



Universidade
Estadual de Goiás

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

ESTHER PEREIRA VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, DE TOXICIDADE E
ANTITUMORAL DA KOMBUCHA DE CHÁ PRETO**

Anápolis

2022



Universidade
Estadual de Goiás

ESTHER PEREIRA VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA E
ANTITUMORAL DA KOMBUCHA DE CHÁ PRETO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Eliete Souza Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Plínio L. Faleiros Neves

Anápolis

2022

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pa	Pereira Vieira, Esther Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antitumoral da kombucha de chá preto / Esther Pereira Vieira; orientador Eliete Souza Santana ; co-orientador Plínio Lázaro Faleiros neves. -- , 2023. 73 p. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual de Goiás, 2023. 1. Kombucha. 2. Antibacteriano. 3. Citotoxicidade. 4. Antitumoral. 5. Chá . I. Souza Santana , Eliete, orient. II. Lázaro Faleiros neves, Plínio , co-orient. III. Título.
----	--

SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE
SANTILLO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N°
060

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO - No dia vinte e dois de novembro de 2022, às 13h 30 min, reuniram-se os componentes da banca Examinadora: Profa. Dra. Eliete Souza Santana – Orientadora, Profa. Dra. Ana Caroline de Souza Barnabé e Profa. Dra. Luciana Damacena Silva, sob a presidência da primeira, e em sessão realizada por videoconferência. Procederam à avaliação da defesa de dissertação de Mestrado intitulada: **“Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antitumoral da kombucha de chá preto”** de autoria de Esther Pereira Vieira, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora: Profa. Dra. Eliete Souza Santana que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação **Esther Pereira Vieira** que, em 32 minutos procedeu à apresentação do trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. A dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE, na área de concentração “Pesquisa e Obtenção de Produtos para Saúde”, na linha de pesquisa- “Monitoramento de Produtos para a Saúde” pela Universidade Estadual de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCAPS, da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 10 minutos, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de Mestrado e para constar eu, Profa. Dra. Eliete Souza Santana, presidente da banca, lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

Ana Caroline de Souza Barnabé

Profa. Dra. Ana Caroline de Souza Barnabé
Membro interno - UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Damacena Silva
Membro externo - UEG

Eliete Souza Santana

Profa. Dra. Eliete Souza Santana
Presidente da Banca

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Aluno: Esther Pereira Vieira

Orientadora: Eliete Souza Santana

Co-Orientador: Plínio Lázaro Faleiros Neves

Membros:

1. Prof^a. Dra. Eliete Souza Santana

2. Prof^a. Dra. Ana Caroline de Souza Barnabé (membro externo) - Unicamp

3. Prof^a. Dra. Luciana Damacena Silva (membro interno) - CAPS/UEG

OU

4. Prof. Dra. Valéria de Sá Jayme (membro externo) - UFG

5. Profa. Dr. Flávio Monteiro Ayres (membro interno) - CAPS/UEG

Data: 22/11/2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me sustentar e dar forças nos momentos difíceis, ao meu marido que foi meu incentivador e apoio, aos meus pais por acreditarem no poder do conhecimento e acreditarem que com dedicação, conseguiria concluir essa etapa. Com um carinho todo especial, agradeço a minha orientadora Eliete Santana, que foi sempre um alicerce de sabedoria, não medindo esforços para que eu concluísse esse trabalho, não só com o seu conhecimento científico, mas com palavras de alento e ânimo, um presente de Deus no meu caminho. Aos meus colegas de caminhada Osvaldo Pinto e Kamilla Cecílio, Hallyson Kim Lee, Shirley dos Santos Alves Ferreira e Cássia Rodrigues Arruda. E a todos os educadores que estiveram no meu caminho, deixando um pedacinho de conhecimento, sem cada um de vocês, não seria possível chegar até aqui.

Sumário

INTRODUÇÃO	18
1.1 TRATO GASTROINTESTINAL.....	21
1.2 PROBIÓTICOS.....	25
1.3 KOMBUCHA.....	29
1.4 BENEFÍCIOS DA KOMBUCHA.....	31
2 OBJETIVOS	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA.....	45
3.2 ANÁLISE DE PH.....	46
3.3 ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO DA KOMBUCHA.....	46
3.4 ENSAIO DE TOXIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA LEACH</i>	47
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA KOMBUCHA.....	48
3.6 TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	50
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 ANÁLISE DO PH.....	54
4.2 ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO.....	54
4.3 TOXICIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA LEACH</i>	56
4.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA.....	59
4.5 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA.....	61
4.6 BIOENSAIO ANTITUMORAL EM DISCOS DE BATATA.....	62
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

TABELAS

TABELA 1-	Funcionamento do Sistema simbiótico no chá kombucha.....	30
TABELA 2-	Teste de ANOVA, para análise de toxicidade da kombucha em <i>Artemia salina</i>	57
TABELA 3-	Concentração Letal (CL ₅₀) da kombucha.....	57
TABELA 4-	Concentração mínima inibitória (µg.ml ⁻¹) dos compostos contra os quatro microrganismos avaliados.....	60

FIGURAS

FIGURA 1	Trato gastrointestinal humano.....	22
FIGURA 2	Filtro de Celulose.....	45
FIGURA 3	Demonstração da leitura do teor alcóolico.....	47
FIGURA 4	Avaliação do teor alcóolico da kombucha utilizando o alcoômetro centesimal.....	47
FIGURA 5	Teste de Concentração Inibitória Mínima, placa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 29213).....	50
FIGURA 6	Batatas adquiridas em um mercado local, limpas e desinfetadas.....	51
FIGURA 7	Discos de batata de aproximadamente 5 mm de espessura, inoculados com <i>Rhizobium radiobacter</i> e com a kombucha.....	52
FIGURA 8	Discos de batata corado com solução de lugol 0,5% para contagens de tumores.....	53
FIGURA 9	Determinação da Concentração Letal 50.....	58
FIGURA 10	Determinação do CMB da kombucha frente ao <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
FIGURA 11	Resultados do teste variância (ANOVA) do teste antitumoral em discos de batata.....	63
FIGURA 12	Resultados do bioensaio de kombucha em discos de batata...	64

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

OMS	- Organização Mundial da Saúde
DSL	- Ácido D-Sacárico-1 4-Lactona
TBHP	- Hidroperóxido de Terc-butil
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
CMI	- Concentração mínima inibitória
pH	- Potencial hidrogeniônico
TBARS	- Substâncias relativas ao ácido tiobarbitúrico
SCOBY	- Cultura simbiótica de bactérias e leveduras
EUA	- Estados Unidos da América
BAL	- Bactérias ácido Lácticas
CO2	- Dióxido de Carbono
HMO	- Oligossacarídeos do leite humano
AST	- Asparto amino transferase
ALT	- Alanina aminotransferase
GGT	- γ -glutamil transpeptidase
SOD	- Superóxido dismutase
CCET	- Campus Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG
UEG	- Universidade Estadual de Goiás
CAT	- Catalase
ALX	- Aloxana
STZ	- Estreptozotocina
KEAF	- Fração de kombucha de acetato de etila
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
DPPH	- Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DMSO	- Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
CL₅₀	- Concentração letal 50%
CLSI	- Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
ATCC	- Coleção de Cultura de Tipo Americano

TSB	- Caldo Triptona soja - meio de cultura microbiológico
MH	- Mulher Hinton - meio de cultura microbiológico
UFC	- Unidade formadora de colônias
TSA	- Ágar Triptona de soja
ANOVA	- Análise de variância
®	- Marca registrada
μ	- Micro – um milionésimo representado 10 ⁻⁶
Nm	- Nanômetro
μg	- Micrograma
μL	- Microlitro
mL	- Mililitro
Mg	- Miligrama
p/v	- Peso volume
Mm	- Milímetro
Cm	- Centímetro
Min	- Minuto

Kombucha é uma bebida refrescante probiótica fermentada, com sabor agridoce, sua fermentação acontece a partir de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras. Foi realizado um estudo com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana e antitumoral da bebida kombucha, sendo analisados também o teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, análises de pH e do teor alcoólico. A determinação da atividade antimicrobiana da kombucha foi realizada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme o protocolo recomendado pela Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) onde observou-se ação antimicrobiana favorável para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, na concentração de 60 µg.mL⁻¹ foi verificado que nessa concentração a kombucha possui ação bacteriostática, mas não bactericida. No bioensaio antitumoral a kombucha apresentou uma inibição máxima de 79,36% na concentração de 1.500µL. O pH da kombucha apresentou valores de 6,7 e 3,2 para os dias 1 e 21 de fermentação, respectivamente, valores considerados ideais para garantir um sabor agradável. O valor do teor alcoólico encontrado foi 0,0% v/v, o que se enquadra no preconizado pela legislação brasileira, considerando as precauções de saúde e segurança associadas a ingestão de bebidas alcoólicas. Conclui-se, que a bebida kombucha possui ações antimicrobiana e antitumoral, mas que precisam ser melhor elucidadas em prol da nossa saúde.

Palavras-chave: Bebida fermentada; Probióticos; Saúde.

Kombucha is a fermented probiotic refreshing drink, with a bittersweet flavor, its fermentation takes place from a symbiotic culture of bacteria and yeast. A study was carried out to evaluate the antimicrobial and antitumor activity of the kombucha drink, also analyzing the toxicity test against the microcrustacean *Artemia salina*, pH analysis and alcohol content. The determination of the antimicrobial activity of kombucha was carried out by the microdilution test in broth, according to the protocol recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), where a favorable antimicrobial action was observed for the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, at a concentration of 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ it was verified that at this concentration kombucha has a bacteriostatic action, but not a bactericidal one. In the antitumor bioassay, kombucha showed a maximum inhibition of 79.36% at a concentration of 1,500 μL . The pH of kombucha showed values of 6.7 and 3.2 for days 1 and 21 of fermentation, respectively, values considered ideal to ensure a pleasant taste. The alcohol content value found was 0.0% v/v, which is in line with what is recommended by brazilian legislation, considering the health and safety precautions associated with the ingestion of alcoholic beverages. It is concluded that the kombucha drink has antimicrobial and antitumor actions, but that need to be better elucidated in favor of our health.

Keywords: Fermented beverage; Probiotics; Health.

INTRODUÇÃO

O corpo humano é um sistema complexo e cada célula ou órgãos presentes nesse sistema, representa uma função importante no funcionamento do organismo. O trato gastrointestinal é um dos sistemas fundamentais do corpo humano. Os Órgãos como a boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, reto, ânus em conjunto com estruturas anexas como glândulas salivares, o fígado, vesícula biliar e pâncreas fazem que o processo digestório aconteça e possui como função primária, encaminhar nutrientes, água e eletrólitos ao corpo humano (BRITO; FERRAZ, 2019).

O intestino possui uma relação específica com a microbiota intestinal. Uma variedade de microrganismos atua no intestino humano, esses microrganismos são únicos em cada indivíduo, devido ao trato gastrointestinal e tudo que rodeia, como por exemplo: o ambiente, dieta, patogenias, fatores genéticos de cada pessoa. Portanto, cada microbiota intestinal é única e específica daquele ser humano (BRITO; FERRAZ, 2019).

A microbiota intestinal é um complexo sistema que possui um desenvolvimento e funcionamento muito particular, consideram que um intestino adulto possui entre 400 e 1.000 espécies diferentes de microrganismos, onde 60% dessas não são cultiváveis em ambientes externos ao organismo humano, ou seja, são exclusivas da microbiota humana. Essa diversidade da microbiota pode ser explicada pela variedade da dieta que a pessoa realiza. Entende-se por dieta, não o que comumente ouve-se falar sobre restrições alimentares e estilos de vida, mas de uma forma mais geral, como tudo que é ingerido por uma pessoa (BEDANI; ROSSI, 2009).

Esses microrganismos apresentam importância na saúde continuada devido a dependência humana da absorção de vitaminas e de outros

nutrientes do metabolismo bacteriano. Portanto, a relação entre a nossa microbiota (as bactérias que habitam nossos corpos) e a nossa saúde tornou-se um tema de pesquisa nos últimos anos (BEDANI; ROSSI, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define bactérias probióticas como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/OMS, 2001).

Segundo Matos (2010) o conceito de probiótico também pode ser definido como o uso de exclusão competitiva para melhorar uma ecologia específica. A terapia ou prevenção com probióticos introduz um tipo de bactéria benéfica em detrimento à diminuição de outra espécie de bactéria. Os probióticos concorrem pelos nutrientes e pela adesão ao epitélio intestinal, articulando a microbiota intestinal no sentido de diminuir as bactérias patogênicas e suas toxinas (BEDANI; ROSSI; 2009).

A união, ao promover a resistência ao trânsito intestinal e a interação duradoura com o epitélio, conserva a atividade metabólica e o contato com o tecido linfóide intestinal, mediando efeitos imunes locais e sistêmicos. A integridade do epitélio intestinal é fundamental para a manutenção das suas funções de barreira e respostas cito-protetoras (BADARÓ; GUTTIERRES; REZENDE; STRINGHETA, 2008).

Dentro desse contexto, o probiótico kombucha vem ganhando cada vez mais espaço no mercado, o qual trata-se de uma bebida agridoce e fermentada à base de chá, de origem asiática.

A Kombucha é conhecida desde a antiguidade pelas suas propriedades terapêuticas. Essas propriedades veem sendo cada vez mais estudadas a fim de investigar esses efeitos relatados. Entre esses benefícios estão o alívio de dores de cabeça, propriedades antioxidantes, redução do nível de colesterol, bom funcionamento do fígado, melhora dos sistemas digestivos e circulatórios, aumenta a resistência ao câncer, retarda o envelhecimento, melhora o metabolismo e a visão, diminui a incidência de inflamações, entre

outros diversos benefícios (JAYABALAN et al., 2014; CHAKRAVORTY et al., 2015; BHATTACHARYA et al., 2016; VIEIRA et al., 2021).

Os Estados Unidos é o maior consumidor de kombucha do mundo, segundo o Portal do Agronegócio, as vendas de kombucha movimentam US\$ 1 bilhão por ano, para se destacarem, os produtores procuram inovar o seu produto introduzindo kombuchas com sabores e combinações diferentes. Segundo o site Probióticos Brasil, existem 59 produtores regulamentados no Brasil, estas empresas têm produção média de 2 mil e 5 mil garrafas por mês, as vendas são feitas de forma regional. Entretanto algumas empresas vêm se destacando, como a empresa Tao Kombucha, de Porto Alegre, fundada em 2014, a bebida é vendida em 22 capitais brasileiras, segunda a companhia, possui crescimento de 20% ao mês. (Portal do Agronegócio, 2018; TAO KOMBUCHA, 2014).

Inicialmente, a kombucha era doada de pessoa a pessoa e a produção realizada de forma doméstica, a comercialização começou a acontecer em lojas de produtos naturais, com enfoque de atingir pessoas que buscavam um estilo de vida mais saudável, entretanto, grandes redes de mercados estão adquirindo o produto para revenda, o que sugere que o produto agradou e agora também atinge as pessoas com diversos hábitos alimentares. No Brasil, a produção começou a ganhar força em 2017. O preço varia entre R\$ 10 e R\$ 15 por garrafa de aproximadamente 300 mililitros. A rápida expansão do consumo de Kombucha no Brasil não é um fator isolado (Portal do Agronegócio, 2018; TAO KOMBUCHA, 2014).

Uma pesquisa de mercado realizada pela Zion Market Research publicou um relatório sobre o mercado global de Kombucha e observou que o mesmo foi avaliado em torno de USD 1.062 milhão de dólares em 2016 e que espera-se alcançar aproximadamente USD 2.457 bilhões até 2022, o que representa uma taxa de crescimento anual de cerca de 25% entre 2017 e 2022 (ZION, 2018).

