encontradas como subprodutos dos processos fermentativos e as

mesmas vêm sendo estudadas e analisadas nos mais diversos produtos fermentados (LEE et al., 2019; RAI et al., 2019).

As bactérias, microrganismos procariotas, são formadas basicamente pela membrana plasmática, citoplasma e o seu próprio material genético sem separação do resto do citoplasma. A sua reprodução é assexuada e alimentação feita a partir da quimiossintetização, isto é, através de reações de oxidação de alguns compostos (carboidratos e compostos nitrogenado) para produção de energia e consequente multiplicação. Sendo aeróbicas, realizam a respiração celular, e quando anaeróbicas, fermentação. Como produto da fermentação há substâncias já bem estudadas como o ácido láctico, o ácido acético e álcool etílico. Além das citadas, as bactérias ainda produzem compostos nutricionais, compostos bioativos e outros ácidos orgânicos de interesse da saúde do ser humano, gomas como dextrana, toxinas, entre outros (PAVLOVA et al., 2019).

Estudos recentes voltados para probióticos mostram que diferente da fermentação láctica, as bactérias precisam de oxigênio atmosférico para realizar a fermentação acética e essa é uma das razões pelas quais há a formação do SCOBY na superfície do líquido fermentado (SHENOY et al., 2019).

Sendo a *Acetobacter xylinum* (reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus*) como a maior responsável pela produção de celulose na superfície do líquido. Quando predominante, a mesma transforma o ácido acético em CO₂ e H₂O, diminuindo assim o teor de ácido acético no meio. Isso interfere tanto na produção industrial de vinagres, quanto no pH do meio que tem influência sobre outros microrganismos, sendo o líquido da kombucha o mais influenciado devido ao maior número de microrganismos em comparação ao disco de celulose (ROOS & VUYST, 2018; SHARMA & BHARDWAJ, 2019).

Análises de MANOVA realizadas nos últimos três anos confirmam a influência da temperatura do meio de cultura no número de espécies do gênero *Gluconobacter* encontrado e, conseqüentemente, na produção de ácidos orgânicos e do biofilme produzido. O gênero *Gluconobacter* sempre é dominante independente da temperatura comumente encontrada no cultivo de kombucha, porém, à medida que a temperatura

aumenta, o meio pode levar outros gêneros de microrganismos para o líquido como *Acinetobacter*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (REVA et al., 2015; FILIPPIS et al., 2018).

3.3 Alegações de Saúde

As alegações de saúde da kombucha passam pela origem do chá. Desde o seu descobrimento até os dias atuais, o chá ainda é tratado como bebida saudável e, a partir do conhecimento da preparação do chá de *Camellia sinensis*, as pessoas passaram a fazer infusões com outras plantas. Essas, por sua vez, também trazendo seus benefícios para o ser humano (AL-RAWAF et al., 2020; LI et al., 2020, LIU et al., 2020).

Tratando-se do intestino, sua microbiota é considerada saudável quando os microrganismos nela empregam seu papel favorecendo o bem-estar do ser humano e impedindo a atuação de microrganismos patogênicos, evitando infecções. Fortalecer essa microbiota é um trabalho que pode ser realizado através do consumo de alimentos com inulina, frutooligossacarídeos, amido resistente, pectina ou até mesmo do consumo direto, porém adequado e equilibrado, dos microrganismos vivos através de produtos fermentados (KAPP et al., 2019; AHMED et al., 2020; DELZENE et al., 2020, LI et al., 2020).

Bebidas fermentadas são opções acessíveis para o consumo de probióticos, sendo os leites fermentados os mais encontrados nos mercados. Contudo, o perfil de doenças alimentares, em especial as intolerâncias, podem limitar o consumo de probióticos fermentados a partir de leite de mamíferos. Além do teor de colesterol encontrado no leite, que pode ser um fator determinante para algumas pessoas, vale mencionar a presença de proteína do leite que afeta alérgicos e a lactose que afeta intolerantes. Com mais de 70% da população mundial sofrendo de intolerância à lactose, desde desconfortos e gases até respostas mais graves como diarreia, a ingestão de produtos sem leite sendo priorizada e estudada. Fatores que também influenciam o aumento de produtos fermentados livres de lactose incluem o aumento no número de vegetarianos no mundo (WATAWANA et al., 2016; PANGHAL et al., 2018; ZUBAIDAH et al., 2019).

Algumas empresas produzem probióticos a partir de material vegetal como sucos probióticos de vegetais que não frutas, sucos de frutas probióticos, probiótico com folhas como Moringa, kefir de água, kombucha, entre outros. Dentre eles, um que tem ganhado destaque ao longo dos anos pelo seu fácil cultivo doméstico é o chá verde utilizado na

produção da kombucha (WATAWANA et al., 2016; ZUBAIDAH et al., 2019; AHMED et al., 2020).

Estudos recentes mostram que o consumo regular de chá traz benefícios para o ser humano devido ao teor de compostos fenólicos, que atuam no corpo humano com capacidade de sequestrar radicais livres de oxigênio, agir como quelante, antioxidante, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antitumoral, e melhorando o sistema imunológico, entre outros (CARDOSO et al., 2020; LI et al., 2020; YAN et al., 2020).

O consumo de kombucha de chá também se provou mais benéfico que quando adicionado a outros substratos. Em 2020, Ahmed e colaboradores avaliaram e comprovaram a atividade antioxidante de diferentes tipos de kombucha utilizando *Camellia sinensis*, arroz e cevada. No estudo foi verificada uma eficiência de desenvolvimento de microrganismos e síntese de etanol e ácido acético superior à da fermentação fazendo uso de arroz ou cevada. Além do comparativo, o estudo também avaliou a perda de atividade antioxidante nas kombuchas após tratamento térmico, sendo confirmada a sua diminuição.

Além da atividade antioxidante, anti-hipertensiva e outras citadas, os compostos nutricionais e bioativos na kombucha também auxiliam no tratamento direto de doenças em animais. Em 2016, Hyun e colaboradores avaliaram a atividade de proteção hepática em ratos submetidos à dietas que induziam a esteatose hepática e foi confirmado que, quando os ratos faziam uso de chá de kombucha na dieta, os mesmos tiveram uma supressão de lipídios no fígado, prevenindo não somente o acúmulo excessivo de lipídios no fígado, mas promovendo a restauração do órgão.

3.4 Principais metabólitos e bioativos reconhecidamente disponíveis

Além dos micro e macronutrientes encontrados nos alimentos, há substâncias, conhecidas como compostos bioativos, que possuem atividade biológica no corpo. O grupo desses compostos se divide em três categorias: nutracêuticos, antinutrientes e tóxicos, com benefícios e/ou malefícios. Por conseguinte, alimentos que, além dos nutrientes necessários, fornecem essas substâncias nutracêuticas, são chamados de alimentos funcionais (CVETANOVIC et al., 2017; AHMED et al., 2020; LIU et al., 2020). Substâncias nutracêuticas com efeitos fisiológicos benéficos ao ser humano podem ser

inerentes ao alimento ou serem sintetizadas por microrganismos, como subprodutos, através da fermentação (FILIPPIS et al., 2018).

Alguns destes subprodutos presentes na kombucha comprovada são ácidos graxos de cadeia curta (como ácido glucônico, glucurônico e acético), compostos nutricionais e compostos bioativos (CARDOSO et al., 2020). Estes dois fatores, a presença de microrganismos e de substâncias benéficas ao corpo, auxiliam no bom funcionamento do trato intestinal do ser humano, e da sua microbiota própria, atuando em doenças inflamatórias locais, bem como através de efeitos sistêmicos aumentando a taxa de absorção de nutriente, sintetizando nutrientes biodisponíveis, combatendo a anemia, regulando do sistema imunológico, entre outros (SHARMA & BHARDWAJ, 2019; ZHOU et al., 2019; SUN et al., 2020; YAN et al., 2020).

3.4.1 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que atuam na taxa de oxidação de substâncias no organismo, prevenindo a formação de radicais livres, os quais contribuem com a perda da qualidade e saúde dos organismos, a exemplo do aparecimento de tumores em humanos (CARDOSO et al., 2020). Já nos alimentos, a ação dos antioxidantes previne a oxidação das substâncias que poderia comprometer as características sensoriais do produto e composição nutricional, bem como produzir substâncias nocivas ao ser humano (HOQUE et al., 2020; ALWAZEER, 2020).

Há estudos avaliando o potencial antioxidante de kombuchas de chá verde e preto, bem como a separação e identificação das substâncias com atividade antioxidante nas bebidas (CARDOSO et al., 2020; MHATRE, et al., 2020; YAN et al., 2020). Os achados dos últimos anos focam em compostos bioativos, porém, de modo geral, além do tipo de substrato e insumo, considera-se que a mudança de ambiente seja um dos fatores que determinam as alterações na fermentação e, conseqüentemente, no perfil microbiológico, e composição de nutrientes e compostos bioativos. Em razão disso, há a necessidade de estudar produtos alimentícios fermentados que são produzidos em locais com condições geográficas diferentes (PLESSAS et al., 2016; CARDOSO et al., 2020).

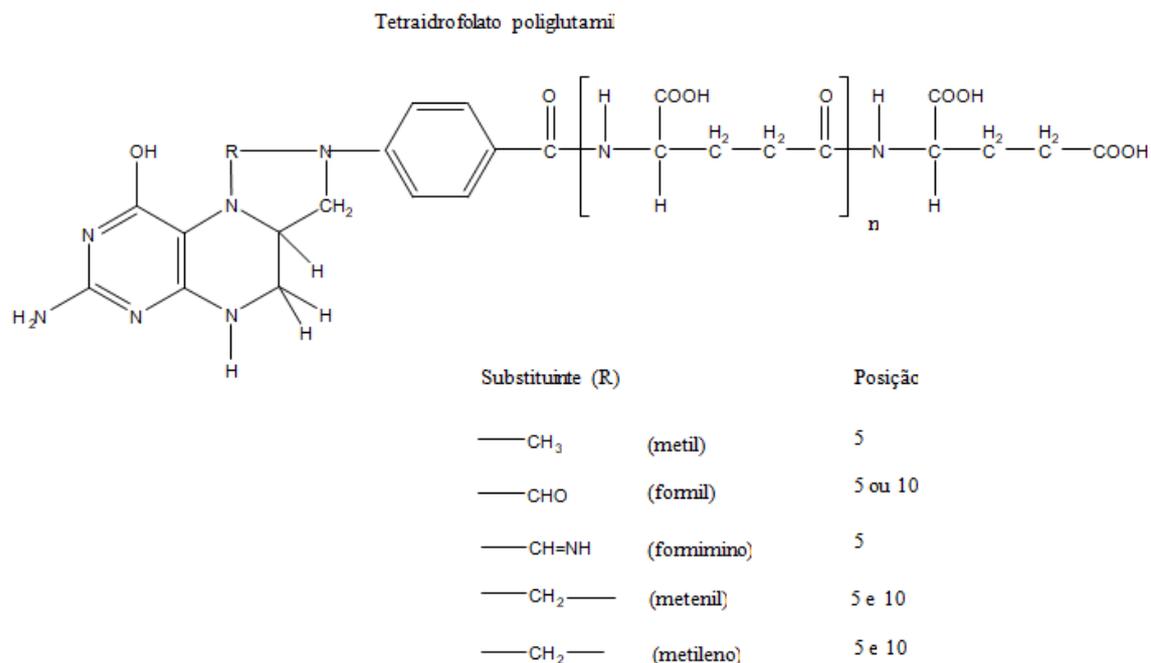
Os carotenoides são pigmentos naturais encontrados comumente em plantas e que atuam no corpo humano como precursores da vitamina A. Por sua vez, esta vitamina

lipossolúvel faz parte do desenvolvimento do corpo do ser humano, compõe parte das células epiteliais e auxilia na saúde da visão. Ocorre que, a disponibilidade de carotenoides no mundo é regional e até sazonal. Ainda assim, estudos já mostraram a capacidade das leveduras de produzir carotenoides a partir de material vegetal como trigo ou subprodutos agroindustriais, todos com potenciais antioxidantes. Analisar bebidas fermentadas com leveduras probióticas para verificar e confirmar a presença de substâncias como os carotenoides poderá oferecer suporte para a caracterização da bebida como funcional. (CIPOLATTI et al., 2019, LIU et al., 2020²).

3.4.2 Folatos

Folato é um termo utilizado para nomear um grupo de substâncias que se assemelham quimicamente e nutricionalmente ao ácido fólico (pteroil-L-glutâmico). A parte do ácido fólico, os outros constituintes deste grupo são genericamente chamados de folatos (JUZENIENE et al., 2013).

