



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MARIA DE FÁTIMA DANTAS LINHARES

KOMBUCHA SABORIZADA COM EXTRATOS DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS: INFLUÊNCIA DO AÇÚCAR NA FERMENTAÇÃO E NA
MICROBIOTA INTESTINAL

FORTALEZA

2024

MARIA DE FÁTIMA DANTAS LINHARES

KOMBUCHA SABORIZADA COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: INFLUÊNCIA DO
AÇÚCAR NA FERMENTAÇÃO E NA MICROBIOTA INTESTINAL

Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Microbiana e Enzimática.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

FORTALEZA
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L728k Linhares, Maria de Fátima Dantas.
Kombucha saborizada com resíduos agroindustriais : Influência do açúcar na fermentação e na microbiota intestinal / Maria de Fátima Dantas Linhares. – 2024.
82 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profª. Dra. Sueli Rodrigues.
1. kombucha. 2. bebida fermentada. 3. prebiótico. 4. SCOBY. 5. digestão in vitro. I. Título.
CDD 664
-

MARIA DE FÁTIMA DANTAS LINHARES

KOMBUCHA SABORIZADA COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: INFLUÊNCIA DO
AÇÚCAR NA FERMENTAÇÃO E NA MICROBIOTA INTESTINAL

Tese de doutorado submetido à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Microbiana e Enzimática

Aprovada em: 03/12/2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. Mayra Garcia
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Isabel Cristina da Silva Haas

A Deus.

Sou grata por tudo que tenho e sou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita misericórdia e bondade.

À minha família, pelo cuidado, amor e paciência comigo.

Ao meu grande amor Assis Neto, eu agradeço por todo o seu cuidado, carinho, cumplicidade, amor e incentivo. Obrigada por fazer meus dias melhores.

À professora Sueli Rodrigues, pela acolhida, orientação, incentivo e confiança no meu trabalho.

À Dra. Thatyane Vidal Fonteles pelas dicas, ajuda, orientação e amizade.

À equipe Labiotec, Cris, Raquel, Eciângela, Betina, Yvina e Elenilson pela ajuda que me foi dada sempre que pedia socorro e os momentos de risadas e descontração. Em especial, Ana Karoline, Elaine, Brenda e Sannara por toda amizade, apoio, ajuda nos momentos de correria e consolo quando o desânimo batia. Muito obrigada!

Aos meus amigos Natanael Campos e Regina Campos por sua amizade, apoio e conselhos que edificaram minha vida. Sou grata a Deus por suas vidas!

Aos membros da banca, Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura, Dra. Mayra Garcia, Dra. Francisca Andrea de Oliveira, Dra. Isabel Cristina da Silva Haas por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Frutos Tropicais (INCT-FT) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará pela formação acadêmica.

Seja forte e corajoso!
Não se apavore, nem se desanime,
pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar.
(Josué 1:9)

RESUMO

Kombucha é uma bebida oriental obtida a partir da fermentação de chá verde (*Camellia Sinenses*) e sacarose por um consórcio de leveduras e bactérias (SCOBY), rica em ácidos orgânicos, gás carbônico e etanol. A Kombucha apresenta características específicas e propriedades que podem beneficiar a saúde humana. O seu consumo está associado a efeitos antioxidantes, antidiabéticos, anti-inflamatórios, anticancerígenos e antimicrobianos. O objetivo desse estudo foi investigar como o uso de extratos obtidos a partir de diferentes resíduos agroindustriais e diferentes concentrações de açúcar afetam a fermentação da kombucha e seu impacto na microbiota intestinal. Inicialmente, foram produzidas duas kombuchas mãe, sendo uma sem açúcar (kombucha) e outra com açúcar (kombucha_A). As bebidas foram saborizadas com extrato aquoso sonificado proveniente de resíduos liofilizados de manga, caju e uva. Foram preparadas seis kombuchas, sendo três bebidas sem açúcar e três bebidas com açúcar. As concentrações de metabólitos variaram entre as bebidas, onde, a maior produção de acetato foi nas bebidas de caju, lactato nas bebidas de manga e ácido glucônico nas bebidas de uva. A produção de etanol ficou dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira (Etanol<0,05% v/v). Durante a estabilidade houve aumento da concentração de butirato, onde a maior concentração foi na kombucha de manga com açúcar (2,34 g/L). O perfil sensorial foi empregado para descrever as características de cor, sabor, aparência e aroma das kombuchas. A avaliação sensorial utilizou o perfil livre, com terminologia descritiva baseada no Método de Rede e escalas não estruturadas de 10 cm. Os participantes evidenciaram que os resíduos agroindustriais foram eficazes como saborizantes das bebidas. Quanto a microbiota intestinal humana a avaliação do inóculo fermentado na presença das bebidas mostrou aumento da diversidade de microrganismos e riqueza de espécies em todas as amostras, em destaque a amostra kombucha sem adição de açúcar. Nessa amostra, os gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* tiveram aumento de 33,85%, 12,10%, 7,93% e 2,97%, respectivamente, na abundância relativa. Apenas para as amostras de kombucha com açúcar e kombucha de caju com açúcar o maior crescimento foi observado nos gêneros *Escherichia shigella* (57,85%) e *Clostridium XIVa* (32,79%). Durante a fermentação fecal houve consumo de compostos fenólicos e produção de ácidos orgânicos de cadeia curta (butirato e propionato) na amostra fermentada com kombucha. No entanto, as amostras de kombucha com açúcar e kombucha de caju com açúcar houve consumo de ácidos orgânicos pela microbiota fecal. O índice prebiótico positivo foi observado para a amostra que não continha açúcar, enquanto as amostras com açúcar tiveram índice negativo. Contudo, os

resultados obtidos neste estudo apoiam a possibilidade do desenvolvimento de uma bebida com a redução de açúcar e até mesmo da eliminação deste. Os ensaios de digestão simulada demonstraram que o consumo de kombucha tem potencial para modificar a microbiota intestinal nativa fortalecendo as alegações sobre a kombucha ser considerada uma bebida prebiótica.

Palavras-chave: kombucha; SCOBY; prebiótico; bebida fermentada; digestão in vitro.

ABSTRACT

Kombucha is an oriental beverage obtained from the fermentation of green tea (*Camellia sinenses*) and sucrose by a consortium of yeasts and bacteria (SCOBY), rich in organic acids, carbon dioxide, and ethanol. Kombucha has specific characteristics and properties that can benefit human health. Its consumption is associated with antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial effects. This study aimed to investigate how the use of extracts obtained from different agro-industrial waste and different sugar concentrations affect kombucha fermentation and its impact on the intestinal microbiota. Initially, two mother kombuchas were produced, one without sugar (kombucha) and the other with sugar (kombucha_A). The beverages were flavored with sonicated aqueous extract from freeze-dried mango, cashew, and grape waste. Six kombuchas were prepared, three without sugar and three with sugar. Metabolite concentrations varied among beverages, with the highest acetate production in cashew beverages, lactate in mango beverages, and gluconic acid in grape beverages. Ethanol production was within the limits required by Brazilian legislation (ethanol <0.05% v/v). During stability, there was an increase in butyrate concentration, with the highest concentration being in mango kombucha with sugar (2.34 g/L). The sensory profile was used to describe the color, flavor, appearance, and aroma characteristics of the kombuchas. The sensory evaluation used the free profile, with descriptive terminology based on the Network Method and unstructured scales of 10 cm. The participants showed that agro-industrial waste was effective as flavoring agent in the beverages. Regarding the human intestinal microbiota, the evaluation of the fermented inoculum in the presence of the beverages showed an increase in the diversity of microorganisms and species richness in all samples, with emphasis on the kombucha sample without added sugar. In this sample, the genera *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, and *Lactobacillus* had an increase of 33.85%, 12.10%, 7.93%, and 2.97%, respectively, in relative abundance. Only for the samples of kombucha with sugar and cashew kombucha with sugar, the greatest growth was observed in the genera *Escherichia shigella* (57.85%) and *Clostridium* XIVa (32.79%). During fecal fermentation, there was consumption of phenolic compounds and production of short-chain organic acids (butyrate and propionate) in the sample fermented with kombucha. However, the samples of kombucha with sugar and cashew kombucha with sugar had a consumption of organic acids by the fecal microbiota. The positive prebiotic index was observed for the sample that did not contain sugar, while the samples with sugar had a negative index. However, the results obtained in this study support the possibility of developing a beverage with reduced sugar and even its elimination.

Simulated digestion trials demonstrated that kombucha consumption has the potential to modify the native gut microbiota, strengthening claims about kombucha being considered a prebiotic beverage.

Keywords: kombucha; SCOBY; prebiotic; fermented beverage; in vitro digestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Principal via metabólica do consorcio de microrganismos	21
Figura 2	– Alterações ocorridas nas catequinas durante a fermentação do chá verde para obtenção da kombucha	23
Figura 3	– Fluxograma do processo de fermentação da kombucha	27
Figura 4	– Esquema de produção das Kombuchas	31
Figura 5	– Esquema do processo de digestão gástrica e fermentação entérica das kombuchas	36
Figura 6	– pH, sólidos solúveis totais e acidez tituláveis, ácidos orgânicos e açúcares, da fermentação sem açúcar (FSA) e fermentação com açúcar (FCA)	39
Figura 7	– ABTS, DPPH e compostos fenólicos totais das bebidas fermentadas sem açúcar (FSA) e fermentadas com açúcar (FCA)	41
Figura 8	– Kombuchas com e sem adição de açúcar saborizadas com resíduos agroindustriais durante segunda fermentação	43
Figura 9	– Ácidos orgânicos, açúcares e etanol das kombuchas de caju (Kombucha_C e Kombucha_CA), manga (Kombucha_M e Kombucha_MA) e uva (Kombucha_U e Kombucha_UA) durante a fermentação	46
Figura 10	– Ácidos orgânicos, açúcares e etanol das kombuchas de caju (Kombucha_C e Kombucha_CA), manga (Kombucha_M e Kombucha_MA) e uva (Kombucha_U e Kombucha_UA) durante a estabilidade	51
Figura 11	– Concentração de etanol das amostras comerciais, marcas A, B, C e D	53
Figura 12	– Distribuição dos julgadores e do consenso da equipe em relação às amostras nas duas primeiras dimensões da análise	56
Figura 13	– Concentração dos compostos fenólicos (mg GAE/L) ao final de cada fase da digestão simulada in vitro e fermentação fecal de kombucha sem a açúcar (kombucha) com açúcar (Kombucha_A) e de caju (kombucha_CA)	57

Figura 14 – Abundância relativa (%) a nível do filo em 0 e 48h de fermentação colônica	61
Figura 15 – <i>Heatmap</i> da microbiota fecal a nível de família e ácidos após 48h de fermentação	62
Figura 16 – Concentração dos ácidos orgânicos de cadeia curta durante fermentação colônica	63
Figura 17 – Abundância relativa (%) da microbiota intestinal após fermentação fecal a nível taxonômico de gênero	65
Figura 18 – Escores do gráfico VIP com as espécies da microbiota fecal após 48h de fermentação	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais compostos presentes na kombucha com propriedades promotoras de saúde	21
Tabela 2 – Resíduos agroindustriais e suas aplicações.....	26
Tabela 3 – Delineamento experimental fatorial simples para o processamento dos resíduos por ultrassom	30
Tabela 4 – Nomenclatura e abreviações das kombuchas produzidas	30
Tabela 5 – Composição química dos fluidos utilizados na digestão simulada	34
Tabela 6 – pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante durante a segunda fermentação	44
Tabela 7 – pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante durante a estabilidade	49
Tabela 8 – Valores residuais das amostras de kombucha	54
Tabela 9 – Valores residuais dos julgadores de kombucha	54
Tabela 10 – Estimativa Alfa, Chao1, Shannon e Simpson para espécies bacterianas antes e depois da fermentação fecal de kombuchas	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Alimentos fermentados	17
2.2	Kombucha	17
2.2.1	<i>Parâmetros do processo e concentração dos substratos</i>	18
2.2.2	<i>Compostos bioativos</i>	20
2.2.3	<i>Kombucha como uma bebida prebiótica e probiótica</i>	22
2.2.4	<i>Saborização da kombucha</i>	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Fermentação da kombucha e saborização	29
4.1.1	<i>Fermentação do chá verde</i>	29
4.1.2	<i>Processamento dos resíduos e saborização</i>	29
4.1.3	<i>Kombuchas comerciais</i>	31
4.2	Análises físico-químicas	31
4.2.1	<i>pH, sólidos solúveis e acidez titulável total</i>	31
4.2.2	<i>Determinação de açúcares e ácidos orgânicos</i>	32
4.2.3	<i>Compostos fenólicos totais</i>	32
4.2.4	<i>Atividade antioxidante in vitro</i>	33
4.3	Estabilidade	33
4.4	Análise sensorial	33
4.5	Digestão <i>in vitro</i> e fermentação fecal	34
4.5.1	<i>Análise da microbiota, produção de ácidos graxos de cadeia curta e consumo de açúcar</i>	36
4.5.2	<i>Índice prebiótico</i>	37
4.6	Análise estatística	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Perfil químico das bebidas durante a fermentação, estabilidade e sensorial	38

5.1.1	<i>Primeira fermentação (F1)</i>	38
5.1.2	<i>Segunda fermentação (F2)</i>	42
5.1.3	<i>Estabilidade</i>	48
5.1.4	<i>Análise sensorial</i>	53
5.2	Digestão <i>in vitro</i> das kombuchas e fermentação colônica	56
5.2.1	<i>Biodisponibilidade dos compostos fenólicos após digestão e fermentação colônica</i>	56
5.2.2	<i>Análise da microbiota intestinal</i>	59
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL	81

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Kombucha é a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e anaeróbia obtido a partir da infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) (Brasil, 2019). Os alimentos fermentados, como a Kombucha, possuem componentes que conferem características específicas a esse produto e que podem promover benefícios a saúde humana. O resultado desse processo fermentativo favorece propriedades adicionais além daquelas já esperadas para o alimento *in natura* (Diez-Ozaeta; Astiazaran, 2022).

O consumo de Kombucha vêm se popularizando cada vez mais devido aos efeitos que esta bebida pode oferecer (de Oliveira *et al.*, 2023). Alguns estudos relatam efeitos antioxidantes (Morales *et al.*, 2023) antidiabéticos (Aloulou *et al.*, 2012), anti-inflamatórios (Villarreal-Soto *et al.*, 2019), anticarcinogênico (Kaewkod; Bovonsombut; Tragoolpua, 2019) e antimicrobianos (Ivanišová *et al.*, 2020).

Apesar do apelo a saúde atribuído ao consumo de kombucha, a bebida ainda pode conter uma quantidade considerável de açúcar no produto. Alguns estudos relatam uso de até 100g/L de açúcar para iniciar a fermentação da kombucha (Mizuta *et al.*, 2020). Vázquez-Cabral *et al.* (2017) produziu quatro formulações distintas de bebidas análogas a kombucha utilizando *Quercus resinosa*, *Quercus Arizonica*, *Quercus Convallata* e *Camellia sineses* com 10% de sacarose. Após 7 dias de fermentação a concentração de sacarose era aproximadamente 40, 70, 90 e 70 g/L, respectivamente, nas formulações de *Q. resinosa*, *Q. Arizonica*, *Q. Convallata* e *C. sineses*. No entanto, dentro do processo de fermentação altos níveis de açúcar podem diminuir o crescimento dos microrganismos, através do estresse osmótico, e com isso reduzir a produção de metabólitos de interesse (Bortolomedi; Paglarini; Brod, 2022).

Além de afetar o processo fermentativo da própria bebida, o excesso de açúcar nesse produto pode afetar também a microbiota intestinal humana. Os nutrientes são absorvidos em porções distintas do sistema digestório, favorecendo o desenvolvimento de gêneros diferentes de microrganismos. Os açúcares são absorvidos na porção do intestino delgado, enquanto as fibras são utilizadas pela microbiota presente no colón descendente, como as espécies do filo *Actinobacteria* (Gonczi; Bessissow; Lakatos, 2019; Unusan, 2020).

O efeito dos açúcares na fisiologia microbiana tem sido abordado em estudos e sua abundância tem sido associada a doenças (Mokhtari *et al.*, 2024; Noble *et al.*, 2017; Shon *et al.*, 2023; Wilding *et al.*, 2021), como no caso das *Enterobacteriaceae* e diabetes tipo 2 e *Clostridium sensu stricto* ao desenvolvimento de alergia alimentar (Ling *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2015). Assim,

os açúcares mais simples servem como fonte de nutrientes para microrganismos, dos quais alguns podem ser patogênicos em relação a microbiota distal (Di Rienzi; Britton, 2020; Noble *et al.*, 2017)

Não só o açúcar, mas outros compostos também estão envolvidos na produção dos compostos bioativos da kombucha. A exemplo disso, a composição fenólica do chá utilizado na fermentação. Esses compostos são hidrolisados através do baixo pH e enzimas produzidas pelo consórcio microbiano. Esses compostos são pouco biodisponíveis no intestino delgado passando-os intactos e alcançando o intestino grosso inalterados onde serão consumidos pela microbiota local. Várias espécies são conhecidas por utilizarem compostos complexos no seu metabolismo, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Roseburia* e *Ruminococcus*. Dentre estas *Bifidobactérias* e *Lactobacillus* são usadas como probióticos comerciais (Liu *et al.*, 2018; Liu; Vincken; de Bruijn, 2022).

Revisões sistemáticas sobre o efeito prebiótico dos polifenóis comprovam que estes compostos modulam o perfil microbiano intestinal e regulam a saúde do hospedeiro (Alves-Santos *et al.*, 2020; Mithul Aravind *et al.*, 2021; Moorthy *et al.*, 2020). Seu efeito está associado ao aumento dos microrganismos probióticos e redução das bactérias patogênicas, o que resulta no aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta (SFCAs), redução de endotoxinas, redução do risco de gastroenterite, câncer de cólon, doença inflamatória intestinal e outras infecções relacionadas e síndrome metabólica, como, obesidade e diabetes tipo 2 (Roberfroid *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi investigar como o uso de extratos obtidos a partir de diferentes resíduos agroindustriais e diferentes concentrações de açúcar afetam a fermentação da kombucha e seu impacto na microbiota intestinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos fermentados

A procura por alimentos com potencial de afetar benéficamente o bem-estar tem aumentado significativamente. Os produtos alimentares provenientes de processos fermentativos possuem componentes que conferem características específicas que podem promover a saúde humana. O resultado desse processo fermentativo favorece propriedades adicionais além daquelas já esperadas para o alimento in natura (Diez-Ozaeta; Astiazaran, 2022).

Durante a fermentação diversas reações são desencadeadas resultando na alteração das propriedades nutritivas, bioativas e sensoriais das matrizes alimentares. A variabilidade dos componentes químicos presentes na fermentação irá ocorrer de acordo com a condução do processo (Marco *et al.*, 2017; Melini *et al.*, 2019).

A popularidade dos alimentos fermentados com benefícios potenciais para a saúde emergiu fortemente ao longo do tempo. Através de uma infinidade de combinações entre microrganismos e matrizes alimentares, milhares de alimentos e bebidas fermentadas podem ser encontradas hoje em dia. Estima-se que mais de 3.500 diferentes tipos de alimentos fermentados, como, bebidas à base de leite, vegetais ou frutas estão sendo produzidos em todo o mundo (Diez-Ozaeta; Astiazaran, 2022; Kabak; Dobson, 2011).

Em vista do potencial observado nos alimentos fermentados, a Kombucha tem se destacado em meio as bebidas fermentadas como um produto com propriedades funcionais. Essa bebida milenar originalmente consumida na China têm crescido nos países ocidentais e sendo comercializada em todo o mundo (Vargas; Fabricio; Záchia Ayub, 2021).

2.2 Kombucha

A Kombucha é uma bebida originária da China durante a Dinastia Qin em 221 a.C e foi disseminada para o Japão, Rússia e Europa Oriental, sendo popularizada durante a Segunda Guerra Mundial. É uma bebida levemente ácida, não alcoólica e ou de baixo teor alcoólico e gaseificada obtida pela fermentação do chá adoçado. A fermentação ocorre pela ação da cultura simbiótica de bactérias e leveduras denominado SCOBY (Batista *et al.*, 2022).

Os insumos utilizados na obtenção da bebida e os parâmetros da fermentação irão conferir características sensoriais, como sabor e aroma, específicas dessa bebida. Diferentes condições (como tipo de chá, açúcares, temperatura e tempo de fermentação) do processo podem

influenciar as concentrações dos compostos bioativos na bebida, como ácidos orgânicos (ácidos acético, láctico, glucônico, glucurônico e oxálico), proteínas, etanol, polifenóis, vitaminas (B₁, B₆, B₁₂, C), minerais (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn), ânions (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, HPO₄⁻ SO₄⁻), ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL) e a composição do consórcio microbiano do SCOBY (Bortolomedi; Paglarini; Brod, 2022; Morales, 2020).

2.2.1 Parâmetros do processo e concentração dos substratos

A fermentação é tradicionalmente realizada durante o período de 7 a 14 dias em temperaturas que variam de 20 a 30°C. A concentração do substrato também pode variar de 10 a 100g/L de sacarose e 7 a 10g/L de folhas de *Camellia sínese*s (Júnior *et al.*, 2022).

Değirmencioglu *et al.* (2021) avaliaram o impacto de diferentes folhas de chá nas propriedades antioxidantes e na bioacessibilidade da kombucha. Foram utilizados nesse estudo 6 g/L de cada tipo de chá (Chá branco, chá verde, chá oolong, chá preto e chá pu-erh), 10 g/L de sacarose conduzido a 30°C por 15 dias. Em todas as kombuchas houve aumento da capacidade antioxidante, do teor de polifenóis e da bioacessibilidade.

Ebrahimi Pure e Pure (2016) avaliaram a atividade antioxidante e antibacteriana de Kombuchas preparadas com casca de banana, urtiga e infusões de chá preto. Essas bebidas foram preparadas utilizando 20g/L de sacarose, 10g/L de chá preto (*Camellia sinensis*). O processo foi conduzido a 25°C por 21 dias. Os resultados sugeriram que casca de banana e folha de urtiga são bons ingredientes para serem usados como substrato na fabricação de bebida antioxidante de kombucha.

Amarasinghe *et al.* (2018) avaliaram as propriedades físico-químicas e atividades antioxidantes do kombucha durante 8 semanas de fermentação. Os resultados sugeriram uma redução significativa na atividade antioxidante após 8 semanas, indicando queda nas propriedades funcionais, além de um aumento na acidez e turbidez, que podem afetar as características sensoriais da bebida.