A Kombucha é a bebida funcional que mais cresce no mundo, impulsionada principalmente por vendas nas regiões da Ásia, Pacífico e nos Estados Unidos (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2018). Esse crescimento deve-se ao fato de apesar da Kombucha ser uma bebida milenar, muitos não conheciam seus sabores e benefícios e partir disso novos adeptos a kombucha estão sendo conquistados.

O crescimento significativo do mercado de kombucha apresenta ainda, outro fator, a mudança de estilo de vida da população, preocupada em adquirir melhores hábitos de vida, mais saudáveis e sustentáveis. Além disso, o aumento da prevalência de doenças crônicas como diabetes, hipertensão arterial e câncer tem levado a população a buscar alimentos melhores hábitos alimentares, o que tem levado o aumento no consumo da bebida. A crescente investigação e investimento de desenvolvimento para expandir o portfólio de produtos podem transformar em uma oportunidade para o mercado de kombucha, com o objetivo de prevenção de doenças e promoção da saúde (BRUSCHI; SOUSA; MODESTO, 2018).

1.1 TRATO GASTROINTESTINAL

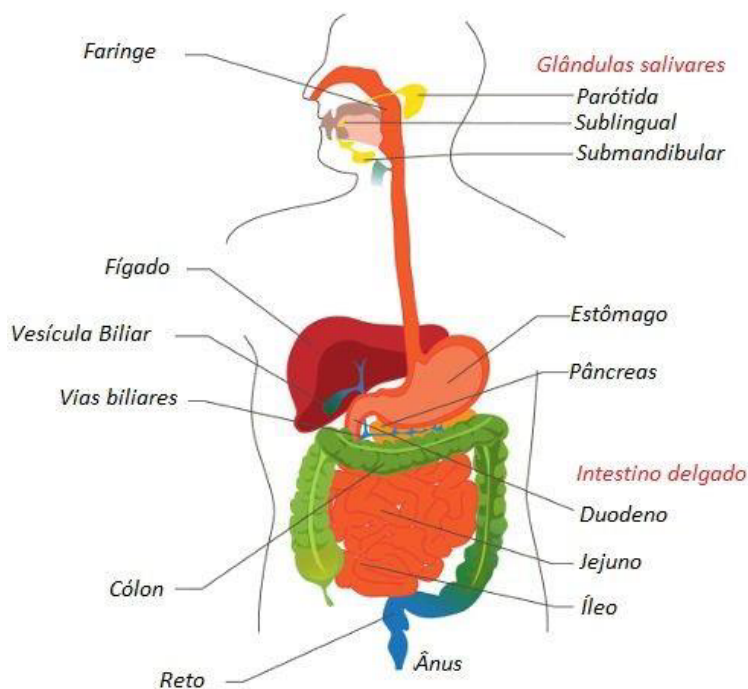
Os seres humanos vivem em íntima associação com muitos microrganismos presentes no nosso corpo, muitos desses microrganismos vivem no nosso trato gastrointestinal como podemos observar na(Figura 1), entretanto, a maior concentração de organismos comensais é encontrada no trato gastrointestinal (SAAD, 2006).

A microbiota intestinal pode ser definida como o conjunto de microrganismos (não só bactérias) encontrados no trato gastrointestinal (TGI) humano e que, em condições normais, podem estabelecer uma associação vantajosa entre o organismo humano e o hospedeiro, mas que também podem estabelecer relações patogênicas com o hospedeiro (SOKOL, 2019).

É sabido que os microrganismos estão diretamente ligados à manutenção da nossa saúde e relacionados a uma variedade de doenças, tanto gastrointestinais, como de outros sistemas. Estima-se que, esses

organismos microscópicos do sistema respiratório, trato genital, pele e, mais importante, do trato digestivo totalizam quase 1,5 kg de microbiota em um humano adulto, com mais de dez trilhões de organismos simbioticamente relacionados aos humanos. Como resultado, o trato gastrointestinal é o nosso sistema mais colonizado (SEKIROY et al., 2010; DAVENPORT et al., 2017).

FIGURA 1- Trato gastrointestinal humano.



Fonte: brasilescola.uol.com.br

Desse modo, a microbiota intestinal é considerada uma estrutura de extrema importância e complexidade. As bactérias representam a maior parte dos microrganismos comensais no intestino, embora fungos e vírus estejam presentes. A microbiota intestinal saudável conserva a ausência de doença, sobretudo do trato gastrointestinal (SAAD, 2006). Ela nos acompanha ao longo de toda a vida, sendo moldada, com o passar dos anos, por diversos fatores como carga genética, idade, estilo de vida, dieta, exercícios, hábitos de higiene, estresse, poluição, tabagismo, uso de antibióticos, entre outros (SAAD, 2006).

O surgimento da microbiota intestinal começa logo após o parto, vindos predominantemente da mãe. A colonização do recém-nascido ocorre após o nascimento e o tipo de nascimento interfere diretamente nos perfis imunológicos e características genéticas do indivíduo (DAVENPORT et al., 2017) .

As crianças nascidas de parto vaginal serão inicialmente colonizadas por bactérias do períneo da mãe, enquanto nos casos de cesariana, as bactérias do hospital e da pele do abdômen materno serão as primeiras a serem recebidas pela criança. Além disso, o próprio estresse do parto vaginal é considerado de extrema importância para que essa colonização inicial ocorra de forma saudável (AKAGAWA et al., 2019).

As crianças que nascem de cesariana apresentam um risco maior de diabetes no futuro (o que, em teoria, poderia ser reforçado por essa população microbiana diferente). A microbiota também varia quando esses indivíduos nascidos de parto cesariana ficam adultos e idosos, apresentando mais chances de adoecerem a medida que envelhecem comparado ao parto vaginal. (DINAN; STANTON; CRYAN, 2013).

A amamentação é outro fator essencial para o desenvolvimento de uma microbiota saudável. Embora fórmulas de aleitamento se pareçam o máximo com o leite materno e sejam cada vez mais usadas, nenhum produto pode substituir o leite materno de forma adequada. O leite materno inclui lactobacilos e carboidratos conhecidos como oligossacarídeos do leite humano (HMO). O leite de cada mãe possui diferentes tipos e quantidades de microrganismos e HMO. Há evidências convincentes de que a amamentação e o parto vaginal têm um efeito protetor contra infecções virais e bacterianas e previnem o desenvolvimento de doenças alérgicas e autoimunes (BODE, 2012; BODE, 2015; AKAGAWA et al., 2019).

(AKAGAWA et al., 2019).

Esses microrganismos funcionam estimulando o desenvolvimento e o crescimento de bactérias benéficas, essas bactérias benéficas as quais se ligam a receptores da mucosa intestinal, impedindo que bactérias patogênicas se estabeleçam ali, desse modo, diminuindo a probabilidade de desenvolver

infecções. Eles produzem efeitos imunomoduladores, controlando o desenvolvimento do nosso sistema imunológico, modificam a proliferação e diferenciação das células intestinais e participam da formação de nosso sistema nervoso central. (BODE, 2012; BODE, 2015; AKAGAWA et al., 2019).

A microbiota gastrointestinal humana executa uma função fundamental na nutrição e saúde. Pelo processo de fermentação, as bactérias do intestino metabolizam vários substratos, formando produtos finais como ácidos graxos de cadeia curta e gases (WAGNER et al., 2018).

A maioria das bactérias do intestino é encontrada no intestino grosso (cólon), e nos últimos anos, tem se intensificado o interesse nessa microbiota. Muitas pesquisas demonstram que os residentes habituais do intestino estão longe de serem apenas habitantes passivos do trato gastrointestinal, mas interagem com seu hospedeiro, de forma bastante entrelaçada. Eles são capazes de modular os efeitos de bactérias potencialmente nocivas, no trato gastrointestinal, na digestão, no metabolismo e no sistema imunológico do hospedeiro, entre outras funções no organismo do hospedeiro (ILSI, 2014).

As principais bactérias que compõe a microbiota entérica são benéficas e/ou probióticas. Como exemplo de probióticas, temos as *Bifidobactérias* e *Lactobacilos* (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. (SANTOS; VARAVALHO, 2011).

Esses microrganismos vivos podem ser introduzidos na preparação de uma vasta gama de produtos, esses produtos são denominados probióticos, cuja função é equilibrar a microbiota residente, causando benefícios ao hospedeiro. Esses produtos precisam ser administrados em doses adequadas e estarem viáveis quando consumidos, necessitam permanecerem vivos após contato com o suco gástrico e bile, para assim, fixarem-se à mucosa intestinal para concorrer com os microrganismos patogênicos e promover benefícios à saúde do hospedeiro (FAGUNDES, 2018).

Estudar a microbiota é desafiador, existe uma dificuldade em definir quais microrganismos vivem nesse meio e como eles convivem em harmonia, devido a enorme variabilidade entre indivíduos. Bactérias comensais como as

pertencentes aos gêneros *Roseburia*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prausnitzii*, estão associadas a um intestino saudável. Além disso, as vezes o equilíbrio da microbiota intestinal pode ser perdido, devido a alteração na quantidade de bactérias e ocorre mudanças na sua composição e função. Essa perda do equilíbrio é chamada de disbiose normalmente é apresentada com algumas características como perda de comensais e crescimento exagerado de organismos prejudiciais, o que acarreta dificuldade de absorção de nutrientes, fadiga, constipação, distensão abdominal entre outros sintomas (LEVY et al., 2017).

Os probióticos como a kombucha ajudam na recomposição dessa microbiota intestinal, realizando a fixação e a colonização da mucosa intestinal de bactérias benéficas e essa ação impendem que bactérias patogênicas indesejáveis se estabeleçam na mucosa intestinal. Somando a isso os probióticos participam de uma competição com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis. Essa relação em que a convivência entre os seres é vantajosa, impedem uma produção excessiva de nutrientes, a qual favoreceria o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro (SAAD, 2006).

Os probióticos desempenham efeitos benéficos na formação e no funcionamento da microbiota humana, e os prebióticos por sua vez, tem o poder de inibir a propagação de microrganismos patogênicos, os prebióticos atuam predominantemente no intestino grosso (BARROS et al., 2022).

1.2 PROBIÓTICOS

O termo probiótico possui origem grega e significa “para a vida”, sendo esse termo descrito pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965). Desse modo, a definição de probióticos era associada a suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro através da promoção do equilíbrio da sua microbiota intestinal. Mas com o decorrer do tempo, esse assunto despertou um maior interesse, o número de estudos aumentaram gradativamente e outras definições surgiram.

Atualmente, a definição mais aceita mundialmente é que os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem um efeito benéfico para a saúde do hospedeiro (WGO, 2017).

Para ser reconhecida como alimento probiótico, a bactéria precisa ser reconhecida internacionalmente, resistir à acidez gástrica e à ação dos sais biliares, demonstrar benefício ao hospedeiro com provas *in vitro* e *in vivo* por meio de uma dose conhecida, ser capaz de aderir ao muco ou epitélio intestinal, oferecer uma comprovada segurança e garantia da manutenção da viabilidade até o momento do consumo independente do veículo utilizado (STÜRMER; CASASOLA; GALL, 2012).

Panigrahi et al. (2017) e Kleerebezem et al. (2019) ao analisarem quase 2.000 estudos clínicos constataram uma variedade de benefícios à saúde relacionados ao consumo de probióticos. É sabido que uma abundante diversidade de produtos probióticos são ingeridos diariamente por milhões de pessoas, esses probióticos estão popularmente associados a leites fermentados e outros produtos dessa natureza.

Recomenda-se que esse produto contenha no mínimo de 10^8 a 10^9 UFC/g de bactérias para que traga benefícios fisiológicos ao consumidor. As bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas para o consumo humano (TRIPATHI; GIRI, 2014).

No mercado, a maioria dos probióticos disponíveis são as bactérias ácido lácticas (BAL), tais como *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. essas bactérias apresentam propriedades de sobrevivência no intestino definidas e atividades biológicas associadas, além disso, podem ser ingeridos em produtos lácteos fermentados ou como um suplemento (CALAÇA; BEZERRA; PORTO; MARIA, 2017; BOSTAN et al.; 2017).

As bactérias ácido lácticas são úteis para os seres humanos e animais, elas beneficiam o organismo em diversos aspectos, entre eles a prevenção de diarreia, aumento da imunidade, tanto a nível intestinal e sistêmico, papel

na prevenção de doenças infecciosas, bem como, nos efeitos sobre a incidência de câncer de cólon e no retardo da progressão do câncer (CALAÇA; BEZERRA; PORTO; MARIA, 2017).

Estudos em animais, demonstram que vários isolados de BAL protegem contra o câncer de cólon em roedores, em humanos a maioria dos ensaios relatam que as cepas testadas podem exercer efeitos anticancerígenos, diminuindo a atividade da enzima β -glucuronidas, também atuando como controle da diabetes *Mellitus*, associado aos seus efeitos na microbiota intestinal e auxiliando no controle da glicemia, facilitando o metabolismo de carboidratos, diminuindo os efeitos contrários da hiperglicemia crônica e aumentando a sensibilidade à insulina das células alvo (CALAÇA; BEZERRA; PORTO; MARIA, 2017; FREIRE; SILVA; FERREIRA, ; SANTOS, 2021).

Os probióticos popularmente são associados a leites fermentados e outros produtos desta natureza, contudo, essa ideia tem uma base histórica, pois em meados do século passado, alguns cientistas a procura de descobrirem uma forma de regular a microbiota intestinal começaram a fazer algumas observações quanto a microbiota intestinal. Foi identificado que, devido as mudanças da sociedade quanto aos cuidados infantis, as crianças passaram a ter menos exposição a microrganismos devido as melhores condições de saúde, o que causou uma certa desestabilização bacteriana da microbiota. Os autores relacionam essas mudanças com o aumento de doenças alérgicas e infecciosas (BRITO; FERRAZ, 2019).

Os probióticos vem sendo utilizados cada vez mais na prevenção de diversos tipos de doenças importantes, dentre elas: diabetes, hipertensão, alguns tipos de cânceres, dermatites e alergias. O efeito da administração dessas cepas associado ao exercício físico pode reduzir as comorbidades frequentemente relatadas por esses indivíduos, além de aumentar a biodisponibilidade de nutrientes e melhorar a absorção deles. A suplementação de probióticos vem sendo estudada, devido sua aplicabilidade no estresse oxidativo e inflamação, que favorece redução de mediadores

inflamatórios que atuam em vias de sinalização celular e capacidade para alterar padrões de expressão de determinados genes (LATVALA et al., 2011).

As bactérias probióticas desenvolvem importantes atributos na saúde do indivíduo. Via de regra, as bactérias produtoras de ácido láctico promovem a acidificação, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos, o ácido láctico também ajuda na produção de boas quantidades de citocinas, incluindo a interleucina 10, que desempenha um papel de controle da inflamação e no estabelecimento da tolerância imunológica da mucosa intestinal. As bactérias probióticas produzem substâncias antimicrobianas que ajudam a diminuir a presença no lúmen intestinal de peptidoglicanos, que podem ser prejudiciais aos seres humanos (PIARD et al., 2005).

O tratamento da obesidade com alimentos funcionais como probióticos tem demonstrado uma alternativa benéfica a saúde por visarem à integridade intestinal, e são usados para o reestabelecimento da microbiota em casos de disbiose intestinal. Conseqüentemente, a microbiota intestinal tem um papel importante na obesidade e demonstra que é uma questão relevante para pacientes obesos (PERPETUO; WILASCO; SCHNEIDER, 2015).