Figura 2: Estrutura do tetraidrofolato poliglutamil e suas formas em função do radical.



Fonte: Autoria própria.

Apesar do maior numero de citações do termo “ácido fólico” para descrever a vitamina B₉, na natureza, essa substância é somente encontrada em quantidades traço, mas sinteticamente produzida para utilização em fortificação de alimentos pela sua maior estabilidade se comparada aos outros folatos como os tetraidrofolatos (H₄folatos). Apesar desta obrigatoriedade por lei de inserção de ácido fólico em produtos alimentícios (farinhas de trigo, milho, massas e outros), o maior consumo de folatos ainda é pela ingestão na sua forma de poliglutamil.

De forma geral, os folatos apresentam atividade vitamínica e normalmente atuam em reações de transferência, oxidação e redução. A vitamina B₉ atua também na síntese de

metionina partir da homocisteína, no metabolismo de aminoácidos e constituição de proteínas, na síntese dos ácidos nucléicos sendo importante para o funcionamento do sistema nervoso (BAUDIN, 2019; EDELMANN et al., 2019; BELARDO et al., 2019).

Apesar de atuar em reações de oxidação e redução, os folatos podem sofrer clivagem por oxidantes e redutores, transformando-os em substâncias sem potencial vitamínico. Quanto à susceptibilidade desse grupo de substâncias a se degradar, também é importante mencionar o pH do meio no qual elas se encontram. A forma mais comum de folato encontrado nos alimentos é o 5-metiltetraidrofolato e, em meio ácido, este pode ser convertido em 5-metildiidrofolato. Este segundo folato ainda possui atividade vitamínica, podendo ainda ser reduzido de volta para 5-metiltetraidrofolato através de redutores fracos. Porém, permanecendo em meio ácido, o 5-metildiidrofolato pode sofrer clivagem e perder o seu potencial vitamínico. Sendo assim, bem como alguns bioativos, os compostos folatos podem apresentar uma pequena diferença de estabilidade em função do pH (JUZENIENE et al., 2013; GAZZALI et al., 2016; VITAS et al., 2018).

Muito embora todas as substâncias do grupo dos folatos sejam susceptíveis à degradação oxidativa, pelo fato do anel pteridina do ácido fólico se encontrar totalmente oxidado, em relação aos tetraidrofolatos e diidrofolatos, este se encontram mais estáveis a estas mudanças (GAZZALI et al., 2016). Ainda assim, a luz, presença de ascorbato no meio, a presença de compostos como hipoclorito, usado na higienização de alimentos, temperatura e cocção em meio aquoso podem ter grande interferência na absorção da vitamina pelas perdas causadas por oxidação ou lixiviação (LEŠKOVÁ et al., 2006; JUZENIENE et al., 2013; WATANABE et al., 2013; MELLIDOU et al., 2019).

Sobretudo, a absorção de folatos é dada não somente pela ingestão de alimentos fortificados pela vitamina, mas por alimentos tidos como fonte desta substância como carnes, legumes e folhas verdes. Por outro lado, a ingestão de alimentos pobres deste nutriente, o processamento que promova a perda da vitamina ou até mesmo a biodisponibilidade incompleta de formas naturais da substância (cerca de 50% da forma natural é biodisponível) pode causar carência vitamínica no ser humano. O seu mal armazenamento, com exposição à luz também leva a degradação da vitamina B9 pelo seu caráter fotossensível. Outra forma de diminuição do teor dessa vitamina no alimento é quando o alimento é feito em meio aquoso, promovendo a perda ou diminuição da

substância de caráter hidrossolúvel (SHERGILL-BONNER, 2017; TOIVONEN et al., 2018).

É de grande importância a determinação verdadeira dos micronutrientes nos alimentos, sobretudo as vitaminas hidrossolúveis, não somente pelos seus benefícios ao ser humano, mas para melhor entender a sua biodisponibilidade real levando em consideração antinutrientes, formas de preparo dos alimentos e outros fatores que impactam na absorção e degradação, assim buscando a melhor maneira de consumi-los (CUNHA-SANTOS et al., 2019).

3.5 Análises em kombucha

3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As técnicas para análise de alimentos nos últimos 10 anos tem se apropriado da eficiência dos equipamentos e detectores para oferecer maior sensibilidade e precisão, permitindo uma melhor separação e identificação das substâncias, e assim obtendo resultados mais confiáveis. Alguns destes métodos são os cromatográficos como o de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) e cromatografia gasosa (CG ou GC). Estes reproduzem metodologias mais confiáveis acerca da separação e identificação real das substâncias analisadas (CUNHA-SANTOS et al., 2019).

Devido à existência de isômeros das vitaminas (que podem não ter atividade biológica) e à sensibilidade das próprias vitaminas expostas ao meio e após o preparo dos alimentos, faz-se necessária à utilização de métodos analíticos que distingam as substâncias com mais sensibilidade, analisando o conteúdo real de vitaminas em nível de isômero (PENG et al., 2015; BOONPANGRAK et al., 2016; CUNHA-SANTOS et al., 2019; MARSHALL et al., 2020).

Nesta ótica, tem-se a vitamina B₉ como exemplo de grupo de substâncias que, apesar de semelhantes na atividade biológica, possuem sensibilidade à temperatura que varia de uma substância para a outra. A forma sintética, conhecida como ácido fólico, é comumente adicionada aos alimentos pela sua maior resistência às temperaturas mais altas e à luz quando comparada às suas formas encontradas naturalmente nas plantas (ex: 5-metiltetrahidrofolato). Porém, quando a vitamina B₉ é analisada em material vegetal é

perceptível que há perdas quando o mesmo é submetido a tratamentos térmicos (DIAS et al., 2016; PINELA et al., 2019; AZEVEDO et al., 2020).

Além de analisar fatores de degradação, novas pesquisas de análises cromatográficas vêm tomando foco nos substratos utilizados a fim de potencializar a produção de compostos nutricionais e bioativos em produtos fermentados. Em 2017, Laiño et al. verificaram que a utilização de leite fermentado por bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus* melhorou o teor de folatos na bebida fermentada, permitindo não só a reversão de quadro de deficiência de folato em ratos, mas também prevenindo o aparecimento da mesma.

A utilização de alguns substratos em bebidas lácteas já é conhecida, porém, há alguns anos, alternativas de origem vegetal também vêm sendo estudadas para a produção de folatos a partir de bactérias ácido lácticas. Em um estudo realizado em 2015, Espírito-Santo e colaboradores, utilizaram sucos de maçã, uva e laranja como substrato de fermentação de *Lactobacillus* e verificaram que o suco de maçã proporcionou um melhor desenvolvimento dos microrganismos, permitiu a produção de folatos e foi melhor aceito pela maioria dos provadores na análise sensorial. Análises específicas como estas são importantes para entender melhor os alimentos.

3.5.2 Composição físico-química

Produtos alimentícios normalmente possuem matrizes complexas com estruturas químicas variadas que podem dificultar as análises de substâncias. As análises bromatológicas servem para garantir a segurança alimentar, proteção contra fraudes, processamentos dos alimentos e conhecimento acerca dos mesmos (ULBERTH, F., 2020).

Partindo da premissa ancorada na hipótese de que o fermentado de kombucha (tanto o líquido quanto o disco de celulose) é um produto alimentício que vem ganhando popularidade nestes últimos anos, muito interesse tem se voltado para estudos a cerca destes probióticos. O entendimento sobre o teor de micronutrientes e perfil microbiológico (para confirmar a atividade probiótica na kombucha) são igualmente importantes à compreensão do teor de macronutrientes da kombucha (MAPA, 2019).

Estes dados podem nortear o valor nutritivo real da kombucha, auxiliando profissionais da área de Nutrição a trabalharem com os valores calóricos com mais

exatidão, os pesquisadores da área de alimentos que trabalham com a kombucha na sua forma natural e também o fortalecimento da padronização das características da bebida através de leis e instruções normativas (DAY, 2013; VITAS, 2018; MAPA, 2019; ISPIROVA et al., 2020).

Análises físico-químicas também permitem que pesquisadores criem novos produtos, potencializando os seus benefícios. Em 2015, Albuquerque et al. utilizaram subproduto industrial de maracujá e fructooligossacarídeos para estimular a produção de folatos e verificar o desenvolvimento de microrganismos em bebida de soja fermentada. O estudo confirmou que houve aumento do teor de folatos na bebida que dependeu não só dos microrganismos, mas também do tipo de substrato utilizado.

A kombucha é uma bebida promissora que vem sendo estudada cada vez mais. Entender a sua composição de forma mais detalhada permite que as pessoas não só trabalhem com a bebida da melhor forma para potencializar os seus benefícios, mas que novos produtos sejam elaborados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, R. F.; HIKAL, M. S.; ABOU-TALEB, K. A. *Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha*. Annals of Agricultural Sciences, 2020.
- ALBUQUERQUE, M. A. C.; BEDANI, R.; LEBLANC, J. G.; SAAD, S. M. I. *Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by started and probiotic cultures in fermented soymilk*. International Journal of Food Microbiology, vol. 261, p. 35 – 41, 2017.
- AL-RAWAF, H. A.; ALGHADIR, A. H.; GABR, S. A. *Circulating microRNAs expression as predictors of clinical response in rheumatoid patients treated with green tea*. Herbal Medicine, 2020.
- ALWAZEER, D. *Importance of consideration of oxidoreduction potential as a critical quality parameter in food industries*. Food Research International, vol. 132, 2020.

AZEVEDO, E. P. P.; ALVES, E. M. S.; KHAN, S. S.; SILVA, L. S.; SOUZA, J. R. B.; SANTOS, B. S.; RABELLO, C. B.; COSTA, A. C. S.; AZEVEDO, C. A. F.; SILVA, M. A. V. *Folic acid retention evaluation in preparations with wheat flour and corn submitted to different cooking methods by HPLC/DAD*. PLoS One, 2020.

AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. *Yeasts in sustainable bioethanol production: A review*. Biochemistry and Biophysics Reports, vol, 10, 52 – 61, 2017.

BAE, M.; LEE, Y.; PARK, Y. K.; SHIN, D. G.; JOSHI, P.; HONG, S. H.; ALDER, N.; KOO, S. I.; LEE, J. Y. *Astaxanthin attenuates the increase in mitochondrial respiration during the activation of hepatic stellate cells*. Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 71, 82 – 89, 2019.

BASU, A.; BETTS, N. M.; MUUGETA, A.; TONG, C.; NEWMAN, E.; LYONS, T. J. *Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome*. Nutrition Research, vol. 33, 180 – 187, 2013.

BAUDIN, B. *Les vitamines du groupe B: structures et rôles dans le métabolisme, déficits nutritionnels*, Revue Francophone des Laboratoires, França, ed. 514, p. 36 – 44, 2019.

BELARDO, A.; GEVI, F.; ZOLLA, L. *The concomitant lower concentrations of vitamins B6, B9 and B12 may cause methylation deficiency in autistic children*. The Journal of Nutritional Biochemistry, Itália, vol. 70, p. 38 – 46, 2019.

BERES, C.; FREITAS, S. P.; GODOY, R. L. O.; OLIVEIRA, D. C. R.; DELIZA, R.; IACOMINI, M.; SILVA, C. M.; CABRAL, L. M. C. *Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value?*. Journal of Functional Foods, vol. 56, 276 – 285, 2019.

BOONPANGRAK, S.; LALITMANAT, S.; SUWANWONG, Y.; PRACHAYASITTIKUL, S.; PRACHAYASITTIKU, V. *Analysis of ascorbic acid and isoascorbic acid in orange and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS*. Food Analytical Methods, Tailândia, v. 9, n. 6, p. 1616-1626, 2016.

CABRAL, B. D. V.; PÉREZ, M. L.; INFANTE, J. A. G.; JIMÉNEZ, M. R. M.; LAREDO, R. F. G.; QUIÑONES, J. G. R.; GÓMEZ, C. I. G.; GUZMÁN, N. E. R. *Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes*. *Chemico-Biological Interactions*, 272, p. 1 – 9, 2017.

CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; D'ALMEIDA, T. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D.; CAMERON, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; BARROS, F. A. R. *Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities*. *Food Research International*, vol. 128, 2020.

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

CHEN, P. T.; HONG, Z. S.; CHENG, C. L.; NG, I. S.; LO, Y. C.; NAGARAJAN, D.; CHANG, J. S. *Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized Lactobacillus plantarum 23 using microalgae as feedstock*. *Bioresource Technology*, vol. 308, 2020.

CUNHA-SANTOS, E. C. E.; VIGANÓ, J.; NEVES, D. A.; MARTÍNEZ, J.; GODOY, H. T. *Vitamin C in camu-camu [Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods*. *Food Research International, Brasil*, vol. 115, p. 160 – 166, 2019.