Dartora *et al.* (2023) avaliaram o efeito do tempo de fermentação nas características físico-químicas de kombucha a partir do chá verde (10 g), 25 g de açúcar por um período de 14 dias a 25°C. Concluíram que o tempo de fermentação das kombuchas deve ser controlado, pois o impacto nos parâmetros físico-químicos e no perfil sensorial da bebida pode ser negativo.

Quanto a temperatura, deve haver um equilíbrio para garantir a formação adequada dos metabólitos da bebida. A exemplo disso, temperaturas entre 27 e 37 °C são recomendadas para aumentar a produção de ácido glucônico e glucorônico e produção da celulose. Em temperaturas

mais altas, a produção de ácido acético aumenta, o que está relacionado à inibição da via glicolítica (De Filippis *et al.*, 2018; Nguyen; Nguyen; Le, 2015).

Contudo, os parâmetros da fermentação devem ser avaliados a fim de se obter uma bebida que seja rica em compostos bioativos e que ainda possua características sensoriais agradáveis ao consumo. Assim, como o tempo e a temperatura, o tipo de substrato utilizado também influenciará nas características da bebida.

A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada na fermentação da kombucha, no entanto, outras fontes potenciais de carboidratos podem ser utilizadas na fabricação da bebida conferindo diferentes sabores e aromas ao produto (Miranda *et al.*, 2022). Fernando dos Santos *et al.* (2024) desenvolveram e avaliaram o perfil fenólico e aceitação sensorial de kombucha de erva-mate e mel. O estudo demonstrou que fontes de carboidratos como o mel, é um método viável para produzir kombucha. Não há consenso sobre o consumo de açúcar para o kombucha tradicional, sendo relatados entre 18% e pouco mais de 40%. Outras fontes também já foram utilizadas para produção da bebida como, beterraba sacarina, açúcar mascavo, açúcar de coco e melaço (Malbaša *et al.*, 2008; Mohd Ariff *et al.*, 2023; Watawana *et al.*, 2017).

Contudo, após a fermentação quantidades consideráveis de açúcar ainda são encontradas no produto. Jayabalan *et al.* (2014) afirma que 34,06% da sacarose permanece não fermentada após 7 dias, e após 21 dias esse valor decai para 19,28%. Nguyen *et al.* (2015) afirma que níveis de açúcar superiores a 12,5% podem causar estresse osmótico que suprime o crescimento de microrganismos inibindo assim, a produção de compostos bioativos.

Diferentes tipos de chás são utilizados para produção de kombucha incluindo chá branco e verde (não fermentado), chá preto (fermentado) chá oolong (semi-fermentado) e chá puerh (pós-fermentado com microrganismos). A variedade do chá utilizado confere características sensoriais e químicas específicas das bebidas (Cao *et al.*, 2021).

O chá verde retém a maior parte dos polifenóis e possui a maior capacidade antioxidante, pois estes não sofrem oxidação enzimática (Xu *et al.*, 2019). O processo de preparo do chá, assim como, a proporção chá/água, temperatura, tempo infusão e a fonte de água usada influenciam fortemente no sabor da bebida e concentração dos polifenóis (Sharpe *et al.*, 2016)

Silva *et al.* (2021) caracterizaram kombuchas a partir de infusão de plantas comestíveis não convencionais e chá verde. A infusão de chá verde apresentou atividade antimicrobiana mais pronunciada do que as outras amostras de kombucha, indicando que a bioatividade pode estar mais relacionada aos compostos presentes no substrato do que produzidos durante a fermentação.

Jakubczyk *et al.* (2020) avaliaram o perfil químico e atividade antioxidante de kombuchas derivadas do chá branco, verde, preto e vermelho. Os resultados sugeriram que o chá

vermelho e verde no 1º e 14º dia de fermentação são uma fonte rica de antioxidantes, especialmente polifenóis, incluindo flavonoides.

Diante de tantos estudos variando os parâmetros de processo fermentativo e a fim de se obter a máxima produtividade em compostos potencialmente benéficos à saúde, algumas diretrizes devem ser seguidas para atender as demandas da indústria de alimentos. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) disponibilizou normas que estabelecem os padrões de identidade e qualidade das kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil (Brasil, 2019). O pH deve ser em torno de 2,5 a 4,2, a graduação alcoólica até 0,5 para bebidas não alcoólicas e 0,6 a 8,0% para alcoólicas e acidez entre 30 e 130 mEq/L.

2.2.2 Compostos bioativos

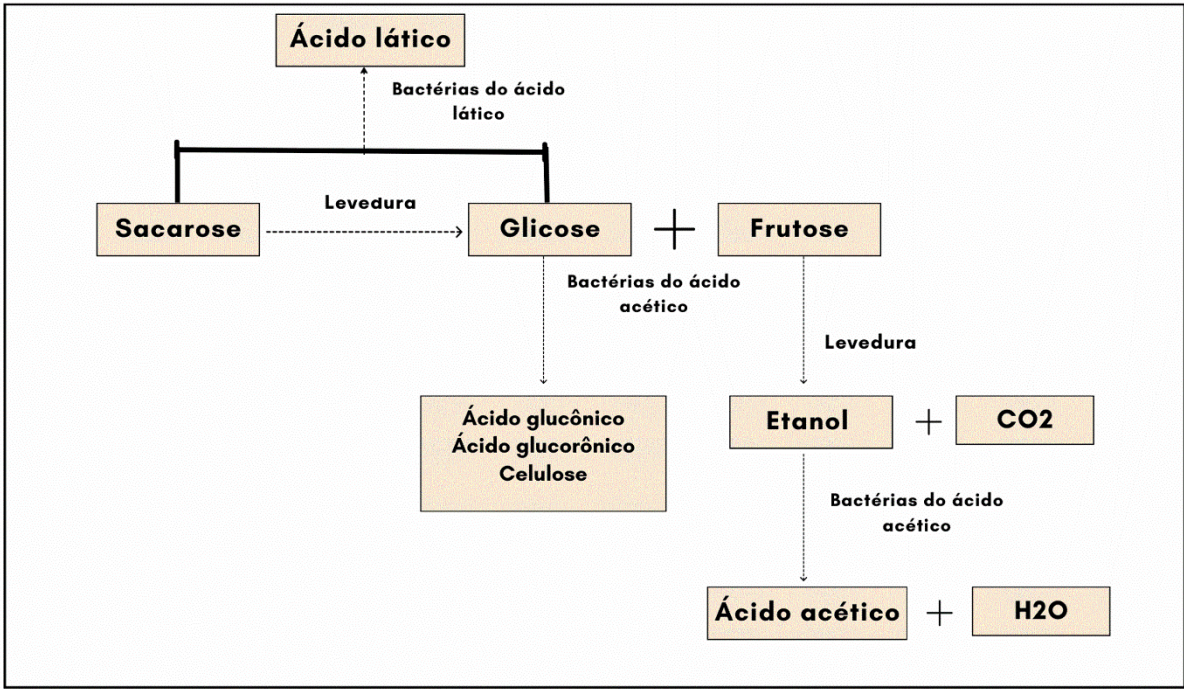
Para a produção dos metabólitos duas vias são utilizadas pelos microrganismos, a via aeróbia, onde a sacarose é metabolizada em glicose e frutose pela invertase, em seguida, em etanol e dióxido de carbono. O etanol é então oxidado pelas bactérias em acetaldeído, e após em ácido acético. A fase anaeróbica se intensifica quando a bebida é envasada e a produção de CO₂ aumenta. Durante essa fase o álcool é convertido em ácido acético, se a cadeia do frio não for mantida adequadamente esse processo sofre inibição aumentando o teor de álcool (Miranda *et al.*, 2022; Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

Nesse processo de produção de metabolitos, leveduras como as do gênero *Saccharomyces*, têm preferência pela glicose, enquanto leveduras específicas do gênero *Zygosaccharomyces* têm preferência pela frutose (Jayabalan *et al.*, 2014). Na produção de acetato as bactérias do gênero *Acetobacter* usam glicose para produzir esse ácido, enquanto o gênero *Gluconobacter* não é capaz de oxidar o acetato, pois não possui as enzimas necessárias para o processo de oxidação, levando ao aumento de produtos, como o gluconato (Leal *et al.*, 2018).

A bactéria *Gluconacetobacter xylinu* é a principal responsável pela produção de celulose no meio fermentado. A rede celulósica retém os microrganismos da kombucha, assim quando iniciado uma fermentação as bactérias presas no entrelace de celulose utiliza o oxigênio dissolvido no meio aumentando rapidamente a produção de celulose e formando uma camada espessa na superfície do líquido. Isso acaba por gerar um ambiente anaeróbio, onde as leveduras continuam o processo fermentativo de forma anaeróbia (Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

A Figura 1 esquematiza a principal via metabólica utilizada pelos microrganismos durante a fermentação.

Figura 1 – Principal via metabólica do consorcio de microrganismos



Fonte: Adaptado de Coelho *et al.* (2020).

Os compostos bioativos produzidos durante a fermentação da kombucha fazem com que esta bebida tenha um alto potencial antioxidante, assim como sua ingestão tem sido associada a diversos benefícios a saúde humana. A Tabela 1 faz um levantamento de alguns compostos presentes na kombucha com propriedades promotoras de saúde.

Tabela 1 – Principais compostos presentes na kombucha com propriedades promotoras de saúde

Propriedade	Compostos	Autor
Anticâncer, antioxidante, regulação da microbiota intestinal e antiviral	Teaflavinas	(Chakravorty <i>et al.</i> , 2016; Longevity, 2024)
Reduz a produção de compostos oxidativos, cancerígenos e tóxicos	Ácido D -sacárico-1,4-lactona (DSL)	(Hrnjez <i>et al.</i> , 2014)
Saúde do cólon, antioxidante	glucônico	(Kaewkod; Bovonsombut; Tragoolpua, 2019)
Desintoxicação do fígado, antioxidante	Glucorônico	(Sarkaya; Akan; Kinik, 2021)

(continua)

Tabela 1 (conclusão) – Principais compostos presentes na kombucha com propriedades promotoras de saúde

Propriedade	Compostos	Autor
Aumento da solubilidade lipídica, aumentando o acúmulo de ácidos graxos na membrana celular,	Acético	(De Roos; De Vuyst, 2018; Watawana <i>et al.</i> , 2015)
Agente antimicrobianos, regulação da microbiota intestinal	Lático	(Oyewole <i>et al.</i> , 2023; Sarkaya; Akan; Kinik, 2021)
Propriedades antiobesidade, antimicrobiano, anticancerígeno, proteção da camada mucosa do trato gastrointestinal.	Polifenóis	(Zhang <i>et al.</i> , 2022)
Antioxidante, anti-inflamatório	Cafeína	(Barbosa <i>et al.</i> , 2022; Depaula; Farah, 2019)
antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas	Flavonoides	(Jakubczyk <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: Elaborado pela autora.

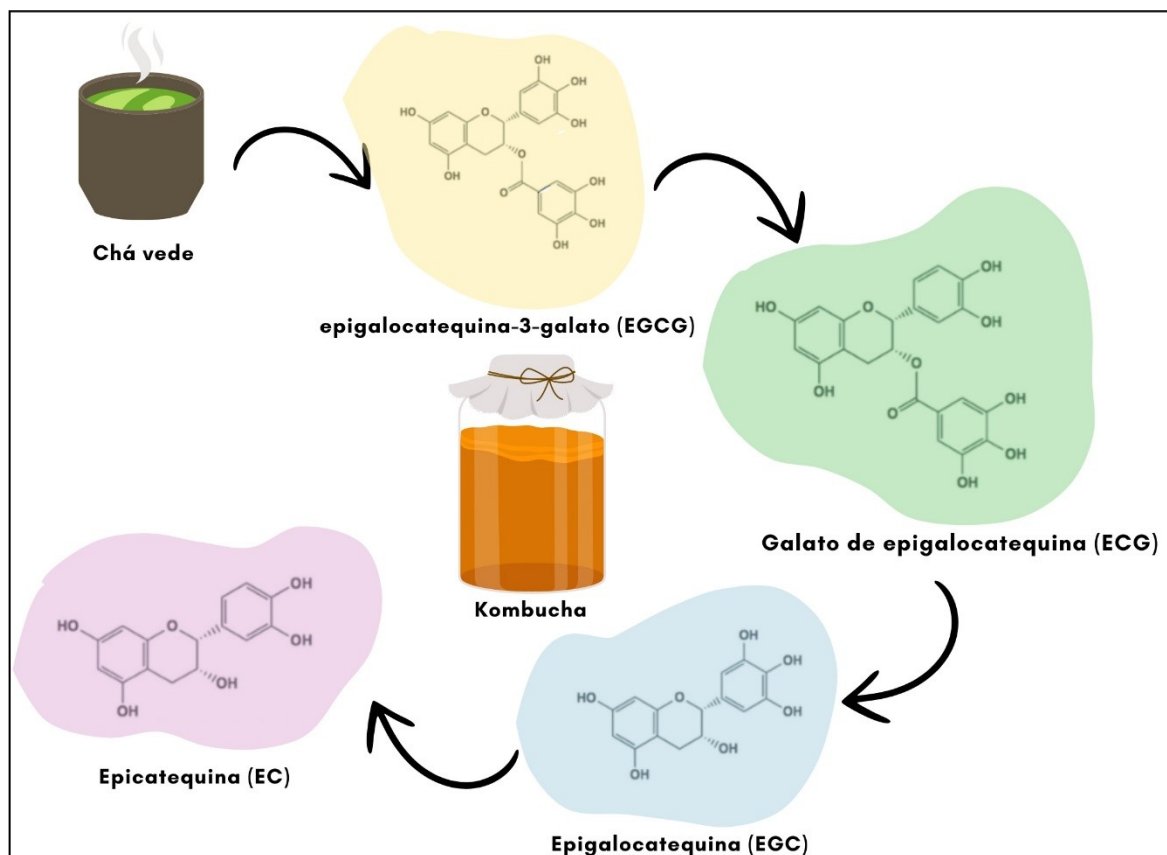
2.2.3 Kombucha como uma bebida prebiótica e probiótica

Os compostos fenólicos são os principais compostos encontrado no chá verde e em outros chás utilizados para fabricação da kombucha. Os principais fenólicos identificados na kombucha são catequinas como galocatequina 3-*O*-galato/epigalocatequina 3-*O*-galato, isômero de galocatequina/epigalocatequina, catequina, ácido 5-*O*-galoilquínico e derivados de quercetina como quercetina 3-*O*-ramnosil-ramnosil glicosídeo e quercetina 3-*O*-glucosil-ramnosil galactosídeo (Barros; Botelho; Chisté, 2024).

Durante a fermentação esses compostos sofrem degradação ou conversão em moléculas menores, que faz com que o conteúdo fenólico aumente durante o tempo de fermentação. A acidez do meio e a atividade enzimática é responsável por essas modificações (Su *et al.*, 2023). A Figura 2 ilustra as alterações dos compostos fenólicos complexos da kombucha em moléculas biológicas menores, o que eleva o conteúdo geral de catequina no chá.

Os compostos fenólicos do chá podem variar de acordo com o substrato utilizado. Tanto o chá verde quanto o chá preto contêm altas concentrações de polifenóis, porém o chá verde recebe um tratamento que inibe a fermentação das folhas após a colheita, portanto, esses compostos permanecem preservados (Lobo *et al.*, 2017).

Figura 2 – Alterações ocorridas nas catequinas durante a fermentação do chá verde para obtenção da kombucha



Fonte: Adaptado de Su *et al.* (2023).

Os compostos fenólicos da kombucha além de estarem relacionados a atividade antioxidante da bebida (Shi *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2022) também é considerado um composto prebiótico (Liu; Vincken; de Bruijn, 2022).

Bond e Derbyshire (2019) realizaram um estudo visando reunir evidências de ensaios e estudos mecanicistas que analisaram os compostos do chá e o microbioma intestinal. Os resultados sugerem que os compostos dos chás podem beneficiar a saúde intestinal, principalmente aqueles com disbiose. Os polifenóis atuam como prebióticos modulando a abundância dos tipos de bactérias no intestino.

A vasta microbiota que habita o intestino grosso humano é capaz de transformar os compostos fenólicos complexos, como catequinas, em compostos mais simples. A ação dos microrganismos colônicos podem hidrolisar glicosídeos, glicuronídeos, sulfatos, amidas, ésteres e lactonas por meio da ação de enzimas (α -ramnosidase, β -glicuronidase, β -glicosidase, sulfatase e esterase), também ocorre a clivagem de anel não aromático, redução (redutase e hidrogenase),

descarboxilação (descarboxilase), desmetilação (desmetilase), isomerização (isomerase) e desidroxilação (desidroxilase) (Liu *et al.*, 2018).

Além de favorecer a microbiota benéfica os compostos fenólicos podem também possuem efeito inibitório, já que nas plantas estes funcionam com compostos secundários que são excretados para proteção contra bactérias e insetos (Yoda *et al.*, 2004). Este efeito é atribuído a ruptura da membrana celular de bactérias gram positivas, onde EGCG pode se ligar a peptidoglicanos e causar uma ruptura. As bactérias gram-negativas não são afetadas pois sua membrana externa e o lipopolissacarídeo carregados negativamente repele as catequinas (Szliszka *et al.*, 2009).

A variabilidade na comunidade microbiana da kombucha demonstra o quão complexo é o processo dessa bebida fermentada. Não existe uma fórmula que descreva a microbiota do kombucha, pois esta irá depender das culturas iniciais, assim como os parâmetros do processo. A fermentação ocorre principalmente na presença de leveduras, bactérias acéticas (AAB) e Bactérias lácticas (BAL). A coexistência desses microrganismos na bebida é o que define o SCOBY (cultura simbiótica de bactérias e leveduras) (Jayabalan *et al.*, 2014).

Os microrganismos predominantemente encontrados são os membros das famílias *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter intermedius*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans*, pertencentes as bactérias ácido acéticas (AAB), *Lactobacillus* e *Lactococcus*, do grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* e *Pichia* para leveduras (Arikan *et al.*, 2020; Chakravorty *et al.*, 2016).

Embora exista essa grande diversidade de microrganismos na bebida alguns autores sugerem que *Acetobacteraceae* como dominantes na kombucha, especialmente no biofilme (Chakravorty *et al.*, 2016; Marsh *et al.*, 2014). Com isso, as alegações sobre a bebida ser probiótica é uma informação controversa, pois para que uma bebida seja considerada probiótica, quantidades adequadas de cepas probióticas devem estar contidas na bebida e serem capazes alterar a microbiota intestinal por meio de implantação ou colonização daquele meio (Vargas; Fabricio; Záchia Ayub, 2021).

Entretanto é possível que cepas probióticas sejam isoladas, identificadas e caracterizadas da kombucha. Pei *et al.* (2020) isolaram, purificaram e identificaram uma nova cepa de *Lactobacillus plantarum* em kombucha convencional produtora de uma bacteriocina, que aumentou a permeabilidade da membrana celular, causando liberação de íons potássio e inibindo a formação de biofilmes.

Bogdan *et al.* (2018) isolaram uma cepa de *Pediococcus pentosaceus* de kombucha, e verificaram que as cepas foram capazes de sobreviver a concentrações de sais biliares e produzir bacteriocinas, bem como de aderir às linhagens celulares intestinais. Embora estas cepas tenham sido isoladas e outras mais como *Lacticaseibacillus casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lb. acidophilus*, *S. cerevisiae*, *Schizo. pombe*, *G. oxydans*, *Bif. bifidum* e *Bif. longum* o potencial probiótico ainda é questionável dado a predominância de outros microrganismos (Chakravorty *et al.*, 2016; Içen *et al.*, 2023; Watawana *et al.*, 2017).

Contudo o efeito benéfico da kombucha está associado principalmente aos compostos produzidos durante a fermentação e aos polifenóis do chá. O uso inadequado do termo probiótico pode estar atrelado ao fato da presença de microrganismos vivos na bebida, o que não quer dizer que todas as cepas sejam probióticas (Kapp; Sumner, 2019).

2.2.4 Saborização da kombucha

A geração de resíduos é uma consequência inevitável do crescimento populacional. Vários tipos de resíduos são produzidos a partir da atividade agrícola e industrial. Em sua maioria as sobras que são geradas no beneficiamento de alimentos vão para o lixo ou são utilizadas para produção de ração animal ou até mesmos descartadas de maneira inadequada. Práticas de descarte como a queima e o aterramento desses resíduos levam a poluição do meio ambiente e afetam negativamente a saúde humana (Yafetto, 2022).

Diante dessa problemática, tem havido pesquisas concentradas para o uso de matéria-prima renováveis visando a valorização e aproveitamento desses resíduos. A necessidade de se empregar abordagens, como a conversão desses subprodutos em fontes de energia ou criação de produtos de alto valor agregado são necessárias para a redução do desperdício (Wang *et al.*, 2022).

Alguns estudos propõe o uso de resíduos como ingredientes alimentares como forma de agregar características nutricionais aos alimentos ou processos industriais para geração de energia. A Tabela 2 mostra um levantamento de alguns estudos realizados com resíduos da agroindústria e sua possível aplicação.

Em vista a tantos trabalhos utilizando os resíduos, a kombucha confere uma base adequada ao uso do subproduto de frutas. Leonarski *et al.* (2022) utilizaram o subproduto de acerola para produção de kombucha e celulose bacteriana. Os resultados mostraram aumento na concentração de ácido acético, polifenóis e vitamina C, além do ambiente favorável para produção de celulose bacteriana. Tu *et al.* (2019) utilizaram consórcio microbiano da kombucha para transformar soro de soja em uma nova bebida funcional. A fermentação produziu novos voláteis

ativos, especialmente ésteres e aldeídos, que conferiram sabor frutado ao soro de soja e melhoraram sua qualidade sensorial.