Dessa forma o equilíbrio da microbiota intestinal auxilia a redução de peso corporal e melhoram marcadores inflamatórios e diminuem os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de doenças metabólicas como a obesidade (VITIATO et al., 2022).

O uso de probióticos está relacionado a muito benefícios, e têm se mostrado seguros para o consumo da maioria da população. No entanto, a administração de probióticos para pessoas imunocomprometidas, doentes crônicos, pacientes em ambiente hospitalar, com distúrbios gastrointestinais e portadores de cateteres, podem predispô-los a riscos. Para esse grupo é indicado cautela na administração de probióticos industrializados e mais estudos que demonstrem a segurança do uso de probióticos (VERNA; LUCAK, 2010).

1.3 KOMBUCHA

A kombucha é uma bebida refrescante probiótica, produzida artesanalmente e comercialmente em todo mundo, conhecida por suas propriedades medicinais e por seus componentes bioativos. É uma bebida agri-doce, proveniente da Ásia, especificamente da China e Coréia e nomeado pelo Dr. Kombu, que levou o cogumelo do chá (SCOBY) da Coréia para o Japão. 'Kombu', é um nome japonês, é uma alga marinha de folhas largas (*Laminaria japonica*) e 'Cha' significa chá em japonês (LONČAR et al., 2006; GALLEGOS et al., 2016; SANTOS; COSME, 2017; LAUREYS; BRITTON; DE CLIPPELEER, 2020).

A produção da kombucha tradicional é realizada a partir da fermentação da infusão das folhas da *Camellia sinensis* (chá preto ou verde), a esse chá já adoçado é somado a um volume de um chá kombucha já fermentado e um SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), que juntamente com a sacarose serão responsáveis pelo processo de fermentação (JAYABALAN et al., 2014).

A kombucha tem sabor refrescante, levemente gaseificado devido à fermentação, com sabor ácido, é comparado a um espumante, similar a sabor da cidra de maçã (AMARASEKARA; WANG; GRADY, 2020).

Ela tem se difundido devido a potenciais propriedades benéficas à saúde como efeito protetor para doenças cardiovasculares e hepáticas, doenças metabólicas, artrite, constipação, entre outras (LEAL et al., 2018).

O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* é a segunda bebida não alcoólica mais consumida no mundo, sendo uma cultura de grande importância econômica e social (SANTOS; COSME, 2017). A kombucha utiliza tradicionalmente o chá preto e o chá verde como base para sua fermentação. Estes chás bases se destacam devido ao teor de cafeína que apresentam e que é necessária para o desenvolvimento da cultura. Porém, é possível obter esta bebida utilizando outras matérias-primas base

nas quais a cultura simbiótica se desenvolve adequadamente, mesmo sem a presença de cafeína (RODRIGUES, 2018).

A kombucha é composta por um sistema integrado por bactérias, principalmente (*Acetobacter* e *Gluconobacter*) e leveduras que estão presentes no SCOBY, as quais convertem sacose em álcool etílico com CO₂ usando a enzima invertase, e as acetobactérias convertem o álcool etílico formado pelas leveduras em ácido acético pelas enzimas aldeído desidrogenase. Em outro ângulo, as gluconobactérias produzem gluconato e não podem deixar acontecer oxidação do ácido acético devido à ausência das enzimas succinato e α -cetogluturato. O ácido glucônico é produzido a partir da glicose por glicobactérias e acetobactérias, enquanto a frutose e o etanol são usados para produzir ácido acético (GOH et al., 2012; LEAL et al., 2018). As principais funções dos microrganismos presentes na kombucha estão descritas a seguir (Tabela 1).

TABELA 1- Funcionamento do Sistema Simbiótico no chá kombucha

Sistema simbiótico integrado por bactérias e leveduras no chá kombucha			
<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	Leveduras	Leveduras
Convertem o álcool etílico formado pelas leveduras em ácido acético pelas enzimas aldeído desidrogenase.	Produzem gluconato. Não podem deixar oxidar o ácido acético, devido à ausência das enzimas succinato e α -cetogluturato.	Estão disponíveis na Cultura Simbiótica de bactérias e leveduras.	Convertem a sacarose em álcool etílico com CO ₂ , e usando a enzima invertase.

A bebida kombucha consiste em muitos compostos, e a sua composição vai depender do seu SCOBY, mas em geral são encontrados

açúcares, ácidos orgânicos, etanol, CO², fibra alimentar, aminoácidos, elementos essenciais (cobre, ferro, zinco), vitamina C, vitamina B, derivados das substâncias antibióticas, enzimas hidrofílicas e polifenóis que provêm das folhas dos chás (JAYABALAN et al., 2014; MIRANDA; MENDES; ANA, 2016).

1.4 Benefícios da kombucha

A kombucha tem sido muito consumida durante muito tempo em todo o mundo por suas propriedades profiláticas e terapêuticas. Via de regra suas propriedades foram respaldadas por observações e relatos pessoais, mas esses efeitos têm sido cada vez mais estudados e comprovados cientificamente. As primeiras descrições sobre essas propriedades são provenientes da Rússia durante a Primeira Guerra Mundial, os quais afirmavam que o “remédio caseiro secreto russo”, como era nomeada a kombucha, dentre os benefícios citados auxiliava em dores de cabeça, doenças gástricas e, especialmente, na regulação das atividades intestinais muitas vezes desequilibradas pelo estilo de vida no exército. Entretanto, nos últimos anos, tem havido maior atenção sobre os possíveis efeitos benéficos da kombucha na saúde humana (VINA et al., 2014).

Efeito Antioxidante

Antioxidantes são ativos que podem ajudar na prevenção e na reparação de prejuízos causados pelo estresse oxidativo que é causado quando os radicais livres produzidos em excesso são superiores as defesas naturais do organismo. Ou seja, os antioxidantes possuem a capacidade de reagir com os radicais livres e assim proteger o organismo dos seus efeitos maléficos (JAYABALAN et al., 2014).

Os antioxidantes podem exercer os seus efeitos também influenciando a regulação de genes envolvidos em mecanismos de defesa ou de reparação do DNA. Isso indica a grande influência dos antioxidantes na regulação do metabolismo e integridade celular (JAYABALAN et al., 2014).

Um dos benefícios do chá fermentado com a kombucha é seu efeito antioxidante de eliminação dos radicais livres. A atividade antioxidante

da kombucha também é atribuída devida a presença de polifenóis do chá, ácido ascórbico e ácido D-sacárico-1, 4-lactona (DSL). Também observou que o chá fermentado com a kombucha tem maior atividade antioxidante que o chá tradicional não fermentado (JAYABALAN et al., 2014).

Um estudo realizado por SHIARI et al. (2013) demonstrou que a quantidade de compostos fenólicos e flavonoides aumentou no chá preto após a fermentação pela cultura da kombucha em 75%. Isso se deve ao fato das enzimas liberadas pelas bactérias e leveduras durante o processo de fermentação degradarem os polifenóis complexos em pequenas moléculas, resultando no aumento dos compostos fenólicos totais e flavonoides (SHIARI et al., 2013).

Os compostos fenólicos e os flavonoides são chamados de antioxidantes de alto nível, devido a sua capacidade de eliminar os radicais livres flavonoides (SHIARI et al.; 2013).

Em seu estudo, VILLAREAL et al. (2020) também corrobora com o estudo de (BHATTACHARY et al., 2013), trazendo que a kombucha pode atuar eficientemente na prevenção e recuperação da saúde devido as suas propriedades antioxidantes e considera que os recentes estudos experimentais sugerem que a kombucha é adequada na prevenção de distúrbios metabólicos e infecciosas de amplo espectro.

Segundo VELICANSKI et al. (2014) a kombucha fermentada com a erva-cidreira, em comparativo com a fermentação tradicional (com chá verde e chá preto) revelou que a infusão com a erva-cidreira tem maior potencial antioxidante, e que diferente do chá kombucha tradicional, o principal fenólico encontrado foi o ácido rosmarínico presente na erva-cidreira. O ácido rosmarínico possui forte capacidade de eliminação dos radicais livres.

Eles também encontraram uma acidez ótima no quarto dia da fermentação, alguns outros estudos realizados com a bebida tradicional, apresentaram a acidez ótima entre o quarto e o oitavo dia. Essas diferenças nos parâmetros químicos básicos e na duração do processo em diferentes estudos podem ser esperadas, porque as culturas de kombucha são

originárias de diferentes localizações geográficas, não possuem composições microbiológicas e químicas padronizadas VELICANSKI et al. (2014).

A Kombucha exibiu atividades de eliminação de radicais livres aumentadas durante a fermentação. A extensão da atividade depende do tempo de fermentação, do tipo de material do chá e da microbiota normal da cultura kombucha, que por sua vez determinou a natureza de seus metabólitos (JAYABALAN et al., 2014).

Atividades Antimicrobianas

O chá Kombucha foi estudado por muitos pesquisadores por sua atividade inibitória em muitos microrganismos patogênicos (JAYABALAN et al., 2014).

Kombucha tem sido considerado como uma bebida funcional popular que melhora a saúde humana devido a seus vários efeitos positivos nas funções bioregulatórias. Suas várias propriedades farmacológicas foram contribuídas por ácidos orgânicos (ácido acético, ácidoglucurônico, ácido glucônico etc.), polifenóis do chá e seus derivados, bacteriocinas, enzimas, proteínas presentes como matéria-prima ou formadas durante a fermentação microbiana (SRIARI et al., 2013; JAYABALAN et al., 2014).

Em especial, a kombucha exerce um poder antimicrobiano contra uma ampla gama de bactérias. Esse efeito está intimamente relacionado com o ácido acético produzido durante o processo de fermentação (JAYABALAN et al., 2014).

A atividade antibacteriana da kombucha está presente na fase polifenólica, presente na kombucha. A bebida também pode ser administrada como um potente antibacteriano contra infecções causadas por bactérias enteropatogênicas (ROSSETO; MIKCHA, 2011).

Bebidas de kombucha de erva-cidreira com diferentes acidez, soluções de ácido acético e bebidas de kombucha desnaturadas pelo calor mostraram atividades antibacterianas contra diversas cepas selvagens testadas. Esses estudos indicam a atividade bactericida contra as cepas bacterianas Gram-negativas e amostras de Kombucha e soluções de ácido

acético reduziram o crescimento de algumas bactérias Gram positivas como (*Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Bacillus* sp. das bactérias Gram-positivas restantes que são membros do gênero *Listeria* (VELICANSKI et al., 2014).

BHATTACHARYA et al. (2016) também investigaram a eficácia da kombucha, contra *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Salmonella Typhimurium*, seguido pela identificação dos componentes antibacterianos presentes em kombucha. A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação do diâmetro da zona de inibição, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. A Kombucha fermentada por 14 dias mostrou atividade máxima contra as cepas bacterianas. A catequina e a isorhamnetina foram detectadas como os principais compostos antibacterianos presentes nessa fração de kombucha por cromatografia líquida de alta eficiência. A catequina, um dos principais polifenóis antibacterianos do chá, também foi encontrada na kombucha. Porém, não é relatado que a isorhamnetina esteja presente no chá, o que pode sugerir o papel do processo de fermentação do chá preto para sua produção em kombucha (BHATTACHARYA et al.; 2016).

A kombucha fermentada com a erva-cidreira exibiu atividade antibacteriana contra as cepas testadas do tipo selvagem, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas patogênicas. Também evidenciou que o principal componente antibacteriano é o ácido acético, cuja concentração na bebida kombucha influencia diretamente seu potencial antimicrobiano, e que, no entanto, a atividade antibacteriana da kombucha neutralizada contra várias cepas bacterianas indica que a presença de alguns componentes não ácidos pode contribuir para essa bioatividade (VELICANSKI et al., 2014).

A atividade antimicrobiana observada nas infusões fermentadas com kombucha foi significativa não apenas contra as bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, mas também contra todas as cepas de *Candida* testadas, exceto *C. krusei* (BATTIKH; CHAIEB; BAKHROUF; AMMAR, 2013).

Atividade Hepatoprotetora

O chá kombucha foi estudado por sua propriedade hepatoprotetora contra vários poluentes ambientais em modelos animais e linhas celulares e foi demonstrado que ele pode impedir a hepatotoxicidade induzida por vários poluentes. O chá Kombucha (preparado a partir de chá preto) foi testado contra cloreto de cádmio (BATTACHARYA et al., 2011; WANG et al., 2013). E foi demonstrado que ele pode atenuar efetivamente as alterações fisiológicas causadas por esses tóxicos no fígado. O volume de chá de kombucha, número de doses, período de tratamento e o método de administração utilizados nesses estudos não foram iguais.

A eficácia hepatoprotetora do chá kombucha foi estudada medindo-se marcadores de toxicidade hepática (piruvato glutâmico transaminase sérico, transaminase oxaloacética glutâmica sérica, malondialdeído, fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase), glutatona reduzida, enzimas antioxidantes, glutatona-S-transferase, glutatona-S-transferase, catalase e superóxido dismutase), vários níveis de creatinina e uréia, níveis de óxido nítrico no fígado, por análise histopatológica do tecido hepático, apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio, alterações no potencial da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, ativação de caspases (3 e 9) e Apaf - 1 foram estudadas para mostrar a propriedade hepatoprotetora do chá Kombucha contra o hidroperóxido de terc-butil (TBHP) que é um peróxido orgânico amplamente utilizado em uma variedade de processos de oxidação (BATTACHARYA et al., 2011).

A atividade antioxidante e sua capacidade de facilitar os processos antioxidante e de desintoxicação no fígado foram atribuídas à hepatoproteção oferecida pelo chá de kombucha. Wang et al. (2013) relataram que os efeitos hepatoprotetores da kombucha contra o acetaminofeno (Paracetamol) são amplamente atribuídos à presença do *antioxidante* conhecido como ácido D-sacárico-1, 4-lactona (DSL) e a *Gluconacetobacter* sp. A4 foi a principal produtora desse antioxidante. (WANG et al., 2013).

A *Gluconacetobacter* sp. A4, que é o principal produtor de DSL, foi considerado o principal microrganismo funcional responsável pela propriedade hepatoprotetora do processamento da kombucha (BELLASSOUED et al., 2015).

Os presentes achados sugerem que a kombucha pode ser usada como antioxidante natural para a proteção de hepatócitos no insulto oxidativo e na morte induzidos por TBHP (VELICANSKI et al., 2014).

A maioria dos estudos concluiu que o chá kombucha pode ser benéfico contra doenças hepáticas, para as quais o estresse oxidativo é um fator causal bem conhecido.

Atividade Antitumoral

A carcinogênese é um fator multifatorial e processo, no qual numerosos genes são afetados. Muitos desses genes são alvos principais para quimioprevenção agentes porque regulam a superfície celular intracelular ou funções extracelulares. Vários relatórios estão disponíveis na literatura para as propriedades anticâncer do chá preto. Como o chá kombucha é preparado a partir de chá preto, espera-se que tenha propriedades anticâncer (JAYABALAN et al., 2014).

A quimioprevenção usando uma combinação de fitoquímicos da dieta com diversos mecanismos foi proposta como uma abordagem bem-sucedida para controlar diferentes tipos de câncer com menos efeitos colaterais (SHIARI et al., 2013).

A Kombucha foi seriamente reivindicada por ter propriedades anticancerígenas pelos bebedores de kombucha por muitos anos. Foi reivindicado por um estudo populacional realizado na Rússia pela “Unidade Central de Pesquisa Oncológica” e pela “Academia Russa de Ciências em Moscou” em 1951, foi investigada a atividade antiproliferativa de bebidas kombucha de chá preto e chá saboroso de inverno (*Satureja montana* L.) nas células HeLa (carcinoma epitelial do colo do útero), HT - 29 (adenocarcinoma

do cólon) e MCF - 7 (adenocarcinoma da mama) usando o ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SHIARI et al., 2013).