CVETANOVIC, A.; SVARC-GAJIC, J.; GASIC, U.; TESIC, Z.; KENGIN, G.; ZEKOVIC, K.; DUROVIC, S. *Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process*. *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 120, 32 – 42, 2017.

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PISKUR, J. *Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?*. *Federation of European Microbiology Society*, 2014.

DAY, L. *Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security*. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 32, 2013.

DIAS, M. I.; MORALES, P.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; FERREIRA, I. C. F. R. *Minerals and vitamin B₉ in dried plants vs. Infusions: Assessing absorption dynamics of minerals by membrane dialysis tandem in vitro digestion*. Food Bioscience, vol. 13, pag. 9 – 14, Mar. 2016.

DIAS, R. *Gestão Ambiental: Responsabilidade Social e Sustentabilidade*. Ed. 3. Brasil. Editora Atlas, 2017.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. *Tea, Kombucha, and health: a review*. Food Research International, vol. 33, 409 – 421, 2000.

EDELMANN, M.; CHAMLAGAIN, B.; SANTIN, M.; KARILUOTO, S.; PIIRONEN, V. *Stability of added and in situ-produced vitamin B12 in breadmaking*. Food Chemistry, Finlândia, vol. 204, p. 21 – 28, 2016.

ELZENNE, N. M.; OLIVARES, M.; NEYRINCK, A. M.; BEAUMONT, M.; KJOLBEAK, L.; LARSEN, T. M.; PÁEZ, A. B.; PÉREZ, M. R.; CAMPAYO, V. G.; BOSSCHER, D.; SANZ, Y.; KAMP, J. W. V. D. *Nutritional interest of dietary fiber and prebiotics in obesity: Lessons from the My New Gut consortium*. Clinical Nutrition, vol. 39, 414 – 424, 2020.

ESPÍRITO-SANTO, A. P.; CARLIN, F.; RENARD, C. M. G. C. *Apple, grape or Orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth? A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics*. Food Research International, vol. 78, p. 352 – 360, 2015.

FILLIPS, F.; TROISE, A. D.; VITAGLIONE, P.; ERCOLINI, D. *Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during kombucha tea fermentation*. Food Microbiology, vol. 73, 11 – 16, 2018.

GAZZALI, A. M.; LOBRY, M.; COLOMBEAU, L.; ACHERAR, S.; AZAÏS, H.; MORDON, S.; ARNOUX, P.; BAROS, F.; VANDERESSE, R.; FROCHOT, C. *Stability of folic acid under several parameters*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, França, ed. 93, p. 419 – 430, 2016.

- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. *The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation*. Trends in Food Science & Technology, vol. 62, 2017.
- CHENG, X.; ZHENG, J.; LIN, A.; XIA, H.; ZHANG, Z.; GAO, Q.; LV, W.; LIU, H. *A review: Roles of carbohydrates in human diseases through regulation of imbalanced intestinal microbiota*. Journal of Functional Foods, China, vol. 74, 104197, Nov. 2020.
- CIPOLATTI, E. P.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. S.; RODRIGUES, A. B.; RAMOS, J. M. G.; BURKERT, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M. *Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Brazil, vol. 20, 101208, 2019.
- HIKMETOGLU, M.; SOGUT, E.; SOGUT, O.; GOKIRMAKLI, C.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. *Changes in carbohydrate profile in kefir fermentation*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, vol. 23, 2020.
- HO, V. T. T.; FLEET, G. H.; ZHAO, G. *Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms*. International Journal of Food Microbiology, vol. 279, 43 – 56, 2018.
- HOQUE, M.; AGARWAL, S.; GUPTA, S.; GARG, S.; SYED, Y.; RUPESH, A.; MOHAPATRA, N.; BOSE, S.; SARKAR, P. *Lipid Nanostructures in Food Applications*. Reference Module in Food Science, 2020.
- HOPFE, S.; FLEMMING, K.; LEHMANN, F.; MOCKEL, R.; KUTSCHKE, S.; POLLMAN, K. *Leaching of rare earth elements from fluorescent powder using the tea fungus Kombucha*. Waste Management, vol. 62, 211 – 221, 2017.
- HRNJEZ, D.; VASTAG, Z.; MILANOVIC, S.; VURIK, V.; ILICIC, M.; POPOVIC, L. J.; KANURIC, K. *The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage*. Journal of Functional Foods, vol. 10, 336 – 345, 2014.

HYUN, J.; LEE, Y.; WANG, S.; KIM, J.; KIM, J.; CHA, J.; SEO, Y.; JUNG, Y. *Kombucha Tea Prevents Obese mice from Developing Hepatic Steatosis and Liver Damage*. Food Science and Biotechnology, vol. 25, 861 – 866, 2016.

ISPIROVA, G.; EFTIMOV T.; SELJAK, B. K. *Evaluating missing value imputation methods for food composition databases*. Food and Chemical Toxicology, vol. 141, 2020.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R. V.; LONCAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. *A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity and Tea Fungus*. Comprehensive Reviews in Food Science and Technology, vol. 13, 2014.

JUZENIENE, A.; TAM, T. T. T.; IANI, V.; MOAN, J. *The action spectrum for folic acid photodegradation in aqueous solutions*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Noruega, vol. 126, p. 11 – 16, 2013.

KANURIC, K. G.; MILANOVIC, S. D.; IKONIC, B. B.; LONCAR, E. S.; ILICIC, M. D.; VUKIC, V. R.; VUKIC, D. V. *Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter*. Journal of Food and Drug Analysis, vol. 26, 1229 – 1234, 2018.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. *Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit*. Annals of Epidemiology, vol. 30, 66 – 70, 2019.

LAIÑO, J. E.; ZELAYA, H.; VALLE, M. J.; GIORI, G. S.; LEBLANC, J. G. *Milk fermented with selected strains of lactic acid bacteria is able to improve folate status of deficient rodents and also prevent folate deficiency*. Journal of Functional Foods, vol. 17, p. 22 – 32, 2015.

LEE, D. W.; HONG, C. P.; KANG, H. A. *An effective and rapid method for RNA preparation from non-conventional yeast species*. Analytical Biochemistry, vol. 586, 2019.

LEŠKOVÁ, E. et al. *Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models*. Journal of Food Composition and Analysis, Eslováquia, 19, p. 252–276, 2006.

LI, B.; XIE, C. Y.; YANG, B. X.; GOU, M.; XIA, Z. Y.; SUN, Z. Y.; TANG, Y. Q. *The response mechanisms of industrial Saccharomyces cerevisiae to acetic acid and formic*

acid during mixed glucose and xylose fermentation. *Process Biochemistry*, vol. 91, 319 – 329, 2020.¹

LI, H.; MEI, X.; LIU, B.; LI, Z.; WANG, B.; REN, N.; XING, D. *Insights on acetate-ethanol fermentation by hydrogen-producing *Ethanoligenens* under acetic accumulation based on quantitative proteomics*. *Environment International*, vol. 129, 1 – 9, 2019.

LI, X.; WANG, W.; HOU, L.; WU, H.; WU, Y.; XU, R.; XIAO, Y.; WANG, X. *Does tea extract supplementation benefit metabolic syndrome and obesity? A systematic review and meta-analysis*. *Clinical Nutrition*, vol. 39, 1049 – 1058, 2020.²

LIU, Y.; ZHAO, G.; SHEN, Q.; WU, Q.; ZHUANG, J.; ZHANG, X.; XIA, E.; ZHANG, Z.; QIAN, Y.; GAO, L.; XIA, T. *Comparative analysis of phenolic compound metabolism among tea plants in the section *Thea* of the genus *Camellia**. *Food Research International*, 2020.

LIU, Z.; FEIST, A. M.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I. *Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts*. *Journal of Cleaner Production*, vol. 249, 119308, 2020².

MAPA, Instrução Normativa N° 41, de 17 de Setembro de 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete da Ministra, Ed. 181 Seção 1, Pág. 13. 18 de Setembro de 2019

MAPELLI-BRAHM, P. BARBA, F. J.; REMIZE, F.; GARCIA, C.; FESSARD, A.; KHANEGHAH, A. M.; SANT'ANA, A. S.; LORENZO, J. M.; MONTESANO, D.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. *The impact of fermentation processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: An overview*. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 99, 389 – 401, 2020.

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

MARSHALL, J.; ZHANG, H.; KHAZAEI, H.; MIKITUK, K.; VANDENBERG, A. *Targeted quantification of B vitamins using ultra-performance liquid chromatography-*

selected reaction monitoring mass spectrometry in faba bean seeds. Journal of Food Composition and Analysis, 103687, Oct. 2020.

MELLIDOU, I.; GEORGIADOU, E. C.; KALOUDAS, D.; KALAITZIS, P.; FOTOPOULOS, V.; KANELLIS, A. K. Chapter 17: *Vitamins*. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, p. 359 – 383, 2019.

SHERGILL-BONNER, R. *Micronutrients*. Paediatrics and Child Health, Inglaterra, vol. 27, p. 357 – 362, 2017.

MHATRE, S.; SRIVASTAVA, T.; NAIK, S.; PATRAVALE, V. *Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19: A review*. Phytomedicine, India, 2020.

MIGL, D.; KSCHONSAK, M.; ARTHUR, P. C.; KHIN, Y.; HARRISON, S. C.; CIFERRI, C.; DIMITROVA, Y. N. *Cryoelectron Microscopy Structure of a Yeast Centromeric Nucleosome at 2.7 Å Resolution*. Structure, vol. 28, 363 – 370, 2020.

NAGANO, T.; YANO, H. *Dietary cellulose nanofiber modulates obesity and gut microbiota in high-fat-fed mice*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, vo. 22, 2020.

NANTAPO, C. W. T.; MUCHENJE, V.; NKUKWANA, T. T.; HUGO, A.; DESCALZO, A.; GRIGIONI, G.; HOFFMAN, L. C. *Socio-economic dynamics and innovative technologies affecting health-related lipid content in diets: Implications on global food and nutrition security*. Food Research International, vol. 76, 2015.

PANGHAL, A.; JANGHU, S.; VIRKAR, K.; GAT, Y.; KUMAR, V.; CHHIKARA, N. *Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach*. Food Bioscience, vo. 21, 80 – 89, 2018.

PAVLOVA, N.; KALOUDAS, D.; PENCHOVSKY, R. *Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria*. Gene, vol. 708, 38 – 48, 2019.

PENG, J.; LING, J.; ZHANG, X. Q.; ZHANG, L. Y.; CAO, Q. E.; DING, Z. T. *A rapid, sensitive and selective colorimetric method for detection of ascorbic acid*. Sensors and Actuators B: Chemical, China, v. 221, p. 708-716, 2015.

PEREIRA, A. F.; SILVA, P. H. A.; PINHEIRO, P. F.; BRAGA, L. M.; PINHEIRO, C. A. *Adição de fontes de nitrogênio e de duas linhagens de levedura na fermentação alcoólica para produção de cachaça*. Revista de Engenharia Química e Química, vol. 1, 45 – 59, 2015.

PINELA, J.; MORALES, P.; VERDE, S. C.; ANTONIO, A. L.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; CÁMARA, M.; FERREIRA, I. C. F. R. *Stability of total folates/vitamin B₉ in irradiated watercress and buckler sorrel during refrigerated storage*. Food Chemistry, vol. 274, pag. 686 – 690, Fev. 2019.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. *Yeast: the soul of beer's aroma – a review of flavor-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast*. Applied Microbiology Biotechnology, vol. 98, 1937 – 1949, 2014.

PLESSAS, S.; NOUSKA, C.; MANTZOURANI, I.; KOURKOUTAS, Y.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E. *Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains*. Fermentation, v. 3, 2017.

RAI, A. K.; PANDEY, A.; SAHOO, D. *Biotechnological potential of yeasts in functional food industry*. Trends in Food Science and Technology, vol. 83, 129 – 137, 2019.

RAMOZ-MARTINEZ, J. I. *The regulation of the pentose phosphate pathway: Remember Krebs*. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 614, 50 – 52, 2017.

REVA, O. N.; ZAETS, I. E.; OVCHARENKO, L. P.; KUKHARENKO, O. E.; SHPYLOVA, S. P.; PODOLICH, O. L.; VERA, J.; KOZYROVSKA, N. O. *Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments*. AMB Express, 2015.

ROJAS-GARBANZO, C.; WINTER, J.; MONTERO, M. L.; ZIMMERMANN, B. F.; SCHIEBER, A. *Characterization of phytochemicals in Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum* -Nied) fruit and stability of main compounds during juice processing – (U)HPLC-DAD-ESI-TQD-MSⁿ*. Journal of Food Composition and Analysis, Costa Rica, vol. 75, p. 26 – 42, 2019.