Tabela 2 – Resíduos agroindustriais e suas aplicações

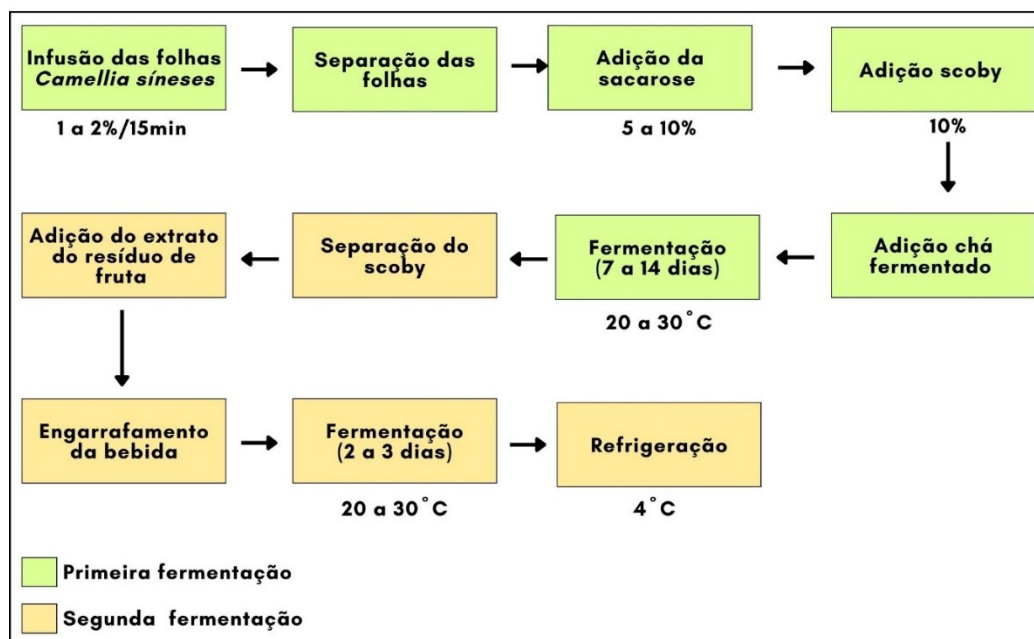
Tipo de resíduo	Aplicação	Referência
Bagaço de caju	Produção de geleia a partir do bagaço de caju	(Nurerk; Junden, 2021)
Pó do bagaço de maçã	Avaliação de produtos extrusados feitos de milho amarelo suplementado com pó de bagaço de maçã Teor	(León <i>et al.</i> , 2022)
farelo de arroz, trigo, bagaço de cana, serragem, milho, palha, casca de café	Utilizados como fonte de carbono no meio basal para produção da enzima tanase para clarificação de suco de maçã	(Thiyonila <i>et al.</i> , 2022)
Bagaço, talos e folhas de sorgo sacarino	Avaliação da solubilização da hemicelulose e açúcares das biomassas de sorgo sacarino	(Martins <i>et al.</i> , 2021)
Bagaços de cana-de-açúcar	Produção de biossurfactante por <i>Bacillus safenensis</i> J2 utilizando bagaço na fermentação submersa.	(Das; Kumar, 2019)
Bagaço de cana-de-açúcar	Aproveitamento das fibras de bagaço de cana-de-açúcar em tijolos de cimento: efeito econômico e ambiental.	(Micheal; Moussa, 2021)
Casca de maracujá, bagaço de maçã e bagaço de laranja	Efeito de dietas suplementadas com resíduos do maracujá, maçã e laranja como fontes de fibra nas respostas biológicas em ratos Wistar	(Macagnan <i>et al.</i> , 2015)
Casca de batata	Filmes biodegradáveis ativos à base de casca de batata integral incorporada com celulose bacteriana e curcumina.	(Xie <i>et al.</i> , 2020)
Pytaia	Aplicações inovadoras baseadas em resíduos agroindustriais de pitaias para melhorar o desempenho antioxidante e biológico em Kombuchas	(Miglioranza <i>et al.</i> , 2024)

Fonte: Elaborado pela autora.

O uso de matérias-primas alternativas pode promover o desenvolvimento de novos alimentos com composição diversificada e com novas propriedades funcionais. (Emiljanowicz; Malinowska-Pańczyk, 2020). Dentro do processo de fabricação da kombucha, a etapa de saborização seria a mais adequada para a utilização dos resíduos, pois é na segunda fermentação onde o sabor característico aumenta e ocorre a formação de gases. Tradicionalmente são utilizados

os sucos de frutas para saborização, porém resíduos como casca e semente ainda contém compostos bioativos que podem agregar a essa bebida (Fonteles *et al.*, 2024). A Figura 3 mostra um fluxograma das etapas de produção da kombucha e como os resíduos podem ser aplicados nesse processo.

Figura 3 – Fluxograma do processo de fermentação da kombucha



Fonte: Adaptado de Coelho *et al.* (2020).

Embora a quantidade de trabalhos utilizando resíduos para a saborização da kombucha seja pequeno, os resultados obtidos até o momento provam que os resíduos possuem ainda substâncias valiosas para agregar valor ao produto e promoverem benefícios a saúde através da fermentação. Compostos importantes que ainda são encontrados nos resíduos são vitaminas, polifenóis, minerais e fibras (Emiljanowicz; Malinowska-Pańczyk, 2020; Sharma *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar como a adição de diferentes extratos obtidos a partir de resíduos agroindustriais e concentrações de açúcar afetam a fermentação da kombucha e seu impacto na microbiota intestinal.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair compostos de interesse dos resíduos utilizando tecnologia não térmica (Ultrassom);
- Avaliar o efeito da redução/eliminação de açúcar na fermentação da kombucha;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos em kombuchas fermentadas com diferentes resíduos agroindustriais;
- Quantificar os compostos fenólicos totais da Kombucha;
- Avaliar sensorialmente as kombuchas produzidas com e sem açúcar.
- Avaliar o efeito prebiótico da kombucha na microbiota intestinal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fermentação da kombucha e saborização

4.1.1 Fermentação do chá verde

O chá foi preparado a partir das folhas secas de *Camelia sinenses* 1% (p/v) e água potável. Foram produzidas duas kombuchas mãe, uma contendo açúcar cristal 3% (p/v) e outra sem adição de açúcar. Essas kombuchas foram chamadas de fermentação com adição de açúcar (FCA) e fermentação sem adição de açúcar (FSA).

As folhas foram infundidas por 15 minutos com água potável (90°C) e filtradas após o tempo de infusão. A primeira fermentação (F1) ocorreu para obtenção da chamada “Kombucha mãe”. O início da fermentação ocorreu pela adição da cultura starter SCOBY que foi obtida de uma fonte local em Fortaleza – CE. O SCOBY passou por sucessivas fermentações para produção de novos SCOBYS e obtenção do chá fermentado para se iniciar as próximas fermentações.

Para a produção das bebidas, o chá homogeneizado ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) foi inoculado com 10% (p/v) de SCOBY e 10% (v/v) de chá fermentado. A fermentação ocorreu em recipiente de vidro (15 x 20 cm) e foi conduzida sob temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, durante um período de 7 dias. O pH, a acidez titulável e o ° brix foram monitorados durante todo o processo, em intervalos de 48 horas (Leonarski *et al.*, 2022; Silva Júnior *et al.*, 2021).

4.1.2 Processamento dos resíduos e saborização

Os resíduos de caju e manga foram obtidos a partir da indústria de processamento de sucos (Fortaleza, CE, Brasil) e os resíduos de uva da indústria de processamento de vinhos (Nova Trento, SC, Brasil). Os resíduos foram congelados (-20°C) e submetidos à liofilização (liofilizador LioTop, modelo L101) por 8h a -50°C e 500 μHg . Em seguida, os resíduos liofilizados foram moídos para a posterior utilização. A preparação do extrato se deu pela diluição do pó em água na proporção de 1:8 (pó: água), essa concentração foi determinada através de testes preliminares ao estudo. Para um melhor aproveitamento dos compostos fenólicos dos resíduos, estes foram extraídos através de ultrassom. Os parâmetros utilizados foram os limites mínimos e máximo do equipamento (Desruptor/Sonicador Ultrassônico – Ultronique QR500 de 500 W com frequência constante de 19 kHz e macro ponta de titânio de 13 mm). A intensidade de energia ultrassônica dissipada pela ponta de titânio é calculada de acordo com a Equação 1.

$$I = \frac{P}{\pi r^2} \quad (1)$$

Onde r é o raio (cm) da macro ponta de titânio e P (Watt) é a potência aplicada. A temperatura foi controlada durante todo o processamento em 23 °C.

As condições de sonicação dos resíduos foram avaliados através de um delineamento experimental fatorial simples para otimização das condições dos processos (Tabela 3).

Tabela 3 – Delineamento experimental fatorial simples para o processamento dos resíduos por ultrassom

Ensaio	Potência Ultrassônica W/cm ²	Tempo (min)
1	75,34	2
2	373	2
3	75,34	10
4	373	10

Fonte: Elaborado pela autora.

A melhor condição (Ensaio 4) quanto a concentração de compostos bioativos foi selecionada para extração dos compostos fenólicos dos resíduos agroindustriais.

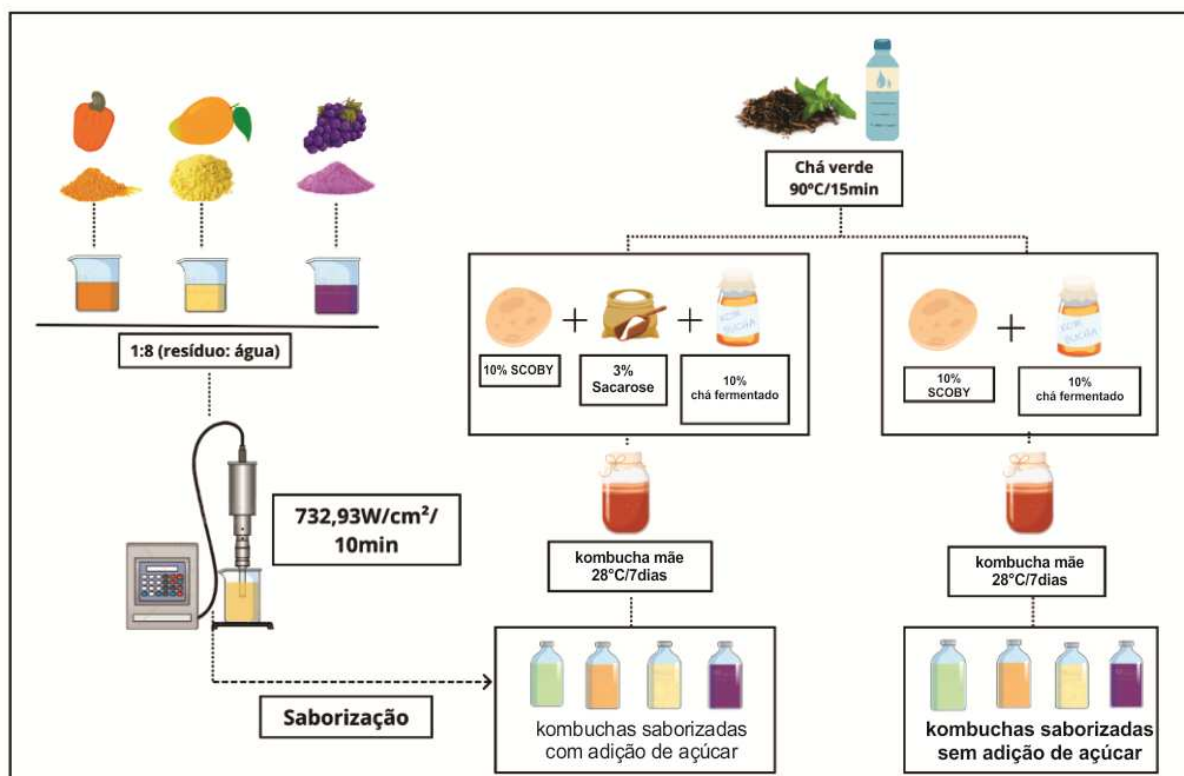
Após a fermentação (F1), o chá foi filtrado e os extratos processados no ultrassom foram adicionados a Kombucha mãe, na proporção de 80% chá e 20% de extrato. As oito formulações obtidas foram incubadas à temperatura 28°C ± 1 por 48h. Esta foi chamada de segunda fermentação (F2). Após o período de incubação as amostras foram armazenadas sob refrigeração 4 ± 1°C até o momento das análises. A Tabela 4 e a Figura 4 a seguir mostram a nomenclatura e abreviações das bebidas, assim como todo processo de obtenção das bebidas.

Tabela 4 – Nomenclatura e abreviações das kombuchas produzidas

Nomenclatura	Siglas
Kombucha sem adição de açúcar	kombucha
Kombucha de caju sem açúcar	Kombucha_C
Kombucha de manga sem açúcar	Kombucha_M
Kombucha de uva sem açúcar	Kombucha_U
Kombucha com adição de açúcar	Kombucha_A
Kombucha de caju com açúcar	Kombucha_CA
Kombucha de manga com açúcar	Kombucha_MA
Kombucha de uva com açúcar	Kombucha_UA

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4 – Esquema de produção das Kombuchas



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 Kombuchas comerciais

As kombuchas comerciais foram adquiridas no mercado local de Fortaleza, Ceará. Quatro marcas, de sabores distintos, foram obtidas a fim de avaliar a concentração alcoólica destas bebidas durante o armazenamento de 30 dias e comparar com as bebidas produzidas nesse estudo. As amostras foram codificadas como amostra A, B, C e D.

4.2 Análises físico-químicas

4.2.1 pH, sólidos solúveis totais e acidez titulável total

O pH foi monitorado com um potenciômetro MS Tecno pon calibrado com tampão pH 4,0 e 7,0. As leituras de sólidos solúveis totais (°Brix) foram realizadas utilizando um refratômetro digital portátil HANNA HI 96801. O aparelho foi calibrado com água destilada e as medições foram feitas em 25 ± 2 °C. A acidez total titulável foi determinada pelo método de titulação e os resultados foram calculados através da Equação 2 e expressos em gramas de ácido acético por litro de kombucha (Porto *et al.*, 2020).

$$M = (N_{\text{real}} \times 1 \times E_q) \times FD \quad (2)$$

Onde: M – massa do ácido acético em g; N_{real} – Normalidade da amostra; E_q – Equivalente em grama do ácido acético; e FD – Fator de diluição.

4.2.2 Determinação dos açúcares e ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos presentes nas kombuchas foram identificados por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um sistema Agilent Technologies Infinity_1260. A separação dos compostos foi feita através de uma coluna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm) (Bio-Rad) a 50°C. O tempo de corrida foi de 40 min. Ácido sulfúrico 5 mM a 0,4 mL/min foi utilizado como fase móvel. Os ácidos ascórbico, acético, lático, glucônico e isobutírico foram detectados por um detector UV-DAD a 210 nm e identificados através dos tempos de retenção de cada composto. Sacarose, glicose, frutose e etanol foram quantificados pelo mesmo sistema cromatográfico. A separação foi realizada em coluna BIORAD HPX-87C (300 × 7,8 mm) a 60°C. O tempo de corrida foi de 30 min. Um detector de índice de refração (IR) foi utilizado para detecção dos açúcares. O eluente usado foi Água MilliQ (0,6 ml min⁻¹). As amostras foram diluídas 1:5 (v/v) e as concentrações dos ácidos, açúcares e etanol foram obtidas através das curvas de calibração (Fonteles *et al.*, 2024).

4.2.3 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados usando o método Folin–Ciocalteu (Folin; Ciocalteu, 1927) com adaptações (Almeida *et al.*, 2015). Para a realização da análise as amostras foram centrifugadas (10.000 g /10min). 10 µL de amostra diluídas (1:5) foram colocados em microplaca de 96 poços e misturados com 200 µL de Folin–Ciocalteu por 3 min. 100 µL de carbonato de sódio 20% (p/v) foram adicionados para interromper a reação. A leitura foi feita em espectrofotômetro de leitor Elisa (Biotek Epoch, Winooski, VT, EUA) usando o software Gen 5 1.10 à 765nm. Água foi utilizada como branco. Os resultados foram calculados a partir de uma curva de calibração de ácido gálico.

4.2.4 Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi medida pelos métodos DPPH e ABTS descrito por (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995). Uma solução foi preparada contendo 2,4 mg de DPPH com 100ml de etanol. 90 μ L de amostra reagiram com 1800 μ L de radical DPPH. A cinética de decaimento da absorbância de 515 nm foi monitorada por 30 min. O etanol foi utilizado como branco. Os resultados foram dados de acordo com a Equação 3.

$$\text{Atividade antioxidante total } (\mu\text{M trolox/ mL}) = (K_p * C_t / K_t) * D \quad (3)$$

Onde: K_p – constante cinética obtida para cada amostra; C_t – concentração de Trolox (500 μ M); K_t – constante cinética obtida para Trolox após 30 min de reação; e D – diluição da amostra.

Para o método ABTS, o radical ABTS $\bullet^+$ foi preparado 16 horas antes das análises e mantido protegido da luz. Para isso, 10 mL da solução estoque ABTS (7 mM) foi adicionado de 176 μ L de persulfato de potássio 140 mM. O radical ABTS $\bullet^+$ foi diluído com etanol até uma absorbância inicial de 0,7 a 734 nm. Para as análises, 15 μ L das amostras foram adicionados em 1500 μ L do radical ABTS e a solução foi mantida por 6 min no escuro. As análises foram feitas em triplicata e uma curva de calibração foi feita e os resultados expressos em μ M Trolox/mL de suco (Paixão *et al.*, 2019; Rufino *et al.*, 2010).

4.3 Estabilidade

Após o período de fermentação, as bebidas foram armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) durante 30 dias. Amostras foram avaliadas quanto a concentração dos ácidos orgânicos, compostos bioativos e açúcares nos tempos de 0 e 30 dias de armazenamento.

4.4 Análise sensorial

Esta pesquisa foi realizada em parceria com a Universidade Federal do Maranhão e foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa da UFMA (CAAE 10205619.8. 0000.5087). A avaliação sensorial foi realizada usando a metodologia do perfil livre. Para isso, o desenvolvimento da terminologia descritiva das amostras foi realizado de acordo com o Método de Rede proposto por Kelly (Meilgaard *et al.*, 1999). A partir dos termos gerados por cada julgador, foram elaboradas

fichas de avaliação individuais, sendo os atributos avaliados por meio de escalas não estruturadas de 10 cm. A definição dos termos descritos foi elaborada pelo julgador e o pesquisador, de tal maneira que ficasse claro a terminologia para ambos. Foram utilizadas três repetições para a quantificação dos atributos das amostras.

Onze julgadores treinados avaliaram as oito amostras de kombucha que foram servidas em taças de vidro a 7 °C. A ordem de apresentação das amostras, dentro de cada sessão, foi balanceada com o objetivo de minimizar o efeito da posição nos julgamentos. As 8 amostras foram servidas em seis sessões. A apresentação das amostras foi realizada de forma monádica e sequencial, em cabines individuais, sob condições de temperatura e iluminação controladas.

4.5 Digestão *in vitro* e fermentação fecal

Para avaliação do efeito da kombucha na microbiota intestinal humana três bebidas foram selecionadas. Kombucha tradicional com açúcar e sem açúcar e kombucha de caju com açúcar.

As Kombuchas foram submetidas a digestão gastrointestinal *in vitro* e em seguida a fermentação fecal que ocorreu durante a fase entérica. O método INFOGEST 2.0 foi utilizado para a simulação das fases salivar, gástrica e intestinal do aparelho digestivo humano. A composição dos fluidos simulados está descrita na Tabela 5 de acordo com a metodologia de (Brodkorb *et al.*, 2019).

Tabela 5 – Composição química dos fluidos utilizados na digestão simulada

Solução	Fluido Salivar Simulado (FSS) pH 7/mM	Fluido Gástrico Simulado (FGS) pH 3 /mM	Fluido Intestinal Simulado (FIS) pH 7/mM
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	6,8	12,5	85
NaCl	-	11,8	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5	0,4	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	-
HCl	0,09	1,3	8,4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0,025	0,005	0,6

Fonte: Elaborado pela autora.

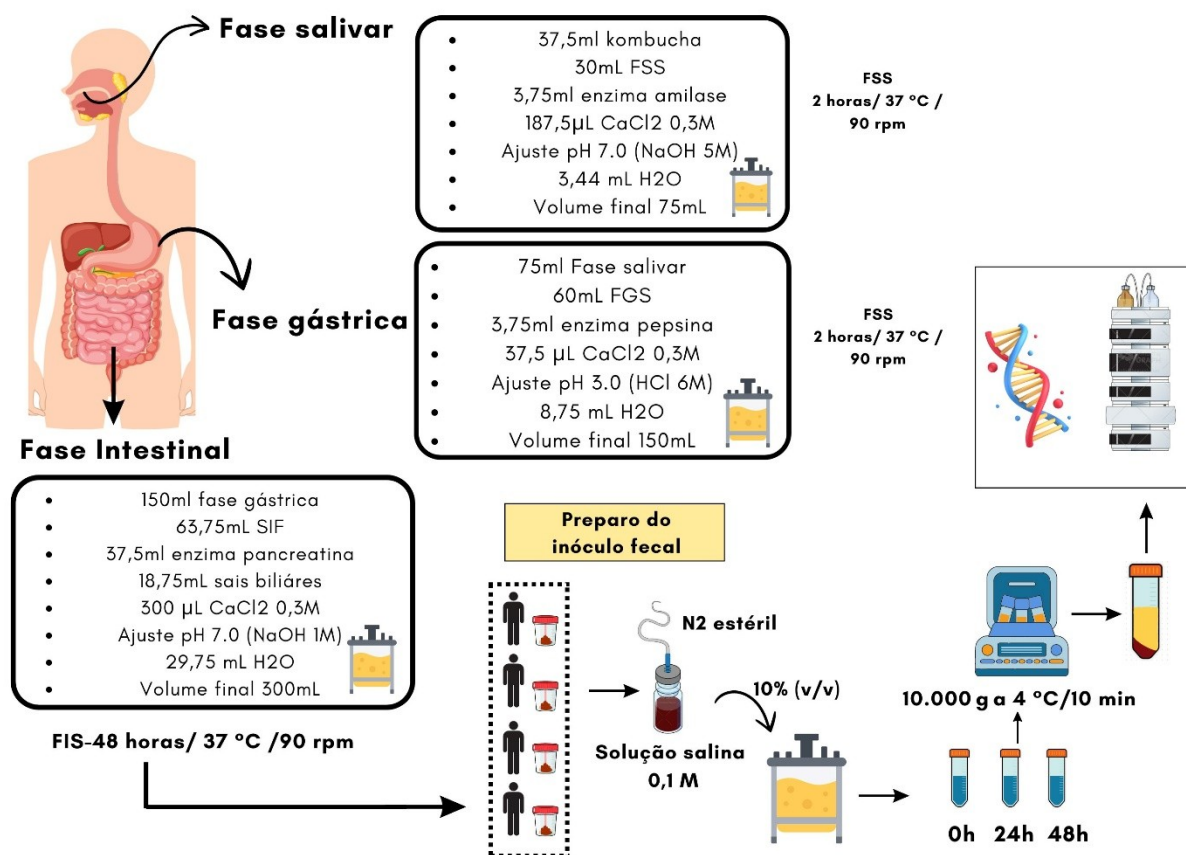
A digestão simulada *in vitro* foi realizada em sistema de digestão semi-dinâmico. O biorreator utilizado (300 mL) foi conectado ao módulo de controle BIO-TEC-PRO® (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) operando a 37 °C a com 90 rpm de agitação (Leite *et al.*, 2023)

Inicialmente 37,5 mL de amostra de kombucha foi colocada no reator e diluída com 30mL do SSF, 3,75ml solução de amilase, amilase (75 U/mL, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), 187,5µL CaCl₂ 0,3M. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5M e o volume foi completado para 75ml com H₂O. Em seguida, a fase salivar foi diluída com 60 mL FGS, 3,75ml solução de pepsina (2000 U/mL, P7000, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), 37,5 µL CaCl₂ 0,3M. O pH foi ajustado novamente para 3.0 com solução de HCl 6M e o volume aferido para 150 mL com 8,75 mL H₂O (fase gástrica). Após 2 horas a 37 °C e 90 rpm deu-se início a fase entérica. Por fim, a mistura gástrica (150ml) foi diluída em 63,75mL do SIF, 37,5ml solução de pancreatina (100 U/mL, P3292, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), 18,75mL solução de sais biliares (10 mM, B8756, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), 300 µL CaCl₂ 0,3M. Em seguida o pH foi ajustado para 7.0 com uma solução de NaOH 1M e o volume ajustado para 300 mL com 29,75 mL de H₂O. Em seguida, o volume foi ajustado para que 10% (v/v) da mistura fosse de inóculo fecal. A fermentação fecal foi realizada por 48 horas e o pH foi ajustado e mantido em 7,0 durante todo o período. As amostras foram coletadas 0, 24 e 48 h de fermentação e centrifugadas sob 10.000 g a 4 °C/10 min. O sobrenadante foi utilizado para quantificar os compostos fenólicos, ácidos orgânicos e açúcares. O precipitado foi congelado e posteriormente utilizado para sequenciamento da microbiota fecal.

