

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**KOMBUCHA E SEUS DERIVADOS DESIDRATADOS E
LIOFILIZADOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA
E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE “*IN VIVO*”**

DÉBORA CORREIA SANTANA

VILA VELHA-ES
JULHO/2021

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**KOMBUCHA E SEUS DERIVADOS DESIDRATADOS E
LIOFILIZADOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA
E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE “*IN VIVO*”**

Dissertação apresentado à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Vegetal
para a obtenção do título de Mestra
em Biotecnologia Vegetal.

DÉBORA CORREIA SANTANA

VILA VELHA-ES
JULHO/2021

S232k

Santana, Debora Correia.

Kombucha e seus derivados desidratados e liofilizados :
caracterização físico-química, microbiológica e avaliação de
toxicidade "*in vivo*" / Debora Correia Santana. – 2021.
51 f. : il.

Orientadora: Christiane Mileib Vasconcelos.

Dissertação (Biotecnologia vegetal) – Universidade Vila
Velha 2021.

Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia vegetal. 2. Fermentação. 3. Bactérias.
I. Vasconcelos, Christiane Mileib. II. Universidade Vila Velha
III. Título.

CDD 660.603

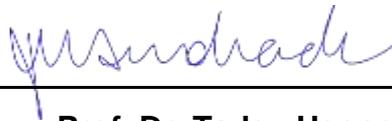
DÉBORA CORREIA SANTANA

**KOMBUCHA E SEUS DERIVADOS DESIDRATADOS E
LIOFILIZADOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VIVO*.**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia
Vegetal para a obtenção do grau de
Mestra em Biotecnologia Vegetal.

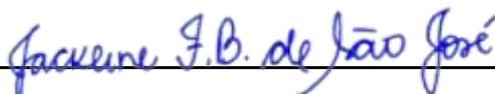
Aprovada em 28 de julho de 2021.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade

Universidade Vila Velha



Profª. Drª. Jackline Freitas Brilhante de São José

Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Christiane Mileib Vasconcelos.

Orientadora

Universidade Vila Velha

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

(LOUIS PASTEUR)

AGRADECIMENTOS

A Deus porque sem Ele nada sou e por ter me concedido saúde, força e disposição para conseguir concluir essa dissertação e dado saúde a meus familiares. Por ter tranquilizado o meu espírito nos momentos mais difíceis da minha trajetória acadêmica. Não foram anos fáceis então a Ele me rendo totalmente pelas graças.

Agradeço a minha orientadora Christiane Mileib. Obrigada, você é meu exemplo. Obrigada por exigir de mim muito mais do que eu imaginava ser capaz de fazer. Manifesto aqui a minha gratidão eterna por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência.

A Fabiany e Kellen, IC's que se tornaram amigas, e ressalto que sem elas eu não teria conseguido chegar até aqui. Vocês foram fundamentais para o resultado, e é gratificante ver os seres humanos formidáveis que se tornaram nessa caminhada e profissionais que estão se formando. A Clarisse Máximo por toda paciência, amizade e gargalhadas durante as infinitas análises microbiológicas, você me marcou com sua bondade e lealdade. A Lêda Carneiro pelo auxílio nos testes "*in vivo*" e por compartilhar comigo tudo que sabe seus infinitos conselhos a mim dados. Estendo também o meu obrigada ao Labcardio e ao Prof. Tadeu que cedeu o espaço para que fosse concluídos os testes.

Ao meus pais por respeitarem minhas ausências, minhas falhas e esquecimentos durante essa jornada. Tudo que eu faço é para deixar vocês orgulhos. As minhas irmãs pela amizade e entendimento.

À Universidade Vila Velha que me forneceu ambiente estruturado para minhas pesquisas e estudos. Aos laboratórios que transitei e amigos que me ajudaram.

Por fim a mim mesma. É realizador perceber o quanto cresci e desenvolvi valores e conhecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 A bebida Kombucha	13
1.2 Benefícios à saúde	15
1.3 Comercialização da Kombucha	16
1.4 Técnicas de secagem de alimentos	18
2. REVISÃO EM BASES DE PROPRIEDADE INTELECTUAL	21
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Materiais.....	22
4.2 Delineamento Experimental	22
4.3 Preparo da infusão de chá verde e da bebida Kombucha.....	23
4.4 Desidratação da SCOBY e precipitado de Kombucha	23
4.5 Análises físico-químicas do chá e bebida de Kombucha	24
4.5.1 Determinação do pH	24
4.5.2 Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix)	24
4.5.3 Determinação da acidez total titulável	24
4.5.4 Determinação de turbidez	25
4.6 Determinação dos compostos bioativos do chá e bebida de Kombucha ...	25
4.6.1 Preparo dos extratos	25
4.6.2 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais	25
4.6.3 Determinação da atividade antioxidante.....	25
4.7 Análises microbiológicas da bebida Kombucha e seus desidratados	26
4.8 Avaliação da toxicidade por <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
4.8.1 Preparo da cepa de <i>Caenorhabditis elegans</i> para sincronização	27
4.8.2 Tratamento da cepa de <i>C. Elegans</i>	28
4.8.3 Avaliação da mortalidade e desenvolvimento dos <i>C. Elegans</i>	29
4.9 Análise estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30

5.1 Caracterização físico-química e de compostos bioativos do chá e bebida de Kombucha	30
5.2 Caracterização microbiológica da bebida de Kombucha e seus derivados	33
5.3 Toxicidade pelo <i>C.elegans</i>	37
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

SANTANA.CORREIA, DÉBORA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Julho de 2021. **Kombucha e seus derivados desidratados e liofilizados: caracterização físico-química, microbiológica e avaliação de toxicidade *in vivo***. Orientador: Christiane Mileib Vasconcelos.

A SCOBY de Kombucha é um biofilme composto por um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras, que é uma sigla em inglês que significa “*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*”. A SCOBY pode deteriora-se e ocasionar a perda dos atributos nutricionais, bioativos e sensoriais de interesse da bebida, comprometendo também o tempo de vida útil, e que podem ser evitados por meio das técnicas de secagem, auxiliando no aumento de “*Shelf life*”, preservando os compostos ação de seus constituintes, qualidade e segurança alimentar. Considerando esses fatores, o objetivo do trabalho foi avaliar o impacto da desidratação e da liofilização nas características físico-químicas, microbiológicas e toxicidade da SCOBY seca e bebida de Kombucha. Foram realizadas análises de pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, turbidez, teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, análises microbiológicas e toxicidade. Todas as análises foram avaliadas estatisticamente considerando o nível de 5% de probabilidade e utilizando o software SAS. O chá e as bebidas de Kombucha apresentaram resultados físico-químicas de acordo com os parâmetros analíticos para uma produção segura ao consumo e quantidade consideráveis de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Para os derivados de Kombucha desenvolvidos, contagem de microrganismos que variaram de 10^4 a 10^8 UFC.ml⁻¹. Para os testes “*in vivo*” com *C. elegans* não houve mortalidade e notou-se maior crescimento dos vermes alimentados com os produtos fermentados. Nesse sentido, foram obtidos produtos derivados da SCOBY de Kombucha com potencial inovador, elevada contagem microbiológica e seguros para consumo humano.

Palavras-chaves: SCOBY, Kombucha, Fermentação, Biofilme, Secagem.

ABSTRACT

SANTANA.CORREIA, DÉBORA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, July 2021.
Kombucha and its dehydrated and lyophilized results: physicochemical, microbiological characterization and in vivo toxicity assessment. Advisor: Christiane Mileib Vasconcelos.

SCOBY de Kombucha is a biofilm composed of a symbiotic consortium of bacteria and yeast, which is an acronym in English that means “Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast”. SCOBY can deteriorate and cause the loss of the beverage's nutritional, bioactive and sensory attributes of interest, also compromising the shelf life, which can be avoided through drying techniques, helping to increase the “Shelf life”, preserving the compounds action of their constituents, quality and food safety. Considering these factors, the objective of this work was to evaluate the impact of dehydration and lyophilization on the physicochemical, microbiological and toxicity characteristics of dry SCOBY and Kombucha beverage. Analyzes of pH, total soluble solids, total titratable acidity, turbidity, content of total phenolic compounds, antioxidant activity, microbiological analyzes and toxicity were performed. All analyzes were statistically evaluated considering the 5% probability level and using the SAS software. Kombucha tea and beverages showed physicochemical results according to the analytical parameters for safe production for consumption and considerable amounts of total phenolic compounds and antioxidant activity. For the Kombucha derivatives developed, microorganism counts ranged from 10^4 to 10^8 CFU.ml⁻¹. For the “in vivo” tests with *C. elegans* there was no mortality and a greater growth of the worms fed on the fermented products was noted. In this sense, products derived from SCOBY Kombucha with innovative potential, high microbiological count and safe for human consumption were obtained.

Keyword: SCOBY, Kombucha, Fermentation, Biofilm, Drying

INTRODUÇÃO GERAL

A busca por um estilo de vida mais saudável tem aumentado nos últimos anos, apesar da rotina diária intensa da população, há interesse na incorporação de hábitos alimentares benéficos à saúde. Com as novas tendências e exigências dos consumidores, o setor de alimentos e bebidas tem se renovado e investido no desenvolvimento de produtos saudáveis, associando seu marketing às características medicinais ou funcionais. Os alimentos e bebidas com alegação de propriedades funcionais fazem parte de um segmento de consumo que conferem ao indivíduo efeitos fisiológicos e metabólicos benéficos quando acompanhados por hábitos saudáveis e ingeridos regularmente (HANSEN; THOMSEN, 2018; GRANATO et al., 2020; FARAG et al., 2020; KIM; ADHIKARI, 2020).

Quando direcionando as bebidas funcionais, atualmente no mercado encontra-se variedades de chás medicinais, sucos e vitaminas, bebidas fermentadas entre outros capazes de conferir ao indivíduo benefícios associados com seu consumo. A bebida de Kombucha destaca-se dentre elas e atende as tendências atuais e propicia inúmeras vantagens, como proteção às doenças cardiovasculares e hepáticas, metabólicas, intestinal e outras, promovendo deste modo a saúde e bem-estar do indivíduo. Além de estar em franca expansão por parte de pequenas e grandes empresas, produzindo de forma caseira ou industrializada (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2017 KIM; ADHIKARI, 2020).

Com o aumento de produtores comerciais de kombucha no Brasil, foi publicada a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sobre o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional que dispõe sobre a obrigatoriedade da graduação alcoólica na Kombucha com álcool, rotulagem, parâmetros analíticos para segurança da bebida entre outros, transmitindo confiança ao consumir e padronizando a categoria produtora brasileira (BRASIL, 2019).

No entanto, a produção e comercialização das bebidas de Kombucha na forma líquida podem ser limitadas devido ao processo de deterioração, acidificação excessiva, produção de *flavor* desagradável, formação de uma nova

SCOBY no produto, dentre outros. Esses processos podem comprometer o tempo de vida útil, que tem como prazo de validade de mercado de até três meses dependendo do modo de produção da bebida. A qualidade sensorial e comercialização também podem ser afetadas, tendo em vista que a SCOBY e/ou os microrganismos na bebida encontram-se em constantes alterações. Tais processo pode ser minimizados com a aplicação de técnicas de secagem que auxiliam na preservação dos alimentos por meio da redução da água disponível (GUINÉ; PINHO; BARROCA, 2011; JAYAS, 2016; CHITRAKAR; ZHANG; ADHIKARI, 2019).