- ROOS, J.; VUYST, L. *Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages*. Current Opinion in Biotechnology, vol. 49, 115 – 119, 2018.
- ROWLEY-IV, T. J.; BITNER, B. F.; RAY, J. D.; LATHEN, D. R.; SMITHSON, A. T.; DALLON, B. W.; PLOWMAN, C. J.; BIKMAN, B. T.; HANSEN, J. M.; DORENKOTT, M. R.; GOODRICH, K. M.; YE, L.; O'KEEFE, S. F.; NEILSON, A. P.; TESSEM, J. S. *Monomeric cocoa catechins enhance β -cell function by increasing mitochondrial respiration*. Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 49, 30 – 41, 2017.
- SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. *Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms*. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 132, 166 – 177, 2019.
- SHENOY, K. C.; LOBO, R. O.; DIAS, F. O. *16 – Kombucha (Bio-Tea): An Elixir of Life?* Nutrients in Beverages, vol. 12: The Science of Beverages, pag. 591 – 616, 2019.
- STANDAGE, T. *História do Mundo em 6 Copos*. Ed. 1. Rio de Janeiro. Editora Zahar, 2005.
- SUN, L.; ZHANG, Y.; LAI, X.; LI, Q.; ZHANG, L.; SUN, S. *Green and black tea inhibit proliferation and migration of HepG2 cells via the PI3K/Akt and MMPs signaling pathway*. Biomedicine and Pharmacotherapy, vol. 125, 2020.
- TOIVONEN, K. I.; LACROIX, E.; FLYNN, M.; RONKSLEY, P. E.; OINONEN, K. A.; METCALFE, A.; CAMPBELL, T. S. *Folic acid supplementation during the preconception period: A systematic review and meta-analysis*. Preventive Medicine, Canadá, ed. 114, p. 1 – 17, 2018.
- TROITINO, C. *Kombucha 101: Demystifying The Past, Present and Future of Fermented Tea Drink*. Forbes, 2017. Disponível em: <
<https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-past-present-and-future-of-the-fermented-tea-drink/#5709ec944ae2>>. Acesso em: 17 fev. 2020.
- TU, C.; TANG, S.; AZI, F.; HU, W.; DONG, M. *Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage*. Journal of Functional Foods, vol. 52, 81 – 89, 2019.

TURNER, A. L.; MICHAELSON, L. V.; SHEWRY, P. R.; LOVEGROVE, A.; SPENCER, J. P. E. *Increased bioavailability of phenolic acids and enhanced vascular function following intake of feruloyl esterase-processed high fibre bread: A randomized, controlled, single blind, crossover human intervention trial*. *Clinical Nutrition*, 2020.

ULBERTH F. *Tools to combat food fraud – A gap analysis*. *Food Chemistry*, vol. 330, 127044, Nov. 2020.

VASSILEV, S.; ILIEV, V.; SHOPSKA, V.; KANEVA, M.; KOSTOV, G. *Modeling of Alcohol Fermentation in Brewing – Integrated Approach for Control of Continuous Alcohol Fermentation*. *Proceedings 29th European Conference on Modelling and Simulation*, 2015.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.; RENARD, T.; ROLLAN, S.; TAILLANDIER, P. *Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts*. *Process Biochemistry*, vol. 83, 44 – 55, 2019.

VITAS, J. S.; CVETANOVIC, A. D.; MASKOVIC, P. Z.; SVARC-GAJIC, J. V.; MALBASA, R. V. *Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverage with yarrow*. *Journal of Functional Foods*, vol. 44, 95 – 102, 2018.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages*. *Beverages*, vol. 2, 30, 2016.

WATANABE, F.; YABUTA, Y.; TANIOKA, Y.; BITO, T. *Biologically Active Vitamin B₁₂ Compounds in Food for Preventing Deficiency among Vegetarians and Elderly Subjects*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Japão, 61, 6769 – 75, 2013.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. *Enhancement of the antioxidant and starch hydrolate inhibitory activities of king coconut water (Cocos nucifera var. aurantiaca) by fermentation with kombucha 'tea fungus'*. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, 490 – 498, 2016.

XIA, X.; DAI, Y.; WU, H.; LIU, X.; WANG, Y.; YIN, L. WANG, Z.; LI, X.; ZHOU, J. *Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage*. *Journal of Functional Foods*, vol. 62, 2019.

YAN, Z.; ZHONG, Y.; DUAN, Y.; CHEN, Q.; LI, F. *Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits*. Animal Nutrition, 2020.

ZENG, L.; ZHOU, Y.; FU, X.; MEI, X.; CHENG, S.; GUI, J.; DONG, F.; TANG, J.; MA, S.; YANG, Z. *Does oolong tea (Camellia sinensis) made from a combination of leaf and stem smell more aromatic than leaf-only tea? Contribution of the stem to oolong tea aroma*. Food Chemistry, vol. 237, 488 – 498, 2017.

ZHOU, X.; TAN, J.; GOU, Y.; LIAO, Y.; XU, F.; LI, G.; CAO, J.; YAO, J.; YE, J.; TANG, N.; CHEN, Z. *The biocontrol of postharvest decay of table grape by the application of kombucha during cold storage*. Scientia Horticulturae, vol. 253, 134 – 139, 2019.

ZUBAIDAH, E.; AFGANI, C. A.; KALSUM, U.; SRIANTA, I.; BLANC, P. J. *Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit Kombucha, black tea Kombucha and metformin*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, vol. 17, 2020.

ZUBAIDAH, E.; DEWANTARI, F. J.; NOVITASARI, F. R.; SRIANTA, I.; BLANC, P. J. *Potential of snake fruit (Salacca zalacca (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the kombucha consortium*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, vol. 13, 198 – 203, 2018.

4. ARTIGO

Disponibilidade de 5-metil-tetraidrofolato e potencial antioxidante de Kombucha de chá verde (Camellia sinensis)

RESUMO

Kombucha é uma bebida probiótica à base de chá das folhas de *Camellia sinensis*, promissora e com crescente consumo mundial. No entanto, conhecimento acerca da sua composição ainda é limitado, em especial quanto aos micronutrientes. Diante do exposto, o presente estudo avaliou a disponibilidade de 5-metil-tetrahidrofolato e potencial antioxidante, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides totais e a composição físico-química de kombucha de chá verde (*Camellia sinensis*) durante 21 dias de fermentação. Para as análises a kombucha foi monitorada nos dias 1, 3, 7, 14 e 21. 5-metil-tetrahidrofolato foi identificado e quantificado em cromatógrafo HPLC-DAD. Carotenoides totais, flavonoides totais, fenólicos totais e atividade antioxidante total (ABTS) foram avaliadas utilizando método colorimétrico em espectrofotômetro. Para caracterização físico-química foi avaliado umidade, cinzas, lipídios, pH, Aw, sólidos solúveis, acidez titulável e açúcares totais. A kombucha apresentou teores de 5-metiltetrahidrofolato de $39,12 \pm 1,32$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ no líquido e $45,78 \pm 8,42$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ no disco de celulose no terceiro dia de fermentação e $50,87 \pm 3,56$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ no líquido e $54,88 \pm 3,89$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ no disco no vigésimo primeiro dia de fermentação. Teores de compostos fenólicos totais na faixa de $1,05 \pm 0$ mg EAG/ mL (dia 1) até $1,94 \pm 0,01$ mg EAG/ mL (dia 21) foram encontrados na kombucha, com aumento de acordo com a prolongação da fermentação até o dia 21. O disco de celulose apresentou valores não significativos para fenólicos $0,09 \pm 0$ mg EAG/ mL. Flavonoides totais não apresentaram diferenças significativas ao longo da fermentação, mantendo-se em torno de $0,07 \pm 0,00$ mg EC/mL durante todo o processo fermentativo. Carotenoides totais presentes tiveram uma queda significativa com a progressão da fermentação de $53,80 \pm 0,36$ $\mu\text{g}/100$ mL no início para $24,69 \pm 0,70$ $\mu\text{g}/100$ mL no final da fermentação. Os valores de umidade foram similares durante o processo fermentativo com média do líquido e SCOBY de $93,06\% \pm 0,57$ e $92,33 \pm 0,59$ respectivamente. A Aw para o líquido e SCOBY se manteve em $0,99 \pm 0,00$ e cinzas abaixo de 0,1% para o líquido e para o SCOBY sem diferenças significativas durante o processo de fermentação. Valores de sólidos solúveis para o líquido ficaram entre 6,5 – 7,5 e os lipídios apresentados tiveram uma média igual a $0,3\% \pm 0,12$ e $0,6\% \pm 0,19$ para o líquido e SCOBY respectivamente, ambos sem variação ao longo da fermentação. No presente estudo, a acidez titulável aumentou com o decorrer da fermentação e os valores de pH caíram de $3,34 \pm 0,01$ no primeiro dia até $2,06 \pm 0,10$ no

último dia de fermentação. Os dados sobre 5-metiltetraidrofolato encontrados no estudo são inéditos e de extrema relevância para diretrizes alimentares, ciência e tecnologia de alimentos, bem como para o consumo geral da população uma vez que a kombucha agora pode ser considerada fonte da vitamina. O estudo concluiu que o melhor tempo para consumir a kombucha e obter 5-metiltetraidrofolato e os bioativos encontrados, é consumir o líquido entre os dias de fermentação 7 a 14 e sem adição de outros ingredientes possivelmente oxidantes ou redutores.

Palavras-chave: Folatos, CLAE, Valor Nutritivo, Antioxidante.

ABSTRACT

Kombucha is a promising probiotic tea-based drink made from *Camellia sinensis* leaves, with an increasing worldwide consumption. However, knowledge about its composition is still scarce, especially when it comes to micronutrients. Given the above, the present study evaluated the antioxidant potential, availability of 5-methyltetrahydrofolate, total phenolic compounds, total flavonoids and total carotenoids and also the physicochemical composition of green tea kombucha (*Camellia sinensis*) during fermentation. Green tea kombucha was fermented for 21 days and analyzed on days 1, 3, 7, 14 and 21. The analyses of the water-soluble vitamin were performed in an HPLC-DAD chromatograph, total carotenoids, total flavonoids, total phenolics and total antioxidant activity (ABTS) were evaluated using a colorimetric method in a spectrophotometer. For physico-chemical characterization, moisture, ash, lipids, pH, Aw, soluble solids, titratable acidity and total sugars were evaluated. The kombucha had concentrations of 5-methyltetrahydrofolate of $39.12 \pm 1.32 \mu\text{g} / \text{mL}$ in the liquid and $45.78 \pm 8.42 \mu\text{g} / \text{mL}$ in the SCOBY on the third day of fermentation and $50.87 \pm 3.56 \mu\text{g} / \text{mL}$ in the liquid and $54.88 \pm 3.89 \mu\text{g} / \text{mL}$ in the SCOBY on the twenty-first day of fermentation. Total phenolic compounds contents ranged from $1.05 \pm 0 \text{ mg EAG} / \text{mL}$ to $1.94 \pm 0.01 \text{ mg EAG} / \text{mL}$ in the kombucha liquid, increasing as the fermentation continued until day 21. However, the cellulose-disk showed non-significant values for total phenolic compounds, $0.09 \pm 0 \text{ mg EAG} / \text{mL}$. Total flavonoids did not show significant differences during the fermentation, remaining around $0.07 \pm 0.00 \text{ mg EC} / \text{mL}$ throughout the fermentation process. Total carotenoids had a significant decrease as the fermentation progressed, going from $53.80 \pm 0.36 \mu\text{g} / 100 \text{ mL}$ at the beginning to $24.69 \pm 0.70 \mu\text{g} / 100 \text{ mL}$ at the end of the fermentation. The humidity values were similar throughout the fermentation process with an average of $93.06\% \pm 0.57$ and 92.33 ± 0.59 for the liquid and SCOBY respectively. Aw for both liquid and SCOBY remained at 0.99 ± 0.00 and ash found was below 0.1% for both throughout the fermentation process. Values for total soluble solids for the liquid were between 6.5 - 7.5 and the lipids found during the whole fermentation process did not vary significantly, with

an average equal to $0.3\% \pm 0.12$ and $0.6\% \pm 0.19$ for the liquid and SCOBY respectively. In the present study, the titratable acidity increased with the course of the fermentation and pH values dropped from 3.34 ± 0.01 on the first day, to 2.06 ± 0.10 on the last day of fermentation. The information on 5-methyltetrahydrofolate found in the study is unprecedented and highly relevant for food guidelines, food science and technology, as well as for the general consumption of the population as kombucha can now be considered a source of the vitamin. The study concluded that the best time to consume the kombucha liquid and obtain 5-methyltetrahydrofolate and the bioactive compounds found on the study, is between the days of fermentation 7 to 14 and without the addition of other possibly oxidizing or reducing ingredients.