Para a digestão simulada, foram coletadas amostras fecais de quatro doadores saudáveis distintos, no dia da análise. Os voluntários com idades entre 25 e 35 anos não fumantes, sem doenças metabólicas e com dietas distintas não tomaram antibióticos, prebióticos e probióticos pelo menos 3 meses antes. Todos os doadores assinaram um termo de consentimento voluntário no momento da coleta da amostra fecal.

As amostras fecais dos 4 doadores foram misturadas e diluídas (1:10) em solução salina 0,1 M tamponada com fosfato pH 7,0 e armazenadas a 4 °C antes do uso (máximo 5 horas) em frascos estéreis. N₂ estéril (100%) foi utilizado para garantir condições anaeróbicas no tampão e *headspace*. O procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Universidade Federal do Ceará, CEP/UFC, CAAE 56171022.2.0000.5054). A Figura 5 esquematiza o processo de digestão gástrica e fermentação colônica.

Figura 5 – Esquema do processo de digestão gástrica e fermentação entérica das kombuchas



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.1 Análise da microbiota, produção de ácidos graxos de cadeia curta e consumo de açúcares

O DNA foi extraído utilizando o kit DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen, CA, EUA) e 250 mg de cada amostra fecal. A análise foi realizada no início e após 48 horas de fermentação colônica. De acordo com o protocolo de rRNA foi amplificada com primers específicos (515F-Y e 806R). O sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento (300 ciclos, 2 × 150 pb) foi obtido usando o reagente MiSeq kit v2 na plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA). A filiação taxonômica foi obtida através da base de dados DADA2 e Greengenes. A diversidade e riqueza foram estimadas usando o software EstimateS (versão 9.1.0) para obter a riqueza de Chao1 (Chao; Bunge, 2002), Simpson (Simpson, 1949) e Shannon (Shannon, 1948). A determinação de ácidos e açúcares foi feita de acordo com o item 4.2.2.

4.5.2 Índice prebiótico

O índice prebiótico foi determinado após o cálculo da abundância relativa (porcentagem) de cada grupo bacteriano (gênero) após a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento, de acordo com a Equação 4 (Massa *et al.*, 2022; Vardakou *et al.*, 2008).

$$\text{Índice prebiótico} = (\% \text{Bif} + \% \text{Lac}) - (\% \text{Bac} - \% \text{Esc/Shigella}) \quad (4)$$

Onde: % Lac – diferença entre 0 e 48h da abundância relativa de *Lactobacillus* spp./ *Enterococcus* spp; %Bif – diferença entre 0 e 48h da abundância relativa de *Bifidobacterium* spp.; %Bac – diferença entre 0 e 48h da abundância relativa de *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp; % Esc/Shigella – diferença entre 0 e 48h da abundância relativa de *Escherichia/Shigella*.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados pela análise de variância ANOVA e teste de Tukey ao nível de significância de 0,05% utilizando o software Origin™ (versão 9.4, 2016). Os dados sensoriais foram gerados pela técnica do Perfil Livre e analisados por meio do pacote estatístico XLSTAT utilizando a Análise de Procrustes Generalizada (GPA).

A análise multivariada, análise discriminativa de mínimos quadrados parciais (PL-SDA) foram feitos através do software MetaboAnalyst 6.0. ([//www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)). O *heatmap*, foi feito através da medida da distância Euclidiana. Para o gráfico VIP (importância da variável na projeção) pontuações superiores a 1,0 foram consideradas significativas de acordo com (Akarachantachote; Chadcham; Saithanu, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil químico das bebidas durante a fermentação, estabilidade e sensorial

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas das bebidas foram separados por processo fermentativo. A primeira fermentação (F1) compreende os resultados das kombuchas com e sem adição de açúcar e a segunda fermentação (F2) a saborização dessas bebidas.

5.1.1 Primeira fermentação (F1)

Os valores de pH, acidez titulável, sólidos solúveis, açúcares, ácidos orgânicos, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais da fermentação sem adição de açúcar (FSA) e com açúcar (FCA) durante F1 (7 dias) são mostrados na Figura 6.

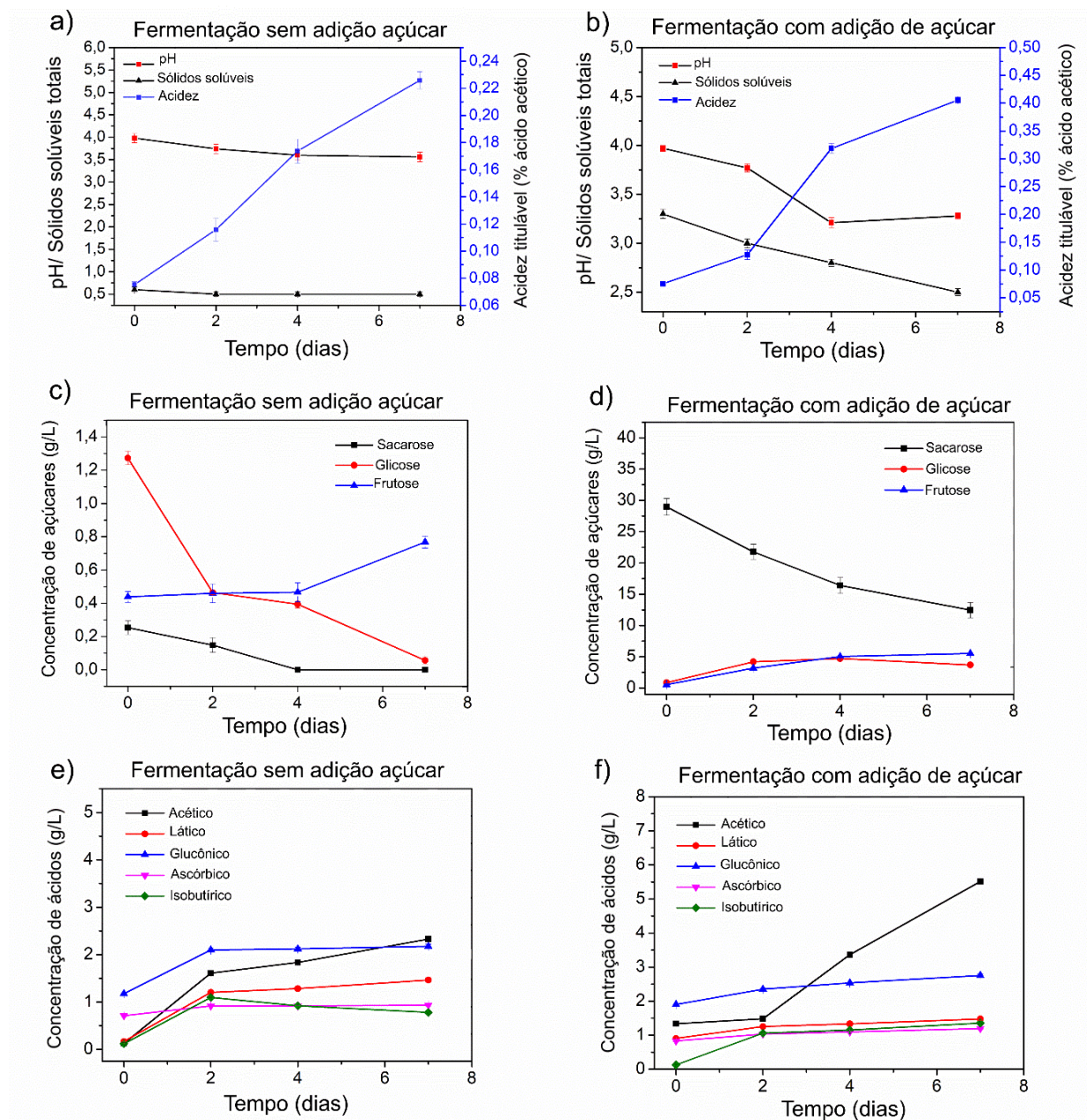
O teor de sólidos solúveis teve uma maior redução na fermentação com açúcar de 3,3 para 2,5. O consorcio de microrganismos hidrolisa a sacarose em glicose e frutose, que serão posteriormente utilizadas, contribuindo para redução do brix (Tran *et al.*, 2020). Quanto a fermentação sem açúcar o brix reduziu de 0,6 para 0,5 e se manteve até o final da fermentação. Entre essas bebidas FCA possui acidez maior (0,4%) do que FSA (0,2%). O aumento da acidez ao longo da fermentação é proveniente da produção dos ácidos orgânicos.

FSA e FCA apresentaram pH inicial de 3,98 e 3,97 respectivamente (Figura 6a e 6b). Ao longo do tempo de fermentação esses valores diminuíram para 3,56 e 3,28. Após 4 dias de fermentação o pH estabilizou. Durante a fermentação também ocorre a produção de dióxido de carbono que tem efeito de tamponamento, evitando assim uma grande redução do pH (Chakravorty *et al.*, 2016).

Em relação aos açúcares (Figura 6c e 6d) durante F1 o mesmo comportamento é observado para sacarose em ambas bebidas, decaimento da concentração ao longo dos 7 dias de fermentação. As concentrações de açúcares observados em FSA são provenientes do inóculo adicionado para iniciar a fermentação. Devido ao inóculo ser originário de uma outra fermentação contendo açúcar, ainda é possível observar sacarose, glicose e frutose no fermentado. Não só o inóculo como o próprio chá verde utilizado também contém sacarose, glicose e frutose na sua composição 0,34 g/L, 0,31 g/L e 0,13 g/L respectivamente (Piyasena *et al.*, 2022). A frutose encontra-se em maior concentração após 7 dias de fermentação, isso devido ao uso primário dos outros açúcares pelos microrganismos (Miranda *et al.*, 2022). Leonarski *et al.* (2021) relata que as

leveduras têm maior preferência pela glicose, quando estes dois açúcares estão disponíveis no meio de cultivo.

Figura 6 – pH, sólidos solúveis totais e acidez tituláveis, ácidos orgânicos, açúcares, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais da fermentação sem açúcar (FSA) e fermentação com açúcar (FCA)



Nota: Os resultados foram expressos como médias com desvio padrão (n=3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Na fermentação com açúcar houve aumento da concentração de glicose e frutose com dois dias de fermentação, o que pode ser explicado pela hidrólise da sacarose. Os açúcares

residuais no fim da fermentação contribuem na suavização do gosto ácido observado nas kombucha. Entre esses três açúcares a frutose possui a maior contribuição para o fator doçura (Timmermans *et al.*, 2023). Além disso, vários parâmetros podem influenciar nas suas concentrações, como, temperatura, tempo de fermentação, via metabólica utilizada pelos microrganismos, matriz vegetal utilizada e população microbiana (Silva Júnior *et al.*, 2021).

Os ácidos orgânicos identificados nas bebidas são ácidos graxos de cadeia curta, com cadeias de no máximo 6 carbonos, produtos derivados da fermentação anaeróbica de açúcares e outros compostos (Xiao *et al.*, 2021). Os ácidos observados (Figura 6e e 6f) foram o ácido acético, láctico, glucônico, isobutírico e ascórbico. O pico de produção desses ácidos foi com dois dias de fermentação para as duas bebidas, exceto pelo ácido acético que continuou aumentando sua concentração até o sétimo dia.

A produção de ácido acético pode estimular a produção de mais etanol no meio fermentado, este etanol é novamente convertido em ácido (Yassunaka Hata *et al.*, 2022). Nesse estudo não foi quantificado álcool em nenhuma das fermentações até o sétimo dia. Isto sugere que o álcool produzido foi todo convertido em ácido acético. O acúmulo contínuo de ácido acético no meio e consequentemente sua acidificação evita contaminação por microrganismos patogênicos.

Os demais ácidos após o segundo dia de fermentação tendem a estabilizar para ambas as kombuchas (FSA e FCA). A temperatura utilizada pode selecionar tipos diferentes de microrganismos e favorecer seu crescimento, e assim, aumentar seus metabolitos no meio fermentado. Como a temperatura ótima de produção de ácido acético para a maioria das bactérias acéticas é em torno de 30 °C, este pode ter inibido a produção dos demais ácidos (Ndoye *et al.*, 2006).

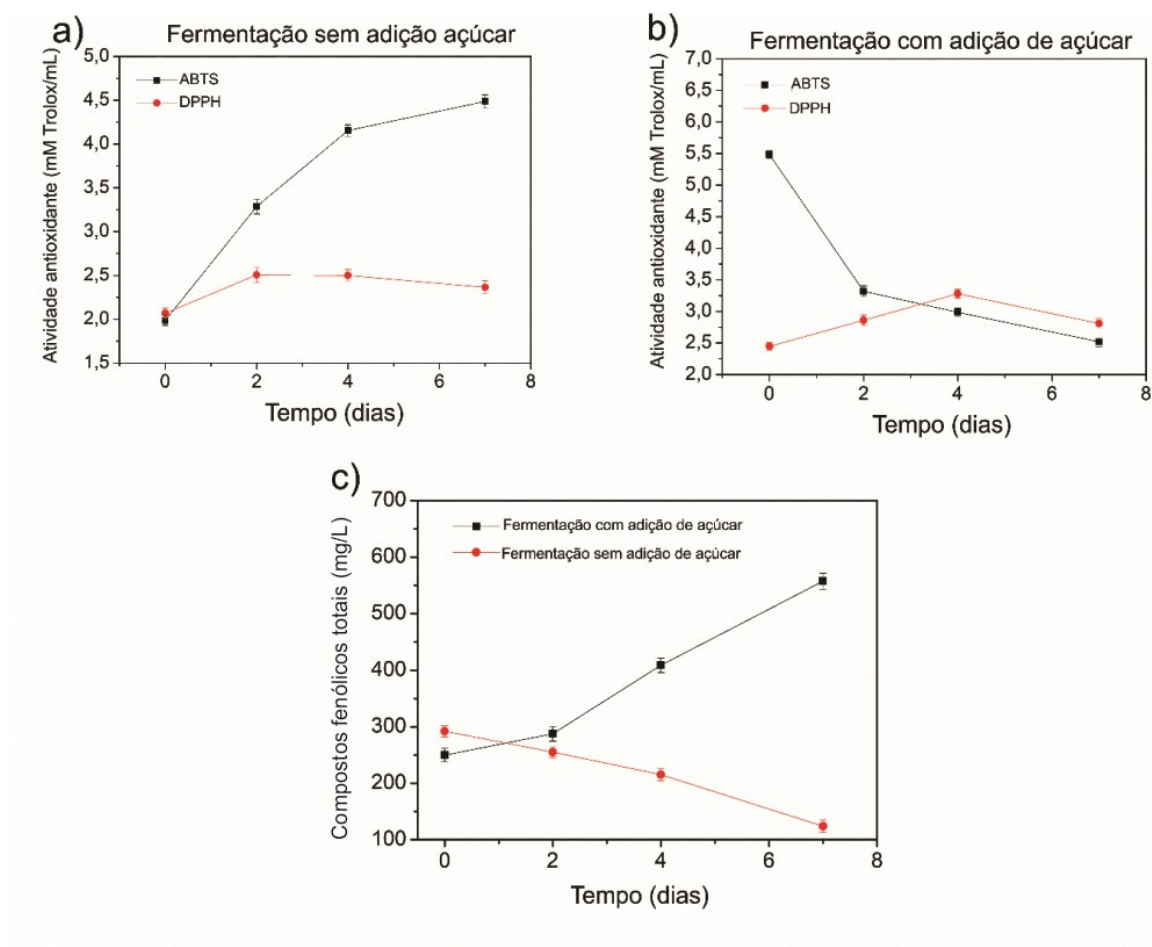
Xia *et al.* (2019) utilizou a cultura inicial de kombucha para a fermentação do leite de soja a 28°C e 37°C para desenvolver uma nova bebida de leite de soja funcional. Concluíram que a temperatura de 37° C foi a melhor para o crescimento das bactérias ácido lácticas e 28°C para o crescimento de bactérias acéticas. Estes resultados corroboram com esse estudo.

Os compostos bioativos, como os polifenóis contidos na Kombucha podem ser provenientes tanto do chá, quanto da atividade metabólica de microrganismos envolvidos na fermentação da bebida (Miranda *et al.*, 2022). A Figura 7c mostra a concentração de compostos fenólicos ao longo de F1. A redução de 57,47% na concentração dos compostos fenólicos até o sétimo dia de fermentação está relacionado a utilização destes pelo consórcio de bactéria e levedura, visto que, o substrato utilizado por esses microrganismos encontra-se pouco disponível no meio sem adição de açúcar. Pode ocorrer também a degradação de alguns polifenóis por enzimas durante a fermentação.

Na fermentação com açúcar a concentração dos compostos fenólicos aumentou (90%) até o sétimo dia de fermentação (Figura 7c). O aumento de compostos bioativos como compostos fenólicos deve-se a biotransformação dos metabólitos primários presentes no meio e até a quebra de compostos mais complexos em compostos mais simples (Bortolomedi; Paglarini; Brod, 2022; Zubaidah *et al.*, 2018).

A atividade antioxidante de FSA e FCA (Figura 7a e 7b) tiveram comportamentos contrário a concentração de compostos fenólicos. A utilização dos compostos fenólicos na fermentação sem açúcar e a hidrólise de compostos glicosilados podem ter tornado mais disponíveis a reagirem com os radicais do ácido 2,2'-azinobis, 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico (ABTS), aumentando assim a atividade antioxidante nessa kombucha. Na fermentação com açúcar atividade antioxidante diminuiu ao longo do tempo de fermentação pelo método ABTS e aumentou pelo método DPPH enquanto compostos fenólicos nessa bebida aumentou.

Figura 7 – ABTS, DPPH e compostos fenólicos das bebidas fermentadas sem açúcar (FSA) e fermentadas com açúcar (FCA)



Nota: Os resultados foram expressos como médias com desvio padrão (n=3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Além dos compostos fenólicos outros compostos como a vitamina C também são considerados antioxidantes e podem estar relacionados a atividade nessa bebida (Shi *et al.*, 2023). Fonteles *et al.* (2024) afirmaram que a atividade antioxidante observada em sua pesquisa se correlacionou positivamente com a vitamina C, indicando que este composto é o principal contribuinte para as propriedades antioxidantes do produto. Assim, atividade antioxidante em FSA e FCA pode estar correlacionada a outros compostos que não foram quantificados.

5.1.2 Segunda fermentação (F2)

A segunda fermentação tem como objetivo a saborização do chá fermentado e a carbonatação do produto (Coelho *et al.*, 2020). A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para pH, sólidos solúveis totais e acidez tituláveis, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais durante a segunda fermentação.

Durante 48 horas de F2 não houve grandes variações do pH das bebidas. Durante esse período as bebidas estavam envasadas em garrafas pet lacradas (Figura 8) o que aumentou a produção de CO₂, e com isso o tamponamento. Houve redução da concentração dos sólidos solúveis em todas as bebidas. Os componentes dos extratos foram suficientes para continuar a fermentação por mais 48 horas, pois com sete dias de fermentação o valor do °Brix dessas bebidas já havia estabilizado. Os sólidos solúveis presentes em uma determinada bebida compreendem os açúcares, sais, proteínas e ácidos, destes os açúcares compreende a maior parte (Leite Cavalcanti *et al.*, 2006). Os microrganismos hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, que serão posteriormente utilizados, contribuindo para redução do Brix° (Tran *et al.*, 2020).

A acidez titulável não teve variação significativa durante a segunda fermentação onde o maior valor observado foi na Kombucha de uva com açúcar (0,5%). O uso do açúcar disponível no meio aumenta a produção de vários ácidos orgânicos durante a fermentação. Os principais ácidos orgânicos encontrados nesse experimento foram o ácido lático, glucônico, ascórbico e acético (Chakravorty *et al.*, 2016).