Eles relataram que o efeito antiproliferativo do chá salgado de inverno kombucha era comparável ao do chá preto kombucha tradicional; e concluíram que o kombucha preparado a partir de chá saboroso de inverno pode ter componentes antiproliferativos mais ativos do que simples extratos de água de chá saboroso de inverno. Uma fração de acetato de etila do chá preto de kombucha que continha 2-(2-hidroxi-2-metoxipropilideno) malonato de dimetila e vitexina a uma concentração de 100 µg / mL causou efeitos citotóxicos em 786-O (carcinoma renal humano) e U2OS (osteossarcoma humano), reduziu significativamente a invasão celular e a motilidade celular nas células A549 (carcinoma do pulmão humano) (SHIARI et al., 2013).

O extrato de chá de kombucha liofilizado diminuiu significativamente a sobrevivência de células de câncer de próstata ao diminuir a expressão de estimuladores de angiogênese, como metaloproteinase de matriz, ciclooxigenase-2, interleucina-8, fator de crescimento endotelial e fator indutível humano-1α¹⁰. Este estudo mostrou um grande potencial do kombucha na inibição da angiogênese através de alterações na expressão de estimuladores angiogênicos (SHIARI et al., 2013).

Os possíveis mecanismos contra o câncer dos polifenóis do chá aceitos pela maioria dos pesquisadores agora são os seguintes: inibição da mutação genética, inibição da proliferação de células cancerígenas, indução de apoptose de células cancerígenas; e término de metástases. As propriedades anticancerígenas do chá kombucha podem ser devidas à presença de polifenóis do chá e seus produtos de degradação formados durante a fermentação (SHIARI et al., 2013).

Anticolesterolêmica

Em seu estudo BELLASSOUED et al. (2015) investigaram os efeitos de *Camellia sinensis* e da kombucha, duas bebidas naturais, sobre o *status* de colesterol e antioxidante usando um modelo de rato com

hipercolesterolemia. Esse estudo comparou as habilidades de eliminação de radicais livres e os níveis de polifenóis da *Camellia sinensis* e da kombucha. Foram utilizados Ratos Wistar alimentados com dietas ricas em colesterol receberam Kombucha ou *Camellia sinensis* (5 mL / kg de peso corporal por dia, por 16 semanas, em seguida, jejuaram durante a noite e foram sacrificados. Os níveis lipídicos plasmáticos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e níveis séricos de γ -glutamil transpeptidase (GGT), atividades antioxidantes da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e ratos creatinina e uréia foram examinados.

A kombucha induziu níveis séricos baixos de colesterol total, triglicérides, VLDL, E LDL em 26, 27, 28 e 36%, respectivamente, e aumentou o nível sérico de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL). A kombucha induziu uma diminuição de 55% no nível de TBARS no fígado e 44% no rim, em comparação com os de ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol (BELLASSOUED et al., 2015)

O chá a partir da *Camellia sinensis* e a kombucha, são apresentados na literatura como duas bebidas muito distintas e nenhuma correlação foi até agora relatada entre elas. Alguns dos efeitos relatados para a ingestão da kombucha são, no entanto, muito semelhantes aos descritos para o chá. No entanto, embora a composição, propriedades e efeitos do chá em doenças crônicas e progressivas, como obesidade e hiperlipidemia, estejam bem documentados na literatura poucos dados estão disponíveis atualmente sobre essas questões em relação à Kombucha. De fato, a maioria dos dados sobre a kombucha é anedótica e são necessários mais estudos para elucidar seu potencial terapêutico curativo, particularmente contra a hipercolesterolemia (JAYABALAN et al., 2014).

Efeito antiglicêmico

O diabetes tornou-se um grave problema de saúde e um importante fator de risco associado a complicações de saúde problemática, como

distúrbios do metabolismo e disfunções hepáticas e renais. As inadequações associadas aos medicamentos convencionais levaram à uma busca determinada por agentes terapêuticos naturais alternativos (ALOULOU et al., 2012).

Aloulou et al. (2012), conduziram um estudo em que ratos diabéticos induzidos por aloxana, foram submetidos ao chá preto fermentado com kombucha na dose de 5 mL / kg de peso corporal por dia, durante 30 dias, em jejum durante a noite e sacrificados no 31º dia do experimento (ALOULOU et al., 2012).

O sangue dos animais foram coletados e submetidos a várias medidas bioquímicas, incluindo glicemia, colesterol, triglicerídeos, ureia, creatinina, transaminases, transpeptidase, lipase e atividades de amilase. Os órgãos pâncreas foram isolados e processados para medir as atividades de lipase e α -amilase e realizar análises histológicas, e os resultados revelaram que, comparado ao chá preto, o chá fermentado com kombucha era o melhor inibidor das atividades da α -amilase e lipase no plasma e no pâncreas e um melhor supressor dos níveis elevados de glicose no sangue (ALOULOU et al., 2012).

Curiosamente, observou-se que a kombucha induz atraso acentuado na absorção do colesterol LDL e triglicerídeos e um aumento significativo no HDL-colesterol. As análises histológicas também mostraram que exercia uma ação melhoradora no pâncreas e protegia eficientemente as funções fígado- rim de ratos diabéticos, evidenciadas por diminuições significativas nas atividades do aspartato transaminase, alanina transaminase e gama-glutamil transpeptidase no plasma, bem como no conteúdo de creatinina e uréia (ALOULOU et al., 2012).

Outros pesquisadores (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013), também estudaram o efeito antiglicêmico do chá preto e do chá fermentado com Kombucha em ratos diabéticos induzidos por aloxana (ALX). A exposição ao ALX reduziu o peso corporal e a insulina plasmática em cerca de 28,12%

e 61,34%, respectivamente, e elevou o nível de glicose no sangue e a hemoglobina glicada em cerca de 3,79 e 3,73 vezes, respectivamente. Os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, como produtos de peroxidação lipídica (aumentados em 3,38, 1,7, 1,65, 1,94 vezes, respectivamente), teor de carbonila da proteína (aumentada em 2,5, 2,35, 1,8, 3,26 vezes, respectivamente), conteúdo de glutatona (diminuiu 59,8%, 47,27%, 53,69%, 74,03%, respectivamente), as atividades das enzimas antioxidantes também foram alteradas nos níveis pancreático, hepático, tecidos renais e cardíacos de animais diabéticos.

Os resultados mostraram ainda, um potencial antidiabético significativo da bebida fermentada (150 mg de extrato liofilizado / kg de peso corporal por 14 dias), pois restaurou efetivamente as alterações fisiopatológicas induzidas por aloxana, além disso, poderia melhorar a fragmentação do DNA e a ativação da caspase-3 no tecido pancreático de ratos diabéticos. Embora o chá preto não fermentado seja eficaz na fisiopatologia acima, a kombucha mostrou ser mais eficiente. Isso pode ser devido à formação de algumas moléculas antioxidantes durante o período de fermentação (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013).

O estudo realizado por Srihari et al., (2013) que teve como objetivo delinear o efeito anti-hiperglicêmico do extrato liofilizado de kombucha em ratos experimentais induzidos por estreptozotocina, observou-se que após o período experimental de 45 dias, que uma suplementação de kombucha com 6 mg / kg de peso corporal diminuiu significativamente a hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) e aumentou os níveis de insulina plasmática, hemoglobina e glicogênio tecidual, além de reverterem significativamente as atividades alteradas de enzimas gluconeogênicas, como glicose-6-fosfatase, frutose-1,6-bifosfatase e glicolítica, enzimas como a hexoquinase nos tecidos de ratos experimentais. Assim, os resultados desse estudo sugeriram que o kombucha exerce efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Melhora contra o envelhecimento da Pele

O envelhecimento da pele é um processo biológico durante o qual mudanças na estrutura a integridade estrutural e a função fisiológica da pele são induzidas. O envelhecimento resulta na diminuição da espessura da derme e da epiderme (PAKRAVAN et al., 2018).

Também pode haver perda da gordura por baixo da pele. A redução no volume e na eficácia em geral de todas as três camadas da pele resulta em uma série de importantes efeitos médicos e estéticos. A pele perde um pouco de sua elasticidade (PAKRAVAN et al., 2018).

Ela se torna mais seca devido ao comprometimento da função de barreira e à diminuição da produção de óleos essenciais. O número de extremidades nervosas diminui, então a sensação fica reduzida (PAKRAVAN et al., 2018).

O número de glândulas sudoríparas e vasos sanguíneos também diminui, reduzindo, assim a capacidade da pele de responder à exposição ao calor. O número de melanócitos tende a diminuir com a idade e, então, a pele fica menos protegida contra os raios ultravioleta. Com essas mudanças, a pele torna-se mais sensível às lesões e a sua cura torna-se mais lenta (PAKRAVAN et al., 2018).

A partir dos benefícios antioxidantes da kombucha, foi realizado um estudo afim de avaliar os seus potenciais no antienvelhecimento da pele.

Para essa análise, o chá de Kombucha foi fracionado em clorofórmio, butanol e acetato de etila, e o conteúdo de flavonoides foi determinado. Ratos jovens e velhos foram usados como controle. A fração kombucha de acetato de etila (KEAf), apresentou o maior conteúdo de flavonoides, foi administrada por via intradérmica em camundongos idosos (PAKRAVAN et al., 2018).

A administração de KEAf aumentou significativamente o conteúdo de colágeno, e melhorou concomitantemente as anormalidades do tecido conjuntivo da pele na pele envelhecida. Não foi observada nenhuma

sensibilidade ou irritação o que sugeriu que o KEAf pode ser um candidato adequado como produto cosmético para melhorar as anormalidades da pele relacionadas ao envelhecimento e a regeneração da pele envelhecida (PAKRAVAN et al., 2018).

Combate a Ulceração Gástrica

A gastrotoxicidade de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), muitas vezes levando à ulceração gástrica e atraso na cicatrização, continua sendo um problema crucial, apesar dos recentes avanços farmacêuticos (SAAD, 2006; SANTOS; VARAVALHO, 2011).

Os medicamentos anti-úlceras sintéticos atualmente disponíveis são caros, mostram efeitos colaterais e não podem prevenir a recorrência da úlcera (SANTOS; VARAVALHO, 2011).

A exploração de plantas/ervas, especialmente as variedades comestíveis, pode fornecer formulações anti-úlceras alternativas adequadas. Muitos taxa de plantas medicinais foram avaliados em todo o mundo por seus efeitos antiulcerogênicos (FAO, 2019).

Durante décadas, os médicos recomendam ajustes na dieta, destinados a prevenir ou tratar os sintomas de gastrite e ulceração, pois a dieta pode moderar o risco de gastrite ou úlcera péptica. O autor teve como objetivo principal do avaliar a propriedade de cura da kombucha fermentada a partir do chá preto contra ulceração gástrica induzida em ratos e comparar a atividade com a da droga , omeprazol (BANERIEE et al., 2010).

A amostra de kombucha produzida pela fermentação do chá preto por quatro dias apresentou a melhor capacidade de eliminação de radicais DPPH e conteúdo de fenólicos. Portanto, a atividade de cicatrização de úlceras do kombucha foi comparada com a do chá preto. Todos os extratos de chá (15 mg.kg⁻¹) poderiam curar efetivamente a ulceração gástrica, conforme revelado nos estudos histopatológicos e bioquímicos, com relativa eficácia como Kombucha aproximada a do chá preto (BANERIEE et al., 2010).

As capacidades de cura dos extratos de chá podem ser atribuídas à sua atividade antioxidante bem como a capacidade de proteger o conteúdo de mucina dos tecidos gástricos. Além disso, a capacidade da kombucha de reduzir a secreção de ácido gástrico também pode contribuir para sua atividade de cicatrização de úlceras. O Autor também encontrou que a preparação do chá kombucha (15 mg.kg^{-1}) foi tão eficaz quanto o controle positivo, omeprazol (3 mg.kg^{-1}) na cicatrização da úlcera (BANERIEE et al., 2010).

Com base no exposto, sobre a kombucha e sua possibilidade de potencializar a microbiota residente do trato gastrointestinal e com base na literatura consultada sobre seus efeitos terapêuticos, foi realizado este estudo com o intuito de avaliar a citotoxicidade da mesma, a ação de inibição do crescimento de microrganismos patogênicos e da atividade antitumoral em células vegetais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade de uma bebida fermentada em diferentes modelos biológicos, avaliando seus potenciais efeitos terapêuticos como alimento funcional probiótico.

2.2 Objetivos específicos

1. Aferir o pH da kombucha aos um, sete, 14 e 21 dias de fermentação e o teor alcóolico aos sete dias de fermentação;
2. Avaliar a toxicidade por meio do teste de letalidade em *Artemia salina*;
3. Analisar a atividade antimicrobiana *in vitro* de microrganismos patogênicos pela bebida probiótica;
4. Realizar a avaliação da atividade antitumoral por meio do bioensaio em células vegetais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação da kombucha

O SCOBY utilizado neste estudo foi obtido a partir de uma kombucha doada pela professora Cláudia Didonet (*In memoriam*) armazenada em sacos herméticos, acomodados em uma geladeira no Laboratório de Microbiologia do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Estadual de Goiás.

O cultivo do SCOBY foi realizado em 500 mL de infusão de chá-preto assepticamente preparado com a dissolução de 5 g.L⁻¹ (*Camellia sinensis* da marca Leão™) em água a 100 °C, seguida da adição de 25 g de açúcar cristal após o resfriamento da dissolução a temperatura ambiente (FU et al., 2014).

Posteriormente, 20 g do SCOBY foi transferido para o frasco de vidro com 500 mL da infusão, acompanhado de 5 mL do sobrenadante da cultura prévia da kombucha. Em seguida, o frasco foi tampado com tecido poroso que permitia as trocas gasosas e impedia a contaminação por insetos (FU et al., 2014).

Esse preparo foi guardado em temperatura ambiente em média 25°C, ao abrigo da iluminação solar direta durante 21 dias. As amostras analisadas posteriormente, foram obtidas ao final de sete, 14 e 21 dias.

Antes da realização das análises descritas a seguir, as amostras de kombucha foram filtradas com filtro de celulose.

FIGURA 2- Filtro de celulose



Fonte: Próprio autor, 2022.

3.2 Análise de pH

Foram realizadas análises de pH da kombucha com o auxílio de um pHmetro digital portátil da marca Kasvi (modelo K39-0014PA), aos sete, 14 e 21 dias, com o intuito de monitorar a acidez durante todo o processo de fermentação da bebida.

3.3 Análise do teor alcoólico da kombucha

O teor alcóolico foi medido por meio de um alcoômetro centesimal (Alcoômetro Gay Lussac), da marca Incoterm®, que se destina a determinação do teor alcóolico ou da força real das misturas de água e álcool, indicando somente a concentração de álcool em volume (GOBBI; THEIS, 2012).

A análise foi realizada com o alcoômetro limpo, logo depois, a amostra de kombucha foi homogeneizada, esperou-se ela ficar estática na proveta e foi inserido o alcoômetro. A leitura foi realizada com sete dias de fermentação da kombucha, esse experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Evangélica de Goiás.

FIGURA 3 - Demonstração da leitura do teor alcólico



Fonte: Manual de instruções Incoterm®

FIGURA 4- Avaliação do teor alcoólico da kombucha, utilizando o alcoômetro centesimal (Alcoômetro Gay Lussac), da marca Incoterm®.