Keywords: Folates, HPLC, Nutritional Value, Antioxidant.

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada asiática que tem como base o chá verde ou preto (*Camellia sinensis*) onde a sua elaboração se dá pela fermentação realizada por leveduras e bactérias encontradas dispersas no líquido. Os microrganismos contidos na bebida utilizam carboidratos para o processo fermentativo, bem como para a produção de um biofilme de celulose chamado de SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Como consequência dos processos metabólicos, há também a produção de metabólitos secundários que possuem benefícios para o ser humano, como compostos fenólicos, flavonoides, e compostos nutricionais (TROTINO, 2017; LIU et al., 2020).

Nas últimas décadas do século XX, o consumo de kombucha tornou-se comum pela popularização dos possíveis benefícios da bebida fermentada. O chá (*Camellia sinensis*) já é conhecido por suas propriedades antioxidantes, no entanto a kombucha, fermentado do chá, é sem dúvidas um produto que pode ter potencial funcional (SHARMA & BHARDWAJ, 2019; AL-RAWAF et al., 2020; CARDOSO et al., 2020).

A atividade antioxidante da kombucha já vem sendo estudada há anos e estudos recentes confirmam a presença de substâncias bioativas com potencial antioxidante na bebida fermentada (AHMED et al., 2020). Além da atividade antioxidante um estudo de 2016 comprovou a eficiência da kombucha frente a doenças cardiovasculares e com potencial protetor hepático em animais. Hyun e colaboradores (2016) avaliaram a atividade

da proteção hepática em ratos submetidos a dietas que induziram a esteatose hepática e foi confirmado que, fazendo uso de kombucha na dieta, os mesmos tiveram uma supressão de lipídios no fígado, prevenindo o acúmulo excessivo de lipídios no fígado.

A kombucha possui compostos nutricionais e bioativos benéficos para o ser humano, no entanto alguns fatores que podem alterar a composição do produto, muitas vezes não tem sido considerados nas análises, como localização geográfica, tipo de carboidrato usado na fermentação, tipo de insumo (chás diferentes) e dias e fermentação. Existem diferentes tipos de kombucha no mundo e estas seguem cultivo em climas diferentes, tendo composições de substâncias e caracterização microbiológica diferenciada (PLESSAS et al., 2016; ZENG et al., 2017; VITAS et al., 2018).

O estudo da kombucha no Brasil é recente, mas sabe-se que existe diferença de composição físico-química, potencial antioxidante e análise de vitaminas durante o período de fermentação. Nesta perspectiva, o presente trabalho buscou analisar o teor de 5-metiltetraidrofolato, teor de fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides totais, a composição físico-química, e potencial antioxidante total da kombucha de chá verde durante o período de fermentação de 21 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Amostras

As amostras de kombucha analisadas no presente trabalho foram obtidas através do cultivo de forma artesanal do produto por consumidores locais. Este coletado para cultivo da nova kombucha em laboratório em condições controladas.

2.1.2 Reagentes e padrão

Foram utilizados metanol (Merck®, Brasil), fosfato de potássio monobásico e ácido fosfórico (Fluka®, Suíça), todos em grau de pureza superior a 99% ou grau cromatográfico. Acetato de amônio e acetona (Vetec®, Brasil), trolox, ácido gálico, ABTS e folin-ciocalteau (Sigma-Aldrich®, Alemanha), hidróxido de sódio, nitrito de sódio e persulfato de potássio (Neon®) todos em grau analítico.

O padrão utilizado foi o 5-metiltetrahidrofolato (Sigma-Aldrich®, EUA) em grau de pureza analítico (superior a 99%) para identificação e quantificação dos picos.

A água utilizada no preparo de soluções e fase móvel foi obtida a partir de um sistema de ultra purificação que apresentou 18MΩ.cm em condutividade e Carbono Orgânico Total 10 ppb a 25°C.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo da kombucha para fermentação

Para obtenção do chá para a fermentação da kombucha utilizou-se folhas secas de chá verde (*Camellia sinensis*), compradas a granel adquiridas no mercado cerealista *Empório Pura Vida*, localizado no bairro São José, em Recife – PE.

Em uma panela de aço inoxidável previamente higienizada foram aquecidos 7,5 L de água filtrada até atingir a temperatura de 90 °C. Atingindo a temperatura, a fonte de calor foi desligada e foram adicionados 75 g (1%) do chá verde desidratado em folhas para realização da infusão durante 30 a 40 minutos. Após, o chá foi filtrado com peneira e foram adicionados e diluídos 600 g (8%) de açúcar cristal comum como fonte de energia e o chá adoçado foi mantido na panela até atingir a temperatura ambiente local (25 °C).

Atingindo a temperatura ambiente, foram adicionados ao chá 1.500 mL (20%) de colônia viável starter de kombucha artesanal (líquido com película de celulose cortada em pedaços de 2 cm³). O volume total foi dividido igualmente em 15 béqueres de volume máximo de 2 L, cobertos com tecido *voal* previamente higienizado, mantidos em laboratório fechado à temperatura ambiente de 22 a 25 °C e protegidos de incidência direta luz e vento. Os chás fermentados foram divididos e 3 grupos (A, B e C) para 5 tempos de fermentação (1, 3, 7, 14 e 21) sendo as amostras coletadas para análise em triplicata nos respectivos dias de fermentação.

2.2.2 Análise de 5-metiltetraidrofolato por CLAE

5-metil-tetraidrofolato foi determinado em cromatógrafo líquido (Shimadzu®, Japão), composto pelos seguintes módulos: sistema controlador modelo CBM-20A, detector de arranjos de diodos (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC-20 AT, forno para coluna modelo CTO-20AC, amostrador automático modelo SIL-20AC.

Todos os comandos foram realizados utilizando software LC Solution (versão 1,25, Shimadzu®, Japão). As análises desenvolvidas no Laboratório Multiusuário para Caracterização Química de Alimentos, Medicamentos e Suplementos Nutricionais (CQAMOS) no Departamento de Nutrição (DN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.2.3 Preparo das soluções padrão

O padrão utilizado neste estudo foi mantido a -18°C . A solução estoque foi preparada a partir de cada padrão na concentração de $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, usando 1 mL de NaOH 2% (m/v) e completando o volume com acetato de amônio $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,7. As soluções de diluição foram preparadas a partir da solução estoque em diferentes concentrações e mantidas à 4°C durante o desenvolvimento do estudo.

2.2.4 Protocolo de extração para análise cromatográfica

Foram pesados em balança analítica (Tecnal®) aproximadamente 4 g de amostra, triturados e adicionados 20 mL da solução extratora de acetato de amônio na concentração $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, o conjunto amostra mais solução extratora foi agitado em vórtex (Fisatom®) durante um minuto. Os extratos foram submetidos a um tratamento em banho termostaticado (Quimis®) à 40°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5810®) em rotação de 4500 rpm (5000 g) a uma temperatura de 4°C durante 15 minutos com subsequente filtração em membranas de acetato de celulose de porosidade $0,45\text{ }\mu\text{m}$. A quantidade equivalente a 1 mL de cada extrato foi novamente filtrada em membranas de fluoreto de polivinidileno de porosidade $0,22\text{ }\mu\text{m}$ para o interior de frasco de vidro tipo vial que, em seguida, foi levado ao cromatógrafo (PAIVA et al., 2012).

A coluna cromatográfica utilizada foi uma C_{18} 150 x 4,6 mm, com $5\text{ }\mu\text{m}$ de tamanho de partícula (Allcrom Phenomenex). As soluções da fase móvel foram: tampão fosfato de potássio monobásico $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 2,0 (misturas equimolares de ácido fosfórico e fosfato de potássio monobásico) (pHmetro Mettler toledo®) e metanol. Ambas filtradas em filtros Millipore com $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro. O fluxo da fase móvel foi de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com injeções de $20\text{ }\mu\text{L}$ por análise para padrões e extratos.

A eluição ocorreu no modo isocrático, na proporção de 85:15 tampão fosfato de potássio:metanol (v/v) e com o tempo de corrida de 25 minutos. O comprimento de onda

de varredura foi na faixa de 200-400 nm e para avaliação do composto o comprimento de onda foi fixado em 280 nm (PAIVA et al., 2012).

2.2.5 Identificação e quantificação

A identificação dos picos foi realizada por similaridade espectral (recurso do equipamento que permite a comparação dos espectros de padrões e amostras), e por comparação dos tempos de retenção de padrões e amostras.

A quantificação foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva de calibração com 10 diferentes concentrações no intervalo de $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções utilizadas para traçar a curva de calibração foram preparadas individualmente por diluição das soluções estoque em acetato de amônio (8 mmol) a partir do padrão individual.

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração do analito que alcançou um sinal 10 vezes acima da linha de ruído (ICH, 1994), utilizando a equação 1: $LQ = (DP \times 10) / IC$. O limite de detecção (LD) foi definido como a menor concentração do analito que alcançar um sinal 3 vezes acima da linha de ruído (ICH, 1994), utilizando a equação 2: $LD = (DP \times 3) / IC$. DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo “y” de no mínimo três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva de calibração.

2.3 Preparo do material para determinação da atividade antioxidante

Para quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante total (ABTS) do disco de celulose, inicialmente foi obtido um extrato em triplicata. Para isso, 1g do disco de celulose foi pesado em um tubo falcon e 10 mL de metanol a 80% foi adicionado, sendo posteriormente agitado por 30 segundos em vórtex e subsequentemente deixado em repouso na ausência da luz por 24 horas. Após, filtrou-se a mistura e o extrato foi acondicionado em tubo falcon recoberto com papel alumínio para o prosseguimento das análises.

2.3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados seguindo o método descrito por Liu e colaboradores (2002) com modificações. Resumidamente, 250 μL (kombucha e do extrato do disco de celulose) foram misturados com 1250 μL do reagente Folin-Ciocalteu 10% em tubos de ensaio. As soluções foram agitadas e armazenadas em temperatura ambiente

(23 °C) na ausência da luz por 6 minutos. Logo após, foram adicionados 1000 µL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi levada ao banho maria (Novatecnica®, modelo NT232, Brasil) a uma temperatura de 50°C/5 min. Após, a absorvância foi medida a 765 nm utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics, Brasil).

Uma solução com a ausência da kombucha e do extrato do disco de celulose foi usada para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas de disco de celulose (mg EAG/100 g) e por litro de kombucha (mg EAG/L).

2.3.2 Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo o método descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), no qual 0,5 mL (líquido kombucha e do extrato de disco de celulose) foram adicionados a 2 mL de água destilada em tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se a mistura 150 µL de nitrito de sódio a 5%. Depois de 5 min, 150 µL de cloreto de alumínio a 10% também foram adicionados. Após 6 min, foram inseridos 1 mL de hidróxido de sódio a 1 M, e 1,2 mL de água destilada. A absorvância das amostras foi medida a 510 nm. Uma solução com ausência dos extratos foi preparada. O teor de flavonoides totais foi determinado por curva padrão de equivalentes de catequina e os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por cem gramas de disco de celulose (mg EC/100g) e por litro de líquido de kombucha (mg EC/L).

2.3.3 Determinação de carotenoides totais

Para determinação de carotenoides totais, utilizou-se a metodologia empregada por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Uma alíquota de 1 mL da kombucha foi pipetada em tubos de ensaio envoltos com papel alumínio. Adicionaram-se 10 mL de acetona em cada tubo e agitou-se por 30 segundos em agitador de tubos (modelo AP56, Phoenix Lufenco, Araraquara, São Paulo, Brasil). Posteriormente, filtrou-se em papel filtro qualitativo (40 Whatman®, 125mm). A amostra foi lida em espectrofotômetro (BEL Photonics) nos comprimentos de onda de 470 nm, 645 nm e 662 nm, contra o branco constituído de acetona. Os valores de carotenoides totais foram calculados utilizando as fórmulas abaixo e expressos em µg/100 mL de kombucha.

$$Ca_{(\mu\text{g}/\text{mL})} = 11,24A_{662} - 2,04A_{645}$$

$$C_b(\mu\text{g}/\text{mL}) = 20,13_{A645} - 4,19_{A662}$$

$$C(\mu\text{g}/\text{mL}) = (1000_{A470} - 1,90_{Ca} - 63,14_{Cb})214$$

2.3.4 Atividade antioxidante total por ABTS

A atividade antioxidante (líquido da kombucha e extrato disco de celulose) foi determinada pelo ensaio ABTS segundo a metodologia de Surveswaran e colaboradores (2007) com modificações. O reagente ABTS (7 mM) foi misturado com persulfato de potássio (140 mM) e incubado a temperatura de 25 °C, no escuro por 16 horas para formação do radical livre. Após, o radical foi diluído em água destilada até a absorbância de 0,800 ($\pm 0,020$) a 734 nm. Posteriormente 100 μL líquido da kombucha e extrato de disco de celulose foram adicionados a 500 μL do radical ABTS em ambiente escuro. Após isso, os tubos de ensaio foram mantidos na ausência de luz por 6 minutos e em seguida, realizou-se a leitura a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics, Brasil). Foi feita uma solução “controle” com uma alíquota de 100 μL do solvente extrator dos extratos adicionada de 500 μL do radical ABTS. O solvente extrator foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em μM trolox/g extrato de disco de celulose e μM trolox/mL de kombucha.