Figura 8 – Kombuchas com e sem adição de açúcar saborizadas com resíduos agroindustriais durante segunda fermentação



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 – pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante durante a segunda fermentação

Amostra	pH		Sólidos solúveis totais (Brix°)		Acidez titulável (% ácido acético)		ABTS (mM Trolox/mL)		DPPH (mM Trolox/mL)		Fenólicos (mg/L)	
	0	48	0	48	0	48	0	48	0	48	0	48
Tempo (h)												
Kombucha_C	3,85	3,65±	1,4	0,7	0,20	0,26	1,78	3,38	2,74	2,53	415,22	213,00
	±0,005 ^a	0,005 ^b	±0,000 ^a	±0,000 ^b	±0,000 ^a	±0,005 ^b	±0,003 ^a	±0,005 ^b	±0,002 ^a	±0,000 ^b	±1,52 ^a	±2,51 ^b
Kombucha_M	3,58	3,50	3,73	1,00	0,23	0,30	3,15	2,92	2,12	2,29	171,88	288,55
	±0,005 ^a	±0,005 ^a	±0,000 ^a	±0,000 ^b	±0,00 ^a	±0,00 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±1,50 ^a	±1,85 ^b
Kombucha_U	3,57	3,47	1,00	0,60	0,23	0,27	3,78	3,58	2,66	3,04	111,88	309,66
	±0,000 ^a	±0,000 ^b	±0,000 ^a	±0,000 ^b	±0,00 ^a	±0,010 ^a	±0,005 ^a	±0,010 ^b	±0,003 ^a	±0,005 ^b	±2,00 ^a	± 2,20 ^b
Kombucha_CA	3,62	3,32	2,90	1,4	0,31	0,44	3,52	3,25	2,96	3,17	387,55	371,88
	±0,000 ^a	±0,000 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±0,005 ^a	±0,010 ^b	±0,002 ^a	±0,005 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±1,000 ^a	±1,89 ^b
Kombucha_MA	3,55	3,37	3,33	2,00	0,38	0,47	2,82	2,92	2,12	2,53	269,66	280,77
	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±0,000 ^a	±0,005 ^b	±0,005 ^a	±0,010 ^b	±0,003 ^a	±0,003 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±2,10 ^a	±2,15 ^b
Kombucha_UA	3,46	3,29	2,30	1,40	0,35	0,52	4,48	4,22	2,60	3,02	483,00	426,33
	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±0,005 ^a	±0,000 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±0,010 ^a	±0,010 ^b	±0,005 ^a	±0,005 ^b	±2,50 ^a	±2,35 ^b

Nota: Letras diferentes representam diferenças significativas entre 0 e 48h, as amostras e análises não foram comparadas entre si.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação aos compostos fenólicos (Tabela 6) quando os extratos foram adicionados houve aumento dos compostos fenólicos totais em todas as kombuchas. A composição dos resíduos fez com que os compostos fenólicos voltassem a aumentar em todas as bebidas. Após 48hrs as concentrações aumentaram nas kombuchas de manga (67,8%) e uva (176,7%) sem açúcar e reduziu nas kombucha de caju (48,7%) sem açúcar. Quanto as bebidas com açúcar houve redução nas kombuchas de caju (4,0%) e uva (11,7%) e aumento nas kombucha de manga (4,12%).

O processamento por ultrassom o qual os resíduos foram submetidos é capaz de romper estruturas complexas dos fenólicos e deixar de forma mais acessível podendo ser quantificados. Além disso, o acúmulo de ácidos e a acidez elevada nas kombuchas com açúcar contribui para a redução dos compostos bioativos, explicando assim, o decaimento dos compostos fenólicos nessas bebidas (Bortolomedi; Paglarini; Brod, 2022; Zubaidah *et al.*, 2018).

A Figura 9 mostra a concentração de açúcares, ácidos e produção de etanol durante a segunda fermentação. Os açúcares presentes em Kombucha_C, Kombucha_M e Kombucha_U durante F2 são provenientes dos resíduos usados para saborização. A concentração de açúcares nos extratos produzidos para saborização eram: sacarose (0,87 g/L- caju, 2,3g/L- manga e 0,66 g/L- uva), glicose (4,57 g/L- caju, 1,86g/L- manga e 1,21 g/L- uva) e frutose (3,97 g/L- caju, 4,26 g/L- manga e 1,67 g/L- uva). Estes continuam sendo utilizados pelo consorcio de microrganismos e a concentração máxima de sacarose observada é de 0,57 g/L em Kombucha_C no final da segunda fermentação (F2).

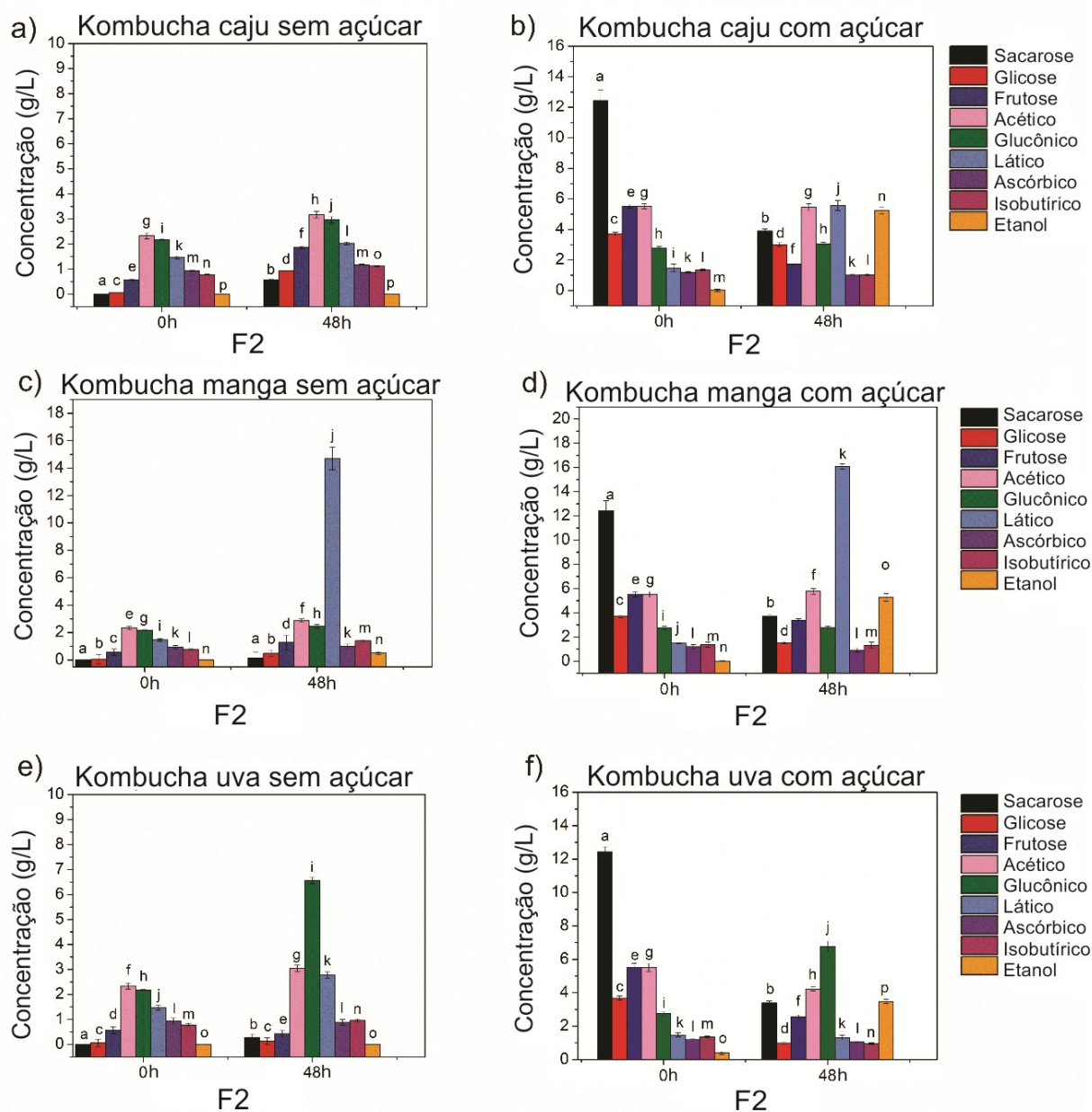
A concentração dos açúcares redutores das bebidas sem adição de açúcar teve aumento significativo durante F2. A maior concentração destes açúcares foi observada em Kombucha_C (0,92g/L- glicose e 1,86 g/L- frutose). Os resíduos de frutas mesmo após processamento ainda contêm quantidades significativas de compostos como: compostos antioxidantes, vitaminas e açúcares (Visakh *et al.*, 2022). O processamento por ultrassom também contribuiu para a extração de compostos nos resíduos (Biswas *et al.*, 2023).

Nas bebidas com açúcar a maior concentração de sacarose, glicose e frutose é observada em Kombucha_CA (3,9g/L – sacarose) e Kombucha_MA (1,5g/L – glicose e 3,37g/L – frutose), respectivamente.

Os açúcares redutores contribuem na suavização do gosto ácido observado na kombucha. Entre esses açúcares a frutose possui a maior contribuição para o fator doçura (Timmermans *et al.*, 2023). Além disso, vários parâmetros podem influenciar nas suas concentrações, como, quantidade de açúcar disponíveis, temperatura, tempo de fermentação,

via metabólica utilizada pelos microrganismos, matriz vegetal utilizada e população microbiana (Miglioranza *et al.*, 2024).

Figura 9 – Ácidos orgânicos, açúcares e etanol das kombuchas de caju (Kombucha_C e Kombucha_CA), manga (Kombucha_M e Kombucha_MA) e uva (Kombucha_U e Kombucha_UA) durante a fermentação



Nota: Letras diferentes denotam significância estatística no composto entre os tempos 0h e 48h (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$), amostras diferentes não foram consideradas para a análise estatística.

Fonte: Elaborado pela autora.

A produção dos ácidos graxos de cadeia curta (Figura 9) variou significativamente entre as bebidas. A maior concentração de ácido acético observada nas bebidas sem adição de açúcar é Kombucha_C com 3,17g/L. Para as bebidas com açúcar não foi observado diferença significativa durante as 48 horas para Kombucha_CA e Kombucha_MA, exceto pela Kombucha_UA que reduziu a concentração (23%). O ácido acético contribui para a qualidade sensorial da bebida produzindo um sabor adstringente e ácido da bebida (Cai *et al.*, 2022).

A maior concentração do ácido glucônico é observada nas kombuchas de uva (Kombucha_U-6,55 g/L e Kombucha_UA -6,76 g/L). Quanto as demais, houve aumento 43% para Kombucha_M e 38% para Kombucha_MA e as kombuchas de caju não tiveram variação significativa.

Esse ácido é relatado como um dos principais ácidos orgânicos da kombucha que contribui para a formação da qualidade do sabor, sua formação deriva da hidrólise enzimática do ácido D-glucano- δ -lactona (Emiljanowicz; Malinowska-Pańczyk, 2020; Neffe-Skocińska *et al.*, 2017).

O ácido láctico foi mais expressivo nas kombuchas de manga (Kombucha_M-14,7 g/L e Kombucha_MA - 16,07 g/L). Fonteles *et al.* (2024) avaliaram a resposta metabólica da fermentação de kombucha após processamento de ultrassom. A saborização da bebida com polpa de manga favoreceu o aumento expressivo do ácido láctico na bebida, chegando a 16 g/L.

Kuria *et al.* (2021) afirma que as bactérias lácticas são essenciais para a formação de metabólitos inibitórios, como o ácido láctico, acético e propiônico. Mandha *et al.* (2022) relata que a manga é um meio adequado para o crescimento de bactérias lácticas. Logo a produção desse ácido pode estar associada aos componentes do resíduo da manga juntamente com a ação das bactérias ácido láctica.

Quanto ao ácido ascórbico, este manteve a concentração ao longo de todo período fermentativo, variando entre 0,9 e 1,0 g/L. A recomendação diária de vitamina C é de 90 mg para homens e 75 mg para mulheres, respectivamente. Portanto, a ingestão de 200 mL de Kombucha forneceria 200 mg de vitamina C (Quadros, 2016). As maiores concentrações de ácido isobutírico foram observadas nas amostras de manga e caju sem açúcar ($1,12 \pm 0,05$ e $1,39 \pm 0,05$, respectivamente).

Os níveis de etanol durante a fermentação do kombucha é uma preocupação significativa devido à sua ocorrência natural. A maior concentração de etanol observada durante F2 (Figura 9) foi de $5,27 \pm 0,05$ e $5,24 \pm 0,05$ g/L em kombucha_CS e kombucha_MS. No caso do kombucha sem açúcar, o etanol foi detectado apenas no kombucha de manga ($0,39 \pm 0,001$ g/L).

O padrão de identidade e qualidade da Kombucha é regulamentado pela Instrução Normativa (IN) nº 41, de 17 de setembro de 2019, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Segundo a IN, o teor alcoólico do Kombucha sem álcool é de até 0,5% (v/v) e com álcool de 0,6% a 0,8%. Isso equivale a 4,0, 4,9 e 6,5g/L (Brasil, 2019).

Vários parâmetros podem influenciar nas concentrações dos compostos da kombucha, como, quantidade de açúcar disponíveis, temperatura, tempo de fermentação, via metabólica utilizada pelos microrganismos, matriz vegetal utilizada e população microbiana. Tais condições tornam a kombucha uma bebida com composições específicas de cada processo.

5.1.3 Estabilidade

Os valores de pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável e compostos fenólicos são mostrados da Tabela 7. O pH variou de 3,1 a 3,6 entre o dia 0 e 30 para as kombuchas sem açúcar e para as bebidas com açúcar os valores foram de 3,1 a 3,4. Quanto aos sólidos solúveis a maior redução observada para as bebidas sem açúcar foi 0,5 Brix° na kombucha de manga e para as bebidas contendo açúcar foi 0,9 Brix° também para bebida de manga durante o armazenamento.

A acidez das bebidas aumentou ao longo do armazenamento para todas as bebidas, tanto para as sem açúcar como as bebidas com açúcar. Os valores máximos obtidos foram de 0,45% para kombucha de manga sem açúcar e 0,71% para kombucha de uva com açúcar após 30 dias de estocagem. Embora exista diferença significativa entre os dias 0 e 30, essa mudança pode não ser percebida sensorialmente.

Tabela 7 – pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante durante a estabilidade

Amostra	pH		Sólidos solúveis totais (Brix°)		Acidez titulável (% ácido acético)		ABTS (mM Trolox/mL)		DPPH (mM Trolox/mL)		Fenólicos (mg/L)	
	0	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0	30
Kombucha_C	3,65 ±0,005 ^a	3,45 ±0,003 ^a	0,70 ±0,000 ^a	0,50 ±0,000 ^b	0,26 ±0,000 ^a	0,37 ±0,00 ^b	3,88 ±0,020 ^a	1,95 ±0,005 ^b	2,58 ±0,002 ^a	2,69 ±0,000 ^a	252,21 ±1,820 ^a	259,35 ±1,600 ^a
Kombucha_M	3,55 ±0,005 ^a	3,23 ±0,005 ^b	1,00 ±0,000 ^a	0,50 ±0,000 ^b	0,30 ±0,000 ^a	0,45 ±0,00 ^b	3,42 ±0,005 ^a	3,05 ±0,005 ^b	2,29 ±0,005 ^a	3,57 ±0,000 ^b	270,07 ±1,520 ^a	177,21 ±1,000 ^b
Kombucha_U	3,47 ±0,000 ^a	3,19 ±0,000 ^b	0,60 ±0,000 ^a	0,40 ±0,000 ^b	0,27 ±0,000 ^a	0,35 ±0,010 ^b	4,95 ±0,005 ^a	4,25 ±0,010 ^b	2,33 ±0,003 ^a	2,23 ±0,005 ^a	122,21 ±2,510 ^a	187,21 ±2,000 ^b
Kombucha_CA	3,32 ±0,000 ^a	3,22 ±0,000 ^b	1,40 ±0,005 ^a	0,80 ±0,005 ^b	0,44 ±0,005 ^a	0,56 ±0,010 ^b	3,78 ±0,020 ^a	2,25 ±0,005 ^b	2,44 ±0,005 ^a	2,46 ±0,005 ^a	297,21 ±1,000 ^a	262,92 ±1,000 ^b
Kombucha_MA	3,37 ±0,005 ^a	3,32 ±0,005 ^a	2,00 ±0,000 ^a	1,10 ±0,005 ^b	0,47 ±0,005 ^a	0,64 ±0,010 ^b	3,25 ±0,030 ^a	2,38 ±0,003 ^b	2,89 ±0,005 ^a	2,17 ±0,005 ^b	330,07 ±1,500 ^a	231,92 ±2,500 ^a
Kombucha_UA	3,29 ±0,005 ^a	3,11 ±0,005 ^b	1,4 ±0,005 ^a	0,80 ±0,000 ^b	0,48 ±0,005 ^a	0,71 ±0,005 ^b	2,75 ±0,010 ^a	3,28 ±0,003 ^b	2,39 ±0,005 ^a	2,41 ±0,000 ^a	390,07± 1,000 ^a	307,92 ±2,300 ^b

Nota: Letras diferentes representam diferenças significativas entre 0 e 48h, as amostras e análises não foram comparadas entre si.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os compostos fenólicos reduziram em todas as bebidas com açúcar (Tabela 7) e nas bebidas sem açúcar houve aumento da concentração na kombucha de caju ao longo dos 30 dias de armazenamento. La Torre *et al.* (2021) investigaram o efeito do armazenamento de longo prazo nas propriedades de eliminação de radicais e no conteúdo fenólico de kombuchas do chá preto. O valor do pH permaneceu constante, até dois meses. Compostos fenólicos diminuíram lentamente sem diferença estatística significativa até o quarto mês de armazenamento. Compostos fenólicos complexos conjugados com açúcares são quebrados pela ação do consórcio de microrganismos aumentando assim a concentração de açúcares no meio e a liberação de compostos fenólicos mais simples que também são utilizados pelos microrganismos (Yuliana *et al.*, 2023). Isso pode explicar a redução observada em algumas kombuchas.

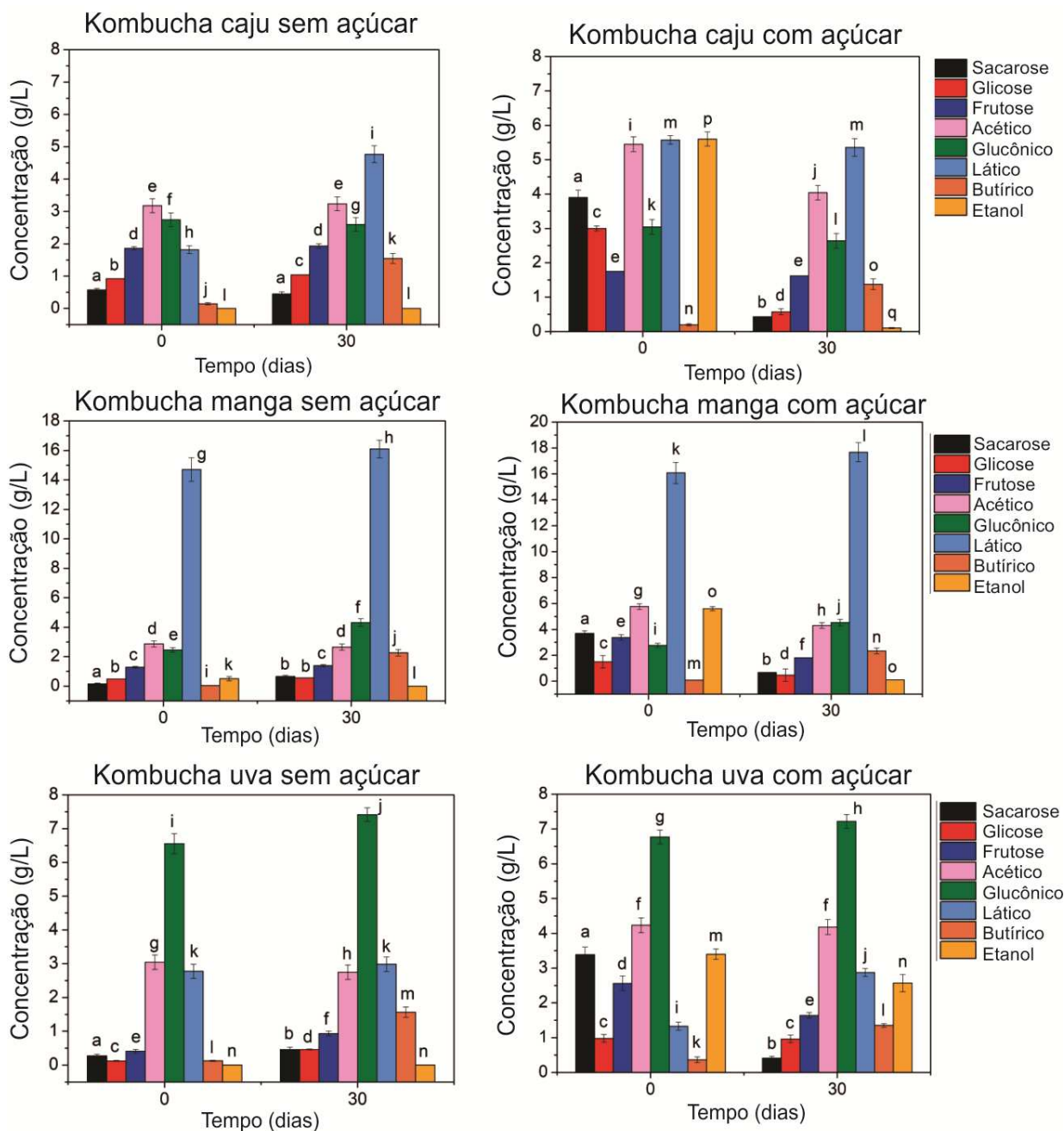
A variação máxima observada para atividade antioxidante pelo método DPPH foi na kombucha de manga sem açúcar que foi de 2,29 em 0 dias de armazenamento para 3,57 mg Trolox /ml em 30 dias. ABTS reduziu em todas as bebidas exceto a bebida de uva com açúcar.

A Figura 10 mostra as concentrações de açúcares, ácidos e etanol durante a estabilidade das bebidas. Glicose e frutose aumentaram suas concentrações em todas as bebidas sem açúcar. O comportamento contrário ocorreu nas bebidas com açúcar. Todos os açúcares reduziram com tempo de armazenamento. A frutose foi o açúcar com maior concentração em todas as bebidas após o período de estabilidade.

Quanto aos ácidos acético, láctico e glucônico das bebidas sem açúcar o aumento máximo observado foi de 38% na kombucha de caju para o ácido láctico. A redução máxima observada foi na kombucha de uva para o ácido acético (10%). Para as bebidas com açúcar a redução máxima observada foi na kombucha de caju para o ácido acético (25%). O aumento máximo foi de 43% para o ácido láctico na bebida tradicional. O ácido glucônico nas kombuchas sem açúcar teve o aumento máximo de 43% para bebida de manga e a kombucha de caju que não houve diferença significativa. Para as kombuchas com açúcar o aumento máximo observado foi de 38,7% para a bebida de manga.