Fonte: Próprio autor, 2021

3.4 Ensaio de toxicidade em *Artemia salina* Leach

Primeiramente, antes da realização do ensaio de toxicidade em *Artemia salina*, neutralizou-se a kombucha com KOH, para impedir que o pH ácido interferisse na mortalidade do microcrustáceo. Posteriormente, foi realizado um ensaio em triplicata, afim de verificar a relação concentração-resposta. Foi

utilizado como grupo controle uma água artificial do mar sintética 3,6% de NaCl suplementada com extrato de levedura (6 g.L⁻¹) esterilizada.

O pH foi ajustado à 8,5 com solução de Na₂CO₃ a 0,1 mol.L⁻¹ e o grupo teste com um número de dez larvas de *Artemia salina* Leach. Elas foram transferidas para tubos de ensaios contendo água artificial do mar e a kombucha, em cinco diferentes concentrações (600 µg.mL⁻¹, 60 µg.mL⁻¹, 6 µg.mL⁻¹, 0,6 µg.mL⁻¹ e 0,06 µg.mL⁻¹), sendo que, o volume final de 1 mL foi completado com água artificial do mar e em seguida, prosseguiu-se com a incubação.

Foram realizados o controle positivo da técnica com dicromato de potássio na diluição de 100 µg.mL⁻¹, visto que ele demonstra toxicidade as larvas de *Artemia salina* Leach e o controle negativo da técnica com água artificial do mar.

A contagem dos animais mortos foi realizada após 24h, sendo determinada ainda a CL50, que avalia a concentração que é capaz de matar 50% dos animais expostos.

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana da kombucha

A determinação da atividade antimicrobiana da kombucha foi realizada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme o protocolo recomendado pela Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) para testes de susceptibilidade antimicrobiana por diluição de agentes antimicrobianos em caldo (CLSI, 2016).

Foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 25313), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) mantidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

Os microrganismos foram semeados em meio *Mueller Hinton*, utilizando a técnica de esgotamento e incubados por 24 horas a 37°C. Após este período, três a cinco colônias foram retirados da placa de Petri e

transferidas para um tubo, contendo solução fisiológica, equiparando assim a turbidez da mesma, correspondendo a 0,5 da escala de McFarland. Seguidamente, preparou-se uma diluição 1:10 em solução fisiológica, para obter a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹.

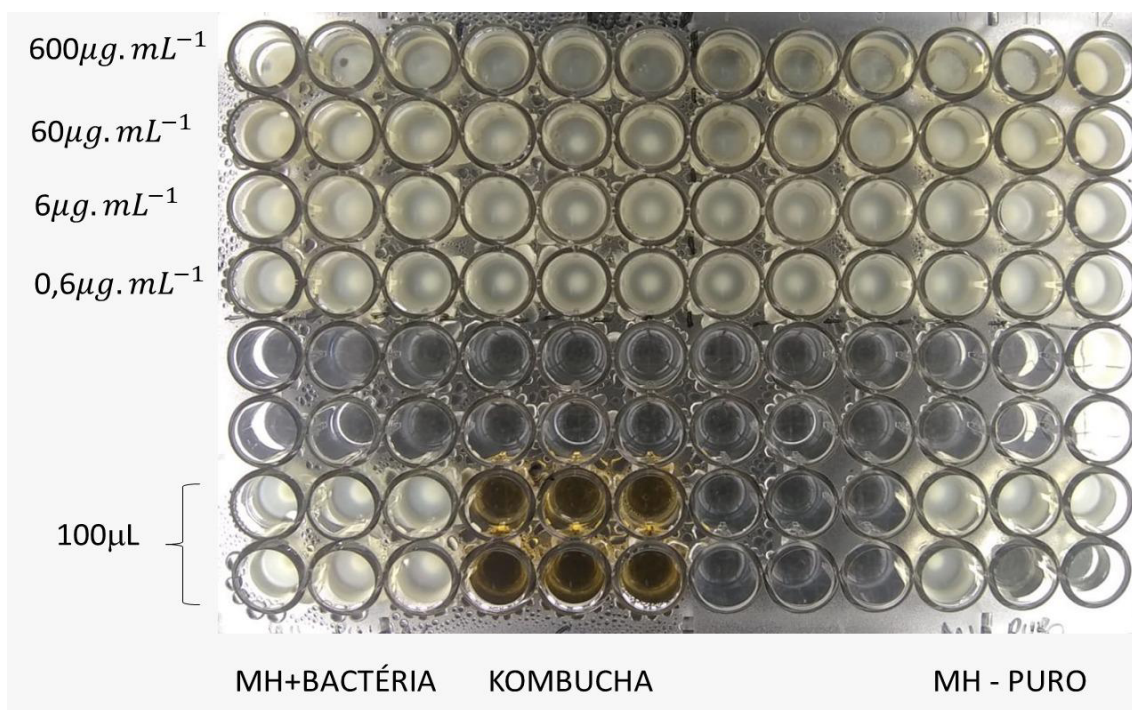
3.5.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Para determinação da CMI, filtrou-se a kombucha em filtro de celulose e em seguida, em uma placa de poliestireno com 96 poços estéril e com tampa, foram pipetados 50 µL, 20 µL, 2 µL e 0,2 µL de kombucha, os quais foram acrescidos com 50 µL, 80 µL, 98 µL e 99,8 µL de caldo Mueller Hinton com os diferentes microrganismos em todos os poços, obtendo-se as diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. Houve exceção, nos poços referentes aos controles da kombucha e do meio de cultura, nos quais foram adicionados 100 µL de kombucha ou 100 µL de caldo Muller Hinton, respectivamente.

A placa foi então incubada em estufa a 37°C, por 24 horas. A análise do crescimento bacteriano ocorreu visualmente, observando a formação de sedimento bacteriano no fundo de cada poço.

Posteriormente, foram realizadas pesagens da kombucha desidratada em estufa bacteriológica e verificou-se as diferentes concentrações para as diluições utilizadas ($600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

FIGURA 5- Avaliação da atividade inibitória da Kombucha contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29213)



Fonte: Próprio autor, 2022

3.5.2 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Para determinação da CMB foram transferidos 100 µL de cada poço sem crescimento bacteriano perceptível a olho nu, para inoculação em placa com ágar *Muller Hinton*. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para a verificação da presença ou ausência de crescimento bacteriano.

3.6 Triagem da atividade antitumoral

Utilizou-se o método adaptado de Mohamed (2016) e Iftkhar et al. (2018). Foram adquiridas batatas (*Solanum tuberosum*) de tamanhos entre 6

e 10 cm, frescas e saudáveis, em um mercado na região central na cidade de Anápolis, Goiás.

No laboratório, as batatas foram lavadas em água corrente, com sabão e bucha esponja multiuso. Logo em seguida, as superfícies das batatas foram desinfetadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, durante 20 minutos. As extremidades da batata foram removidas e estas foram novamente imersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, por mais 10 minutos. De cada batata foi extraído um núcleo cilíndrico de tecido de 10 mm, com auxílio de uma broca metálica estéril. Na extremidade de cada um desses núcleos cilíndricos, foram removidos pedaços de 20 mm, os quais foram descartados.

FIGURA 6 - Batatas adquiridas em um mercado local, limpas e desinfetadas



Fonte: próprio autor, 2021.

Com bisturi estéril, foram retirados discos de 5 mm de espessura do núcleo cilíndrico restante. Posteriormente, os discos foram depositados em placas de Petri contendo ágar- ágar 2%, onde cada placa recebeu três discos para cada diluição da kombucha.

A bactéria *Rhizobium radiobacter* cepa ATCC 4720 foi cultivada em meio ágar Triptona de soja (TSA) por 24 horas e em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana com 1×10^7 UFC.mL⁻¹ e feita uma suspensão 1×10^8 comparado com a escala de McFarland e uma diluição de 1:10 em caldo nutriente e incubado por 48 horas para a inoculação dos discos de batatas.

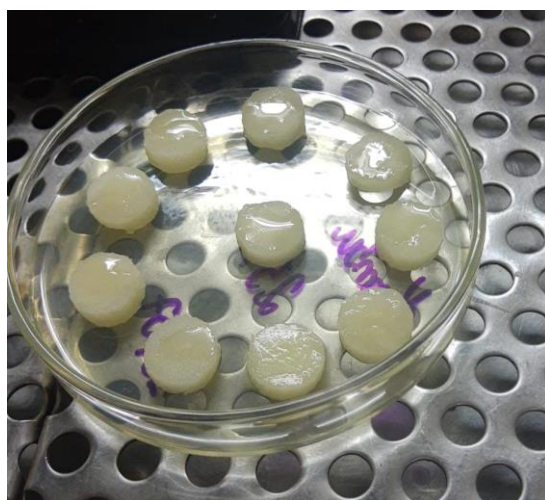
As amostras de kombucha foram diluídas em DMSO 5% nas concentrações de 500 µL, 1000 µL, 1500 µL ou seja 25%, 50% e 75%. Foi realizada a inoculação com a suspensão bacteriana e com a kombucha, com 50 µL nos discos de batatas.

Os discos de batata foram incubados durante 20 dias, a uma temperatura de 25 °C. Após esse período, foi realizada a leitura com uma solução de Lugol (5% I₂ e 10% Iodeto de Potássio). As contagens dos tumores foram realizadas e comparadas com o controle negativo (suspensão bacteriana contendo 5% de DMSO). Os resultados foram apresentados em porcentagem na seguinte fórmula:

$$\frac{100 - \text{Número de tumores encontrados no teste}}{\text{Número de tumores encontrado no controle crescimento}} \times 100$$

Como controle positivo foi usado a Camptotecina, dissolvida em DMSO 5% nas concentrações de 1 µL.mL⁻¹, 10 µL.mL⁻¹, 100 µL.mL⁻¹ e 500 µL.mL⁻¹ na suspensão bacteriana (COKER; WATKINS; SMITH; BRANDT, 2003)

FIGURA 7- Discos de batata com aproximadamente 5mm de espessura, inoculados com a *Rhizobium radiobacter* e com a kombucha.



Fonte: próprio autor, 2021.

FIGURA 8 - Disco de batata corado com solução de lugol a 5%, para contagem de tumores.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.7 Análises Estatísticas

Para o cálculo da CL50, utilizou-se a análise de regressão Probit, no software estatístico IBM SPSS Statistics 20, com intervalo de confiança de 95%. Para analisar os resultados da Concentração Mínima Inibitória obtidos com os extratos, frações e óleo, utilizou-se o teste de ANOVA, no software Action Stat Versão 3.6.331.450, considerando o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Os dados obtidos para os testes de formação antitumoral em disco de batata, foram submetidos a análise estatística, comparando a média obtida pelo teste anova de fator único, com o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do pH

As médias dos valores observados para o pH da kombucha nas triplicatas foram 6,7 e 3,2 para o 1º e 21º dias de fermentação, respectivamente, valores que estão de acordo com o preconizado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Portaria nº 103 de setembro de 2018), que estabelece como valores de pH ideais de 2,5 e 3,5 para que se tenha benefícios para a saúde.

Em trabalho semelhante (FU et al. 2014), foram observados valores próximos aos encontrados neste estudo ao utilizar uma combinação de ervas com 21 dias de fermentação e pH 2,75. A redução de pH observada no decorrer do período de fermentação da kombucha ocorre em razão da formação de ácidos, como o acético e glucônico (GOH et al. 2012), os quais tem sido designado como responsável pelas propriedades funcionais da Kombucha, por isso, a avaliação desse parâmetro é um dos mais importantes na caracterização dessa bebida, pois está intimamente ligado com o processo de fermentação (GOH et al. 2012).

A produção desses ácidos em pH inferiores a 4,2 inibem a propagação da maioria dos microrganismos patogênicos, além de promoverem alterações estruturais dos compostos através de sua atividade antioxidante. Além disso, kombuchas que apresentam pH nessas faixas, não inferiores a 2,0, são consideradas ideais para evitar problemas dentários e gastrointestinais, além de garantir um sabor agradável ao paladar (VILLARREAL-SOTO et al., 2020).

4.2 Análise do teor alcóolico

Durante nosso estudo, foi observada a fermentação da kombucha com chá preto com sete dias de fermentação e foram encontrados valores de teor

alcoólico de 0,0% v/v. Segundo JANG et al. (2021), a kombucha naturalmente fermentada contém de 0 a 3% de álcool por volume.

A kombucha comercializada nos Estados Unidos e Canadá, que apresenta valores menores que 0,5% e 1,1% de álcool por volume, respectivamente, para serem e são consideradas não alcoólicas (CHAN et al., 2020).

No Brasil, na rotulagem da kombucha não alcoólica, somente poderá ser utilizada a expressão “zero % álcool”, “0,0%”, ou similares, no produto que contiver até 0,5% v/v, de álcool (BRASIL,2019).

Alguns estudos relataram produtos de kombucha contendo níveis de álcool acima de 0,5% por volume. Esse maior volume de álcool acarreta algumas preocupações de saúde e segurança associadas a ingestão de bebidas alcoólicas, especialmente entre populações de risco, incluindo as mulheres grávidas, crianças, e pessoas com doença renal, pulmonar ou hepática significativa (TALEBI et al., 2017).

Como os produtos do Kombucha são normalmente vendidos como bebidas não alcoólicas, a presença de qualquer Kombucha com teor alcoólico elevado pode resultar em riscos significativos à saúde para as populações em risco que podem consumir o produto (TALEBI et al., 2017).

Diante aos problemas de saúde associadas ao teor de álcool nas bebidas fermentadas disponíveis ao público, é imperativo que os métodos usados para determinar a concentração de álcool em tais bebidas, tenham passado por um estudo de validação rigoroso que garanta que o método seja preciso e adequado para o fim a que se destina. Na literatura, há registros de vários métodos que são considerados adequados para determinação de álcool em kombuchas, incluindo técnicas enzimáticas, densitométricas e cromatográficas de gás (AOAC, 2012).

As bactérias do ácido acético são microrganismos aeróbicos dominantes na kombucha que utilizam o álcool como substrato para produzir ácido acético. A produção de etanol é realizada pela porção de levedura, o etanol pode ser oxidado em acetaldeído usando a contraparte bacteriana

desta colônia. Durante a produção de etanol, a porção de levedura escolhe a frutose como camada. Existe uma relação dupla entre o ácido acético produzido pela bactéria ácido acético e o etanol. O ácido acético fornecido pelas bactérias do ácido acético podem motivar rapidamente a produção do etanol através da levedura; por outro lado, o etanol pode simplificar a produção de ácido acético e o crescimento de bactérias de ácido acético (HSIAO; LIN; CHEN; CHEN, 2016).

VILLAREAL et al. (2020) notou que as bactérias do ácido acético funcionam para produzir uma nova camada de celulose e metabolizar o etanol para produzir ácidos orgânicos. Desse modo o etanol produzido durante o processo de fermentação pode ser convertido em ácido acético por bactérias de acético.

As bactérias do ácido acético vão reduzir a concentração de etanol como fonte de carbono (BATTIKH; CHAIEB; BAKHROUF; AMMAR, 2013). Um estudo realizado na Polônia observou que a concentração de álcool, até o 7º dia de fermentação atingiu o valor de 3,0%, e uma diminuição para 2,0 % de teor alcoólico (JAKUBCZYK et al., 2020). GAGGIA et al. (2018) também observou um aumento do teor alcoólico do 7º para o 14º dia, indo de 0,64 mg/L para 1,14 mg/L.