2.4 Caracterização Físico-Química

Para o teor de umidade e cinzas utilizaram-se os procedimentos descritos pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC) (AOAC, 2016). O teor de lipídeos foi determinado segundo metodologia de Folch, Less e Sloane-Stanley (1957). A análise de pH, atividade de água, sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$), acidez e açúcares totais foram realizadas conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2008) utilizando pHmetro (GEHAKA, modelo PG1800, São Paulo - SP, Brasil), Aqualab (DECAGON, modelo AQUALAB 4TE, USA), refratômetro portátil (LORBEN, São Paulo - SP, Brasil) e titulação com hidróxido de sódio.

2.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados através da ANOVA, após os testes de homogeneidade de variâncias (Bartlett's) e normalidade (Shapiro-Wilk). Os tratamentos que apresentaram diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) em relação à homogeneidade de variância foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o teste de Tukey a posteriori para a

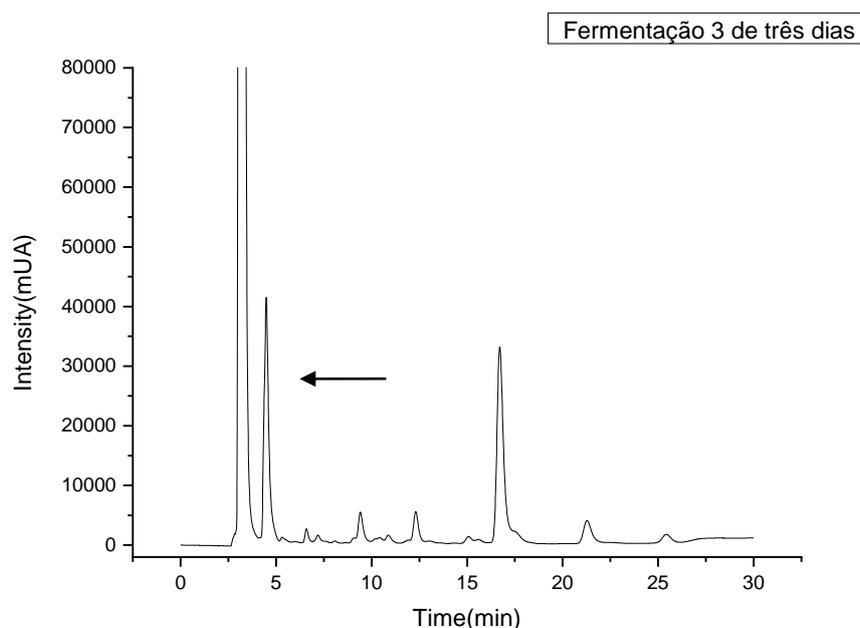
ANOVA paramétrica e Dunn a posteriori para o Kruskal-Wallis, para verificar diferenças entre as amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de 5-metiltetraidrofolato

Os cromatogramas (fig. 1 e 3) apresentam o perfil das substâncias separadas no líquido e disco de celulose (fig. 2 e 4) da kombucha. O segundo pico das análises é relativo ao 5-metiltetraidrofolato (4,48 min). Outros picos que aparecem na análise possuem similaridade acima de 80% com o nosso banco espectral para 5 formas de folatos, porém a indisponibilidade de padrão para análise comparativa não permitiu que houvesse confirmação das substâncias.

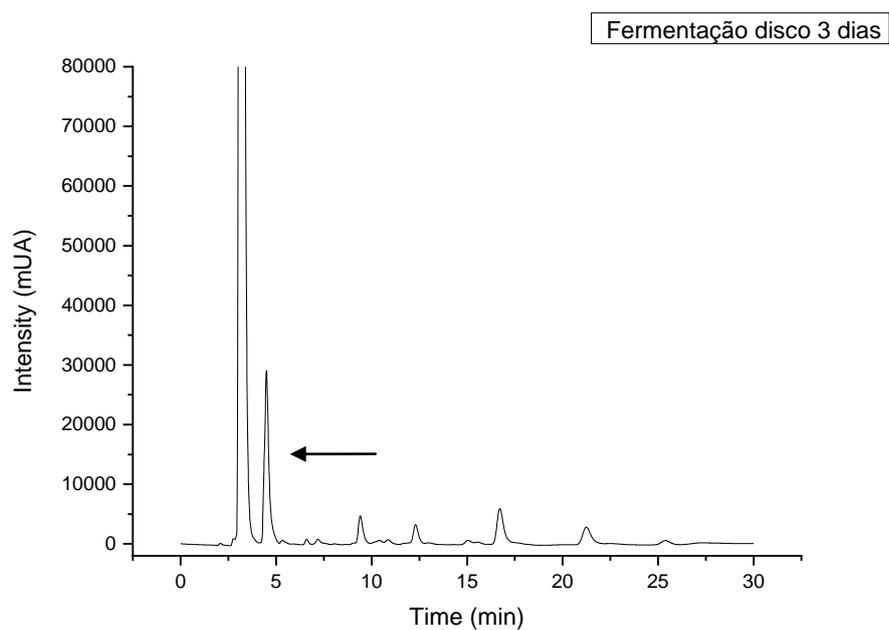
Figura 1 – Cromatograma do líquido da kombucha de chá verde fermentada por 3 dias.



Fonte: Autoria Própria.

Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 (150 x 4.6 mm) com 5 μm de tamanho de partícula (Allcrom Phenomenex), por eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 mol.L⁻¹ (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel (v/v) com injeções de 20 μL por análise, fluxo de 0.5 mL/min⁻¹ e detecção por UV por comprimento de onda em 280 nm.

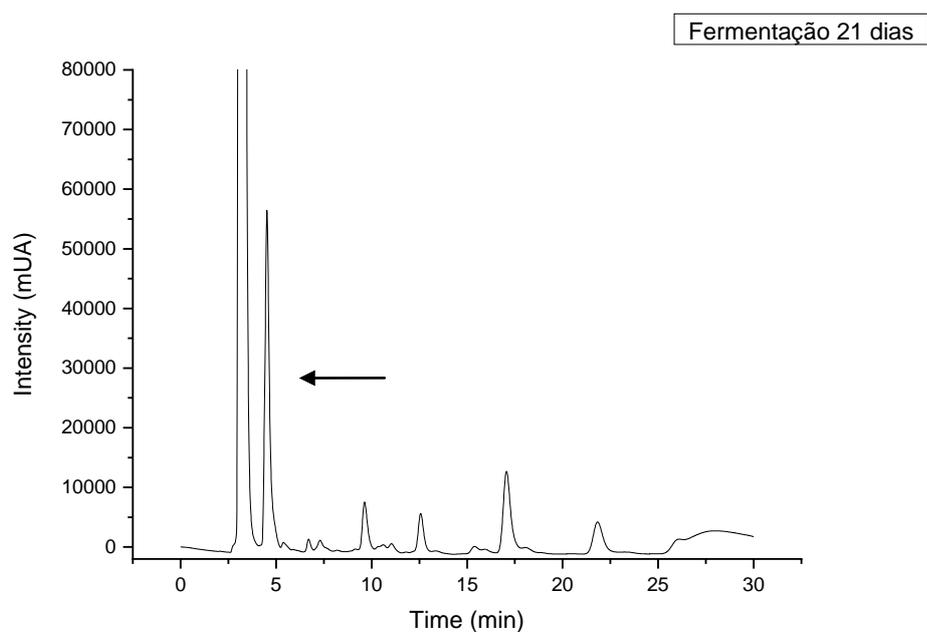
Figura 2 – Cromatograma do disco de celulose da kombucha de chá verde fermentada por 3 dias.



Fonte: Autoria Própria.

Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 (150 x 4.6 mm) com 5 μm de tamanho de partícula (Allcrom Phenomenex), por eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 mol.L⁻¹ (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel (v/v) com injeções de 20 μL por análise, fluxo de 0.5 mL/min⁻¹ e detecção por UV por comprimento de onda em 280 nm.

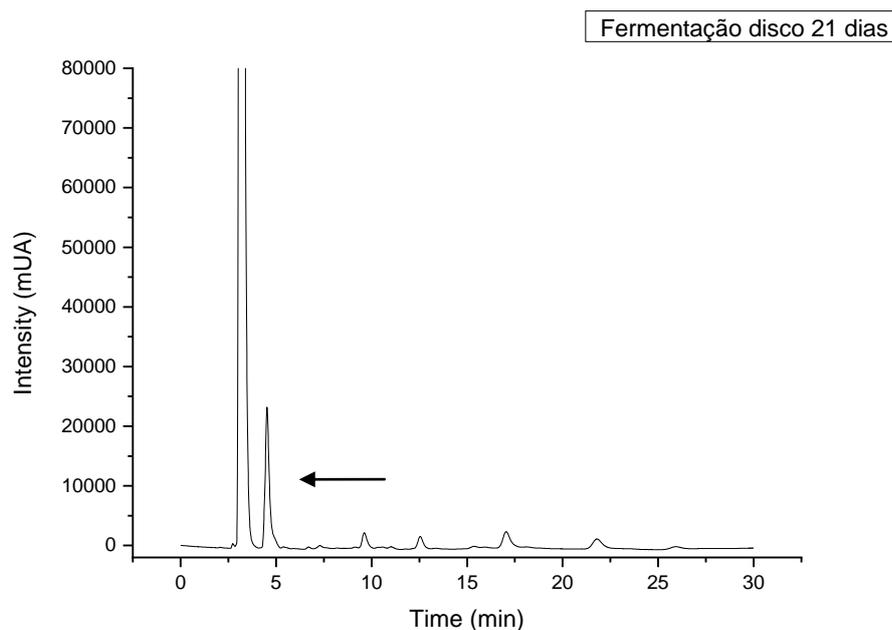
Figura 3 – Cromatograma do líquido da kombucha de chá verde fermentada por 21 dias.



Fonte: Autoria Própria.

Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 (150 x 4.6 mm) com 5 µm de tamanho de partícula (Allcrom Phenomenex), por eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 mol.L⁻¹ (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel (v/v) com injeções de 20 µL por análise, fluxo de 0.5 mL/min⁻¹ e detecção por UV por comprimento de onda em 280 nm

Figura 4 – Cromatograma do disco de celulose da kombucha de chá verde fermentada por 21 dias.



Fonte: Autoria Própria.

Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 (150 x 4.6 mm) com 5 µm de tamanho de partícula (Allcrom Phenomenex), por eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 mol.L⁻¹ (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel (v/v) com injeções de 20 µL por análise, fluxo de 0.5 mL/min⁻¹ e detecção por UV por comprimento de onda em 280 nm.

No tempo de retenção de 4,48 minutos a similaridade espectral foi de 99% para o padrão de 5-metiltetrahidrofolato durante o desenvolvimento do método. Para os cromatogramas referentes ao líquido e ao disco de celulose na kombucha o tempo de retenção para o 5-metiltetrahidrofolato foi de 4,51 minutos.

A tabela a seguir é referente aos parâmetros de análise quantitativa e qualitativa dos teores de 5-metiltetrahidrofolato em kombucha de chá verde fermentada nos dias 3 e 21 no disco de celulose.

Tabela 1 – Teor de 5-metiltetrahidrofolato no líquido e disco de celulose de kombucha nos dias de fermentação 3 e 21 e parâmetros do método analítico.