Houve aumento na concentração de ácido butírico em todas as bebidas após 30 dias de armazenamento. A maior concentração observada foi na kombucha de manga com açúcar (2,34g/L). Silva Júnior *et al.* (2021) também observou a presença deste ácido em kombuchas tradicionais e aromatizadas com polpas de pitanga e umbu-cajá. Nesse estudo o ácido butírico teve maiores concentrações nas kombuchas de sabor umbu-cajá durante o armazenamento de sete dias.

Figura 10 – Ácidos orgânicos, açúcares e etanol das kombuchas de caju (Kombucha_C e Kombucha_CA), manga (Kombucha_M e Kombucha_MA) e uva (Kombucha_U e Kombucha_UA) durante a estabilidade



Nota: Letras diferentes denotam significância estatística no composto entre os tempos 0h e 48h (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$), amostras diferentes não foram consideradas para a análise estatística.

Fonte: Elaborado pela autora.

O butirato é produzido por bactérias anaeróbicas e tem a capacidade de aumentar a fragrância frutada da bebida (Aiello *et al.*, 2023). Além do aspecto sensorial o ácido butírico está associado a benefícios a saúde, como prevenir a obesidade e doenças metabólicas.

Coppola *et al.* (2022) afirma que tanto a produção endógena como a ingestão desse ácido pode ser eficaz no tratamento da obesidade (Coppola *et al.*, 2022; Szliszka *et al.*, 2009).

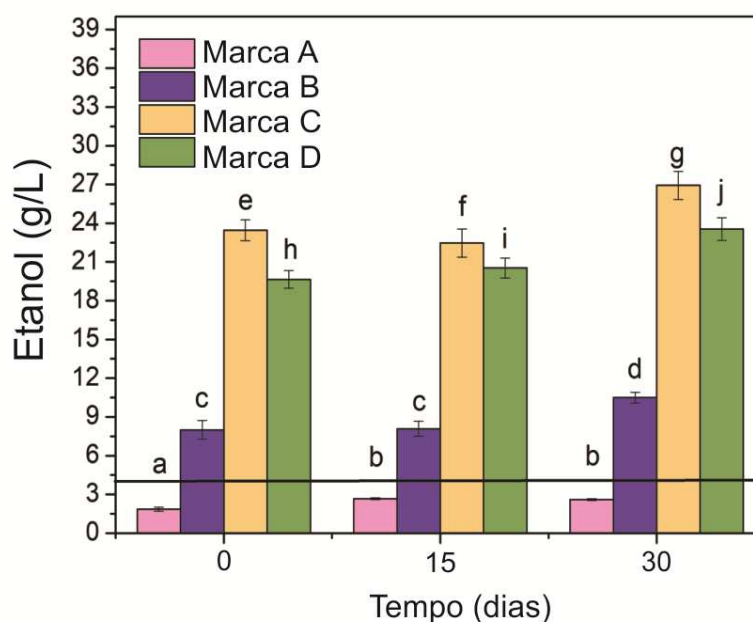
Durante o teste de estabilidade (Figura 10), apenas kombucha_CS e kombucha_GS ainda continham álcool ao final dos 30 dias, porém as concentrações não excederam 4 g/L.

Amostras de kombucha foram adquiridas de lojas próximas para avaliar seu teor de álcool e compará-las com as produzidas neste estudo. As bebidas foram mantidas refrigeradas por 30 dias. A concentração de etanol foi medida a cada 15 dias. A Figura 11 mostra as concentrações das marcas A, B, C e D. A maior concentração observada foi no kombucha C ($26,93 \pm 1,12$ g/L). A kombucha A foi a única que atendeu às especificações brasileiras. Devido à biomassa ainda presente nas kombuchas que não são filtradas ou pasteurizadas, ocorre fermentação anaeróbica no interior da embalagem, aumentando assim o teor alcoólico (Coelho *et al.*, 2020). Além disso, variações na temperatura de armazenamento dessas bebidas podem causar superprodução de etanol (Andreson *et al.*, 2022).

Estudos utilizando polpa de frutas como método de saborização da Kombucha (Akbarirad *et al.*, 2017; Phung *et al.*, 2023) reportam valores maiores na concentração de álcool, chegando a 1% (v/v) o que equivale a 7,89 g/L. Nesse sentido o uso de resíduos para saborização e a redução e retirada do açúcar no processo fermentativo foi uma alternativa interessante para redução do etanol durante a fermentação e estabilidade.

No geral, não houve grandes alterações nas concentrações dos ácidos e nos parâmetros físico-químicos durante a estabilidade das bebidas. Os resultados das análises sugerem estabilidade dos compostos e um produto ainda com propriedades benéficas a saúde do homem.

Figura 11 – Concentração de etanol das amostras comerciais, marcas A, B, C e D



Nota: Letras diferentes denotam significância estatística (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$) nos tempos 0, 15 e 30 dias das amostras de mesma marca.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.4 Análise sensorial

O perfil sensorial descritivo tem sido comumente usado para descrever características sensoriais de produtos. Onze julgadores se levantaram pelo método de rede, 22 atributos, sendo eles: cor amarela, cor roxa, turbidez, presença de fragmentos, presença de bolhas, aroma de caju, aroma de manga, aroma de uva, aroma de chá verde, aroma de fermentado, aroma floral, doçura, acidez, amargor, salgado, sabor de caju, sabor de manga, sabor de uva, sabor de chá verde, sabor de fermentado, adstringência e concentrado.

Em relação à aparência, todos os julgadores determinaram a característica de coloração (amarela ou roxa) como importante no produto. Destes, nove citaram o atributo turbidez, quatro também mencionaram a presença de bolhas, referente a carbonatação das bebidas e três citaram também a presença de fragmentos.

Já em relação ao aroma, somente o termo aroma fermentado foi citado por todos os julgadores. Destes, nove citaram o atributo aroma de caju, cinco de chá verde, três de aroma de manga e uva e dois mencionaram o aroma floral.

Para sabor, todos os julgadores citaram os termos acidez e sabor fermentado. Destes, nove mencionaram sabor de caju, cinco os atributos doçura e sabor de chá verde e três mencionaram os termos amargor, salgado, sabor de manga, sabor de uva e adstringência.

Para textura, todos os julgadores mencionaram o atributo concentrado relacionando com a consistência dos produtos.

Na análise do perfil livre, o grau de consenso dos julgadores é verificado através dos valores residuais de amostras e julgadores. Os resultados permitem verificar que a equipe sensorial apresentou um consenso adequado já que os valores residuais, tanto em relação às amostras como em relação aos julgadores, são baixos, sendo inferiores a 10% (Tabela 8 e 9).

Tabela 8 – Valores residuais das amostras de kombucha

Tratamentos	Resíduo (%)
kombucha	2.696
Kombucha_C	5.269
Kombucha_M	4.895
Kombucha_U	5.708
Kombucha_A	5.502
Kombucha_CA	2.975
Kombucha_MA	4.996
Kombucha_UA	5.730

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9 – Valores residuais dos julgadores de kombucha

Julgadores	Resíduo (%)
1	3.602
2	4.836
3	3.136
4	2.943
5	5.878
6	1.567
7	2.345
8	2.922
9	2.277
10	2.599
11	5.667

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 12, apresenta o mapa de GPA para as bebidas sem e com açúcar. Uma variação total dos dados de 82,88% foi explicada em dois componentes principais (PC1 = 45,84% e PC2 = 37,04%).

As bebidas convencionais, a partir de chá verde, com e sem adição de açúcar, encontraram-se mais próximas dos atributos aroma e sabor de chá verde, doçura e aroma de fermentado. O aroma de fermentado mais pronunciado nessas bebidas em detrimento daquelas contendo resíduos de frutas pode ser resultante da ausência do aroma das frutas percebido nas outras bebidas, que acabou intensificando o aroma fermentado das tradicionais.

As bebidas contendo resíduo de caju ficaram mais próximas dos atributos aroma de caju, sabor de caju, adstringência, sabor de fermentado, acidez, salgado e turbidez. O atributo adstringência é característica do caju, sendo percebida também nessas bebidas. Entre os polifenóis, os taninos estão relacionados a adstringência, que são responsáveis pelo ressecamento na boca (Dartora *et al.*, 2023). A maior acidez pode ser resultante dos ácidos presentes nessas bebidas. Embora a Kombucha_UA tivesse a maior acidez observada dentre as bebidas, está também tinha a maior concentração de frutose residual, o que fez com que a sensação de acidez seja amenizada sensorialmente.

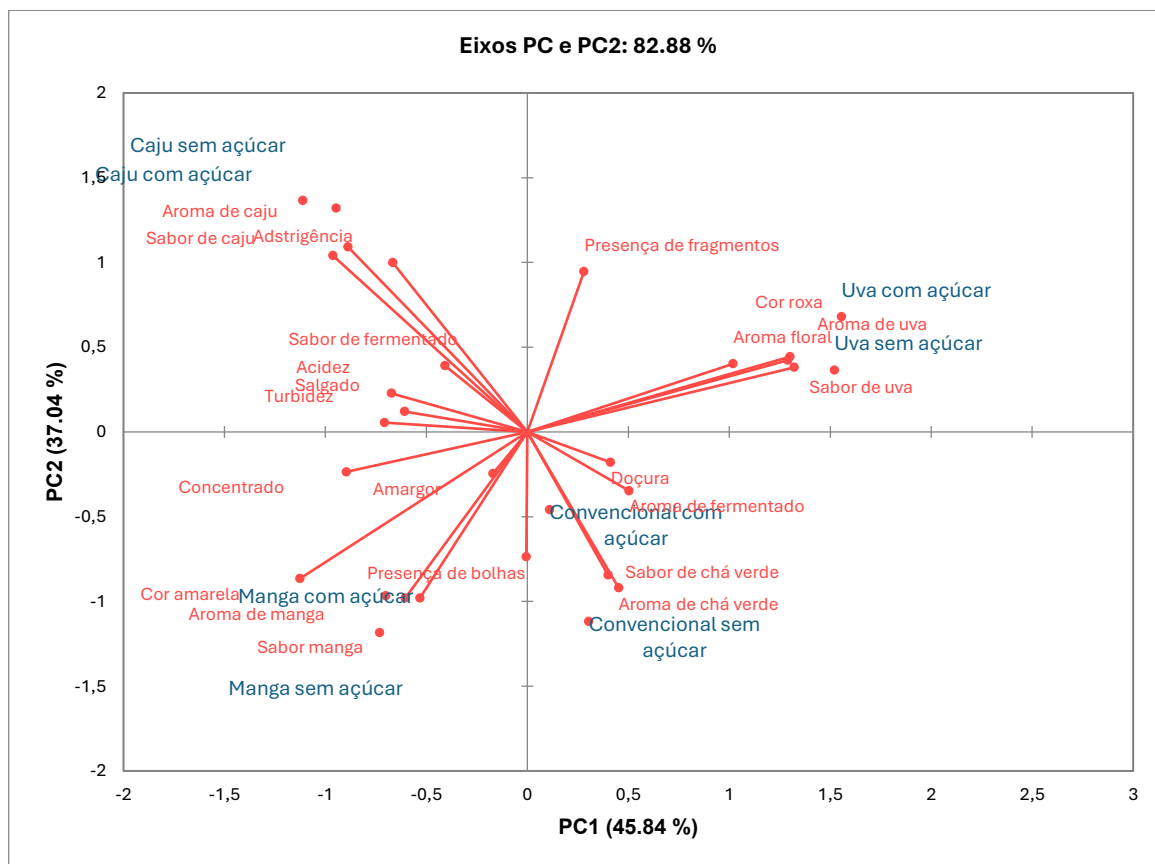
As bebidas contendo resíduo de manga ficaram próximas ao atributo cor amarela, evidenciando que essa coloração foi mais evidente nessas amostras. Além disso, os atributos aromam de manga, sabor de manga, presença de bolhas, concentrado e amargor ficaram mais próximos dessas amostras. Os resíduos da manga possuem aroma e sabor fortes cuja fonte são os componentes voláteis (Kuria; Matofari; Nduko, 2021). Durante a fermentação esses compostos são transformados e podem conferir novas características ao produto. As fibras da manga presentes no resíduo contribui para o atributo concentrado observado.

As bebidas contendo resíduo de uva ficaram mais próximas dos atributos cor roxa, aroma de uva, aroma floral e presença de fragmentos. A coloração roxa de intensidade mais clara dessas bebidas facilitou a visualização da presença de fragmentos delas.

Os ésteres são os principais compostos aromáticos em bebidas fermentadas. Compostos voláteis apresentam maior contribuição para a percepção do aroma. O acetato de isobutil é um composto que contribui para o aroma floral (Gao *et al.*, 2024).

Atributos como cor, sabor, aparência e aroma contribuem para uma melhor aceitação do consumidor a novos produtos. A correlação entre essas características e as kombuchas utilizando resíduos evidenciam sua eficácia como saborizante das bebidas.

Figura 12 – Distribuição dos julgadores e do consenso da equipe em relação às amostras nas duas primeiras dimensões da análise



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Digestão *in vitro* das kombuchas e fermentação colônica

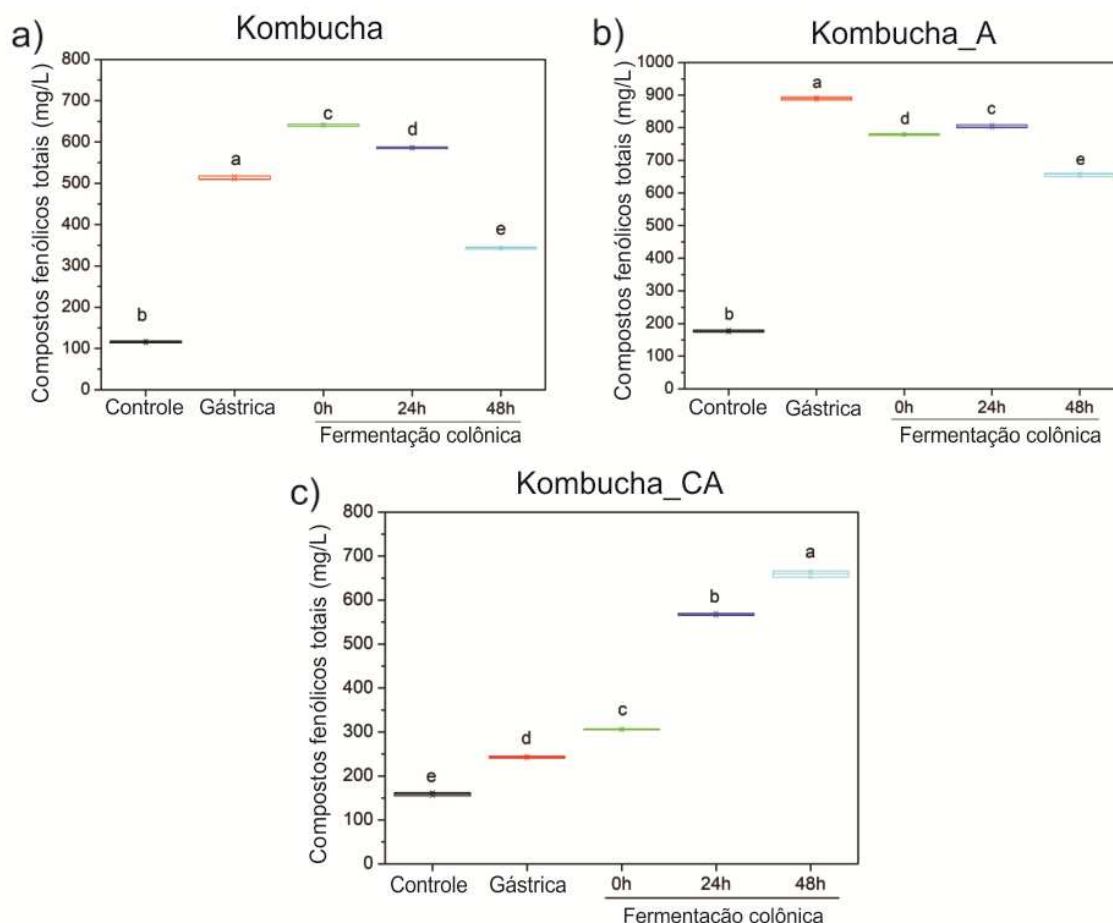
As bebidas selecionadas para digestão *in vitro* foram as amostras kombucha, kombucha_A e kombucha_CA. A escolha foi feita a fim de se avaliar a influência do açúcar residual das bebidas na microbiota fecal humana.

5.2.1 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos após digestão e fermentação colônica

A Figura 13 apresenta os resultados da biodisponibilidade dos compostos fenólicos após digestão simulada *in vitro* e a utilização desses compostos pela microbiota fecal humana. Dentre as amostras kombucha (Figura 13a) tinha a menor concentração de compostos fenólicos ($113,32 \pm 1,62$ mg/L) no início da digestão. Um fator relevante e que influencia a concentração fenólica da bebida é a presença dos açúcares redutores. Durante a fermentação da kombucha, a microbiota presente acaba por utilizar esses açúcares primeiro como fonte de carbono do que outros compostos mais complexos como os polifenóis, explicando assim a diferença na

concentração de compostos fenólicos entre as bebidas (kombucha_A – $173,74 \pm 1,54$, kombucha_CA – $155,48 \pm 2,00$ mg/L) (Figura 13b e 13c).

Figura 13 – Concentração dos compostos fenólicos (mg GAE/L) ao final de cada fase da digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal de kombucha sem açúcar (kombucha) com açúcar (kombucha_A) e de caju (kombucha_CA)



Nota: Letras diferentes denotam significância estatística (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

As mudanças ocorridas no ambiente digestivo como pH e ação de enzimas alteram a estrutura dos compostos fenólicos, interferindo assim, na sua biodisponibilidade. Estruturas complexas são quebradas em porções menores facilitando a absorção intestinal. Durante a fase gástrica houve aumento da concentração de compostos fenólicos em todas as bebidas digeridas. O ambiente gástrico contém enzimas digestivas e baixo pH o que favorece a hidrólise de compostos com grande peso molecular, aumentando assim, a concentração de fenólicos após a fase gástrica (Swain *et al.*, 2024).

A absorção dos compostos fenólicos no lúmen intestinal é um fator crítico, pois depende de vários fatores envolvendo a própria amostra, como a matriz alimentar e a microbiota fecal envolvida no processo. Karakaya (2004), relata que o número de moléculas de açúcar desempenha um papel importante na absorção e o local onde esses compostos são absorvidos. Se o composto tiver uma molécula de açúcar na sua estrutura eles serão absorvidos através do intestino delgado pela hidrolase citosólica-glucosidase/lactase. Porém se a molécula de açúcar for substituída por um ácido orgânico ou um éster o fenólico será degradado pela esterase produzida pela microflora colônica.

Durante as 48h de fermentação colônica TPC reduziu 46,35% na kombucha, 16,21% em kombucha_S e aumento de mais de 100% na kombucha_CS. Esse aumento pode ser atribuído a interação desses compostos ao resíduo utilizado para saborizar a bebida. As fibras (especialmente fibras solúveis) podem criar um complexo poroso capaz de reter esses compostos e protegê-los de variações de pH e ação enzimática (Massa *et al.*, 2022). Lou *et al.* (2021) relata em seu estudo que a concentração de catequina aumentou significativamente em 144,7% após a digestão gastrointestinal *in vitro*.

Nas bebidas que não foram saborizadas é mostrado redução do conteúdo fenólico com tempo de fermentação colônica. Essa redução pode estar associada ao uso dos fenólicos como substratos pela microbiota intestinal que pode ocorrer por meio de reações enzimáticas (desglicosilação, sulfatação, di-hidroxilação e hidrogenação). O pH alcalino do ambiente intestinal também está relacionado a baixa estabilidade desses compostos, favorecendo também a sua redução (Gunathilake; Ranaweera; Rupasinghe, 2018; Liu *et al.*, 2021).

Com isso, podemos fortalecer as alegações feitas nas últimas décadas sobre compostos fenólicos agirem de maneira semelhante aos prebióticos já estabelecidos, como, frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS). Esses compostos poderão estimular seletivamente a microbiota benéfica do hospedeiro (Vargas; Fabricio; Záchia Ayub, 2021). A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) afirma que a seletividade não afetara necessariamente apenas um grupo microbiano, como as *Bifidobacterias* e *Lactobacilos*, mas sim, a vários grupos, desde que traga efeitos benéficos para a saúde (Gibson *et al.*, 2017). Nesse sentido, novas cepas estão sendo consideradas probióticos de próxima geração (Torp, 2022).

A kombucha é uma importante fonte de compostos bioativos provenientes da matéria-prima e do processo de fermentação. Devido a diferença entre as bebidas, como o açúcar presente e a saborização, os compostos fenólicos podem variar suas concentrações entre

as bebidas. A influência desses compostos na diversidade microbiana é relatado mais à frente e esses resultados apoiam as afirmações feitas sobre a kombucha ser uma bebida prebiótica.

5.2.2 Análise da microbiota intestinal

O conjunto de dados do sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento permite ter acesso a uma vasta gama de informações sobre a comunidade microbiana e a influência que os alimentos têm nesse microbioma. A diversidade α é a medição dentro da unidade amostral, esse índice nos fornece informações sobre a diversidade microbiana no habitat primitivo e as alterações ocasionadas pelo homem. No geral os métodos utilizados sugerem que quanto mais divergentes os táxons, maior será a diversidade. Chao 1 expressa apenas a presença ou ausência de táxon (riqueza), enquanto índice de Shannon e Simpson é uma medida quantitativa e contabiliza o número de vezes que cada táxon foi observado (riqueza e/ou uniformidade) (Lozupone; Knight, 2008; Cantu-Jungles; Hamaker, 2023).

A Tabela 10 mostra os índices de diversidade e riqueza das amostras fecais na presença das kombuchas digeridas. A diversidade alpha aumentou significativamente em todas as amostras após 48 horas de fermentação colônica. O índice de Shannon também variou significativamente indicando mudança nas espécies raras da comunidade microbiana. kombucha_CA aumentou 33,45% seguido de kombucha_A com 31,20% e kombucha com 12,3%. Quanto ao índice de Simpson, este diminuiu significativamente em kombucha enquanto nas outras amostras esse índice aumentou. Simpson calcula a probabilidade de dois indivíduos aleatórios pertencerem a mesma espécie. Quanto maior é a diversidade, menor é o valor desse índice, logo, a probabilidade de dominância de uma única espécie é menor. Assim quanto menor esse valor maior é a riqueza de espécies na amostra fecal (Lima; Souza; Pederassi, 2016).

A avaliação do inóculo fermentado na presença das kombuchas mostrou aumento da diversidade de microrganismos e riqueza de espécies em todas as amostras, em destaque a amostra kombucha. Com isso, as bebidas foram capazes de promover mudanças na diversidade e composição microbiana. Os resultados discutidos a seguir corroboram com os índices avaliados.