As técnicas de secagem podem auxiliar na conservação da SCOBY e até mesmo ampliar as formas de obtenção da bebida, além de favorecer o transporte, armazenamento, embalagem e aumentar o mix de produtos, facilitando a produção da bebida por empresas do setor, proporcionar um produto seguro, com tempo maior de prateleira. (GUINÉ; PINHO; BARROCA, 2011; JAYAS, 2016). A secagem dos alimentos abrange mecanismos como a transferência de calor ou frio, modificações na massa, aspectos físicos, químicos e estruturais que podem afetar as características do material, exigindo estudos para avaliar e comparar a composição química dos produtos submetidos às diferentes técnicas (BORGES et al., 2016; BOYER; HUFF, 2008).

Ao submeter os alimentos e bebidas aos processos mais comuns como desidratação e liofilização, obtemos sucesso e eficácia na prevenção e tratamento de doenças ou as mesmas vantagens do consumo “*in natura*”, dado que as funções são preservadas sobre disponibilidade dos compostos ativos, assim como a bioatividade e estabilidade dos mesmos (GUINÉ; PINHO; BARROCA, 2011). Além de comprovar as alegações funcionais com análises físico-químicas e microbiológicas de produtos secos ou “*in natura*”, quando se trata de um novo desenvolvimento para ser introduzido no mercado para o consumo, faz-se necessário a condução de testes “*in vivo*” para avaliação da toxicidade. Dentre os modelos animais usados temos os ratos e camundongos e como modelo alternativo temos o nematódeo chamando *Caenorhabditis Elegans* (*C. elegans*). O teste “*in vivo*” com *C. elegans* é totalmente flexível e válido para avaliação de extratos funcionais, probióticos, ingredientes funcionais entre outros. Para assegurar os benefícios, qualidade e efeitos não tóxicos, o

modelo *C. elegans* é viável nas primeiras fases desenvolvimento de produtos alimentícios e totalmente aplicável (CALVO et al., 2016).

1.1 A bebida Kombucha

Kombucha é uma bebida fermentada tradicionalmente com *Camellia Sinensis*, com os primeiros relatos de uso no Oriente, e de crescente difusão no Ocidente. A bebida é obtida por meio da infusão de folhas ou flores de chá e sacarose, adicionando um tipo de biofilme composto por um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras, que recebe o nome de SCOBY, sigla que significa “*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*”, responsável pelo processo de fermentação, originando uma bebida agri-doce, levemente ácida e gaseificada (LEAL et al., 2018; DE FILIPPIS et al., 2018), como ilustrado na Figura 1.



Figura 1: Ilustração do modo de preparo da bebida Kombucha.

Fonte: Própria autora, 2021.

Tradicionalmente o chá verde e/ou chá preto são utilizados, mas também são descritos atualmente outras possibilidades de variação de infusões com chá de limão, hortelã, camomila e gengibre (LEAL et al., 2018; DE FILIPPIS et al., 2018).

A bebida de Kombucha pode também ser incorporada com os mais diversos ingredientes, atingindo a saborização desejada ou versão original apenas fermentada com chás. Atualmente encontra-se disponível no mercado global a bebida na forma líquida industrializada nos mais diferentes sabores

como gengibre, pêssego, uva, morango, limão, cereja, romã, entre outros (KOMBUCHA BREWERS INTERNACIONAL, 2020; AHMED; HIKAL; ABOU-TALEB, 2020).

Estudos sobre a composição da bebida de Kombucha evidenciam a presença de uma variedade de compostos como ácido acético, glucônico e glucurônico, vitaminas B1, B2, B6, B12, C, proteínas e aminoácidos, minerais como manganês e ferro, e outros compostos que podem variar de acordo com a fermentação e proporção de açúcar e chá utilizados. As principais bactérias encontradas no consórcio são: *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* e *Bacterium gluconicum*; entre as leveduras temos: *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Kloecker apiculata*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* (FU et al., 2014; LESTARI; SA'DIYAH, 2020; AHMED; HIKAL; ABOU-TALEB, 2020; COTON et al., 2017).

Essas bactérias e fungos formam o biofilme, destacando-se as bactérias produtoras de celulose que se deposita na região superior do líquido, tornando a SCOBY mais espessa com as várias fermentações. Ele atua como reservatório de carbono e pode inibir a difusão de patógenos ou outros microrganismos nocivos à saúde humana (MAY et al., 2019; AMARASEKARA; WANG; GRADY, 2020). Na biologia taxonômica recebe a nomenclatura de "*Medusomyces gisevii*" por se tratar de um fungo e se encaixar nos estudos botânicos. Possui aspecto gelatinoso em formato de disco, podendo moldar-se de acordo com as formas dos recipientes utilizados para fermentação (JAYABALAN et al., 2014; VITAS et al., 2018).

Os microrganismos presentes no biofilme produzem principalmente ácido acético e outros ácidos orgânicos e a presença de sacarose é responsável pelo início dos processos metabólicos, que fornece nutrientes necessários para o crescimento dos mesmos. A fermentação do substrato é feita pelos microrganismos existentes, que originam enzimas que irão hidrolisar sacarose em glicose e frutose, posteriormente são convertidos em etanol e dióxido de carbono. O ácido acético é gerado pela oxidação do etanol e confere à bebida baixo valor de pH (MAY et al., 2019; LESTARI; SA'DIYAH, 2020; SA'DIYAH; LESTARI, 2020).

A bebida de Kombucha é também uma fonte de antioxidante proporcionado pelo alto teor de compostos fenólicos. A adição de diferentes ervas e frutas pode potencializar a composição fenólica, aumentando a ação antioxidante da bebida, diminuindo o risco de desenvolvimento e fornecendo defesas contra agentes inflamatórios e mutagênicos. O chá verde é uma fonte abundante de compostos fenólicos que quando fermentados com a SCOBY de Kombucha confere elevada atividade antioxidante (JAYABALAN et al, 2014; ANGELO; JORGE, 2007).

1.2 Benefícios à saúde

A Kombucha possui propriedades probióticas além de ser uma ótima alternativa às bebidas gaseificadas como os refrigerantes tradicionais cheios de açúcar e conservantes, visto que essas propriedades são conferidas pela diversidade microbiológica adquiridas ao longo da fermentação, e com o consumo regular resulta em inúmeros benefícios à saúde (KIM; ADHIKARI, 2020). Devido a existência de microrganismos probióticos, a Organização Mundial da saúde (OMS) e *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), organizações comprometidas com a saúde, desenvolvimento e alimentação, os definiu como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”, validando as aplicações da Kombucha no decorrer de diferentes períodos da humanidade (HILL et al., 2014). Dentre os principais benefícios atribuídos aos probióticos estão a melhora do sistema imunológico, ação anti-carcinogênica e redução do nível sérico de colesterol (TRIPATHI; GIRI, 2014; HUANG et al., 2017a; HUANG et al., 2017b).

Além dos microrganismos presentes na bebida, ela também contém teores expressivos de compostos com potencial antioxidante. Esses compostos atuam como mecanismo de defesa contra radicais livres, que impedem a formação de lesões e perda da integridade celular. Ciente da riqueza dos antioxidantes presentes na bebida de Kombucha, Marzban et al. (2015) realizaram testes “*in vivo*” de inflamação (encefalomielite autoimune experimental - EAE) em 18 camundongos fêmeas para estudar o efeito terapêutico da bebida de Kombucha sobre a doença inflamatória desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), chamada Esclerose Múltipla. Os

camundongos tratados com Kombucha fermentado com chá preto, depois de 21 dias induzidos com EAE, manifestaram melhora clínica e atraso no avanço da doença comparado ao grupo controle, sugerindo que a bebida de Kombucha pode atrasar o surgimento da doença no SNC. Ainda, estudos histológicos demonstraram a desmielinização, degeneração neuronal, infiltração de células inflamatórias, significativamente ($p \leq 0,05$) menores que o grupo controle, atestando seu efeito anti-inflamatório, tornando um produto a ser considerado no tratamento contra Esclerose Múltipla.

O soro de soja foi utilizado no estudo de Tu et al. (2019) depois da primeira fermentação com chá preto, sacarose e a SCOBY de Kombucha, testando a viabilidade de produzir bebidas funcionais, avaliando as alterações nas composições químicas e bioativas durante o processo. Com o decorrer da fermentação observou que o pH reduzia e a acidez total titulável aumentava nos três primeiros dias, e no 8º dia, observou uma leve diminuição da acidez. A atividade antioxidante aumentou, causada pela fermentação dos compostos presente no soro de soja e mostrou atividades antibacteriana em testes *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. A presença de compostos orgânicos como ésteres e aldeídos em teores mais altos também foram observados, o que proporcionou um sabor frutado ao soro, aumentando a qualidade sensorial e posterior aceitação do público.

Outro estudo “*in vivo*” realizado durante 28 dias em camundongos com diabetes mellitus administrando diferentes níveis de Kombucha fermentado por 14 dias com fruta *snake*, apresentou redução da glicemia em jejum, melhora na atividade de superóxido dismutase sérica no sangue e regeneração das células beta pancreáticas dos camundongos, comprovando a atuação como agente terapêutico da hiperglicemia (ZUBAIDAH et al., 2018b).

Além do uso no auxílio de tratamentos às doenças e redução de risco, a Kombucha também pode obter bons resultados no campo da cosmetologia. Pakravan et al (2018) testaram e verificaram a eficácia do Kombucha como cosmético com atividade antienvhecimento, e com propriedades farmacêuticas favoráveis na cicatrização de feridas.

1.3 Comercialização da Kombucha

No Brasil foi publicada a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que dispõe sobre o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. De acordo com a legislação, a Kombucha é a bebida fermentada obtida por meio da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares, por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY). Em relação a sua classificação e/ou denominação, descreve a obrigatoriedade sobre a declaração da graduação alcoólica na Kombucha com álcool, no painel principal do rótulo, expresso em porcentagem em volume (% v/v) e veda o uso de alegações funcionais e de saúde não autorizadas pela legislação específica da ANVISA (BRASIL, 2019).

Dispõe também sobre a rotulagem proibindo o uso de expressões tais como: artesanal, caseira, familiar, bebida viva, bebida probiótica, bebida milenar, elixir, elixir da vida, energizante, revigorante, especial, premium, dentre outras que atribuam características de qualidades superlativas e propriedades funcionais não aprovadas em legislação específica. Para parâmetros analíticos estabelece pH mínimo de 2,5 e máximo de 4,2; e acidez volátil mínima de 30 mEq/L e máxima 130 mEq/L. Na sua composição a instrução autoriza o uso de processos tecnológicos adequados para a produção da Kombucha, e proíbe a presença de contaminantes microbiológicos, contaminantes orgânico ou inorgânico e qualquer substância em quantidade que possa se tornar nociva para a saúde humana, observados os limites de legislação específica para cada (BRASIL, 2019).