Concentração de 5-metiltetrahidrofolato ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
3 dias caldo	$39,12 \pm 1,32 \mu\text{g}/\text{mL}$
3 dias disco de celulose	$45,78 \pm 8,42 \mu\text{g}/\text{mL}$
21 dias caldo	$50,87 \pm 3,56 \mu\text{g}/\text{mL}$
21 dias disco de celulose	$54,88 \pm 3,89 \mu\text{g}/\text{mL}$
Limite de detecção (LD)	$18,16 \mu\text{g}/\text{mL}$
Limite de quantificação (LQ)	$55,03 \mu\text{g}/\text{mL}$
Coefficiente Linear (R)	0,9942
Curva de calibração	$Y = 19772x + 50416$

No presente estudo foi verificado que a concentração de 5-metiltetrahidrofolato no terceiro dia de fermentação do líquido e disco de celulose foi de $39,12 \pm 1,32 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $45,78 \pm 8,42 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. É perceptível que o teor de 5-metiltetrahidrofolato aumentou no período de fermentação.

O líquido da kombucha apresentou $50,87 \pm 3,56 \mu\text{g}/\text{mL}$ e o disco de celulose $54,88 \pm 3,89 \mu\text{g}/\text{mL}$ no vigésimo primeiro dia da fermentação como pode ser visto na tabela 1. No último dia de fermentação, o líquido apresentou aumento de 30,03% de teor de folatos em relação ao terceiro dia de fermentação e o disco de celulose teve um aumento de 19,8%.

O metabolismo dos folatos no corpo humano tem grande importância na síntese de ácidos nucleicos, regeneração de metionina, prevenção de doenças cardiovasculares e defeitos neurológicos em fetos, entre outras funções conhecidas. Folatos dietéticos existem primariamente na forma de poliglutamato, mas estes não passam pela membrana celular devido ao tamanho da molécula. O poliglutamato é então hidrolisado no intestino delgado podendo então ser absorvido e transformado nas suas formas ativas (folil-poliglutamatos, tetraidrofolatos, H₂-folatos) para utilização nos processos metabólicos. Nessa perspectiva, os benefícios obtidos a partir do consumo da kombucha se mostram proveitosos uma vez

que a mesma oferece a substância na forma normalmente encontrada no nosso organismo, em seu estado mais biodisponível e bioativo (DIAS et al., 2016).

A *Food and Nutrition Board* (1998) recomendam consumo de cerca de 400 microgramas diários de ácido fólico (especialmente mulheres grávidas). Isso previne problemas cardiovasculares, anemia e defeitos do tubo neural de bebês. Até então, não há evidências científicas comprovando que chá fermentado de kombucha possui folatos, menos ainda evidências que o seu teor tem um aumento com o passar da fermentação (DIAS et al., 2016).

Os resultados do estudo atual mostram que, em 200 mL de kombucha, pode ser encontrada uma média de 7.824 µg e 10.174 µg de 5-metiltetraidrofolato para os dias de fermentação 3 e 21 respectivamente, valores estes que superam a necessidade diária de consumo de vitamina B9.

A informação sobre a presença de vitamina B9 em kombucha é sem precedentes e, em relação ao estudo de 5-metiltetraidrofolato em kombucha, os achados do presente estudo são inéditos. A relevância agora dada à bebida fermentada é outra, uma vez que a partir deste momento a mesma pode ser considerada fonte de folatos e não só introduzida na alimentação diária, mas estudada nas suas formas de preparo.

3.2 Fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides totais

A tabela 2 apresenta a concentração aos compostos bioativos (compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides) analisados no líquido da kombucha de chá verde nos dias de fermentação 1, 3, 7, 14 e 21 e no disco de celulose no 21º dia de fermentação.

Tabela 2: Teor de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides totais em líquido de kombucha fermentadas nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 e dia 21º no disco de celulose.

Análise	Tempo de Fermentação (dias)					SCOPY
	1	3	7	14	21	
Fenólicos						
Totais	1,05 ± 0 ^a	1,08 ± 0 ^a	1,24 ± 0 ^{ac}	1,86 ± 0,02 ^{bc}	1,94 ± 0,02 ^{bc}	0,09 ± 0
mg EAG/mL						
Flavonoides						
Totais	0,07 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^{ab}	0,07 ± 0 ^{ab}	0,07 ± 0 ^{ab}	0,06 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0
mg EC/mL						
Carotenoides						
Totais	53,80 ± 0,36 ^a	46,26 ± 3,12 ^a	40,93 ± 0,89 ^{ac}	26,61 ± 0,69 ^{bc}	24,69 ± 0,69 ^{bc}	ND
µg/100 mL						

EAG = Equivalente de ácido gálico. EC = Equivalente de catequina. ND = Não detectado.

O teor de compostos fenólicos totais encontrados no presente estudo foi próximo ao encontrado por Cardoso e colaboradores (2020) para chá preto, 1,09 mg GAE/mL. Primordialmente, o chá preto costuma possuir um teor mais elevado de polifenóis quando comparado ao chá verde e isso se dá pelo processamento das folhas da *Camellia sinensis*. Na produção de chá preto, as folhas são sujeitas ao processamento que estimula a atividade de polifenoloxidasas, alterando não só a coloração do produto, mas oxidando catequinas, levando à formação de teaflavinas e tearubiginas, fenólicos predominantes no chá preto (CARDOSO et al., 2020).

Contudo, a metodologia usada na formulação (adição de 20% de kombucha + SCOBY adicionados ao meio de cultura), valor superior ao estudo de Cardoso e colaboradores (13%), e forneceu um número maior de colônias viáveis de microrganismos, favorecendo a atividade de microrganismos no meio de cultura, especialmente de leveduras produtoras de enzimas responsáveis pela transformação de polímeros de polifenóis em suas formas mais livres, aumentando inclusive a sua disponibilidade. Isso possivelmente explica o aumento na produção de compostos fenólicos verificados. De modo geral, o teor de fenóis totais no presente estudo apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) com os tempos de 1 a 7 dias apresentando valores significativamente menores que os dias 14 e 21 (Dunn, $p < 0,01$). Em outros termos, quanto maior o tempo de fermentação, maior o teor de compostos fenólicos presentes no fermentado.

Os valores encontrados para flavonoides totais apresentaram diferença significativa apenas entre os tempos 1 e 21 de fermentação ($p = 0,003$) como visto na Tabela 2. Os valores encontrados são superiores aos encontrados anteriormente em kombucha de chá com flor de milefólio por Vitas e colaboradores (2018) e pelo estudo de kombucha com cogumelo feito por Sknepnek e colaboradores (2020). Não obstante, nos estudos anteriores e no atual, foi concluído que houve perda de flavonoides com a continuação da fermentação. A planta em seu estado natural e integral possui um quantitativo maior de flavonoides e essa diminuição sugere que houve perda com a fermentação, sendo a maior perda no último dia de fermentação (VITAS et al., 2018).

Leveduras são conhecidas pela produção de compostos bioativos e alguns destes são os carotenoides. Estudos como os citados por Sinir e colaboradores (2019), indicam a existência de carotenoides em produtos como kombucha, bem como Rai e colaboradores (2019), cita os carotenoides como sendo parte dos metabólitos produzidos pela

fermentação de leveduras. No presente estudo, houve diferença significativa ($p < 0,0001$), no teor de carotenoides encontrado nos diferentes tempos de fermentação (Tabela 2). Os tempos 1 a 7 dias de fermentação foram significativamente maiores que os tempos de 14 e 21, porém o teor de carotenoides do dia de fermentação 7 não foi significativamente diferente de nenhum outro tratamento (Dunn, $p < 0,01$). Assim como nos flavonoides, também é perceptível a queda no conteúdo de carotenoides com a continuação da fermentação até o último dia. Isso é explicado pela baixa do pH causado pela fermentação, bem como a presença de ácidos orgânicos que favorecem a degradação dos carotenoides (SINIR et al., 2019).

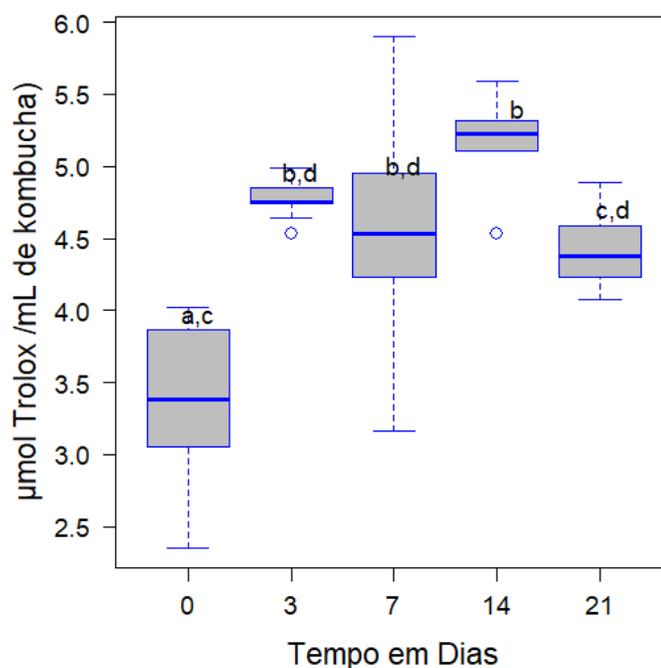
De acordo com Amâncio (2012), o consumo de carotenoides do brasileiro médio se encontra abaixo dos valores recomendados para ter saúde, sendo 4.117 microgramas, quando deveria ser por volta de 9.000 a 18.000 microgramas por dia. A correção desse déficit de carotenoides pode ser realizada pelo consumo de vegetais de fácil acesso para a maioria dos brasileiros como cenoura, manga, tomate (principalmente coccionado) e complementada pelo consumo diário de doses de kombucha (Tabela 2), podendo ser subsequentemente fermentadas com extratos vegetais que agreguem mais carotenoides à bebida. O estudo atual mostra que o consumo de 200 mL de kombucha fermentada por 7 dias fornece 8.186 μg de carotenoides totais, valor que auxilia a atingir a necessidade de consumo diário.

3.3 Antioxidantes

O estudo obteve valores significativos de potencial antioxidante na bebida avaliada (Figura 5) que aumentou à medida que a fermentação continuou até o dia 14. No dia 21 foi vista uma queda deste parâmetro. Além da capacidade antioxidante ser afetada pela temperatura e tempo de fermentação, o pH tem influência na degradação de alguns compostos antioxidantes como os carotenoides, possível razão para explicar a queda da atividade antioxidante (CARDOSO et al., 2020).

A atividade antioxidante do chá de kombucha fermentado aumenta à medida que o tempo da fermentação avança uma vez que é também evidenciado um aumento de compostos fenólicos e flavonoides – antioxidantes. A propriedade antioxidante da kombucha também está atrelada a outros compostos sintetizados na bebida tais quais ácidos orgânicos como o ácido glucurônico e ácido ascórbico (MALBASA et al., 2011; CABRAL et al., 2017).

Figura 5 – Valores de atividade antioxidante avaliada por radical ABTS por dia de fermentação



Letras iguais indicam não haver diferenças significativas ($p < 0,0095$) entre os tempos de fermentação estudados.

3.4 Análises físico-químicas

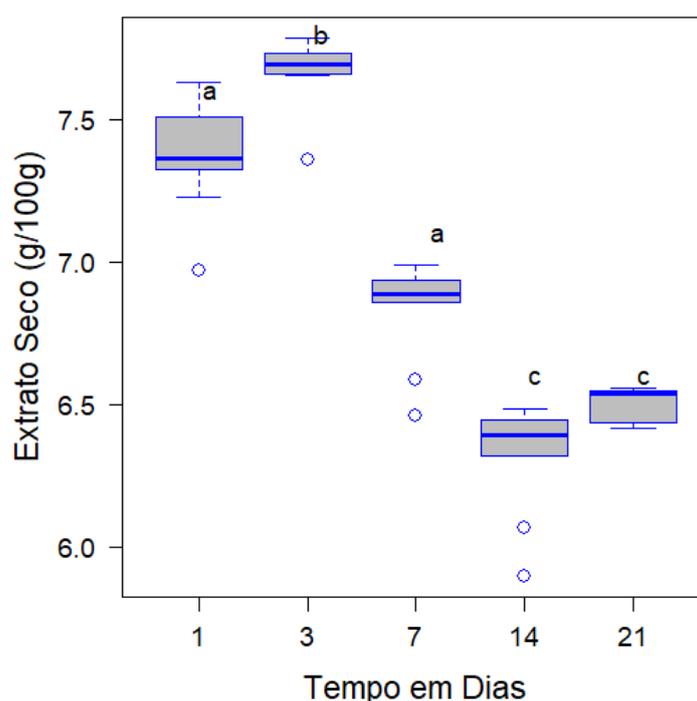
Foram encontrados valores de pH que reduziram com a prolongação dos dias de fermentação (1, 3, 7, 14 e 21) $3,34 \pm 0,00$ (1), $3,07 \pm 0,01$ (3), $3,07 \pm 0,00$ (7) e $2,97 \pm 0,08$ (14), $2,06 \pm 0,10$ (21)., valor similar ao de Villarreal-Soto e colaboradores (2019) com média estável de pH de 2,7 em 15 dias de fermentação. Assim como o estudo atual, Xia e colaboradores (2019) e Villarreal-Soto e colaboradores analisaram kombucha de chá verde e preto e verificaram a redução do pH e o aumento na acidez titulável da kombucha com o aumento do tempo de fermentação.