O uso de amostras fecais humanas de vários doadores reunidas para fermentação colônica permitiu a redução da variabilidade entre doadores, garantindo assim, uma mistura homogênea e equilibrada da microbiota intestinal (Carvalho *et al.*, 2021). A Figura 14 mostra as mudanças na microbiota no nível do filo. A composição da população microbiana incluiu principalmente bactérias gram-positivas (*Firmicutes* and *Actinobacteria*) e gram-negativas

(*Proteobacteria* e *Bacteroidetes*) em adultos saudáveis. No início da fermentação (0 h), *Firmicutes* foram dominantes em todas as amostras. No entanto, após 48 h, a abundância relativa de todas as amostras diminuiu ($p \leq 0,05$). Na amostra de kombucha (Figura 14a), um aumento significativo em *Actinobacteria* foi observado após 48 horas. O filo *Actinobacteria* abrange a família *Bifidobacteriaceae*, que inclui o gênero *Bifidobacterium* (Barka *et al.*, 2016). Houve um aumento notável no filo *Proteobacteria* para as amostras kombucha_S e kombucha_CS (Figuras 14b e 14c). Os representantes primários desta espécie incluem *Escherichia*, *Klebsiella* e *Shigella* (Arumugam *et al.*, 2011). De acordo com Kumar e Kumar (2022), a proliferação de *Proteobacteria* é uma assinatura microbiana de disbiose na microbiota intestinal.

Tabela 10 – Estimativa Alfa, Chao1, Shannon e Simpson para espécies bacterianas antes e depois da fermentação fecal de kombuchas

	Kombucha		Kombucha_A		Kombucha_CA	
	0	48	0	48	0	48
Tempo (h)						
Chao 1	670,19 ±63,61 ^a	1070,03± 85,43 ^b	946,43± 75,38 ^a	1418,53± 85,16 ^b	912,79± 64,35 ^a	1241,8± 61,39 ^b
Alpha	54,03± 0,99 ^a	79,73± 1,14 ^b	74,37± 1,18 ^a	108,89± 1,27 ^b	69,1± 0,96 ^a	99,51± 1,10 ^b
Shannon	2,86± 0,74 ^a	3,21± 0,00 ^b	2,98± 0,75 ^a	3,91± 0,00 ^b	2,75± 0,89 ^a	3,67± 0,00 ^b
Simpson	13,34± 8,16 ^a	10,99± 0,00 ^b	12,44± 8,97 ^a	25,78± 0,00 ^b	10,14± 7,55 ^a	16,68± 10,68 ^b

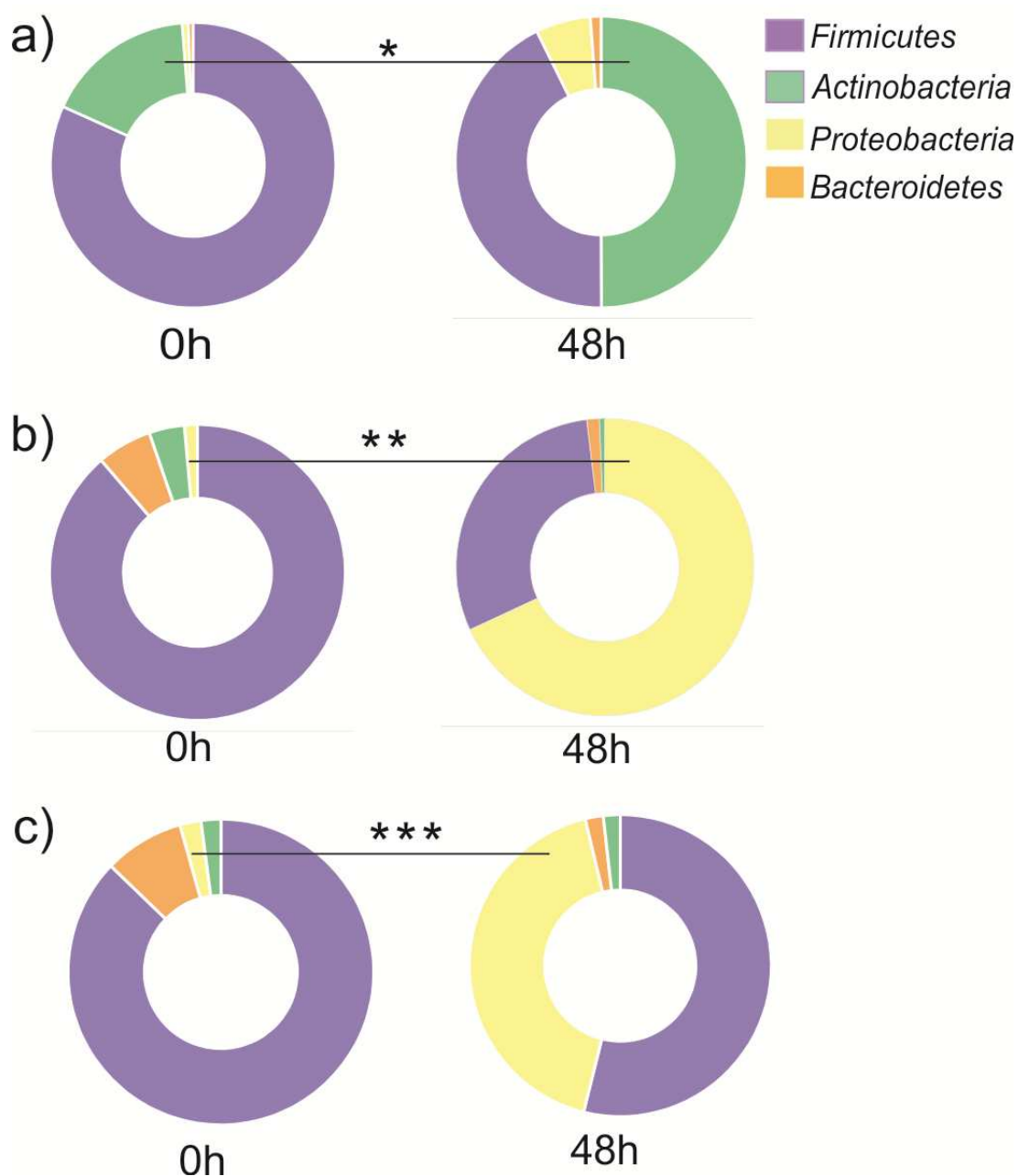
Nota 1: Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Nota 2: kombucha (Bebida tradicional fermentada sem adição de açúcar e sem saborização); kombucha_A (bebida tradicional fermentada sem adição de açúcar) e kombucha_CA – bebida fermentada com adição de açúcar e saborizada com extrato do resíduo do caju.

Nota 3: Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p \leq 0,05\%$) entre os tempos da amostra.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14 – Abundância relativa (%) a nível do filo em 0 e 48h de fermentação colônica

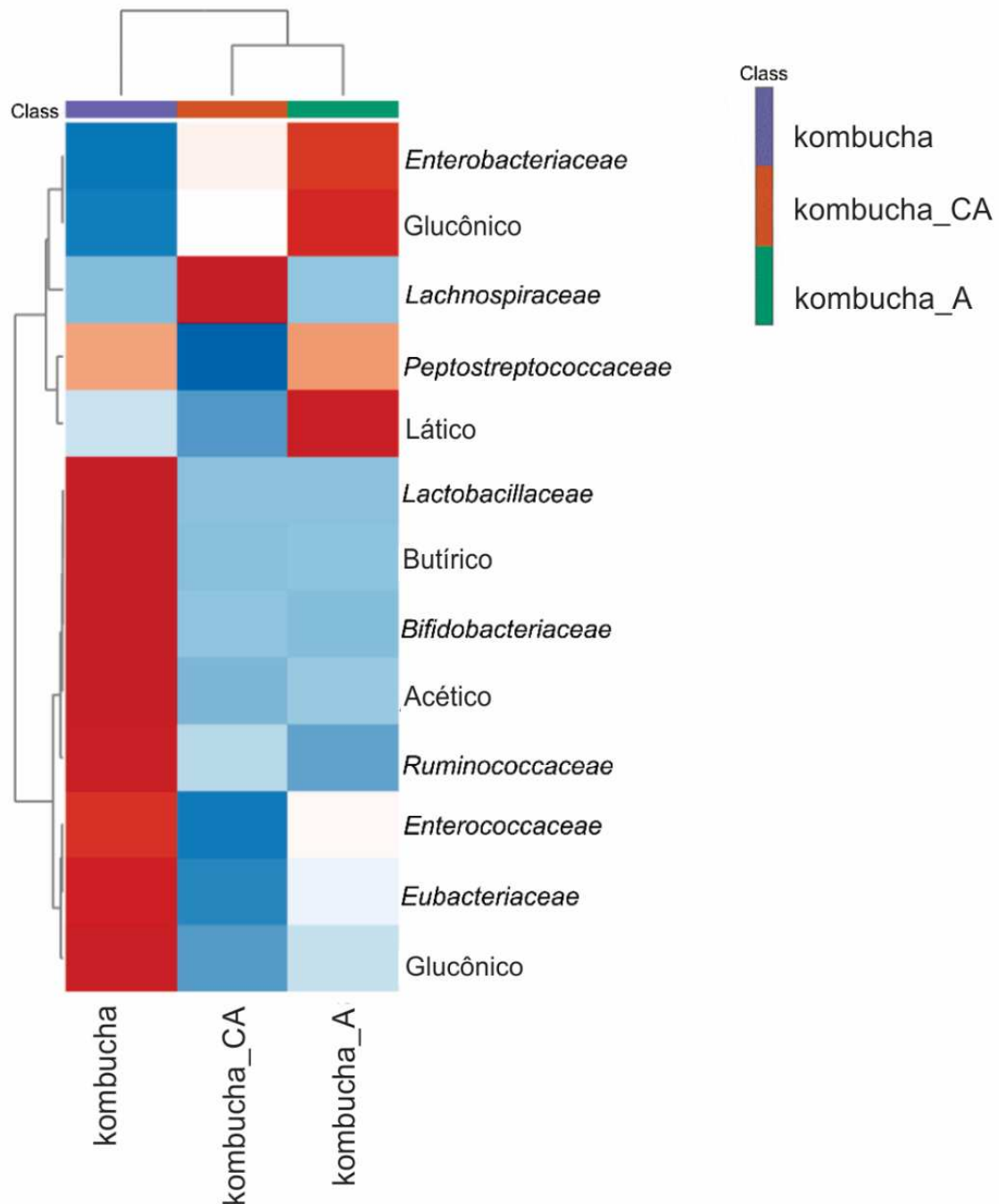


Nota: * Indica significância estatística (Tukey, $p \leq 0,05\%$), não houve comparação entre as amostras.

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 15 revela a dissimilaridade entre as amostras evidenciando três agrupamentos hierárquicos distintos, porém kombucha_A e kombucha_CA agruparam-se indicando semelhança entre essas amostras. Após 48 horas de fermentação colônica as famílias de *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae* e *Enterococcaceae* tiveram maior abundância relativa em Kombucha. *Enterobacteriaceae* para kombucha_A e *Lachnospiraceae* para kombucha_CA.

Figura 15 – *Heatmap* da microbiota fecal a nível de família e ácidos após 48h de fermentação



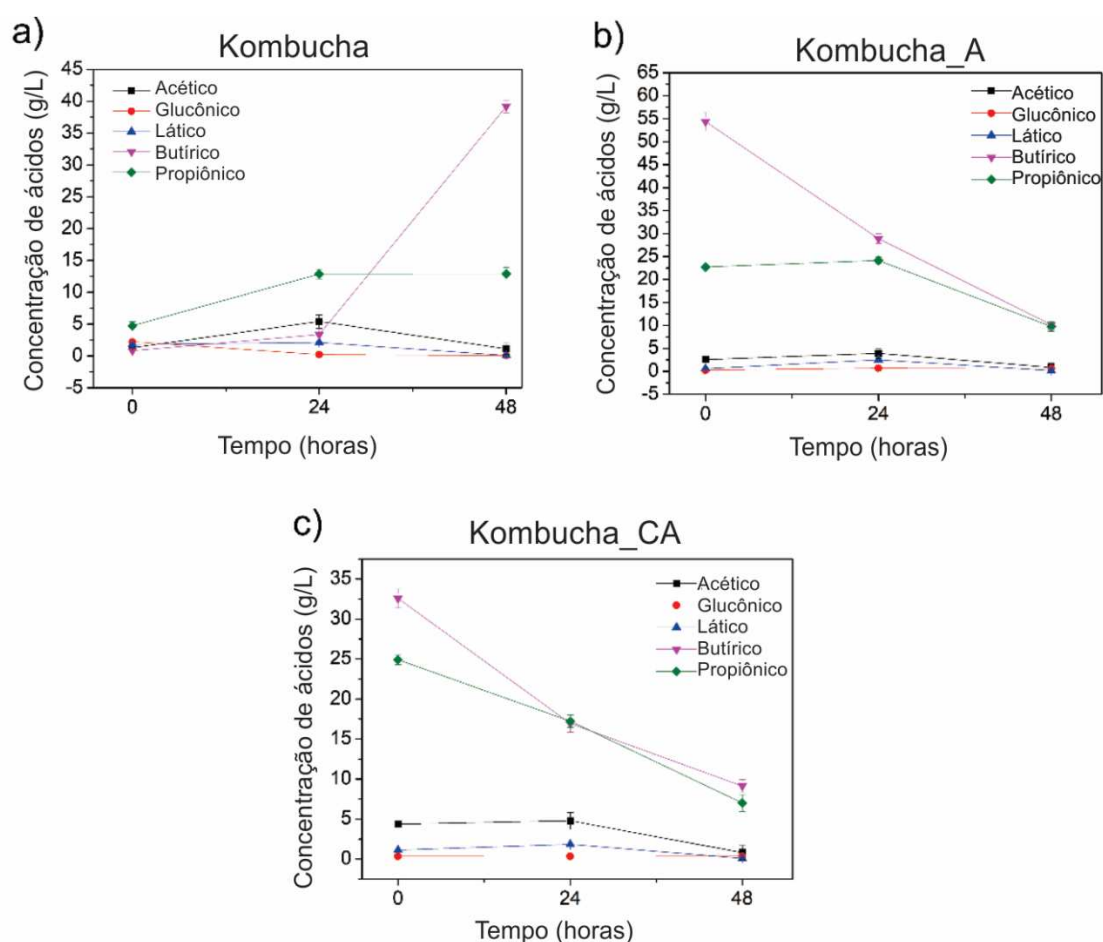
Fonte: Elaborado pela autora.

No *cluster* kombucha (Figura 15) é associado as maiores concentrações de butirato, propionato e acetato. Quanto a kombucha_A e kombucha_CA o principal metabolito foi lactato. A interação entre a dieta e a microbiota intestinal humana, especialmente alimentos potencialmente funcionais como a kombucha, estão ligados a produção de metabolitos como

ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a modulação do ambiente microbiano. A relação observada promove benefícios a saúde humana (Palmnäs-Bédard *et al.*, 2022).

A Figura 16 mostra a produção de SCFAs durante 48 horas de fermentação. A microbiota fecal fermentada com kombucha_S e kombucha_CS consumiu ácidos acético, butírico e propiônico, enquanto a microbiota fecal fermentada com kombucha produziu butirato e propionato. A maior produção de butirato ($38 \pm 1,21$ g/L) no kombucha está ligada ao aumento do consumo de compostos fenólicos pela sua microbiota (Figura 13). Os compostos fenólicos são transformados em metabólitos bioacessíveis durante a digestão simulada, principalmente durante a fermentação entérica. *Bifidobactérias*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Clostridium* desempenham um papel importante na produção desses metabólitos. Durante a fermentação fecal, todo o açúcar foi consumido pelos microrganismos.

Figura 16 – Concentração dos ácidos orgânicos de cadeia curta durante fermentação colônica



Nota: Valores apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

Alimentos vegetais são ricos em polissacarídeos complexos, como componentes bioativos como polifenóis, que estimulam o crescimento de *Firmicutes* e podem inibir bactérias patogênicas. *Firmicutes* e *Actinobacteria*, especialmente aqueles da família Bifidobacteriaceae, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, são butirogênicos e estimulantes para a saúde da mucosa (Holscher, 2017; Rodriguez-Saavedra *et al.*, 2023; Sori *et al.*, 2023).

A produção do propionato pode ocorrer a partir do lactato, a conversão desse ácido em propionato decorre da conversão do lactato a acrilato e pela oxidação de um NADH a propionato. O propionato atua na regulação de vias metabólicas, incluindo a função imunológica, metabolismo lipídico e síntese de neurotransmissores (Sori *et al.*, 2023). A Produção de SCFAs dependem de vários fatores como ingestão de fibra alimentar, a microbiota intestinal, as atividades metabólicas de cepas bacterianas específicas no cólon e a genética individual (Pant *et al.*, 2023).

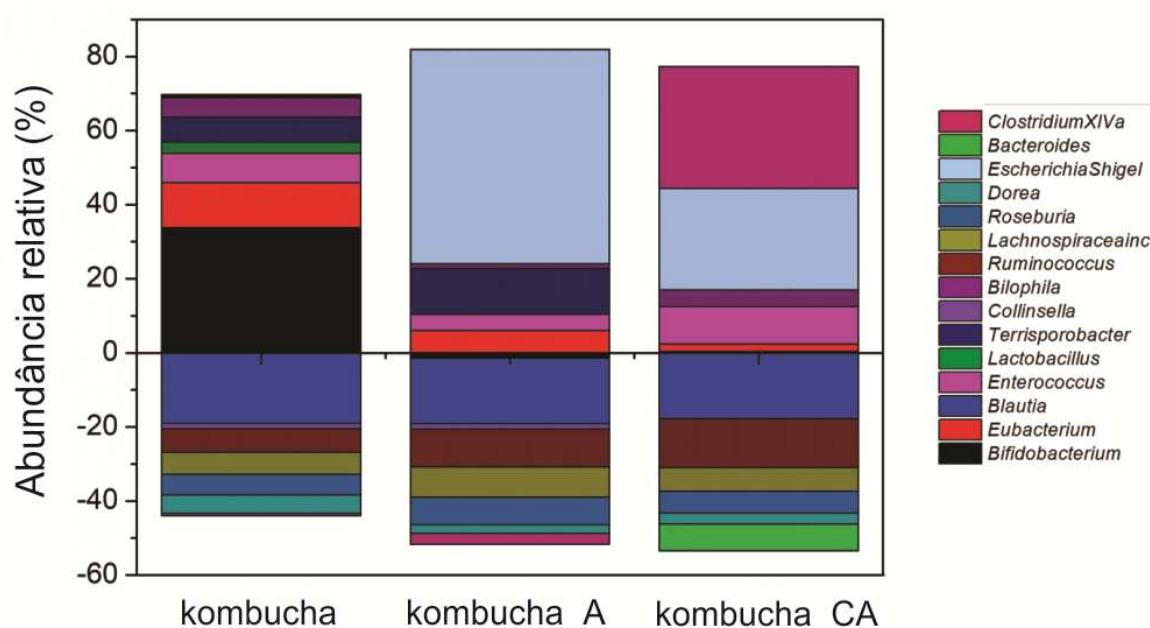
Assim, os resultados obtidos evidenciaram que os polifenóis presentes na kombucha sem adição de açúcar foram hidrolisados, transformando-se em metabólitos fenólicos capazes de influenciar positivamente a composição do microbioma intestinal. As baixas concentrações de açúcares também influenciaram na formação dos SCFAs.

A Figura 17 revela a mudança na abundância relativa da microbiota em nível de gênero. Houve redução na abundância relativa dos gêneros *Blautia*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceainc*, *Roseburia* e *Dorea* para todas as bebidas. O gênero *Blautia* tem sido associado negativamente a várias condições de saúde humana, incluindo, acúmulo de gordura visceral, obesidade, diabetes tipo 2 e câncer colorretal (Fukuoka *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2021). Dentre esses gêneros apenas as espécies *Ruminococcus bromi* e *Lachnospiraceae incertae sedis* e *Eubacterium hali* foram considerados significativo (Figura 17), tendo maior abundância relativa nas amostras kombucha_CA e kombucha respectivamente. Porém os valores da abundância relativa dessas espécies não ultrapassaram 1%. Embora os membros de *Lachnospiraceae* e *Ruminococcus* também participem do metabolismo de produção de SFCA, alguns táxons desses microrganismos também estão associados a diferentes doenças intestinais (Vacca *et al.*, 2020).

Os Gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* tiveram aumento de 33,85%, 12,10%, 7,93% e 2,97% respectivamente na fermentação fecal na presença de kombucha. Para kombucha_A e kombucha_CA o maior incremento é observado nos gêneros *Escherichia Shigella* (57,85%) e *Clostridium XIVa* (32,79%). A presença da *Escherichia shigella* em kombucha_A está fortemente ligada a maus hábitos alimentares e doenças metabólicas dos doadores das amostras fecais (Ye *et al.*, 2024). Quanto ao *Clostridium XIVa*,

este é considerado um probiótico de próxima geração. Uma das características dos probióticos de próxima geração é a produção do butirato e um mecanismo de proteção denominado barreira de colonização que depende da competição microbiana. Dentro dos principais produtores no intestino humano *Ruminococcus bromii*, espécies *Clostridium*, *Bacteroides*, *Roseburia* e *Eubacterium* se destacam (Torp, 2022; Hage; Hernandez-Sanabria; Wiele, 2017).