A produção e consumo dessa bebida tem crescido cada vez mais no Brasil, como demonstram os dados da Associação Brasileira de Kombucha que possui 49 produtores associados, faturamento de 11 milhões de reais por ano, e produção de 500 mil litros e 1.5 milhões de garrafas por mês, vislumbrando um quadro maior com a entrada de novos produtores (ABKOM, 2020). De acordo com o relatório publicado pela Zion Market Research - empresa que cria relatórios estatísticos de mercado baseada em diversos assuntos - a perspectiva global sobre o Kombucha foi avaliada em cerca de 1062 milhões em 2016, com a possibilidade de atingir próximo a 2457 bilhões até 2022, com um crescimento de cerca de 25% entre 2017 e 2022 (ZION MARKET RESEARCH, 2017).

Esse crescimento está relacionado às exigências do consumidor que demanda cada vez mais alimentos saudáveis no seu dia a dia. O Euromonitor estimou em 2017 que o setor de alimentos saudáveis cresceu 98% nos cinco anos anteriores no Brasil e movimentou cerca de 35 bilhões de dólares por ano no país, sendo considerado o quarto maior mercado do mundo. Destaca-se ainda que, para 28% dos brasileiros, o consumo de alimentos nutricionalmente ricos é de suma importância e 22% da população dão preferência à compra de alimentos sem conservantes e naturais (SEBRAE, 2019).

Porém, mesmo com a demanda crescente pela alimentação saudável, os consumidores buscam por soluções rápidas e fáceis e os alimentos desidratados ou liofilizados podem ser uma boa opção. A secagem dos alimentos é uma das respostas a necessidade do mercado que tenta introduzir produtos alimentares com a finalidade de atender esses consumidores. O custo-benefício e facilidade no armazenamento e transporte é outro motivo atrativo para empresas. Outro setor que pode vir a se beneficiar com a oferta de alimentos secos são os restaurantes com serviços rápidos, viabilizados pelos benefícios de fácil armazenamento, usabilidade e vida útil prolongada (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2020).

O relatório de pesquisa *Global Market Insights*, estima que tenha um faturamento de US\$ 38 bilhões para o seguimento B2C (*Business to consumer*) venda direta para outras empresas e para B2B (*Business to business*) venda direta para consumidor de provávelmente US\$ 114 bilhões até 2026 para alimentos secos por ar, prevendo um alto crescimento no setor de frutas e carnes (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2019).

Diante desses fatos, estudos relacionados à fabricação de produtos à base de Kombucha se tornam um campo investigativo promissor e, que podem contribuir para geração de inovações no setor alimentício com vistas a ofertar opções mais saudáveis ao consumidor.

1.4 Técnicas de secagem de alimentos

A secagem dos alimentos confere vantagens como conservação, facilidade no armazenamento, redução do peso, redução dos riscos de contaminação por microrganismos e aumento do período de vida útil em ambientes desfavoráveis. Os métodos mais comuns utilizados para secagem de

alimentos são por ar quente, liofilização, pulverização (*spray-drying*) e à vácuo, considerando que a secagem por pulverização (*spray-drying*) é a mais comum e econômica para secagem de alimentos líquidos e onde se concentra a maior parte dos estudos (TRIPATHI; GIRI, 2014; CELESTINO, 2010; GUINÉ; PINHO; BARROCA, 2011; JAYAS, 2016; MULOT et al., 2019). Porém estudos que utilizem a Kombucha com a adoção de técnicas de secagem são escassos e até o presente momento nenhum relacionando à secagem da SCOBY.

Os produtos secos apresentam semelhanças nas características físicas e nutricionais, se comparados aos produtos “*in natura*”, podendo ser ingeridos diretamente ou adicionado a outros alimentos (CORNEJO, 2015). Biegańska-Marecik et al. (2017) avaliaram bebidas à base de suco de maçã com a adição de folhas de couve congeladas e liofilizadas e obtiveram maior teor de compostos fenólicos, porém o ácido ascórbico diminuiu. Gümüşay et al. (2014) avaliaram os impactos de quatro diferentes técnicas de secagem: ao sol, forno, estufa à vácuo e liofilização de tomates e gengibres e observou perdas consideráveis nos conteúdos antioxidantes. Bennemann et al. (2018) desenvolveram farinhas de bagaço de uva de produção de vinícolas pelos métodos de desidratação em estufa e liofilização e ao comparar os processos verificaram que os bagaços submetidos à desidratação para produção de farinha resultaram apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais e os submetidos à liofilização, maior de antocianinas.

Estudos voltados ao uso de probióticos secos para consumo direto ou como ingrediente para outros produtos já é uma realidade como demonstraram Guergoletto et al. (2012). Os autores evidenciaram métodos de secagem como a desidratação e liofilização aplicados aos probióticos utilizados pelas indústrias de alimentos funcionais e que podem ser utilizados para enriquecer outros conjuntos de alimentos por esses microrganismos, tais como chocolates e sorvetes.

No entanto, mesmo diante dos inúmeros benefícios das técnicas de secagem, pode haver diminuições significativas de microrganismos após a implicação dos processos de desidratação e liofilização (CHEN; LIN; CHEN, 2006; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2006a; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2008b; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2010c). A fim de aumentar viabilidade do *Lactobacillus* aos processos de secagem por *spray-drying* os autores Gong

et al. (2020) testaram o uso de dissacarídeos para melhorar a tolerância a secagem, administrando intracelular a trealose via eletroporção, técnica que permite a introdução de compostos na célula através de um campo elétrico. Verificaram que houve um aumento na taxa de sobrevivência após a secagem de 38% para 61%, constatando o potencial para viabilidade da bactéria.

É importante que a taxa de sobrevivência dos microrganismos probióticos se mantenha assegurada durante a produção e/ou quando submetidos a processos, também ao prazo de validade estabelecido do produto, garantindo os benefícios e confiança ao consumidor (TRIPATHI; GIRI, 2014). Depois de submetidos as técnicas de secagem os produtos necessitam de cuidados para não comprometer a viabilidade dos microrganismos. A temperatura de armazenamento é um fator que pode influenciar, dado que os microrganismos desidratados não estão inertes em suas atividades biológicas, podendo afetar a vida útil de consumo. Em temperaturas mais baixas de armazenamento (4° – 5 °C), microrganismos como as leveduras demonstram atividades metabólicas mais baixas, possibilitando o aumento da estabilidade durante o armazenamento (COSTA et al., 2002; SPADARO et al., 2010; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Estudos que utilizam microrganismos probióticos combinados com técnicas de secagem como forma de estabilizar e conservar as atividades microbiológicas vem aumentando nos últimos anos com o objetivo de prolongar o tempo útil do produto e assegurar todos os benefícios alegados (GUERGOLETTTO et al., 2012; HUANG et al., 2017b; BOLLA et al., 2010). A liofilização é o método mais adequado para obtenção de probiótico secos por preservar bactérias e leveduras, porém seu alto custo e baixa produtividade podem tornar inviável o uso da técnica por pequenas e médias empresas, em contrapartida a desidratação tem baixo custo e alta produtividade, porém podem ocorrer perdas na taxa de sobrevivências dos microrganismos (BHATTA; JANEZIC; RATTI, 2020; HUANG et al., 2017a; HUANG et al., 2017b; FOERST; SANTIVARANGKNA, 2015; CELESTINO, 2010; FELLOWS, 2009)

Sendo assim, faz-se importante testar técnicas de conservação em alimentos, especialmente quando se tem um produto microbiologicamente ativo, como a SCOBY de Kombucha, e conhecer os compostos que poderão ser perdidos ou preservados. A conscientização feita acerca dos probióticos podem direcionar o aumento da demanda pelos produtos de Kombucha nos próximos

anos, o que possibilita o investimento em pesquisas no desenvolvimento de novos produtos e da sua composição microbiológica e físico-química (ZION MARKET RESEARCH, 2017).

2. REVISÃO EM BASES DE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Com o advento da tecnologia cada vez mais as empresas buscam por inovação, o que confere um diferencial em relação aos seus concorrentes. O poder sobre a inovação traz ao seu detentor vantagens de alinhar estratégica e competitivamente, benefício esse que a patente concede ao proteger juridicamente a inovação (INPI, 2016).

Foi utilizado o *Google Patents* para a busca de depósitos de patentes relacionados ao projeto de pesquisa, empregando as seguintes palavras-chaves: Kombucha, *biofilm*, SCOBY, *drying*. Foram encontradas três patentes:

- “*Dehydrated biofilm assemblies and methods for manufacturing dehydrated biofilm assemblies*” (Conjuntos de biofilme desidratado e métodos para a fabricação de conjuntos de biofilme desidratado) sob registro WO2020163438A1 do inventores Joshua D. Erickson e Mark A. Mulvahill.

- “*A kind of compound probiotic freeze-dried powder*” (Um tipo de composto probiótico em pó liofilizado) sob o registro CN106923344A, do inventor Hugo, onde divulga um tipo de composto probiótico em pó liofilizado de cepas probióticas.

- “*Cosmetical use of Kombucha for treating skin aging*” (Uso cosmético de Kombucha no tratamento do envelhecimento da pele), sob o número de registro EP155599B1, do inventor Karl Lintner, atualmente com a Sederma AS. A presente invenção refere-se ao campo de cosméticos e ao uso de Kombucha na composição cosmética ou dermofarmacêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir a bebida e derivados de Kombucha desidratados e liofilizados e avaliar suas características físico-químicas, compostos bioativos, microbiológicas e efeito toxicológico “*in vivo*”.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o chá e bebida Kombucha quanto às características físico-químicas e o conteúdo de compostos bioativos.
- Produzir derivados de Kombucha desidratados e liofilizados e quantificar o conteúdo microbiológico da bebida Kombucha e de seus produtos desidratados e desidratados.
- Avaliar a toxicidade em *Caenorhabditis elegans* dos derivados de Kombucha.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os chás, as bebidas de Kombucha, SCOBYs, material precipitado e os produtos desidratados foram gentilmente cedidos pela empresa Viva o dia Kombucha, localizada em Vitória, Espírito Santo.

4.2 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em 2 fases distintas, de acordo com o recebimento das amostras pela empresa Viva o dia Kombucha.

A 1ª fase foi realizada com o chá de *Camellia sinensis* e a bebida de Kombucha seguindo um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em 3 repetições, totalizando 6 unidades experimentais. Essas unidades foram avaliadas em relação às características físico-químicas e bioativas.

A 2ª fase foi realizada com a bebida de Kombucha e seus derivados liofilizados e desidratados seguindo também um DIC com 3 repetições, totalizando 21 unidades experimentais, como segue as descrições:

- BK - Bebida Kombucha: fermentado do chá de *Camellia sinensis* com a SCOBY de Kombucha;
- SKU - SCOBY de Kombucha úmida: material gelatinoso normalmente encontrado na superfície da bebida (Figura 2A);
- PKU - Precipitado de Kombucha úmido: material gelatinoso de cor amarronzada acumulada no fundo do recipiente (Figura 2B);



Figura 2: SCOBY de Kombucha (A) e Precipitado da SCOBY de Kombucha (B).