O maior tempo de fermentação da kombucha tem impacto direto com o aumento da atividade dos microrganismos lácticos e acéticos, consumo de substrato para produzir energia e consequente produção de metabólicos secundários. Parte desses metabólicos é composta por ácidos orgânicos como ácido lático, ácido glucurônico e principalmente

ácido acético. A produção destes ácidos no meio torna o pH da bebida mais baixo e, a depender do valor encontrado, aumenta a segurança microbiológica da bebida (CARDOSO et al., 2020).

Outros parâmetros de caracterização da kombucha mantiveram-se estáveis durante todo o processo de fermentação como A_w $0,99 \pm 0,00$ e $0,99 \pm 0,01$ para o líquido e disco de celulose respectivamente e valores de umidade com média do líquido e SCOBY de $93,06\% \pm 0,57$ e $92,33 \pm 0,59$ respectivamente durante todo o processo fermentativo.

Figura 6 – Valores de extrato seco por dia de fermentação.



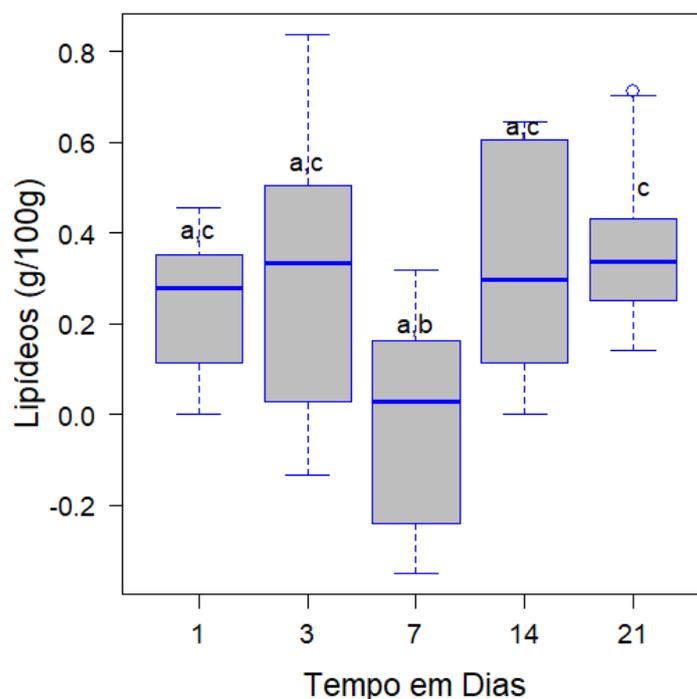
Letras iguais indicam não haver diferenças significativas ($p < 0,0095$) entre os tempos de fermentação estudados.

O extrato seco aumentou significativamente do dia um para o dia três, depois diminuiu significativamente novamente até os dias 14 e 21, que não foram diferentes entre si.

Os teores de cinzas permaneceram abaixo de 0,1% durante todos os tempos de fermentação, com uma média de $0,03\% \pm 0,02$ no líquido e $0,02\% \pm 0,01$ no SCOBY. A

acidez titulável apresentou um aumento ao longo da continuação da fermentação. No presente estudo, a acidez titulável foi de $0,27 \pm 0,00$ para $0,35 \pm 0,01$; $0,46 \pm 0,02$; $0,82 \pm 0,12$ e $1,17 \pm 0,17$ nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 respectivamente e $1,38 \pm 0,01$ para o disco de celulose. Valores dentro dos conformes quando há um aumento dos ácidos orgânicos sintetizados pelos microrganismos.

Figura 7 – Valores de lipídios por dia de fermentação.

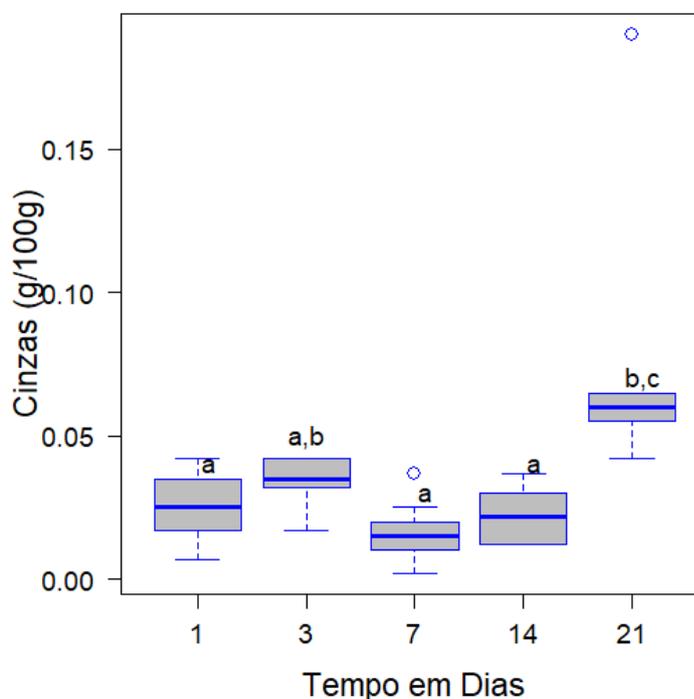


Letras iguais indicam não haver diferenças significativas ($p < 0,0095$) entre os tempos de fermentação estudados.

Os lipídios não apresentaram muita variação ao longo do tempo. Apenas o dia 7 apresentou concentração de lipídios significativamente menor que o dia 21 ($p < 0,001$).

A análise de lipídios apresentou uma porcentagem média geral de $0,3\% \pm 0,12$ de lipídios no líquido da kombucha e $0,6\% \pm 0,19$ no disco de celulose da mesma (XIA et al. 2019, AHMED et al., 2020; CARDOSO et al., 2020).

Figura 8 – Valores de cinzas por dia de fermentação.



Letras iguais indicam não haver diferenças significativas ($p < 0,0095$) entre os tempos de fermentação estudados.

De modo geral, a quantidade de cinzas foi significativamente maior no dia 21 em relação aos dias 1, 7 e 14.

4. CONCLUSÃO

Os dados encontrados no presente estudo são inéditos, sem precedentes e de extrema relevância para diretrizes de nutrição humana e para o entendimento da melhor forma de consumo da kombucha. A kombucha de chá verde fermentado se mostrou uma fonte promissora de 5-metiltetrahidrofolato, uma vez que a vitamina foi encontrada em quantidades significativas na bebida e o teor da mesma aumentou durante a fermentação. Enquanto isso, o teor de compostos fenólicos aumentou nos dias 14 e 21, e foi perceptível uma diminuição dos flavonoides no dia 21 e de carotenoides nos dias 14 e 21. A fermentação prolongada levou à diminuição do teor de alguns compostos bioativos, bem como leva ao aumento de ácidos orgânicos como o acético que comprometem a aceitação

do sabor por consumidores. Os valores encontrados no presente estudo sugerem que o tempo de fermentação ideal para obtenção dos benefícios nutricionais é a partir de 7 dias até 14 dias. Também deve ser levada em consideração a clivagem dos folatos na presença de oxidantes e redutores. Desta forma, a partir do consumo da kombucha sem adição de outros ingredientes, as pessoas podem se beneficiar dos teores de 5-metiltetraidrofolato e compostos bioativos da bebida, mantendo ainda a qualidade sensorial e segurança de consumo em relação à acidez da bebida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, R. F.; HIKAL, M. S.; ABOU-TALEB, K. A. *Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha*. Annals of Agricultural Sciences, 2020.
- AL-RAWAF, H. A.; ALGHADIR, A. H.; GABR, S. A. *Circulating microRNAs expression as predictors of clinical response in rheumatoid patients treated with green tea*. Herbal Medicine, 2020.
- AMANCIO, R. D.; *Consumo de Carotenoides no Brasil: a contribuição da alimentação for a do domicílio*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 116, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists*. 20.ed. Gaithersburg: Maryland, 2016.
- CABRAL, B. D. V.; PÉREZ, M. L.; INFANTE, J. A. G.; JIMÉNEZ, M. R. M.; LAREDO, R. F. G.; QUIÑONES, J. G. R.; GÓMEZ, C. I. G.; GUZMÁN, N. E. R. *Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes*. Chemico-Biological Interactions, 272, p. 1 – 9, 2017.
- CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; D'ALMEIDA, T. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D.; CAMERON, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; BARROS, F. A. R. *Kombuchas from green and black teas have*

different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. Food Research International, vol. 128, 2020.

DIAS, M. I.; MORALES, P.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; FERREIRA, I. C. F. R. *Minerals and vitamin B₉ in dried plants vs. infusions: Assessing absorption dynamics of minerals by membrane dialysis tandem in vitro digestion.* Food Bioscience, p. 9-14, 2016.

FOLCH, J., LESS, M., SLOANE-STANLEY, G. H. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.* Journal of Biological Chemistry, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

HYUN, J.; LEE, Y.; WANG, S.; KIM, J.; KIM, J.; CHA, J.; SEO, Y.; JUNG, Y. *Kombucha Tea Prevents Obese mice from Developing Hepatic Steatosis and Liver Damage.* Food Science and Biotechnology, vol . 25, 861 – 866, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.* 4.ed. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2008. 320 p.

LICHTENTHALER, H. K., BUSCHMANN, C. *Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy.* Current protocols in food analytical chemistry, v. 1, p. F4-3, 2001.

LIU, M.; LI, X. Q.; WEBER, C.; LEE, C. Y.; BROWN, J.; LIU, R. H. *Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries.* J. Agric. Food Chem. v. 50, 2926–2930, 2002.

LIU, Y.; ZHAO, G.; SHEN, Q.; WU, Q.; ZHUANG, J.; ZHANG, X.; XIA, E.; ZHANG, Z.; QIAN, Y.; GAO, L.; XIA, T. *Comparative analysis of phenolic compound metabolism among tea plants in the section Thea of the genus Camellia.* Food Research International, 2020.

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

PITKIN, R. M. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Briefing Público, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 1998.

PLESSAS, S.; NOUSKA, C.; MANTZOURANI, I.; KOURKOUTAS, Y.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E. *Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains*. Fermentation, v. 3, 2017.

RAI, A. K.; PANDEY, A.; SAHOO, D. *Biotechnological potential of yeasts in functional food industry*. Trends in Food Science and Technology, vol. 83, 129 – 137, 2019.

RIZZON, L. A. *Metodologia para análise de vinho*. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, 2010.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. *Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms*. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 132, 166 – 177, 2019.

SINIR, G. O.; TAMER, C. E.; SUNA, S. *10 – Kombucha Tea: A Promising Fermented Functional Beverage*. Fermented Beverages, vol. 5, 401 – 432, 2019.

SKNEPNEK, A.; TOMIC, S.; MILETIC, D.; LEVIC, S.; COLIC, M.; NEDOVIC, V.; NIKSIC, M. *Fermentation characteristics of novel Coriolous versicolor and Lentinus edodes kombucha beverages and immunomodulatory potential of their polysaccharide extracts*. Food Chemistry, 128344, 2020.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. *Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants*. Food Chemistry, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TROITINO, C. *Kombucha 101: Demystifying The Past, Present and Future of Fermented Tea Drink*. Forbes, 2017. Disponível em: <
<https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-past-present-and-future-of-the-fermented-tea-drink/#5709ec944ae2>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

VITAS, J. S.; CVETANOVIC, A. D.; MASKOVIC, P. Z.; SVARC-GAJIC, J. V.; MALBASA, R. V. *Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverage with yarrow*. *Journal of Functional Foods*, vol. 44, 95 – 102, 2018.

XIA, X.; DAI, Y.; WU, H.; LIU, X.; WANG, Y.; YIN, L. WANG, Z.; LI, X.; ZHOU, J. *Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage*. *Journal of Functional Foods*, vol. 62, 2019.

ZENG, L.; ZHOU, Y.; FU, X.; MEI, X.; CHENG, S.; GUI, J.; DONG, F.; TANG, J.; MA, S.; YANG, Z. *Does oolong tea (Camellia sinensis) made from a combination of leaf and stem smell more aromatic than leaf-only tea? Contribution of the stem to oolong tea aroma*. *Food Chemistry*, vol. 237, 488 – 498, 2017.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. *Food Chemistry*. v. 64, n. 4, p. 555 – 559, 1999.