Também foi avaliado em um estudo o teor alcoólico de kombuchas comerciais de diferentes sabores, e foi encontrado valores de 0,03% a 1,63% de teor alcoólico. Os autores desse estudo chamaram atenção para produtos com mesmo sabores e lotes, apresentaram teores alcoólicos diferentes (CHAN et al., 2020).

O teor alcoólico encontrado na kombucha, deriva de muitos fatores, como o substrato utilizado para a fermentação, o SCOBY, os dias de fermentação, a luminosidade e a temperatura (CHEN; LIU, 2000).

4.3 Toxicidade em *Artemia salina* Leach

Para análise de toxicidade foi utilizado o bioensaio para determinação de letalidade de *Artemia Salina*, esse teste tem sido usado em muitos grupos de pesquisa, devido a sua eficácia, a facilidade de encontrar os cistos de

Artemia salina no comércio, seu baixo custo e a facilidade da execução da técnica (HYACIENTH; ALMEIDA, 2015).

Os resultados obtidos no teste de toxicidade foram avaliados pelo teste ANOVA (Tabela 2), o qual comparou-se a média entre os dias de fermentação e a concentração de kombucha e observou-se que não houve diferença entre os dias de fermentação ($p= 1$) e nem interação entre os dias de fermentação e a concentração da kombucha ($p= 1$).

TABELA 2- Teste de ANOVA para teste de toxicidade da kombucha em *Artemia salina*

Fonte	GL	SQ	QM	Valor- F	Valor- P
Trat.	6	5,0807	0,8468	4801	<0,0001
Dias	1	0	0	0	1
Trat.: Dias	6	0	0	0	1
Resíduos	28	0,005	0,0002		

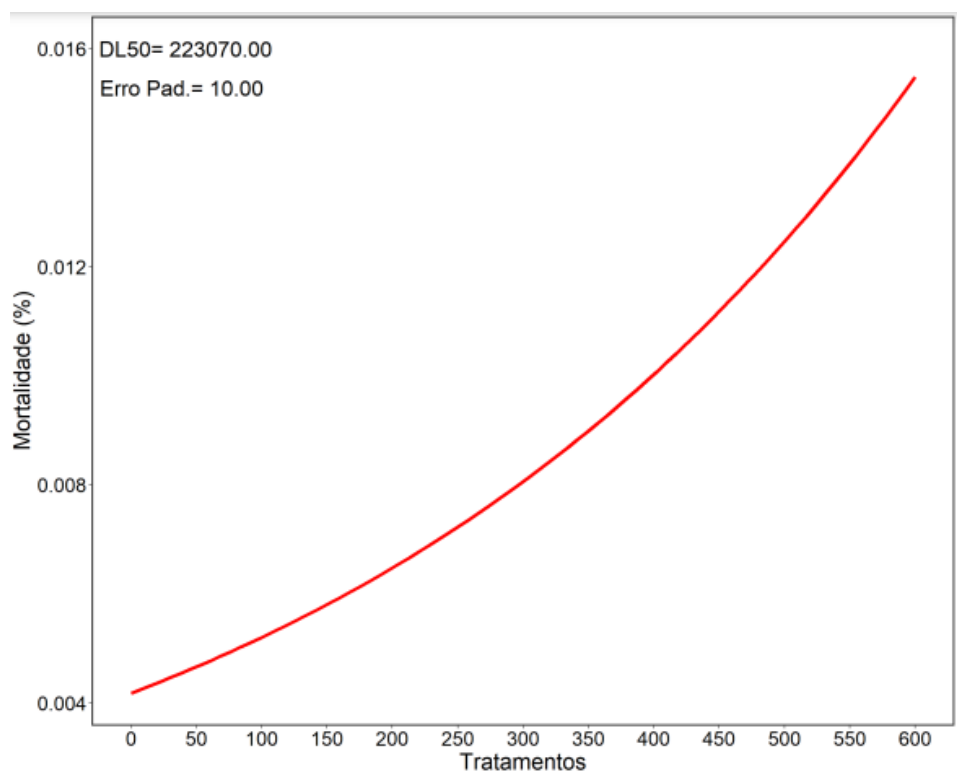
O teste ANOVA demonstrou ainda, uma diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,0001$). As concentrações médias dos tratamentos, por sua vez, foram submetidas ao teste de probit a fim de determinar a concentração letal (CL_{50}) da kombucha (Tabela 3), que de acordo com Meyer e colaboradores (1998), significa a dose necessária de uma substância ou tipo de radiação suficiente para matar 50% da população teste.

TABELA 3- Concentração letal (CL_{50}) da kombucha para *Artemia Salina*

	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	p-Valor
Kombucha	223.070,00	<0.0001

Observa-se que o valor da CL_{50} foi de 223.070,00, portanto, as concentrações avaliadas e mesmo a kombucha integral ($2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) são consideradas atóxicas, ou seja são próprias para o consumo.

FIGURA 9- Determinação da Concentração Letal 50



Segundo os critérios empregados por (DOLABELA et al., 2008) para compostos naturais, a kombucha é classificada como atóxica, pois os autores apresentam as seguintes referências para a CL_{50} quanto a sua toxicidade: menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresenta toxicidade fortes; entre $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ toxicidade moderados; entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresenta baixa toxicidade e CL_{50} maiores de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados atóxicos.

A maioria dos estudos de toxicidade encontrados foram desenvolvidos utilizando testes com camundongos, conforme descrição da pesquisa desenvolvida por Pauline e colaboradores (2001), em que foi fornecido a kombucha por via oral a ratos durante um período de quinze dias, em três dosagens diferentes, uma considerada normal, equivalente a 100 a 200 mL ingeridos por um ser humano adulto, uma dose cinco e dez vezes maiores que essa. Depois desse período, os ratos foram sacrificados e vários parâmetros bioquímicos e histopatológicos foram observados (QUIAO-WON; TEVES, 2018).

Os resultados demonstraram que o efeito da administração oral da kombucha a ratos albinos foi examinado e os resultados indicaram que a

kombucha não tem toxicidade significativa, conforme revelado por vários parâmetros bioquímicos e histopatológicos. Um estudo realizado com chá preto e verde, que também utilizou o teste de toxicidade com *Artemia salina* também apresentou valores muito baixos de CL₅₀ que indica que a kombucha não é tóxica (QUIAO-WON; TEVES, 2018).

Em outro estudo, também utilizando ratos, investigou-se também a toxicidade oral da kombucha por 90 dias. Foram registrados parâmetros como peso corporal, ingestão de ração, ingestão de água, comportamento geral e exames histológicos. E concluiu-se que a alimentação de ratos com kombucha por 90 dias não mostrou quaisquer sinais tóxicos. As variáveis hematológicas e bioquímicas dos ratos estudados estavam dentro dos limites clínicos. O estudo indicou que ratos alimentados com chá de kombucha por 90 dias não mostraram quaisquer efeitos tóxicos (VIJAYARAGHAVAN et al., 2000).

Os estudos analisados corroboram com os resultados encontrados no teste realizado com *Artemia Salina*, que a kombucha não é tóxica, no entanto, alguns aspectos precisam ser analisados como dose, procedência do Scooby, recipiente de armazenamento do chá. Alguns autores, também classifica a kombucha como contraindicada para mulheres grávidas, lactantes e pacientes com HIV positivos, de forma que estudos de toxicidade em humanos ainda são escassos (LUCAK, 2010; JAYABALAN et al., 2014; QUIAO-WON; TEVES, 2018; VERNA;).

4.4 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A microdiluição é um teste quantitativo que permite avaliar qual a concentração mínima necessária de um composto para que aproximadamente 50% das colônias tenham seu crescimento impedido, a avaliação de resultados é feita em duas etapas, a primeira ocorre através da observação da formação de um precipitado branco no fundo do poço, este que indica se a inibição foi o suficiente para o crescimento da bactéria em questão. Quando ele não é formado, se inicia a segunda parte, esta que determina se o composto é bactericida ou bacteriostático, através do teste de CMB (CLSI, 2016) (Figura 7).

TABELA 4 - Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos compostos contra os quatro microrganismos avaliados.

Microrganismos	7 dias	14 dias
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25313)	> 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	> 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	> 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	> 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 29213)	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

A partir dos resultados encontrados no teste de CMI, observa-se que a kombucha apresentou atividade antimicrobiana favorável para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e atividade antimicrobiana baixa para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados estão baseados nos critérios estabelecidos por Holetz e colaboradores (2002) que afirmaram que concentrações em que valores de CMI até 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ desempenham atividade antimicrobiana favorável; CMI entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam atividade antimicrobiana moderada e CMI entre 500 e 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam baixa atividade e CMI acima de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ que não existe atividade antimicrobiana.

Pelos resultados, observa-se também, que a atividade antimicrobiana favorável foi observada tanto em microrganismos Gram-positivos quanto em Gram negativos. Essa eficiência antimicrobiana da kombucha pode ser amplamente atribuída a presença de ácidos orgânicos, em especial o ácido acético, grandes proteínas e catequinas. O ácido acético e as catequinas inibem o crescimento de diversos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000).

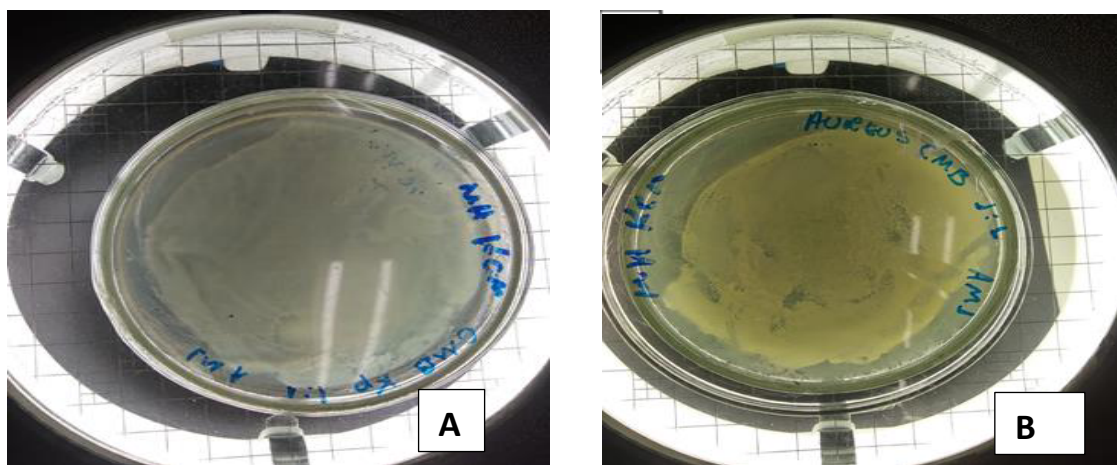
Outros estudos também encontraram a atividade antimicrobiana da kombucha contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo a bactéria *S. aureus* (ANSARI et al., 2017). A fermentação da kombucha em suco de uva tinta, também demonstrou uma atividade antimicrobiana da kombucha. Esses resultados sugerem que a ação antibacteriana não se deve

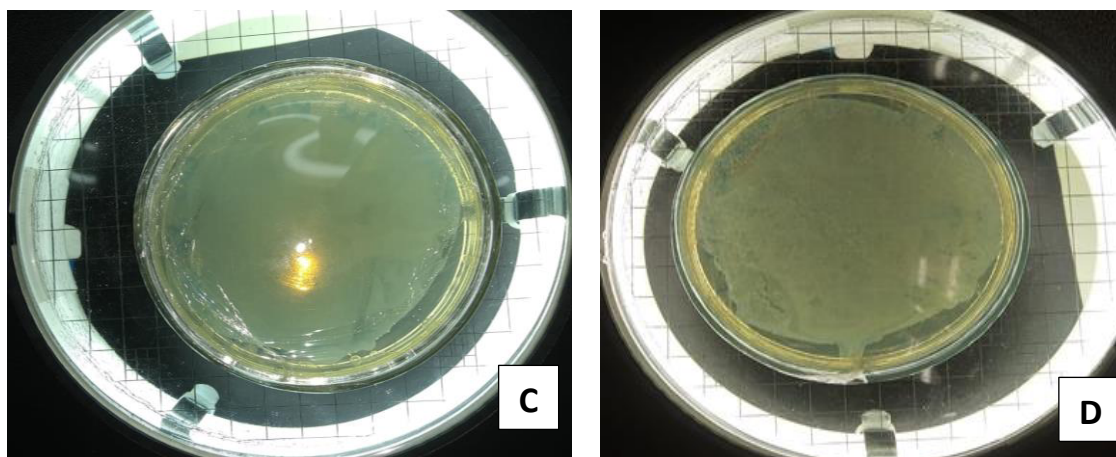
apenas aos polifenóis produzidos durante a fermentação, mas também e principalmente do ácido acético conhecido por ser o principal agente antimicrobiano do chá kombucha, por duas estratégias iniciais: acidificação citoplasmática e acúmulo de do ânion ácido dissociada a níveis tóxicos (AYED; BEN ABID; HAMDÍ, 2017).

4.5 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A partir dos resultados encontrados no teste de CMI, que a kombucha apresentou atividade antimicrobiana favorável somente para *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, portanto, foram utilizadas as menores concentrações do probiótico capaz de inibir o crescimento desses microrganismos ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Conforme demonstrado na (figura 10).

FIGURA 10- Determinação da Concentração Mínima Bacterida da kombucha frente ao *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*





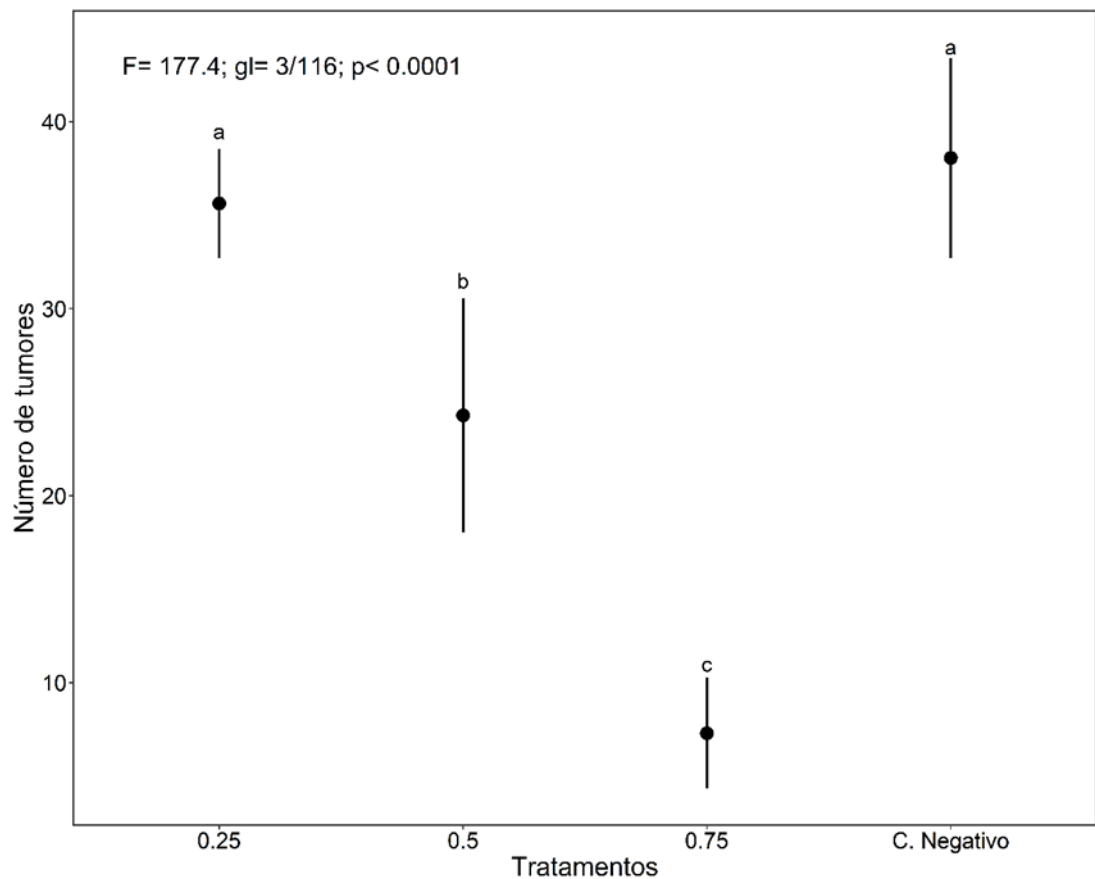
A, B- 7 dias de fermentação da kombucha; **C, D-** 14 dias de fermentação da kombucha

Conforme observado na figura acima, não houve inibição de crescimento para os microrganismos estudados, aos sete e 14 dias de fermentação da kombucha, indicando que as concentrações utilizadas possuem ação bacteriostática, mas não bactericida.