- SKD - SCOBY de Kombucha desidratada;
- SKL - SCOBY de Kombucha liofilizada;
- PKD - Precipitado de Kombucha desidratado;
- PKL - Precipitado de Kombucha liofilizado.

Esses produtos foram avaliados microbiologicamente e modelo de toxicidade “*in vivo*”.

4.3 Preparo da infusão de chá verde e da bebida Kombucha

A infusão do chá verde e posterior preparo da bebida Kombucha foram realizados na própria empresa Viva o dia Kombucha, e depois, as amostras coletadas foram envasadas em garrafas de vidro coletas para análises.

A bebida Kombucha foi obtida a partir da fermentação do chá de *Camellia Sinensis* (chá verde) adoçado com açúcar orgânico, na presença de uma Colônia Simbiótica de Bactérias e Leveduras (SCOBY). As concentrações utilizadas não foram informadas pela empresa.

As bebidas foram armazenadas sob refrigeração entre 2°C a 4°C até o momento das análises.

4.4 Desidratação da SCOBY e precipitado de Kombucha

A desidratação por calor da SCOBY e do precipitado de Kombucha também foi realizada na própria empresa, em equipamento próprio a 42 °C entre 8 e 10 horas, com resultado final apresentado na Figura 3A.

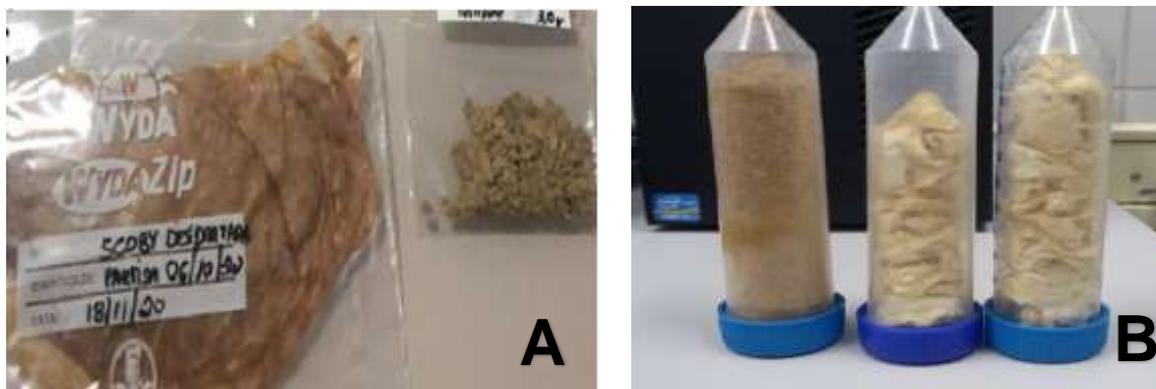


Figura 3: SCOBY e Precipitado de Kombucha desidratados (A) e SCOBY e Precipitado de Kombucha liofilizado (B).

A liofilização foi feita no laboratório de Cromatografia da Universidade Vila Velha no equipamento Liofilizador Enterprise I Terroni em -30°C por 72 horas.

Os produtos desidratados e liofilizados foram armazenados sob refrigeração de 2°C a 4°C até o momento das análises.

4.5 Análises físico-químicas do chá e bebida de Kombucha

4.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro de bancada de marca digital Quismis-Q400 com a introdução direta do eletrodo em 10 mL amostras previamente calibradas com solução tampão 4 e 7 (AOAC, 2000).

4.5.2 Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix)

Para a medida do teor de sólidos solúveis (°Brix) nas amostras foi utilizado refratômetro analógico modelo RTP 20 ATC calibrado com água destilada (AOAC, 2000).

4.5.3 Determinação da acidez total titulável

Para determinação da acidez total titulável foi realizada em 10 mL das amostras diluídas em 100 mL de água destilada, adicionada de 3 gotas de fenolftaleína, e titulados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M. A acidez calculada com base na equação $ATT_{g/100ML} = [n \times N \times Eq] / 10 \times V$ e expressa em g/100 mL de ácido acético (AOAC, 2000).

4.5.4 Determinação de turbidez

As análises de turbidez foram realizadas em equipamento turbidímetro de bancada digital tb-200. Para o branco utilizou-se água destilada para comparação (AOAC, 2000).

4.6 Determinação dos compostos bioativos do chá e bebida de Kombucha

4.6.1 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos, foram transferidos 1 mL de amostra com 10 mL de solução extratora metanólica a 60% para tubos falcon de 15 mL e agitado manualmente. Posteriormente foram completados com água destilada até o volume de 15 mL (BLOOR, 2001).

4.6.2 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

Para determinação de compostos fenólicos foi utilizado o método de Bloor (2001), com modificações. Uma alíquota de 100 µL do extrato foi adicionado de 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma®) em concentração de 20% e em seguida 100 µL de carbonato de sódio o (Na_2CO_3) a 7,5%. A leitura foi realizada a 765 nm no espectrofotômetro SpectraMax®190.

A curva padrão foi elaborada com ácido gálico (Dinâmica Ltda®) nas concentrações de 2 a 10 µL/mL que permitiu a obtenção da equação de regressão $y = 0,0823x + 0,005$; $R^2 = 0,9964$. Os resultados foram expressos em mg de equivalente em ácido gálico /100 mL da bebida.

4.6.3 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por meio dos métodos DPPH e ABTS.

Para o método ABTS, foi preparado a solução estoque pesando 0,1920 g de ABTS dissolvido em etanol 50%, e 0,0331 g de persulfato de potássio dissolvidos em água destilada. As duas soluções dissolvidas foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL e completados com etanol 50%, ficando em repouso por cerca de 16 horas no escuro para formação do radical ABTS. Após o processo de repouso foi preparado a solução diluída para uso adicionada de etanol 50% até obtenção da leitura de 1,0 a 1,12 em 734 nm em espectrofotômetro SpectraMax® 190 (RE et al.,1999).

Em ambiente escuro, foram pipetados em microplaca 30 µL do extrato com 270 µL de solução estoque de ABTS em triplicatas e o branco foi feito com 30 µL de metanol NEON® e 270 µL de solução estoque de ABTS. Após 6 minutos em repouso, foi feita a leitura em 734 nm em espectrofotômetro SpectraMax® 190 (RE et al.,1999).

Os resultados foram expressos por meio do índice de atividade de eliminação de radical (I), utilizando a equação descrita por SCHERER; GODOY, 2009.

$$I (\%) = \frac{[(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}) \times 100]}{\text{Abs Branco}}$$

Para DPPH utilizou-se o método descrito por Scherer e Godoy (2009), com modificações. Para o preparo de DPPH foi feita solução de DPPH a 40 µg/mL, pesando 10 mg e diluído em balão de 250 mL com etanol. Foi feita a leitura antes de iniciar os testes com a solução preparada, para obter a leitura de $1,0 \pm 0,1$ a 517 nm.

Em ambiente escuro, foram pipetados em microplacas, 20 µL do extrato e 280 µL de solução de DPPH em triplicata, e o branco com 20 µL de metanol e 280 µL de solução de DPPH. Após 60 minutos de reação, foi feita a leitura em 517 nm em espectrofotômetro SpectraMax® 190 (BLOOR, 2001).

Os resultados foram expressos também por meio do índice de atividade de eliminação de radical (I) definido na equação 2 (SCHERER; GODOY, 2009).

4.7 Análises microbiológicas da bebida Kombucha e seus desidratados

As análises microbiológicas foram conduzidas conforme descrito por Silva et al. (2007).

A contagem de bactérias e leveduras foi realizada em triplicata por plaqueamento em Ágar Padrão para Contagem (*Plate Count Agar*) (Biolog®), para contagem total de bactérias aeróbicas e anaeróbicas foi utilizado ágar *Man Rogosa & Sharpe* (MRS) (Kasvi®) para cultivo de bactérias lácticas, meio acético preparado com 20g de glicose, 4g de extrato de leveduras, 6g de extrato de ágar e 12g de carbonato de cálcio para 400 mL de cultivo de bactérias acéticas, e Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi®) para leveduras e fungos filamentosos. O preparo dos meios de cultura foi realizado seguindo instruções dos fabricantes e conforme técnica descrita por Silva (2007). Foram preparadas diluições decimais das bebidas em solução salina e, alíquotas foram posteriormente plaqueadas pelo método em superfície. Após o período de incubação de 48 a 72 horas, foram feitas contagens das unidades formadoras de colônias (UFC), estabelecendo a contagem de microrganismos por meio do seu número em UFC/g, multiplicando-se o número de colônias típicas pelo inverso da diluição ($\text{UFC/g} = n^{\circ} \text{ de colônias/diluição}$). Os dados foram expressos em log de UFC/g.

4.8 Avaliação da toxicidade por *Caenorhabditis elegans*

4.8.1 Preparo da cepa de *Caenorhabditis elegans* para sincronização

Utilizou-se no estudo cepas dos nematódeos *C. Elegans* N2, do tipo selvagem, cedidas gentilmente pela Professor Doutor Tadeu Uggere de Andrade, responsável pelo laboratório LabCardio, da Universidade Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

Foram preparadas 3 placas de Petri contendo meio de crescimento para nematoides (NGM) (BRENNER, 1974). Foram acrescentados ao meio 30 microlitros de solução contendo *Escherichia Coli* geneticamente modificadas do tipo Na22. Replicou-se a cepa de *C. Elegans* tipo selvagem (N2 - sem modificação genética) utilizando pedaços do meio de cultura para a manutenção contendo os nematódeos em todos os estágios larvais, que eram mantidos em meio de 63 crescimento para nematódeos (NGM- Nematode Growth Medium) com Ágar e *Escherichia coli* OP50 a 20 °C. As placas contendo a repicagem

foram levadas a estufa TE- 391 BOD mantidas a temperatura de 20 °C por 3 dias para incubação (BRENNER, 1994; PORTA-DE-LA-RIVA et al., 2012).

Após 3 dias verificou-se ao microscópio (Leica, DMLS, Alemanha) a obtenção de altas quantidades de nematódeos grávidos. Lavou-se as placas com água destilada autoclavada utilizando pipeta Pasteur, colocou o conteúdo em tubos falcon de 15 mL até completar seu volume, centrifugou por 6 minutos a 3600 rpm na centrífuga i 2206 (Excelsa®) e em seguida o sobrenadante foi retirado até restar 2 mL de sedimento. Essa etapa foi realizada mais uma vez, desmanchando o pellet formado no fundo dos tubos falcon.

Preparou-se a solução *bleaching* feita com adição de 6 mL NaOH 10 M, 20 mL de hipoclorito e o restante com água destilada autoclavada até completar o balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 4,5 mL dessa solução nos falcons que continham os nematódeos grávidos. Agitou-os de forma manual vigorosamente durante 6 minutos até romper as cutículas liberando os ovos e retirou até 3 mL da espuma formada. Acrescentou nos tubos falcon a solução tampão M9 (3 g KH_2PO_4 + 6 g Na_2HPO_4 + 5 g NaCl + 1 L H_2O com adição posterior de MgSO_4 1M) até completar, desmanchando o pellet formado. Foram submetidos a centrifugação novamente a 3600 rpm por 6 minutos, com posterior retirada do sobrenadante e adição do tampão M9. Esse procedimento de centrifugação e remoção de sobrenadante foi realizado até restar aproximadamente 1,5 mL. O conteúdo dos tubos contendo os ovos foram transferidos para placas de Petri (90x15 mm) e incubados por aproximadamente 16 horas (PORTA-DE-LA-RIVA et al., 2012).