4.6 Bioensaio antitumoral em discos de batata

Os resultados encontrados durante o bioensaio da kombucha em discos de batata foram submetidos ao teste de Anova de fator único, comparando a média entre o grupo controle negativo e diferentes concentrações de kombucha na inibição dos tumores, conforme demonstrado na figura a seguir.

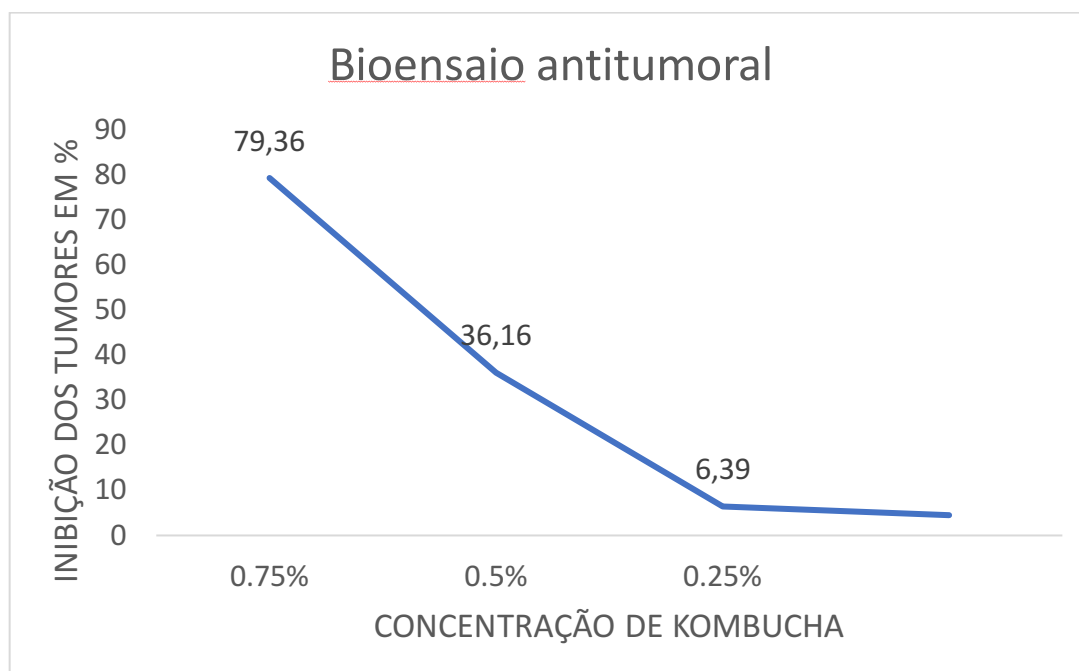
FIGURA 11 – Resultados do teste de variância (Anova) do teste antitumoral em discos de batata



*Leia-se: F= quadrado médio do resíduo do tratamento; GL= grau de liberdade, P= nível de significância do teste.

Observa-se nos resultados apresentados que os dados possuem distribuição homogênea e que houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados ($p < 0,0001$), ou seja, as concentrações de kombucha testadas neste estudo, afetaram o crescimento de tumores nos discos de batata, sugiro que novos testes sejam realizados a posteriori com novas concentrações (Figura 12).

FIGURA 12 – Resultados do bioensaio da kombucha em discos de batata



Conforme demonstrado na Figura 12, foi possível observar a atividade antitumoral da kombucha nos tratamentos estudados. De acordo com Triguí et al. (2013), a atividade antitumoral é significativa quando a diferença é igual ou superior a 20% nos discos com o tratamento em referência aos não tratados (controle). Foram utilizados como controle negativo, o medicamento camptotecina nas concentrações de 100, 10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e em nenhuma dessas concentrações, não houve crescimento de tumores.

Uma possível explicação para esses resultados pode estar baseada nos componentes antiproliferativos ativos que a kombucha possui, conforme demonstrado em alguns estudos, que a kombucha contém dimetil 2 (2-hidroxi-2 metoxipropilideno), malanato e vitexina, que apresentam efeitos citotóxicos em células de carcinoma renal e em osteossarcoma humano, e também reduzem significativamente a invasão celular e a motilidade celular em células de carcinoma de pulmão (CETOJEVIC-SIMIN; BOGDANOVIC; CVETKOVIC; VELICANSKI, 2008; JAYABALAN et al., 2010).

Com base na literatura, muitos pesquisadores concordam que os possíveis mecanismos anticâncer da kombucha se dá através da inibição da proliferação de células cancerosas, indução de apoptose de células

cancerosas e o término da metástase (CONNEY et al., 2002; YOXALL; LOANNIDES 2004; PARK; DONG, 2003).

Em trabalho realizado com o intuito de avaliar o efeito do extrato de chá de kombucha liofilizado, Srihari et al. (2013) observou diminuição significativa da sobrevivência de células de câncer de próstata, regulando negativamente a expressão de estimuladores de angiogênese, como metaloproteinase de matriz, ciclooxigenase-2, interleucina-8, fator de crescimento endotelial e fator de indução humana-1 α .

Vários estudos tem sido realizados sobre a fim de investigar as propriedades anticâncer do chá preto e como o chá kombucha preparado a partir de chá preto (SHIARI et al., 2013; JAYABALAN et al., 2014; MENDONÇA et al., 2020), pois, há muitos anos que se afirmam que a kombucha tem propriedades antitumorais, baseado nas afirmações feitas por seus consumidores e principalmente por um estudo conduzido pela “Unidade Central de Pesquisa Oncológica” e “Academia Russa de Ciências de Moscou” em 1951 (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Dessa maneira, o teste antitumoral em discos de batata, se mostra útil para verificar propriedades conhecidas e novas moléculas antitumorais, já que consiste em verificar as propriedades antitumorais de compostos bioativos biológicos e sintéticos, além disso, possui vantagens por ser um teste rápido, simples e permitir uma confiável pré-triagem antitumoral.

O teste antitumoral em discos de batatas, ainda, é um artifício valioso pois indica a atividade tumoral através da inibição de tumores, sendo que a identificação dos tumores é realizada pelas cepas vivas de *Rhizobium radiobacter*, pois depois da fixação da bactéria e a kombucha, é possível verificar se as formações tumorais, foram inibidas ou não (COKER; WATKINS; SMITH; BRANDT, 2003; INAYATULLAH; IRUM; ATEEQ-UR-REHMAN; FAYYAZ C, 2007).

CONCLUSÕES

- Os valores de pH e de teores alcóolicos encontrados no estudo demonstram o produto está de acordo com a legislação para bebidas fermentadas, considerando que a acidez e o teor alcóolico elevado podem resultar em riscos à saúde;

- No teste de toxicidade foi possível identificar que o chá kombucha não é tóxico, no entanto, é necessário analisar aspectos como procedência do SCOBY, recipiente de armazenamento do chá, entre outros;

- No teste antimicrobiano, apesar da kombucha não apresentar atividade biocida, apresentou atividade bacteriostática, com concentrações inibitórias de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas;

- No ensaio antitumoral, na concentração de 75%, a kombucha apresentou uma inibição de 79,36% na formação de tumores;

- Os resultados apresentados neste trabalho, demonstram que a ingestão do chá kombucha é segura como alimento funcional, proporcionado benefícios para a saúde, seu baixo custo e facilidade de produção podem gerar um importante probiótico. Nesse estudo foi possível observar que a kombucha não apresenta toxicidade, tem um importante efeito antimicrobiano e pode exercer um poder antitumoral. Porém, destaca-se a necessidade de novos estudos que possibilitem verificar seu consumo como seguro para gestantes e pessoas imunocomprometidas.

REFERÊNCIAS

AKAGAWA, S.; TSUJI, S.; ONUMA, C.; AKAGAWA, Y., YAMAGUCHI, T.; YAMAGISHI, M.; et al. Effect of delivery mode and nutrition on gut microbiota in neonates. **Nutrition and metabolism.**, v. 74, n. 2, p. 132-139, 2019. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30716730/> DOI: 10.1159 / 000496427.

ALLOULOU, A.; HAMDEN, K.; ELLOUMI, D.; ALI, M. B.; HARGAFI, K.; JAOUADI, B.; AYADI, F.; ELFEKI, A.; ANMAR, E. Propriedades hipoglicêmicas e antilipidêmicas do chá kombucha em ratos diabéticos induzidos por aloxana. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 12, p. 63. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22591682/> Doi: 10.1186 / 1472-6882-12-63

AMARASEKARA, A. S.; WANG, D.; GRADY, T. L. A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. **Sn Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 10-20, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s42452-020-1982-2>.

ANSARI, M. A.; PEDERGNANA, V.; IP, C. L. C.; MAGRI, A.; VON DELFT, A.; BONSALL, D.; CHATURVEDI, N.; BARTHA, I.; SMITH, D. Genome-to-genome analysis highlights the effect of the human innate and adaptive immune systems on the hepatitis C virus. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 49, n. 5, p. 666-673, 10 abr. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3835>.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (**AOAC**). 2007. Official Methods of Analysis. 18th ed. Gaithersburg, M. D. USA.

AYED, L., BEN ABID, S. & HAMDY, M. Desenvolvimento de uma bebida a partir de suco de uva tinto fermentado com o consórcio Kombucha. **Ann Microbiol.**, v. 67, p. 111-121, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana: parte 1. **Revista Digital de Nutrição**, v. 2, n. 3, p. 1-26, 2008. Disponível em: https://www.academia.edu/10911513/ALIMENTOS_PROBI%C3%93TICOS_APLICA%C3%87%C3%95ES_COMO_PROMOTORES_DA_SA%C3%9ADE_HUMANA PARTE 1 PROBIOTICS FOODS APPLICATION AS THE PROMOTERS OF THE HUMAN HEALTH PART 1

BANERIEE, D.; HASSARAJANI, S. A.; MAITY, B.; NARAYAN, G.; BANDYOPADHYAY, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. **Food Function.**, v. 1, p. 284-293, 2010.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21776478/>. DOI: [10.1039 / c0fo00025f](https://doi.org/10.1039/c0fo00025f).

BARROS, D.M.; SILVA, J.H.L.; LEITE, R.R.; FREITAS, T.S.; SILVA, M.M.; COSTA, M.A.; et al. A importância do consumo de probióticos e prebióticos para a saúde: uma revisão / A importância do consumo de probióticos e prebióticos para a saúde: uma revisão. **Brazilian Applied Science Review**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 54-63, 2022. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BASR/article/view/42905>. Acesso em: 20 abr. 2022.

BATTIKH, K.; CHAIEB, A.; BAKHROUF, E.; AMMAR, M. Atividades antibacterianas e antifúngicas de chás de kombucha pretos e verdes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 231 – 236, 2013.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2009. Disponível em: https://www.sped.pt/images/sped/GE/GE_2009/1janfev2009/v16n1a03

BELLASSOUED, K.; GHRAB, F.; MAKNI-AYADI, F.; VAN PELT, J.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25856715/> DOI: 10.3109/13880209.2014.1001408.

BHATTACHARYA, P.; FROST, T.; DESHPANDE, S.; BATEN, M. Z.; HAZARI, A. A.; BHATTACHARYA, B. et al. **Physical Review Letters**, v. 117, n. 2, p. 629-702 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27447533/> DOI: [10.1103 / PhysRevLett.117.029702](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.117.029702).

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, C. P. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328-340, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23907022/> DOI: 10.1016 / j.fct.2013.07.051.

BODE, L.; JANTSCHER-KRENN, E. Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. **Advances In Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 383-391, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3945/an.111.001404>.

BODE, L. The functional biology of human milk oligosaccharides. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 619-622, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>.

BOSTAN, K.; ALCAY, A. U.; YALÇIN, S.; VAPUR, U. E.; NIZAMLIOGLU, M. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional cone yoghurt. **Food Science and Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1625-1632, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-017-0222-z>.

BRASIL, Decreto Nº.8.851, Dispões sobre o Padrão de Identidade e Qualidade da kombucha em todo território nacional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.p.13, Seção 01,2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>. Acesso em: 17 set. 2019

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, n. 8, p. 5-26, nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 64 de 14 de maio de 2018. **Projeto de Instrução Normativa que visa estabelecer em todo território nacional os Padrões de Identidade e Qualidade de Kombucha**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder executivo, Brasília, DF, 21 jun. 2018. BRASIL.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder executivo, Brasília, DF, 29 mar. 2017.

BRITO, A. B.; FERRAZ, R. R. N. Importância dos probióticos no equilíbrio da microbiota intestinal de recém-nascidos: síntese de evidências. **Revista Saúde em Foco** – Edição nº 11 – Ano: 2019. Disponível em: https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/09/070_IMPORT%C3%82NCIA-DOS-PROBI%C3%93TICOS-NO-EQUIL%C3%82BRIO-DA-MICROBIOTA-INTESTINAL-DE-REC%C3%89M-NASCIDOS-S%C3%8DNTSESE-DE-EVID%C3%82NCIAS

BRUCSHI, J. S.; SOUSA, E.; MODESTO, C. S. K. R. O Ressurgimento do Chá de Kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 1 (Esp.), p. 162-168, 2018. Disponível em: <https://revistasfasesa.senaaires.com.br/index.php/iniciacao-cientifica/article/view/68>

CALAÇA, P. R. A.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. F.; MARIA, T. H. C. Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [online], v. 37, n. 6, p. 587-592, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/x5SQ9W8Yx7hDxX9cyJ6MznQ/abstract/?lang=pt#DOI.org/10.1590/S0100-736X2017000600009>

CETOJEVIC-SIMIN, D. D.; BOGDANOVIC, G. M.; CVETKOVIC, D. D.; VELICANSKI, A. S. Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 13, n. 3, p. 395-401, 2008.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63-72, 2015.

CHAN, J. F.; YUAN, S.; KOK, K.; TO, K. K.; CHU, H.; YANG, J.; XING, F.; LIU, J.; YIP, C. C.; POON, R. W. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30154-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30154-9).

CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial CLSI supplement M100S** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

COKER, A. L.; WATKINS, K. W.; SMITH, P. H.; BRANDT, H. M. Social support reduces the impact of partner violence on health: application of structural equation models. **Preventive Medicine**, v. 37, n. 3, p. 259-267, 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-7435\(03\)00122-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-7435(03)00122-1).