4.8.2 Tratamento da cepa de *C. Elegans*

Uma gota da solução (3 μL) contendo os vermes sincronizados L1 foram analisadas em microscópio (Leica, DMLS, Alemanha®), para calcular o volume necessário de solução para atingir aproximadamente 2500 vermes. Os vermes sincronizados foram adicionados em microtubos Eppendorfs junto com 15 μL solução M9 e 50 μL da diluição de 0,5 g em água destilada de cada derivado desidratado e liofilizado (SCOBYS e material precipitado).

Posteriormente foram expostos por 30 minutos (tratamento agudo) a 20 °C, por agitação constante em um homogeneizador em meio líquido 0,5% NaCl. Após a exposição, os vermes foram lavados 3 vezes com NaCl a 0,5% 64 para

remover as amostras e, em seguida, transferidas e espalhadas para placas NGM inoculadas com *E. coli* OP50. Logo após, foram mantidas à 20 °C até secarem e depois tampadas, sendo colocadas na incubadora BOD por 24 horas (AVILA et al., 2012; CHARÃO et al., 2015; AUGUSTI et al., 2017).

4.8.3 Avaliação da mortalidade e desenvolvimento dos *C. Elegans*

Após a incubação de 24 horas, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes em cada placa por meio de microscópio (Leica, DMLS, Alemanha®), avaliando o percentual de morte causado pelas amostras. A placa contendo os nematódeos foi colocada sobre uma lâmina de retroprojetor com 64 quadrantes igualmente divididos e adicionados abaixo das placas. Contou-se 6 quadrantes de cada duplicata e calculou-se a média (CHARÃO et al., 2015). Feita a contagem, as placas retornaram à incubadora para completar 48 horas do período de incubação.

O desenvolvimento dos *C. Elegans* foi então avaliado por meio da medida de área corporal (μ^2) dos vermes adultos em estereomicroscópio (Olympus IX71). As placas contendo os vermes foram lavadas com água autoclavada e estes transferidos para tubos de centrifugação. O processo foi repetido até que a solução estivesse límpida. Em seguida, 15 μ L da solução com vermes foram depositados sobre uma lâmina coberta por agarose e foi adicionado 30 μ l de Levamisol (substância antiparasitário) 2,25% que ocasionou a morte dos vermes, facilitando o procedimento de captura de fotos. Os vermes foram fotografados para terem seu contorno corporal medido (10 medições) manualmente com auxílio do software AxioVision versão 4.8.2 (CHARÃO et al., 2015; AUGUSTI et al., 2017).

4.9 Análise estatística

Os resultados foram avaliados quanto à sua normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk à 5% de probabilidade.

Para resultados não normais, foi realizada a transformação logarítmica a fim de obter resultados normais e seguir com os testes paramétricos.

Para resultados normais, foi realizada a análise de variância (ANOVA) à 5% de probabilidade e, em caso de diferença estatística, os mesmos foram comparados pelo teste Duncan na mesma probabilidade. Para comparação da

bebida Kombucha com o chá, os resultados foram comparados pelo teste T à 5% de probabilidade.

Todos os resultados foram analisados pelo software SAS, disponível online.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química e de compostos bioativos do chá e bebida de Kombucha

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises físico-químicas e concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante realizadas no chá verde e bebida Kombucha.

Tabela 1: Média e desvio padrão das análises físico-químicas, concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do chá e das bebidas de Kombucha.

Análises	Chá verde	Bebida Kombucha	p(F)
pH	5,26±0,76	2,98±0,62	0,0008*
ATT	0,12±0,06	0,44±0,30	0,0457*
SST	2,43±0,98	2,27±0,25	0,0003*
Relação SST/ATT	21,11±4,19	6,67±3,73	0,0111*
Turbidez	181,67±72,70	135,00±64,63	0,0021*
Compostos fenólicos totais	13,25± 5,69	20,36± 2,14	0,1133 ^{ns}
ABTS	75,97±12.34	69,27±14.26	0,5717 ^{ns}
DPPH	73,82±1.44	74,98±2.90	0,5692 ^{ns}

ATT: acidez total titulável; SST: sólidos solúveis totais; SST/ATT refere-se a divisão do teor de SST por ATT. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste T. ^{ns} não significativo à 5% de probabilidade pelo Teste T.

Houve diferença significativa para os valores de pH, ATT, SST, Relação SST/ATT e turbidez ($p \leq 0,05$) do chá verde e a bebida Kombucha.

O pH da infusão do chá verde encontra valores em torno de 5, e ao ser inoculada a SCOBY, durante o processo fermentativo, ocorre a produção de ácidos orgânicos e conseqüentemente a diminuição dos valores de pH e o aumento da acidez (AMARASINGHE et al, 2018; CHAKRAVORTY et al., 2016).

Os valores observados corroboram com estudos feitos por Neffe-Skocińska et al. (2017) que encontram valores entre 2,5 e 3,5 para sete dias de fermentação.

A SCOBY confere ao meio valores de pH inferior a 4 e de acordo com os autores Nummer (2013), Braghini et al. (2014) e Neffe-Skocińska et al. (2017), o pH é um importante fator a ser medido e controlado durante o processo de fermentação. Com o pH baixo a acidez provoca a falta de oxigênio no meio, diminuindo o número de patógenos que possa existir, resultando em uma bebida segura para consumo (LEAL et al., 2018; LESTARI; SA'DIYAH, 2020).

No entanto, Nummer (2013) destaca que o consumo de chá de Kombucha com pH inferiores a 2 pode ocasionar problemas nos dentais e gastrointestinais, ressaltando que o pH controlado é essencial para um consumo seguro. De acordo com a legislação vigente no Brasil sobre a produção de Kombucha, os valores observados para pH apresentam-se dentro dos parâmetros estabelecidos que variam de 2,5 e 4,2 (BRASIL, 2019).

O aumento da acidez dar-se pelo principal composto produzido durante o processo de fermentação, o ácido acético. Esse ácido é produzido pelas bactérias acéticas que degradam a glicose, produzindo ácido glucônico e etanol, que posteriormente são convertidos à ácido acético (TU et al., 2018; LESTARI; SA'DIYAH, 2020; JAYABALAN et al., 2014; LEAL et al., 2018). De acordo com De Filippis et al. (2018), esse aumento significativo de bactérias acéticas é promovido pelo consumo de nutrientes disponíveis no meio através do substrato utilizado até o 9º dia de fermentação, deixando o meio bem mais ácido. Cardoso et al. (2020) prepararam bebidas com chás preto e verde com a SCOBY para fermentação. As bebidas com chá verde apresentaram acidez maior que a produzida com chá preto, atribuído à predominância de espécies de bactérias acéticas e lácticas. As bebidas de Kombucha desenvolvidas com a adição de diferentes ingredientes podem alterar ou não sua composição química.

A acidez da bebida interfere na percepção sensorial e de acordo com os autores Velicanski et al. (2014) para uma bebida agradável e levemente ácida, o processo de fermentação deve ser finalizado quando a acidez total alcançar valor ideal de 0,44 e 0,45%, corroborando com os valores encontrados neste trabalho.

Para os teores de sólidos solúveis totais observa-se uma redução no chá verde após a inoculação e sete dias de fermentação, ou seja, confirma a utilização da fonte carboidrato pela SCOBY. O resultado tem relação com acidez

total, onde houve aumento da acidez e proporcionalmente houve consumo do substrato provenientes do chá verde e do açúcar. Observa-se também uma relação proporcional com a turbidez, onde com a redução dos sólidos solúveis totais encontramos valores menores para turbidez, evidenciando concentrações de açúcares e nutrientes disponíveis em menor quantidade.

A turbidez está diretamente ligada com as propriedades ópticas ao absorver ou refletir a luz sendo associada com a formação de melanoidinas, compostos responsáveis pela coloração escura (SZUTOWSKA et al., 2020), resultado da oxidação de compostos fenólicos.

Em relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos valores entre o chá verde e a bebida fermentada, evidenciando que houve preservação dos compostos provenientes do chá verde durante o período de sete dias de fermentação.

Estudos *in vitro* da bebida fermentada de Kombucha demonstram que pode haver a preservação ou o aumento dos compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes durante sete dias ou com prolongamento da fermentação. Lobo, Dias e Shenoy. (2017) utilizaram chá verde e após 7 dias de fermentação houve aumento de 4,7% na concentração de compostos fenólicos totais, valor inferior aos nossos achados que apresentam um aumento de aproximadamente 53%. Por outro lado, Chakravorty et al. (2016) observaram um aumento semelhante, de 54%, contudo, em um maior tempo de fermentação, 21 dias utilizando o mesmo tipo de substrato para fermentação.

O aumento na concentração de fenólicos totais é esperado. De acordo com Velicanski et al. (2014) e Zubaidah et al. (2017), o processo de fermentação aumenta os teores de compostos fenólicos em relação ao chá inicial, ocasionado pelas enzimas microbianas que promovem a conversão metabólica dos compostos fenólicos complexos. Entretanto, o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante podem variar de acordo com o tipo de substrato utilizado e tempo de fermentação (GRAMZA-MICHAŁOWSKA et al., 2016) e, longos períodos tendem a diminuir as atividades antioxidantes (AMARASINGHE et al., 2018).

Aspiyanto et al. (2016) observaram aumento de 93% dos compostos fenólicos em 14 dias de fermentação com chá de espinafre. Velicanski et al.

(2014) fermentaram a infusão de erva-cidreira e verificaram que o potencial de atividade antioxidante contra os radicais DPPH foram maiores que o chá fermentado tradicionalmente com chá verde ou preto. Ayed et al. (2017) ao avaliarem seis dias de fermentação com suco de uva tinto observaram o aumento de 55,7% e 38,1% de atividade antioxidante para DPPH e ABTS, respectivamente. Essa variação de compostos pode estar ligada com o método de processamento que é imposto nas plantas.

5.2 Caracterização microbiológica da bebida de Kombucha e seus derivados

A contagem microbiológica da bebida Kombucha, da SCOBY e precipitado desidratados, e da SCOBY e precipitado liofilizados, após transformação logarítmica, são apresentados na Figura 4.

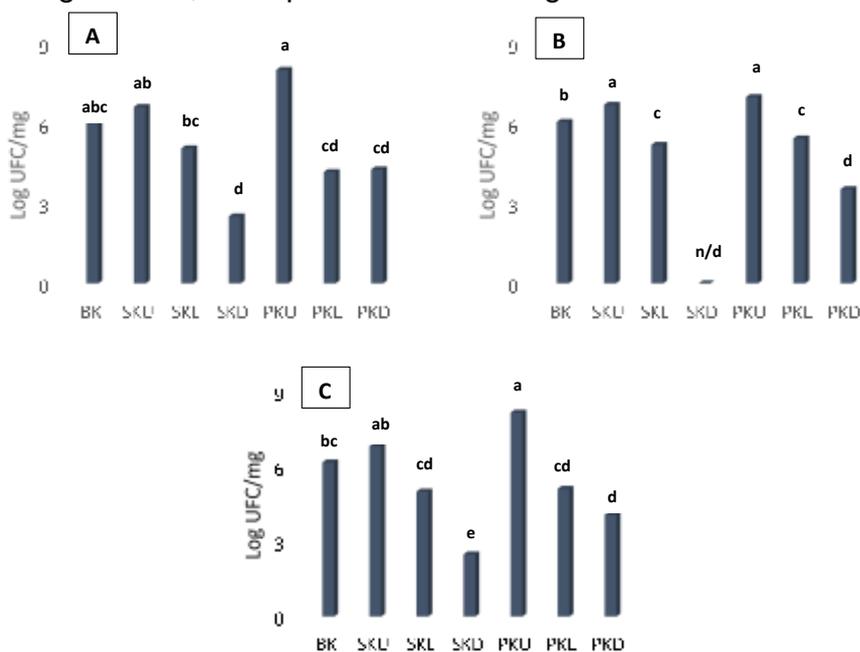


Figura 4: Valores logaritimizados da contagem de microrganismos das bebidas de Kombucha e seus derivados para contagem total de bactérias (A), bactérias acéticas (B) e fungos e leveduras (C).

BK - Bebida Kombucha; SKU - SCOBY de Kombucha úmida; SKL - SCOBY de Kombucha liofilizada; SKD - SCOBY de Kombucha desidratada; PKU - Precipitado de Kombucha úmido; PKL - Precipitado de Kombucha liofilizado; PKD - Precipitado de Kombucha desidratado. n/d – não detectado. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

No presente estudo não foi observado qualquer crescimento de bactérias ácido lácticas. Resultados semelhantes foram observados por Gaggia et al. (2019) que também não encontraram crescimento em ágar MRS para o biofilme e as bebidas fermentadas em chá verde, preto e rooibos (*Aspalathus linearis*). De Fillipis et al. (2018) observaram uma reduzida taxa de crescimento de apenas 0,1% para bactérias ácido lácticas.

A diversidade de microrganismos tem relação com origem geográfica da SCOBY. Essa observação corrobora com os resultados encontrados para bactérias lácticas quando comparados com os autores Cardoso et al. (2020), FU et al. (2014), Neffe-Skocińska et al. (2017), Zhao et al. (2018) e De Fillipis et al. (2018) que submeteram seus experimentos a condições semelhantes na produção da bebida Kombucha e confirma que diferentes origens da SCOBY interferem na microbiota.

Para os demais meios de cultura utilizados para verificar o crescimento dos grupos microbianos observou-se a perda na taxa de sobrevivência dos microrganismos na desidratação e liofilização quando comparados com as amostras úmidas ($p \leq 0,05$). No entanto, a liofilização apresentou-se menos prejudicial para os microrganismos se comparado à desidratação, especialmente a SCOBY desidratada.

As contagens de bactérias totais, bactérias acéticas, fungos e leveduras da bebida de Kombucha chegaram a 10^6 UFC/mL, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Contagem de microrganismos nas bebidas de Kombucha e seus derivados (UFC/mL).

Análises	Contagem bactérias totais	Bactérias acéticas	Fungos e leveduras
BK	$1,39 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$
SKU	$4,16 \times 10^6$	$4,96 \times 10^6$	$6,03 \times 10^6$
SKL	$5,10 \times 10^5$	$1,62 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$
SKD	$3,30 \times 10^2$	n/d	$3,00 \times 10^2$
PKU	$1,01 \times 10^8$	$9,73 \times 10^6$	$1,29 \times 10^8$
PKL	$3,05 \times 10^4$	$2,77 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5$
PKD	$1,95 \times 10^4$	$4,43 \times 10^3$	$1,25 \times 10^4$

BK - Bebida Kombucha; SKU - SCOBY de Kombucha úmida; SKL - SCOBY de Kombucha liofilizada; SKD - SCOBY de Kombucha desidratada; PKU - Precipitado de Kombucha úmido; PKL - Precipitado de Kombucha liofilizado; PKD - Precipitado de Kombucha desidratado. n/d – não detectado.

Cardoso et al. (2020) e Neffe-Skocińska et al. (2017), em dez dias de fermentação, obtiveram contagem de bactérias acéticas e leveduras variando entre 10^5 e 10^6 UFC/mL, para chá verde e chá preto; e 10^7 UFC/mL para chá verde, respectivamente. Zhao et al. (2018) também verificaram contagens de leveduras igual a 10^6 UFC/mL em sete dias de fermentação para o “raw Pu-erh tea”, um tipo de chá verde característico do sul da província Yunnan, na China. FU et al. (2014), em três dias de fermentação para chá verde, encontraram para bactérias acéticas, leveduras e bactérias totais na faixa de contagem igual a 10^7 UFC/mL, e para bactérias de ácido láctico de 10^5 UFC/mL.

Em relação à SCOBY úmida, também definida como biofilme, as contagens microbiológicas encontradas nos diferentes meios de cultura foram próximas à bebida de Kombucha, variando apenas para bactérias acéticas, sendo significativamente ($p \leq 0,05$) maior na SCOBY. De Fillipis et al. (2018) em seu estudo, relataram que a diversidade microbiológica encontrada no chá de Kombucha também foi observada no biofilme. Embora a taxonomia não foi abordada no presente estudo, observou-se que a microbiota contida no biofilme foi semelhante no chá fermentado em valores de contagem.

Para o precipitado úmido foram observadas contagens entre 10^6 e 10^8 UFC/mL, sendo estatisticamente superiores ($p \leq 0,05$) as quantidades de crescimento nos diferentes meios cultivados em comparação à bebida Kombucha. Porém foram semelhantes às contagens da SCOBY úmida, demonstrando seu importante potencial microbiológico com possibilidade de reconstituição e desenvolvimento de uma nova bebida. No entanto, até o presente momento não se tem estudos sobre esse acúmulo de material precipitado material e geralmente é descartado quando feito de forma caseira ou industrialmente.

Estudos que avaliem a adoção de técnicas de secagem na bebida Kombucha e seus derivados são escassos. Ainda, os estudos encontrados focam especialmente na funcionalidade “*in vivo*” da bebida liofilizada e, não

necessariamente no efeito da técnica de secagem sobre a capacidade de preservação ou conservação dos compostos, bem como a taxa de sobrevivência microbiológica. Jung et al. (2018) avaliaram a bebida fermentada por 14 dias e, posteriormente liofilizada, a base de chá preto em camundongos com doença hepática gordurosa não alcoólica e as possíveis mudanças na microbiota intestinal, durante três semanas de intervenção, demonstrando redução do acúmulo de gordura e melhora da microbiota intestinal. Srihari et al. (2013a) testaram a eficácia anti-hiperglicêmica da bebida Kombucha fermentada por 14 dias e depois, liofilizada, em camundongos induzidos por estreptozotocina, mostrando-se eficiente na regulação da glicose. Em outro estudo dos mesmos autores, avaliaram extrato de Kombucha liofilizado em células cancerígenas de próstata humana e verificaram a inibição do crescimento de tumores (SRIHARI et al., 2013b). Apesar dos estudos não abordarem a caracterização microbiológicas das bebidas fermentadas de Kombucha liofilizadas, evidencia-se benefícios na redução do risco e até mesmo no tratamento de doenças.

Os derivados da Kombucha submetidos à secagem apresentaram redução de contagens microbiológicas quando comparados à SCOBY e precipitado úmidos. A SCOBY apresentou maior redução ($p \leq 0,05$), nos três grupos avaliados, quando desidratada, por outro lado, a SCOBY e o precipitado liofilizados não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) em relação à contagem de bactérias totais, bactérias acéticas, fungos e leveduras. Já o precipitado desidratado foi semelhante ($p > 0,05$) à SCOBY e o precipitado liofilizados quanto à contagem de bactérias totais, fungos e leveduras.

A SCOBY desidratada apresentou uma estrutura física semelhante ao couro, o que sugere seu aproveitamento pela indústria de couros ecológicos e plásticos biodegradáveis. O precipitado, seja ele desidratado ou liofilizado, que alcançou valores entre 10^3 e 10^5 UFC/mL, apresentou estrutura física semelhante a uma farinha, o que sugere facilidade de incorporação aos alimentos.

Estudos com a aplicação de técnicas de secagem com produtos ou microrganismos com propriedades probióticas semelhantes ao Kombucha embasam os resultados observados. Huang et al. (2017) reuniram estudos de probióticos secos e constatou que a maioria das pesquisas se concentram na secagem de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e várias espécies de *Bifidobacteria*, e que essas bactérias probióticas geralmente diminuía após a secagem

provavelmente relacionadas com às condições adversas que prevalecem durante o processo. Jokicevic et al. (2020) utilizaram oito probióticos do gênero *Lactobacillus* e confirmou a habilidade de crescimento e fermentação após a secagem, porém verificou baixas taxas de sobrevivência para algumas cepas selecionadas. Moretti et al. (2019) avaliaram a atividade protetora do processo de liofilização sobre os grãos de Kefir, comparando sua composição microbiológica características sensoriais e efeito antimicrobiano. Após a liofilização os grãos permaneceram estáveis até seis meses sobre o armazenamento a 4 °C, e com inibição para *Salmonella Enterica* e *Escherichia coli.*, e boa aceitação sensorial. Os autores concluíram que a liofilização com adequada condição de armazenamento é essencial para sobrevivência da microbiota do Kefir.

É importante que taxa de sobrevivência dos microrganismos, especialmente àqueles com alegação probiótica se mantenha preservada durante a produção e/ou quando submetidos a processos, e considerando o prazo de validade estabelecido do produto, garantindo assim os benefícios e confiança ao consumidor (TRIPATHI; GIRI, 2014).

5.3 Toxicidade pelo *C.elegans*

A toxicidade foi apresentada pelo cálculo das taxas de inibição do crescimento e sobrevivência (Figura 5).

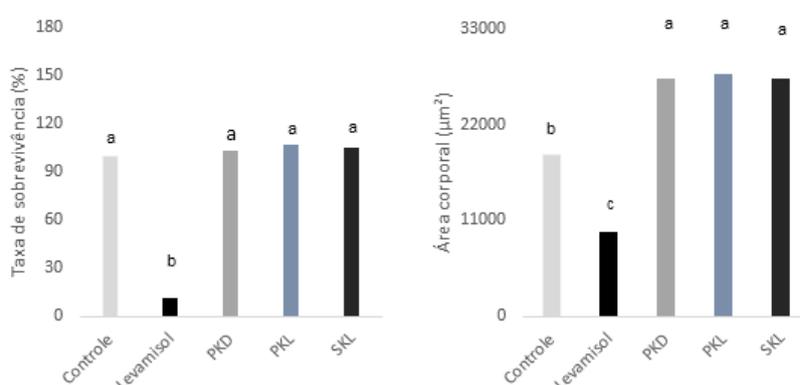


Figura 5: Média e desvio padrão para sobrevivência e desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans* expostos aos derivados de Kombucha.