DAVENPORT, E. R.; SANDERS, J. G.; SONG, S. J.; AMATO, K. R.; CLARK, A. G.; KNIGHT, R. The human microbiome in evolution. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 127, 2017. Disponível em: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0454-7> <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0454-7>

DINAN, T. G.; STANTON, C.; CRYAN, J. F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 720-726, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23759244/> DOI: 10.1016 / j.biopsych.2013.05.001. DOI: 10.1080/19476337.2017.1410499

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; NASCIMENTO, J. M.; PERES, J. M.; WAGNER, H.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Phytomedicine**, v. 15, p. 367–372, 2008.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Chá, Kombucha e saúde: uma revisão. **Food research international**, v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.

DUTTA, H.; PAUL, S. K. Kombucha drink: production, quality, and safety aspects. **Production and Management of Beverages**, p. 259-288, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815260-7.00008-0>.

FAGUNDES, R. A. B.; SODER, T. F.; GROKOSKI, K. C.; BENETTI, F.; MENDES, R. H. Os probióticos no tratamento da WHO. Joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of insuficiência renal crônica: uma revisão sistemática. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** São

Paulo, v. 40, n. 3, p. 278-286, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbn/a/kDZzVVfpwHyWT8QCNNgSSgD/?lang=pt&format=pdf>

FAO/ probiotics in food. **World Health Organization** London, Ontario, Canada, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>.

FAO/ World Health Organization (WHO). **Report of a joint FAO/WHO** expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. October 2001, Córdoba, Argentina. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T.; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. 513-524, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.19964. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19964>. Acesso em: 20 jun. 2022.

FU, C.; YAN, F.; CAO, Z.; XIE, F.; LIN, J. Atividade antioxidante da kombucha preparada a partir de três substratos diferentes e alterações no conteúdo de probióticos durante o armazenamento. **Food Sci. Technol.**, v. 34, n. 1, p.123-126, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000100018&lng=en&nrm=iso

GAGGIÀ, F., BAFFONI, L., GALIANO, M., NIELSEN, D.S., JAKOBSEN, R.R., CASTRO-MEJÍA, J.L. Bebida Kombucha de chás verde, preto e rooibos: um estudo comparativo analisando microbiologia, química e atividade antioxidante. **Nutrientes**, v. 11, n. 1, p. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

GALLEGOS, A. M. A.; HERRERA, C. S.; PARRA, R.; KESHAVARZ, T.; IQBAL, H. M. N. Bacterial cellulose: a sustainable source to develop value-added products. A review. **Bio Resources**, v.11, n. 2, p. 5641-5655, 2016. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.11.2.Gallegos>.

GOBBI, D.L; THEIS, A. V. Determinação do teor alcoólico de bebidas destiladas por um destilador automático. **Anais...** Associação Brasileira de Química. Recife, out. 2012. Disponível em: Acesso em: 02 ago. 2021.

GOH, W. N.; ROSMA, A.; KAUR, B.; FAZILAH, A.; KARIM, A. A.; BHAT, R. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 109, 2012.

GREENWALT, C. J.; LEDFORD, A.; RASTEINKRAUS, K. H. Determinação e caracterização da atividade antimicrobiana do chá fermentado kombucha.

Food Science and Technology, v. 31, p. 291 – 296, 1998.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100414>

HOLETZ, F. B.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; GARCIA CORTEZ, D. A.; PALAZZO MELLO, J. C.; NAKAMURA, C. V. Efeito de extratos de plantas utilizadas na medicina popular no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivada em meio definido. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 24, p. 657-662, 2020. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/2500>. Acesso em: 21 abr. 2021.

HSIAO, H.; LIN, S.; CHEN, L.; CHEN, H. Effect of Antimicrobial Activity Achieved by Time Differential Releasing of Nisin and Chitosan Hydrolysates from Bacterial Cellulose. **Journal Of Food Science**, v. 81, n. 5, p. 1184-1191, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13295>.

HYACIENTH, D.C.; ALMEIDA, S.S.M.S. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra*. **Prebióticos e a Microbiota Intestinal**, p. 1-32, 2013. Disponível em: <https://ilsibrasil.org/publication/probioticos-prebioticos-e-a-microbiota-intestinal/>

IFTIKHAR, I. H.; ROLAND, J. Obesity Hypoventilation Syndrome. **Clinics in chest medicine**, v. 39, n. 2, p. 427–436, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.01.006>

INAYATULLAH, S.; IRUM, R.; ATEEQ-UR-REHMAN, M.; FAYYAZ C. B. M. Avaliação biológica de algumas espécies de plantas selecionadas do Paquistão. **Biologia Farmacêutica**, v. 45, n. 5, p. 397-403, 2007.

JAKUBCZYK, K.; KAŁDUNSKA, J.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 447, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9050447>.

JANG, S. S.; MCINTYRE, L.; CHAN, M.; BROWN, P. N.; FINLEY, J.; CHEN, S. X. Ethanol Concentration of Kombucha Teas in British Columbia, Canada. **Journal Of Food Protection**, v. 84, n. 11, p. 1878-1883, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4315/jfp-21-130>.

JAYABALAN, R.; MALINI, K.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN K., YUN, S. E. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 843-7, 2010.

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

<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.1207>
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

KLEEREBEZEM M.; BINDA S.; BRON P.A.; GROSS G.; HILL C.; VAN HYLCKAMA Vlieg J.E.; LEBEER S.; SATOKARI R.; OUWEHAND A.C.; Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. **Current Opinion in Biotechnology**; v. 56, p. 55-60,2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30296737/> doi: 10.1016/j.copbio.2018.09.007

LATVALA, S.; MIETTINEN, M.; KEKKONEN, R. A.; KORPELA, R.; JULKUNEN, I. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 165, p. 94-103, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21545585/>
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04408.x>

LAUREYS, D.; BRITTON, S. J.; DE CLIPPELEER, J. Kombucha tea fermentation: a review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 3, p. 165-174, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03610470.2020.1734150>
<https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, J. H.; ESCALANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018. Disponível em: <https://pure.udem.edu.mx/en/publications/a-review-on-health-benefits-of-kombucha-nutritional-compounds-and>

LEVY, M.; KOLODZIEJCZYK, A. A.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Disbiosis and the immun system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219-232, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28260787/> DOI: doi: 10.1038 / nri.2017.7.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.147.3659.747> DOI: 10.1126 / science.147.3659.747

LONČAR, E.; JURIĆ, M.; MALBAŠA, R.; KOLAROV, R.; KLAŠNJA, M. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 3, p. 186-192, 2006.

MATOS, P.M.S. **Probióticos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Integrada) Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2010, 97f.

MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A.C.; ANA, L. A. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Revista Brasileira**

de **Geriatrics e Gerontologia**, v. 19, n. 03, p. 507-519, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-98232016019.150140>.

MOMBELLI, B.; GISMONDO, M. R. The use of probiotics in medical practice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 531-536, 2000.

MENDONÇA, G.R.; PEREIRA, A. L. F.; FERREIRA, A. G. N.; SANTOS NETO, M.; DUTRA, R. P.; ABREU, V. K. G. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E EFEITOS ANTIMICROBIANOS DA KOMBUCHA: revisão da evidência científica. **Revista Contexto & Saúde**, [S.L.], v. 20, n. 40, p. 244-251, 4 nov. 2020. Editora Unijui. <http://dx.doi.org/10.21527/2176-7114.2020.40.244-251>

NUMMER B. A. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: risk analysis and processing guidance. **Journal Environ Health**, v. 76, n. 4, p. 8-11. 2013.

PAKRAVAN, N.; MAHMOUDI, E.; HASHEMI, S.; KAMALI, J.; HAJIAGHAYI, R.; RAHIMZADEH, M.; MAHMOUDI, V. Cosmeceutical effect of ethyl acetate fraction of Kombucha tea by intradermal administration in the skin of aged mice. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, Ed. 6, p.1-9 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29152918/> DOI: [10.1111 /jocd.12453](https://doi.org/10.1111/jocd.12453)

PANIGRAHI, P.; PARIDA, S.; NANDA, N. C.; SATPATHY, R.; PRADHAN, L.; CHANDEL, D. S.; BACCAGLINI, L.; MOHAPATRA, A.; MOHAPATRA, S. S.; MISRA, P. R. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 407-412, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature23480>.

PAULINE, T.; DIPTI, P.; ANJU, B.; KAVIMANI, S.; SHARMA, S. K.; KAIN, A. K.; SARADA, S. K.; SAIRAM, H.; ILAVAZHAGAN, L.; DEVENDRA, K.; SELVAMURTHY, W. Estudos sobre toxicidade, propriedades antiestresse e hepatoprotetoras do chá de kombucha. **Biomed Environ**, p. 14, p. 207-213, 2001. Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11723720/>

PERPETUO, J. P.; WILASCO, M. I. A.; SCHNEIDER, A. C. R. The role of intestinal microbiota in energetic metabolism: new perspectives in combating obesity. **Clinical and Biochemistry Research**, v. 35, n. 4, p. 224, 2015.

PIARD, J. C.; LOIR, Y. L.; POQUET, I.; LANGELLA, P. Utilização das bactérias lácticas no centro dos novos desafios. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - Encarte Especial. p. 80- 88, 2005. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. **Produção de Kombucha se multiplica no Brasil**. [S. l.], 30 out. 2018. Disponível em: <https://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/producao-de-kombucha-semultiplica-no-brasil-177446>. Acesso em: 14 nov. 2019.

QUIAO-WON, M. E.; TEVES, F. G. Characteristics of Kombucha Fermentation from Different Substrates and Cytotoxicity of Tea Broth. **Sustainable Food**

Production, [S.L.], v. 4, p. 11-19, dez. 2018. SciPress Ltd. <http://dx.doi.org/10.18052/www.scipress.com/sfp.4.11>.

RODRIGUES, R. S.; MACHADO M. R. G.; BARBOZA G. G. R.; SOARES L. S.; HEBERLE T.; LEIVAS Y. M. Características físicas e químicas de kombucha à base de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*, L.). **Anais... 6º Simpósio de Segurança Alimentar**, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas- RS, 2018. Disponível em: http://www.schenautomacao.com.br/ssa/envio/files/83_arqnovo.pdf

ROSSETO, F. G; MIKCHA, J. M. G. Potencial antibacteriano do chá kombucha e sua associação com sorbato de potássio sobre bactérias de interesse em alimentos. 27º Encontro Anual de Iniciação Científica. **Anais da Universidade Estadual de Maringá**, 2018. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2018/anais/artigos/2703.pdf>

SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Tocantins, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006. doi: 10.1590/S1516- 93322006000100002

SANTOS, R.; VARAVALHO, M. A importância de probiótico para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, n. 1, p. 40-49, 2011.

SANTOS, W. C. R; COSME, D. B; LACERDA, I. A. C. Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto. 69ª Reunião Anual da SBPC - 16 a 22 de julho de 2017 – **Anais da UFMG - Belo Horizonte/MG 5.07.01 - Ciência e Tecnologia de Alimentos/ Ciência de Alimentos**. Disponível em: http://www.sbpnet.org.br/livro/69ra/resumos/resumos/3112_197ceb2d1c03053d187fae353c9a8273d.pdf.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.

SOKOL, C.; R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUSHI, C. T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; V. The Potential of Probiotics: A Review. The Potential of Probiotics. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010. Disponível em: <https://www.ftb.com.hr/archives/59-volume-48-issue-no-4/119-the-potential-of-probiotics-a-review>

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589-2594, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf991333m>.

SRIHARI, T.; KARTHIKESAN, K.; ASHOKKUMAR, N.; SATYANARAYANA, U. Eficácia anti-hiperglicêmica da kombucha em ratos induzidos por estreptozotocina. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1794-1802, 2013.

STÜRMER, E. S.; CASASOLA, S.; GALL M. C. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 27, n. 4, p. 264-274, 2012. Disponível em: http://biomepharma.com.br/files/bxdxshyew_596.pdf

TALEBI, M.; FRINK, L. A.; PATIL, R. A.; ARMSTRONG, D. W. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 4062-4067, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-017-0980-5>.

TAO KOMBUCHA. **Tao Kombucha**. [S. l.], 2014. Disponível em: <https://www.taokombucha.com/>. Acesso em: 15 nov. 2019.

TRIGUI, F.; PIGEON, P.; JALLELI, K.; TOP, S.; AIFA, S.; ELARBI, M. Selection of a suitable disc bioassay for the screening of anti-tumor molecules. **International Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 4, p. 230 – 236, 2013.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5441020> DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

VELICANSKI, A. S.; CVETKOVIC, D. D.; MARKOU, U. S.; SAPONJAC, V. T. T.; VULIC, J. J. Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904315/> DOI: [10.17113 / ftb.52.04.14.3611](https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3611)

VAUTHEY, J.N., LAUWERS, G.Y., ESNAOLA, N.F., DO KA, BELGHITI, J., MIRZA, N., CURLEY, S.A., ELLIS, L.M., REGIMBEAU, J.M., RASHID, A., CLEARY, K.R, NAGORNEY, D.M. Simplified Staging for Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 6, p. 1527-1536, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2002.20.6.1527>

VERNA, E. C.; LUCAK, S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 3, n. 5, p. 307-319, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1756283x10373814>.

VIEIRA, E.P; PINTO, O. G.; MORAIS, K.; SANTANA, E. S. ANÁLISE DAAÇÃO DA KOMBUCHA E SUAS PROPRIEDADES. Enciclopédia Biosfera: Centro Científico conhecer, [S.L.], v. 18, n. 38, p. 6, 30 dez. 2021. Centro Científico Conhecer. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2021d4. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2021D/analise.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2022.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SINGH, M.; RAO, P.V.; BHATTACHARYA, R.; KUMAR, P.; SUGENDRAN, K.; KUMAR, O.; PANT, S.C.; SINGH, R. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. **Biomed Environ Sci.**, v. 13, n. 4, p. 293-299, 2000.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BOUAJILA, J.; PACE, M.; LEECH, J.; COTTER, P. D.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P.; BEAUFORT, S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **Journal of Food Microbiology**, v. 16, n. 333, p. 108-178, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32731153/> DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778

VINA, I.; SEMJONOV, P.; LINDE, R.; DENINA, I. Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 2, p. 179-188, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2013.0031>.

VITIATO, J. A.; BENINCÁ, S. C.; MAZUR, C. E. Relação entre microbiota intestinal e obesidade: efeito do uso de probióticos – uma revisão de literatura. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 1, p. 01-10, 2022. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/75832>.

WAGNER, N. R. F.; ZAPAROLLI, M.R.; CRUZ, M.R.R.; SCHIEFERDECKER; M.E.M; CAMPOS, A.C.L. Mudanças na microbiota intestinal e uso de probióticos no pós-operatório de bypass gástrico em y-de-roux e gastrectomia vertical sleeve: uma revisão integrativa. **ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 31, n. 4, p. 1400, 2018.

WANG, Y.; JI, B.; WU, W.; WANG, R.; YANG, Z.; ZHANG, D. TIAN, W. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the Science of food and Agriculture**, v. 94, ed. 2, p. 265-272, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23716136/>. DOI: 10.1002 / jsfa.6245.

WGO. World gastroenterology organization practice guideline: probiotics and prebiotics. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 1, p. 33-42, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajg.2009.03.001>.

YOXALL, V.R.; PARKER, D.A.; KENTISH, P.A.; LOANNIDES, C. A ingestão de chá preto a curto prazo modula a excreção de mutagênicos urinários em ratos tratados com 2-amino-3- metilimidazo-[4,5-F] Quinolina (IQ):Papel da regulação positiva do CYP1A2. **Archives of Toxicology**, v. 78, p. 477-482, 2004.

ZION MARKET RESEARCH, 2018. Disponível em: http://www.zionmarketresearch.com/sample/kombucha-market?utm_source=kavita&utm_medium=ref&utm_campaign=Zion+Market+Research.