C = Controle; L = Levamisol; PKL - Precipitado de Kombucha liofilizado; PKD - Precipitado de Kombucha desidratado; SKL - SCOBY de Kombucha liofilizada; Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

Foi observado que os nematódeos *C.elegans* quando inoculados em meios de cultivo contendo os derivados desidratados ou liofilizados de Kombucha não apresentaram redução da taxa de sobrevivência em comparação ao grupo controle ($p>0,05$). Por outro lado, os nematódeos em presença de Levamisol (substância antiparasitário), apresentaram redução significativa ($p\leq 0,05$) da taxa de sobrevivência comparado aos demais grupos. Esses resultados confirmam que a SCOBY liofilizada, bem como os precipitados liofilizado e desidratado não apresentam toxicidade, garantindo sua segurança para consumo.

É importante mencionar que foram selecionados para os testes com *C.elegans* apenas os produtos desidratados e liofilizados que apresentaram elevadas taxas de crescimento microbiológico. Desta forma, considerando a baixa contagem de bactérias, fungos e leveduras e até mesmo, ausência de contagem de bactérias acéticas da SCOBY desidratada, optou-se por não avaliar sua toxicidade, por julgarmos um produto com menor possibilidade de alegação probiótica, além da aparência muito similar à um couro ecológico, o que talvez poderia ser melhor aproveitado em outras áreas e para outros fins.

Em relação ao desenvolvimento dos nematódeos observou-se um aumento da área corporal quando comparado aos grupos controle e Levamisol ($p \leq 0,05$), como é possível avaliar pela Figura 6.

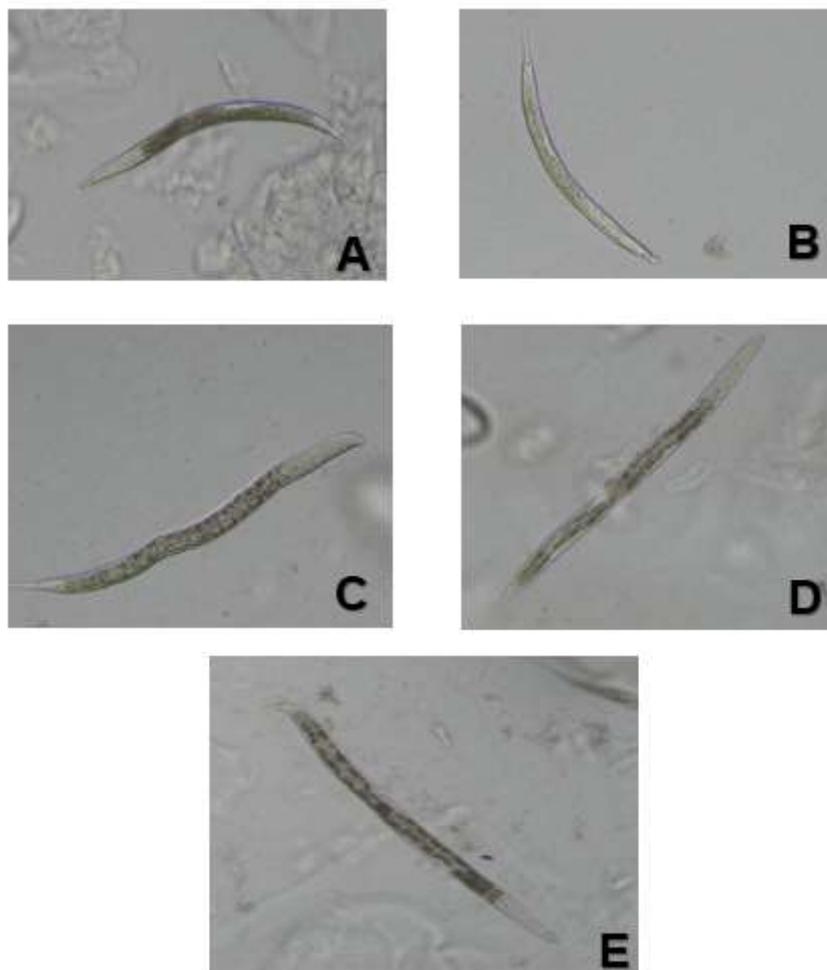


Figura 6: Fotografia de vermes *Celegans* adultos presentes nos produtos desidratados e liofilizados de Kombucha.

A = Controle; B = Levamisol; C= PKD - Precipitado de Kombucha desidratado; D= PKL - Precipitado de Kombucha liofilizado; E= SKL - SCOBY de Kombucha liofilizada;

A SCOBY de Kombucha é composta por uma diversidade de microrganismos, assim como o material precipitado de Kombucha acumulado durante a fermentação, sendo esses microrganismos, em especial as bactérias, fontes de nutrientes ao *C. elegans* e essenciais para a sobrevivência e desenvolvimentos dos mesmos (SCHULENBURG; FÉLIX, 2017; LEUNG et al., 2008; FITZGERALD et al., 2009; HUNT, 2017). Os produtos desenvolvidos,

SCOBY e precipitado, demonstraram ser um substrato ideal para os nematódeos, visto que mesmo sendo impostos por processos de secagem, preservaram microrganismos suficientes e não patógenos para manter a sobrevivência e auxiliar no crescimento dos nematódeos.

A bebida de Kombucha não tem natureza tóxica e a *Food and Drug Administration* e Kappa Laboratories dos Estados Unidos em 1995 realizaram testes microbiológicos e bioquímicos assegurando o consumo humano da bebida (JAYABALAN et al., 2014). Vijayaraghavan et al. (2000) avaliaram a toxicidade aguda em 90 dias de consumo de bebida de Kombucha em ratos e não identificaram sinais de toxicidade. Pauline et al. (2001) avaliaram a toxicidade via oral em ratos por 15 dias com 3 doses diferentes de bebida de Kombucha e observaram ausência toxicidade.

Embora os estudos citados tenham avaliado a toxicidade em outros modelos animais, como ratos, o *C.elegans* é uma espécie altamente sensível a exposições tóxicas de várias substâncias, sendo portanto um modelo adequado e aplicado para assegurar que os produtos produzidos a partir da fermentação da bebida e da SCOBY de Kombucha são seguros para consumo.

Além dos microrganismos encontrados naturalmente nas bebidas e na SCOBY, observados também no material precipitado, o chá verde utilizado com substrato de fermentação, pode influenciar nos resultados observados nos nematódeos. FEI et al. (2017) avaliaram os efeitos do chá puer, chá preto e chá verde em modelo *C. Elegans* e foi verificado o aumento na longevidade dos vermes.

Atualmente são limitados os estudos com testes de toxicidade usando este tipo de modelo “*in vivo*” em bebidas fermentadas microbiologicamente ativas e no desenvolvimento de novos produtos. Porém os nematódeos em questão oferecem vantagens nos primeiros estudos e fases de desenvolvimentos de produtos alimentícios por serem eficientes em relação ao custo e tempo, similaridade com a genética e metabolismo humano e facilidade no manuseio (CALVO et al., 2016).

Desta forma, pode-se considerar que a SCOBY liofilizada, bem como os precipitados liofilizado e desidratado não apresentaram toxicidade “*in vivo*” frente aos ensaios de mortalidade e desenvolvimento do *C. elegans*, indicando que podem ser consumidas por humanos. Somado a isso, pode-se sugerir um efeito

probiótico dos produtos avaliados, considerando o aumento da área corporal dos nematódeos alimentados com os mesmos. Contudo, reforçamos a necessidade de mais investigações, especialmente em relação à identificação dos microrganismos presentes nesses produtos.

6. CONCLUSÃO

As bebidas de Kombucha e o chás produzidos pela empresa parceira foram caracterizados apresentando resultados que atendem a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019 para produção de kombucha, evidenciando a segurança da bebida e das SCOBYS. Os resultados obtidos para caracterização físico-química estão de acordo com a literaturas citadas, onde os teores de acidez total titulável encontram resultados ótimos para uma bebida sensorialmente aceitável e que não cause problemas gastrointestinais ou dentais, bem como os valores de pH, conformes para a não proliferação de patógenos.

Os compostos bioativos foram preservados durante a fermentação de sete dias, com possibilidades de um aumento gradativo caso a fermentação fosse prolongada. Os derivados de Kombucha desidratados foram produzidos pela empresa parceira e os liofilizados na Universidade Vila Velha e ambas técnicas de secagem reduziram a contagem de bactérias totais, acéticas, fungos e leveduras, porém essa redução ainda garante uma quantidade viável ao consumo e ingestão de microrganismos com propriedades probióticas, podendo conferir ao indivíduo os mesmos benefícios da bebida de Kombucha fermentada.

A toxicidade dos derivados desenvolvidos se mostrou seguros para consumo humano quando utilizado o modelo de teste “*in vivo*” com o nematódeo *C. Elegans*. Não houve a mortalidade e os tratamentos dados aos vermes com os derivados de Kombucha auxiliaram no desenvolvimento deles. Nesse sentido, foram obtidos produtos derivados da SCOBY de Kombucha com potencial inovador, elevada contagem microbiológica e seguros para consumo humano. Portanto, o desenvolvimento de produtos à base de Kombucha se torna um campo investigativo promissor e vantajoso para saúde humana quando também agregadas a novos tipos de processamento, disponibilizando em outras formas além da líquida.

Sendo assim, considerando esse trabalho pioneiro, se faz necessário estudar mais sobre esses microrganismos remanescentes após os processos de secagem, especialmente utilizando a liofilização, bem como seus benefícios à saúde e utilização, possivelmente, como ingrediente alimentar.

7. REFERÊNCIAS

- ABKOM. **Associação brasileira de Kombucha**, 2020. Página inicial. Disponível em:< <https://www.abkom.org.br/>>. Acesso em: 31 de Janeiro de 2020.
- AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of 257 physicochemical properties and antioxidant activities of Kombucha “Tea Fungus” during 258 extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.
- AHMED, R. F.; HIKAL, M. S.; ABOU-TALEB, K. A. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. **Annals of Agricultural Sciences**, n. January, p. 1–7, 2020.
- Air-Dried Food Market Size By Product (Fruits, Vegetables, Coffee Beans, Herbs, Meat), By Form (Powder & Granules, Chunks/Pieces, Flakes), By B2C Distribution Channel (Supermarkets & Hypermarkets, Convenience Stores, Online Retailers), By B2B End-user (Hotels & Restaurants, Bakery Chains, Pet Food, Processed Food), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2019 - 2026. **Global Market Insights, 2019**. Disponível em:< <https://www.gminsights.com/industry-analysis/air-dried-food-market>>. em: 31 de Janeiro de 2020
- Alimentação saudável cria ótimas oportunidades de negócio. **SEBRAE**, 2019. Disponível em:<<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/segmento-dealimentacaosaudavelapresentaopportunidadesdenegocio,f48da82a39bbe410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2020.
- AMARASEKARA, A. S.; WANG, D.; GRADY, T. L. A comparison of Kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 2, 2020.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N.;. Phenolic compounds in foods-A brief review. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz** 66, 1–9, 2007.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed. Virginia, 2000.
- ASPIYANTO. et al. Characteristic of fermented spinach (Amaranthus spp.) polyphenol by Kombucha culture for antioxidant compound. **International Symposium on Applied Chemistry**, v. 1803, 2017.
- AUGUSTI, P.R. et al. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in

Caenorhabditis elegans: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. **Food Chem. Toxicol.** 109, 60–67, 2017.

AVILA, D.S. et al. Organotellurium and Organoselenium Compounds attenuate Mn-induced toxicity in C. elegans by preventing oxidative stress. **Radic Biol Med** v. 52, 1903–1910, 2012.

AYED, L.; ABID, S.B.; HAMD, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111–121, 2017.

BENNEMANN, G. D. et al. Bioactive compounds and antiradical activity in grape pomace flours from different cultivars dehydrated in a freeze dryer and in an oven. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

BHATTA, S.; JANEZIC, T. S.; RATTI, C. Freeze-drying of plant-based foods. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 1–22, 2020.

BIEGAŃSKA-MARECIK, R.; RADZIEJEWSKA-KUBZDELA, E.; MARECIK, R. Characterization of phenolics, glucosinolates and antioxidant activity of beverages based on apple juice with addition of frozen and freeze-dried curly kale leaves (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L.). **Food Chemistry**, v. 230, p. 271–280, 2017.

BLOOR, S.J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, in: *Methods in Enzymology*. **Elsevier**, pp. 3–14, 2001.

BOLLA, P. A.; et al. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 1, p. 15–22, 2010.

BORGES, S. et al. A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 381–388, 2016.

BOYER, R.; HUFF, K. Using Dehydration to Preserve Fruits, Vegetables, and Meats. **Virginia Cooperative Extension**, p. 1–5, 2008.

BRAGHINI, F. et al. Composição físico-química de Erva-mate, Antes e Após Simulação do Chimarrão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 20, n. 1/2, p. 7–15, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. **Diário Oficial da União**.

Brasília, 19 set 2019.

BRENNER, S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** v.77, p. 71–94, 1974.

CALVO, D.R. et al. Development of novel functional ingredients: need for testing systems and solutions with *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Food Science & Technology**, 2016.

CARDOSO, R. R. et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, p. 108782, 2020.

CELESTINO, S. M. C. Princípios de secagem de alimentos. **Embrapa Cerrados**, p. 51, 2010.

CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016.

CHARÃO, M.F. et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative “in vivo” model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **Int. J. Nanomedicine** v. 10, 5093–5106, 2015.

CHEN, H. C.; LIN, C. W.; CHEN, M. J. The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in Kefir. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 1, p. 126–130, 2006.

CHITRAKAR, B.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? [s.l.] **Taylor & Francis**, v. 59, 2019.

CORNEJO, F.E.P.; NOGUEIRA, R.I.; WIBERG, V.C. Secagem como método de conservação de frutas. **Embrapa**, 2003.

COSTA, E. et al. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 5, p. 873–878, 2002.

COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1–16, 2017.

DE FILIPPIS, F. et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11–16, 2018.

FARAG, M. A. et al . Metabolomics reveals impact of seven functional foods on metabolic pathways in a gut microbiota model. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p. 47–59, 2020.

FEI, T. et al. The anti-aging and anti-oxidation effects of tea water extract in *Caenorhabditis elegans* The anti-aging and anti-oxidation effects of tea water extract in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, 2017.

FELLOWS, P. J. Freeze drying and freeze concentration. **Food Processing Technology**, p. 687–699, 2009.

FITZGERALD, V.K. et al. **Short Technical Reports**, 2009.

FOERST, P.; SANTIVARANGKNA, C. Advances in starter culture technology: Focus on drying processes. [s.l.] **Elsevier**, 2015.

FU, C. et al . Antioxidant activities of Kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 123–126, 2014.

GAGGIÀ, F. et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. **Journal Nutrients**, 2019

Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, and Forecast, 2016 - 2022. **Zion Market Research**. 2017. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/newsrelease/2017/11/13/1185131/0/en/Global-Kombucha-Market-Sales-to-Grow-USD-2457-0-Million-by-2021-Zion-Market-Research.html>. Acesso em: 31 de Janeiro de 2020.

GONG, P. et al . Enhancing spray drying tolerance of *Lactobacillus bulgaricus* by intracellular trehalose delivery via electroporation. **Food Research International**, v. 127, n. October 2019, p. 108725, 2020.

GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A. et al. Research on the effect of culture time on the Kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 4, p. 447-457, 30 Dec. 2016.

GRANATO, D. et al . Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 93–118, 2020.

GUERGOLETTO, K. B. et al . Dried Probiotics for Use in Functional Food Applications. **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**, 2012.

GÜMÜŞAY, Ö. A. et al . Drying effects on the antioxidant properties of tomatoes and ginger. **Food Chemistry**, v. 173, p. 156–162, 2015.

GUINÉ, R. P. F.; JAO, S.; BARROCA, M. J. Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita maxima*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 422–428, 2011.

HANSEN, T.; THOMSEN, T. U. The influence of consumers' interest in healthy eating, definitions of healthy eating, and personal values on perceived dietary quality. **Food Policy**, v. 80, n. March, p. 55–67, 2018.

HILL, C. et al . Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HUANG, S. et al . Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 63, p. 1–17, 2017a.

HUANG, S. et al . Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 196, p. 11–17, 2017b.

HUNT, P.R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **J. Appl. Toxicol.** 37, 50–59, 2017.

INPI, 2016. Disponível em: < <http://www.inpi.gov.br/menuservicos/informacao/busca-de-patentes>>. Acesso em: 31 de Janeiro de 2020.

JAYABALAN, R. et al. Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, July 2008.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R.V.; LONČAR, 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.

JAYAS, D. S. Food Dehydration. [s.l.] **Elsevier**, 2016.

JOKICEVIC, K. et al. Processing of potential upper respiratory tract probiotics by spray drying. **Drying Technology**, p. 1–15, 2020.

JOHN, S. M.; DEESEENTHUM, S. Properties and benefits of Kefir - A review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 275–282, 2015.

JUNG, Y. et al. Effect of Kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease. **Food Science and Biotechnology**, 2018

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 15, 2020.

Kombucha Brewers Internacional, 2020. Kombucha Market (Herbs & Spices, Citrus, Apple, Coconut & Mangoes, Flowers, and Others) by Distribution Channel (Supermarkets, Health Stores, and Others): Página inicial. Disponível em:<<https://Kombuchabrewers.org/>>. Acesso em: 31 de Janeiro de 2020

LEUNG, M.C.K. et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicol. Sci.** 106, p. 5–28, 2008.

LEAL, J. M. et al . A review on health benefits of Kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.

LESTARI, K. A. P.; SA'DIYAH, L. Karakteristik Kimia dan Fisik Teh Hijau Kombucha pada Waktu Pemanasan yang Berbeda Comparison of Physical Characteristics of Kombucha Green Tea at Different Heating Times. **Journal of Pharmacy and Science**, v. 5, n. 1, 2020.

LOBO, R.O.; DIAS, F.O.; SHENOY, C.K. Kombucha for healthy living: Evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 2, p. 541–546, 2017.

MARZBAN, F. et al . Kombucha tea ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse model of multiple sclerosis. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, n. 6, p. 782–793, 2015.

MAY, A. et al . Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 2019, n. 9, p. 1–22, 2019.

MENDONÇA R,G. et al. Propriedades Antioxidantes e Efeitos Antimicrobianos da Kombucha: Revisão da Evidência Científica. **Revista Contexto & Saúde**. Editora Unijuí, vol. 20, n. 40, p. 244-251, 2020

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al . Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 27–32, 2006a.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al . Survival of freeze-dried bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 9–24, 2008b.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al . Survival of yeasts stored after freeze-drying

or liquid-drying. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 107–119, 2010c.

MORETTI, A. F. et al . Protective Effect of Lyophilization on Fermentative, Microbiological and Sensory Properties of Kefir. **International Journal of Biochemistry and Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 5–11, 2019.

MULOT, V. et al . Experimental and numerical characterization of food dehydration during freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 263, p. 13–24, 2019.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al . Contenido de ácido y efectos de las condiciones de fermentación en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de bebidas de té de Kombucha. *CYTA - Journal of Food*, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2017.

NUMMER, B.A. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model food code: Risk analysis and processing guidance abstract. **Journal of Environmental Health**, v.76, n. 4, p. 8–12, 2013.

PAKRAVAN, N. et al . Cosmeceutical effect of ethyl acetate fraction of Kombucha tea by intradermal administration in the skin of aged mice. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 6, p. 1216–1224, 2018.

PAULINE T. et al. Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of Kombucha tea. **Biomed Environ Sci**, 2001.

PORTA-DE-LA-RIVA, M.; FONTRONDONA, L.; VILLANUEVA, A.; CERÓN, J. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. **Journal Vis. Exp**, 2012.

PRADO, M. R. et al . Milk Kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–10, 2015.

Prepared Dry-Foods Market - Global Industry Analysis, Market Size, Share, Trends, Analysis, Growth and Forecast 2016 – 2024. **Transparency Market Research**, 2020. Disponível em: <<https://www.transparencymarketresearch.com/prepared-dryfoods-market.html>>. Acesso em: 31 de Janeiro de 2020.

RE, R. et al . Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 9-10, 1999.

SA'DIYAH, L.; LESTARI, K. A. P. Pengaruh Lama Pemanasan Terhadap Nilai ALT Bakteri Teh Kombucha The Effect of Heating Duration on the Bacterial TPC

in Kombucha Tea. **Journal of Pharmacy and Science**, v. 5, n. 1, p. 21–24, 2020.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chem.** v. 112, p. 654–658, 2009.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, p 552, 2007.

SCHULENBURG, H.; FÉLIX, M.-A. The natural biotic environment of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, 206, p. 55–86, 2017.

SPADARO, D. et al. Effect of culture age, protectants, and initial cell concentration on viability of freeze-dried cells of *Metschnikowia pulcherrima*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 809–815, 2010.

SRIHARI, T. et al. Antihyperglycaemic efficacy of Kombucha in streptozotocin-induced rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1794–1802, 2013a.

SRIHARI, T. et al. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by Kombucha (lyophilized). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 53–58, 2013b.

SZUTOWSKA, J. et al. Spontaneously fermented curly kale juice: microbiological quality, nutritional composition, antioxidant, and antimicrobial properties. **J Food Sci**, 85(4):p. 1248–1255, 2020.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.

TU, C. et al. Use of Kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 81–89, 2019.

VELIĆANSKI, A. S. et al. Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 2, p. 420–429, 2014.

VIJAYARAGHAVAN R, et al. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. **Biomed Environ Sci**, 2000.

VITAS, J.S. et al. Chemical composition and biological activity of novel types of Kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 95–102, 2018.

ZHAO, Z. et al. Flavour chemical dynamics during fermentation of Kombucha tea. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v 30. p. 732-74,2018.

ZUBAIDAH, E. et al. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 198–203, 2017a.

ZUBAIDAH, E. et al . “in vivo” evaluation of snake fruit Kombucha as hyperglycemia therapeutic agent. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 1, p. 453–457, 2018b.