Figura 17 – Abundância relativa (%) da microbiota intestinal após fermentação fecal a nível taxonômico de gênero



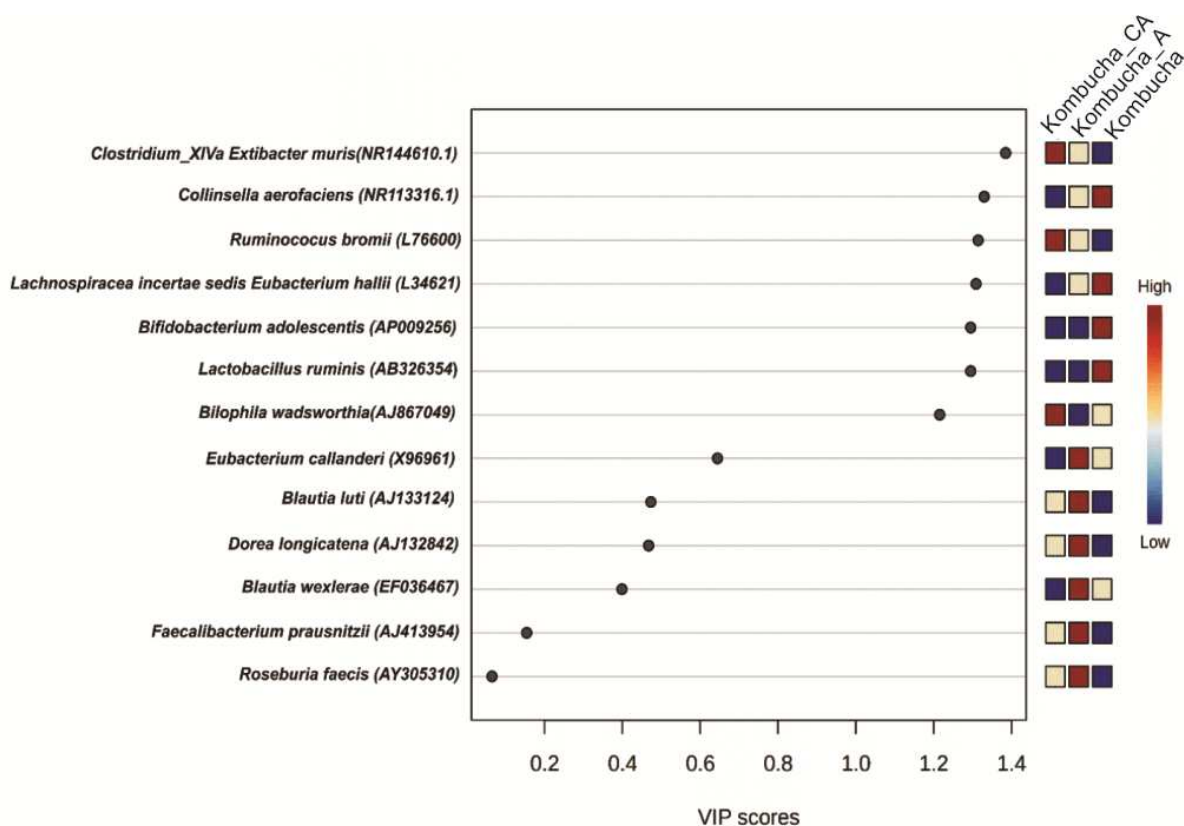
Nota 1: Valores apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Nota 2: Valores positivos indicam aumento e valores negativos redução.

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 18 mostra as espécies mais abundantes nas amostras com pontuações de projeção de importância variável (VIP) do PLS-DA. Metabólitos com VIP alto são mais importantes no fornecimento de separação de classe, enquanto aqueles com VIP pequeno fornecem menos contribuição partir das análises de PLS-DA. As variáveis foram consideradas importantes a partir de altos coeficientes de regressão e a altas cargas fatoriais (Andersen; Bro, 2010). Valores superiores a 1 foram considerados significativos na projeção (Akarachantachote; Chadcham; Saithanu, 2014).

Figura 18 – Escores do gráfico VIP com as espécies da microbiota fecal após 48h de fermentação



Nota 1: As caixas coloridas à direita indicam as abundâncias relativas da espécie correspondente. Vermelho ou azul à direita da figura indicaram a concentração baixa ou alta das espécies.

Nota 2: Valores apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

As espécies observadas com maior abundância na amostra kombucha foram *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus ruminis* e *Collinsella aerofaciens*. Bag et al. (2017) afirma que *Collinsella* e *Bifidobacterium* podem modificar os ácidos biliares para modular a virulência e patógenos entéricos.

A bactéria *Bifidobacterium adolescentis* estava presente no inóculo fecal de todas as amostras, porém, após a fermentação na presença das bebidas contendo açúcar houve redução e aumento da abundância relativa na bebida sem açúcar. Esta espécie é uma das espécies mais abundantes no intestino grosso humano e sua abundância pode ser afetada por dietas ricas em carboidratos de baixo peso molecular. A absorção dos nutrientes alimentares ocorre em porções distintas do sistema digestório, favorecendo gêneros diferentes de microrganismos. Os açúcares simples são absorvidos na porção do intestino delgado pelos microrganismos dos quais alguns podem ser patogênicos. Com isso, esses microrganismos seriam favorecidos em relação a microbiota presente no colón descendente. Nesse sentido

composto não digeríveis no trato gastrointestinal superior como os probióticos estimulam o aumento na abundância de *B. adolescentes* (Di Rienzi; Britton, 2020; Gonczi; Bessissow; Lakatos, 2019; Leite *et al.*, 2023).

Mokhtari *et al.* (2024), relataram associação negativa entre o consumo de açúcar livre e açúcar adicionado aos 6 meses de idade com microrganismos do gênero *Bifidobacterium*. A utilização de diferentes tipos de açúcares e compostos irá influenciar a microbiota intestinal, ou seja, um determinado microrganismo irá prosperar no ambiente que satisfaz as suas necessidades nutricionais e ambientais (Di Rienzi; Britton, 2020)

Outro fator importante na modulação da microbiota intestinal é a alimentação cruzada entre os microrganismos, esta pode influenciar as vias metabólicas e contribuir para a sua estabilidade e produtividade. Os SFCAs produzidos por uma determinada espécie, são consumidos por outra espécie de microrganismo, assim, esse processo torna-se crucial para o aumento da abundância de espécies benéficas ao homem (Belenguer *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2018). Leser e Baker (2023) relata que o comensalismo entre *B. adolescentis* e *Eubacterium hallii* podem favorecer o aumento de compostos como butirato, através da degradação de hidratos de carbono complexos produzindo acetato e lactato e subsequentemente a produção de butirato.

A fermentação colônica na presença das amostras kombucha apresentou índice prebiótico positivo ($45,13 \pm 0,56$), enquanto as amostras kombucha_A e kombucha_CA apresentaram índice prebiótico negativo ($-9,59 \pm 0,20$ e $-50,05 \pm 0,32$). O índice prebiótico (IP) é utilizado para avaliar a relação positiva ou negativa entre os crescimentos de bactéria benéfica (Bifidobactérias e/ou Lactobacilos) e bactérias patogênicas (*Clostridium/Enterobacter* e *Bacteroides*) (Owolabi *et al.*, 2020; Vardakou *et al.*, 2008).

Entre as bebidas apenas kombucha foi capaz de promover uma modulação benéfica da microbiota intestinal. De fato, as maiores abundancias de bifidobactérias e lactobacilos são observadas nesta amostra (Figura 17). Esse resultado pode estar relacionado às diferenças na composição e estrutura dos nutrientes disponíveis como substratos para os microrganismos presentes no inóculo fecal. Contudo, o conteúdo prebiótico além de estimular o crescimento de microrganismos que tragam algum benefício, este deve ser capaz também de inibir o crescimento de espécies microbianas prejudiciais à saúde. Portanto, é importante que essas bactérias promotoras da saúde estejam presentes em número suficiente para competição com microrganismos patogênicos e possam promover os benefícios esperados (Lordan *et al.*, 2020; Massa *et al.*, 2022).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a possibilidade do desenvolvimento de uma bebida com a redução de açúcar e até mesmo a eliminação deste. Tendo em vista o uso dos compostos fenólicos pelo consórcio de microrganismos (SCOBY), a retirada desse insumo pode ser uma alternativa interessante para produção de uma bebida que pode ser consumida por pessoas com restrição de açúcar.

O uso do resíduo como forma de saborização também é uma boa opção para agregar sabor e qualidade nutricional as bebidas. O tempo de fermentação total de 9 dias também foi suficiente para produção de kombuchas com concentrações de compostos adequados para conferir uma bebida suave, gaseificada e com redução de compostos indesejáveis como o etanol.

As bebidas se mantiveram estáveis durante o período de avaliação de 30 dias. A concentração de etanol não aumentou e os compostos de interesse não tiveram reduções significativas ao ponto de comprometer a qualidade das bebidas.

As kombuchas foram capazes de modificar a microbiota intestinal nativa. As bebidas contendo açúcar favoreceram gêneros de microrganismos diferentes daqueles fermentados com a bebida sem açúcar. Como foi o caso das *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e o aumento dos ácidos graxos de cadeia curta como o butirato e propionato.

Os resultados obtidos fortalecem as alegações sobre a kombucha ser considerada uma bebida prebiótica. O uso dos compostos fenólicos e produção de ácidos orgânicos como butirato e propionato por gêneros microbianos ligados a promoção a saúde do hospedeiro torna esses compostos análogos aos prebióticos já conhecidos.

REFERÊNCIAS

- AIELLO, A. *et al.* Production of butyric acid by different strains of *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*). **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 140, 2023.
- AKARACHANTACHOTE, N.; CHADCHAM, S.; SAITHANU, K. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, [s.l.], v. 94, n. 3, p. 307–322, 2014.
- AKBARIRAD, H. *et al.* Employing of the Different Fruit Juices Substrates in Vinegar Kombucha Preparation. **Current Nutrition & Food Science**, [s.l.], v. 13, n. 4, 2017.
- ALMEIDA, F. D. L. *et al.* Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s.l.], v. 32, p. 127–135, 2015.
- ALOULOU, A. *et al.* Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-9, 2012.
- ALVES-SANTOS, A. M. *et al.* Prebiotic effect of dietary polyphenols: a systematic review. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 74, p. 104169, 2020.
- AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 659–665, 2018.
- ANDERSEN, C. M.; BRO, R. Variable selection in regression—a tutorial. **Journal Of Chemometrics**, [s.l.], v. 24, n. 11-12, p. 728-737, 2010.
- ANDRESON, M. *et al.* Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 373, 2022.
- ARIKAN, M. *et al.* Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 85, n. 2, p. 455–464, 2020.
- ARUMUGAM, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, [s.l.], v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.
- BAG, S.; GHOSH, T. S.; DAS, B. Complete genome sequence of *Collinsella aerofaciens* isolated from the gut of a healthy Indian subject. **Genome Announcements**, [s.l.], v. 5, n. 47, 2017.
- BARBOSA, E. L. *et al.* Kombucha fermentation in blueberry (*Vaccinium myrtillus*) beverage and its in vivo gastroprotective effect: Preliminary study. **Future Foods**, [s.l.], v. 5, 2022.
- BARKA, E. Ait *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

BARROS, V. C.; BOTELHO, V. A.; CHISTÉ, R. C. Iternative Substrates for the Development of Fermented Beverages Analogous to Kombucha: an integrative review. **Foods**, [s.l.], v. 13, n. 11, p. 1768, 2024.

BATISTA, P. *et al.* Kombucha: perceptions and future prospects. **Foods**, [s.l.], v. 11, n. 13, p. 1977, 2022.

BELENGUER, A. *et al.* Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 72, n. 5, p. 3593-3599, 2006.

BISWAS, R. *et al.* Microwave and ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from Papaya: A sustainable green process. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 101, 2023.

BOGDAN, M. *et al.* Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, [s.l.], v. 23, n. 3, 2018.

BOND, T.; DERBYSHIRE, E. Tea compounds and the gut microbiome: Findings from trials and mechanistic studies. **Nutrients**, [s.l.], v. 11, n. 10, 2019.

BORTOLOMEDI, B. M.; PAGLARINI, C. S.; BROD, F. C. A. Bioactive compounds in kombucha: a review of substrate effect and fermentation conditions. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 385, p. 132719, 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019. **Diário oficial da união**, [s.l.], 2019. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/09/2019&jornal=515&pagina=13&totalArquivos=76>. Acesso em: 20 ago. 2024.

BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

CAI, D. *et al.* A comprehensive review on innovative and advanced stabilization approaches of anthocyanin by modifying structure and controlling environmental factors. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 366, 2022.

CANTU-JUNGLES, T. M.; HAMAKER, B. R. Tuning Expectations to Reality: Don't expect increased gut microbiota diversity with dietary fiber. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 153, n. 11, p. 3156-3163, 2023.

CAO, Q. Q. *et al.* Effects of brewing water on the sensory attributes and physicochemical properties of tea infusions. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 364, 2021.

CARVALHO, N. M. *et al.* Preservation of Human Gut Microbiota Inoculums for In Vitro Fermentations Studies. **Fermentation**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 14, 2021.

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

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the Number of Species in a Stochastic Abundance Model. **Biometrics**, [s.l.], v. 58, n. 3, p. 531-539, 2002.

COELHO, R. M. D. *et al.* Kombucha: review. **International Journal of Gastronomy And Food Science**, [s.l.], v. 22, p. 100272, 2020.

COPPOLA, S. *et al.* Therapeutic Effects of Butyrate on Pediatric Obesity: A Randomized Clinical Trial. **JAMA network open**, [s.l.], v. 5, n. 12, p. e2244912, 2022.

DARTORA, B. *et al.* Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, [s.l.], p. 113569, 2023.

DAS, A. J.; KUMAR, R. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. **Environmental Technology and Innovation**, [s.l.], v. 16, 2019.

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

DE OLIVEIRA, P. V. *et al.* Kombucha benefits, risks and regulatory frameworks: a review. **Food Chemistry Advances**, [s.l.], v. 2, p. 100288, 2023.

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 49, p. 115-119, 2018.

DEĞİRMENCIOĞLU, N. *et al.* Impact of tea leaves types on antioxidant properties and bioaccessibility of kombucha. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 58, n. 6, p. 2304–2312, 2021.

DEPAULA, J.; FARAH, A. Caffeine Consumption through Coffee: content in the beverage, metabolism, health benefits and risks. **Beverages**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 37, 2019.

DI RIENZI, S. C.; BRITTON, R. A. Adaptation of the Gut Microbiota to Modern Dietary Sugars and Sweeteners. **Advances In Nutrition**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 616-629, 2020.

DIEZ-OZAETA, I.; ASTIAZARAN, O. J. Recent advances in Kombucha tea: microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 377, p. 109783, 2022.

EBRAHIMI PURE, A.; PURE, E. Antioxidant and Antibacterial Activity of Kombucha Beverages Prepared using Banana Peel, Common Nettle and Black Tea Infusions. **Applied Food Biotechnology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 125-130, 2016.

EMILJANOWICZ, K. E.; MALINOWSKA-PAŃCZYK, E. Kombucha from alternative raw materials – The review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 60, n. 19, p. 3185-3194, 2019.

FENG, W. *et al.* Gut Microbiota, Short-Chain Fatty Acids, and Herbal Medicines. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 9, p. 1-12, 2018.

FERNANDO DOS SANTOS, D. *et al.* Honey-kombucha beverage with yerba maté infusion: Development, polyphenols profile, and sensory acceptance. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [s.l.], v. 36, 2024.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

FONTELES, T. V. *et al.* Metabolic responses of kombucha consortium fermentation upon ultrasound-processing. **Food Chemistry Advances**, [s.l.], v. 4, 2024.

FUKUOKA, H. *et al.* Complete genome sequence of *Blautia luti* JCM 17040T. **Microbiology Resource Announcements**, [s.l.], v. 12, n. 9, p. 1-3, 2023.

GAO, F. *et al.* Preliminary characterization of chemical and sensory attributes for grapes and wines of different cultivars from the Weibei Plateau region in China. **Food Chemistry: X**, [s.l.], v. 21, 2024.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (isapp) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GONCZI, L.; BESSISSOW, T.; LAKATOS, P. Ver(s)ifying the Efficacy of Vedolizumab Therapy on Mucosal Healing in Patients With Crohn's Disease. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 157, n. 4, p. 925-927, out. 2019.

GUNATHILAKE, K. D. P. P.; RANAWEERA, K. K. D. S.; RUPASINGHE, H. P. V. Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 245, p. 371–379, 2018.

HAGE, R.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; WIELE, T. Emerging Trends in “Smart Probiotics”: functional consideration for the development of novel health and industrial applications. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 1-11, 2017.

HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 172-184, 2017.

HRNJEZ, D. *et al.* The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 10, p. 336–345, 2014.

- IÇEN, H. *et al.* Microbiology and antimicrobial effects of kombucha, a short overview. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 56, p. 103270, 2023.
- IVANIŠOVÁ, E. *et al.* The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 57, n. 5, p. 1840–1846, 2020.
- JAKUBCZYK, K. *et al.* Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. **Antioxidants**, [s.l.], v. 9, n. 5, 2020.
- JAYABALAN, R. *et al.* A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014.
- JÚNIOR, J. C. da S. *et al.* Kombucha: formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities.. **Current Research In Food Science**, [s.l.], v. 5, p. 360-365, 2022.
- KABAK, B.; DOBSON, A. D. W. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 51, n. 3, p. 248–260, 2011.
- KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. **Microorganisms**, [s.l.], v. 7, n. 12, 2019.
- KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, [s.l.], v. 30, p. 66–70, 2019.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.
- KUMAR, S.; KUMAR, A. Microbial pathogenesis in inflammatory bowel diseases. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 163, p. 105383, 2022.
- KURIA, M. W.; MATOFARI, J. W.; NDUKO, J. M. Physicochemical, antioxidant, and sensory properties of functional mango (*Mangifera indica* L.) leather fermented by lactic acid bacteria. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s.l.], v. 6, 2021.
- LA TORRE, C. *et al.* Effects of long-term storage on radical scavenging properties and phenolic content of kombucha from black tea. **Molecules**, [s.l.], v. 26, n. 18, 2021.
- LEAL, J. M. *et al.* A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.
- LEITE, A. K. F. *et al.* Impact of orange juice containing potentially prebiotic ingredients on human gut microbiota composition and its metabolites. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 405, 2023.
- LEITE CAVALCANTI, B. *et al.* Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (OBrix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de Frutas Industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 57-64, 2006.

LEÓN, E. A. V. *et al.* Phytochemical content and antioxidant activity of extruded products made from yellow corn supplemented with apple pomace powder. **Food Science and Technology (Brazil)**, [s.l.], v. 42, 2022.

LEONARSKI, E. *et al.* Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. **LWT**, [s.l.], v. 135, 2021.

LEONARSKI, E. *et al.* Production process and characteristics of kombucha fermented from alternative raw materials. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 49, p. 101841, 2022.

LESER, T.; BAKER, A. Bifidobacterium adolescentis – a beneficial microbe. **Beneficial Microbes**, [s.l.], v. 14, n. 6, p. 525-551, 2023.

LIMA, M. S. C. S.; SOUZA, C. A. S.; PEDERASSI, J. Qual Índice de Diversidade Usar? **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, n. 30, p. 129-138, 2016.

LING, Z. *et al.* Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 8, p. 2546–2554, 2014.

LIU, Z. *et al.* Green and Black Tea Phenolics: Bioavailability, Transformation by Colonic Microbiota, and Modulation of Colonic Microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 66, n. 32, p. 8469–8477, 2018.

LIU, X. *et al.* The effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion on phenolic bioaccessibility and bioactivities of Prinsepia utilis Royle fruits. **LWT**, [s.l.], v. 138, 2021.

LIU, Z.; VINCKEN, J. P.; DE BRUIJN, W. J. C. Tea phenolics as prebiotics. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 127, p. 156-168, 2022.

LOBO, R. O.; DIAS, F. O.; SHENOY, C. K. Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. **International Food Research Journal**. [S. l.: s. n.], 2017.

LONGEVITY, O. M. A. C. Retracted: theaflavin chemistry and its health benefits. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2024, p. 1-1, 2024.

LORDAN, C. *et al.* Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components. **Gut Microbes**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-20, 2020.

LOU, X. *et al.* Phenolic profiles and antioxidant activity of Crataegus pinnatifida fruit infusion and decoction and influence of in vitro gastrointestinal digestion on their digestive recovery. **LWT**, [s.l.], v. 135, 2021.

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 557-578, 2008.

- MACAGNAN, F. T. *et al.* Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1–6, 2015.
- MALBAŠA, R. *et al.* Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 108, n. 3, p. 926–932, 2008.
- MANDHA, J. *et al.* Effect of Lactic Acid Fermentation on Volatile Compounds and Sensory Characteristics of Mango (*Mangifera indica*) Juices. **Foods**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 383, 2022.
- MARCO, M. L. *et al.* Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 44, p. 94-102, 2017.
- MARSH, A. J. *et al.* Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 38, p. 171–178, 2014.
- MARTINS, R. P. *et al.* Solubilization of hemicellulose and fermentable sugars from bagasse, stalks, and leaves of sweet sorghum. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 170, 2021.
- MASSA, N. M. L. *et al.* In vitro colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 388, 2022.
- MEILGAARD, Morten C.; CIVILLE, Gail Vance; CARR, B. Thomas. **Sensory Evaluation Techniques**. 3. ed. Boca Raton: Crc Press, 1999.
- MELINI, F. *et al.* Health-Promoting Components in Fermented Foods: an up-to-date systematic review. **Nutrients**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 1189, 2019.
- MICHEAL, A.; MOUSSA, R. R. Investigating the Economic and Environmental Effect of Integrating Sugarcane Bagasse (SCB) Fibers in Cement Bricks. **Ain Shams Engineering Journal**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 3297–3303, 2021.
- MIGLIORANZA, M. V. *et al.* Innovative applications based on agro-industrial residues of pitahaya for improving antioxidant and biological performance in Kombuchas. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 61, 2024.
- MIRANDA, J. F. *et al.* Kombucha: a review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal Of Food Science**, [s.l.], v. 87, n. 2, p. 503-527, 2022.
- MITHUL ARAVIND, S. *et al.* Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. **Food Research International**, [s.l.], v. 142, p. 110189, 2021.
- MIZUTA, A. G. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. **LWT**, [s.l.], v. 130, 2020.
- MOHD ARIFF, R. *et al.* Recent trends in Kombucha: conventional and alternative fermentation in development of novel beverage. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 53, p. 102714, 2023.

- MOKHTARI, P. *et al.* Associations between Dietary Sugar and Fiber with Infant Gut Microbiome Colonization at 6 Mo of Age. **Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 154, n. 1, p. 152–162, 2024.
- MOORTHY, M. *et al.* Prebiotic potential of polyphenols, its effect on gut microbiota and anthropometric/clinical markers: a systematic review of randomised controlled trials. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 99, p. 634-649, 2020.
- MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: the need of clinical evidence. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 105, p. 323-333, 2020.
- MORALES, D. *et al.* Novel kombucha beverages with antioxidant activity based on fruits as alternative substrates. **LWT**, [s.l.], v. 189, 2023.
- NDOYE, B. *et al.* Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 916–923, 2006.
- 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**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 601–607, 2017.
- NGUYEN, N. K.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Effects of lactobacillus casei and alterations in fermentation conditions on biosynthesis of glucuronic acid by a dekkera bruxellensis-gluconacetobacter intermedius kombucha symbiosis model system. **Food Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 356–370, 2015.
- NOBLE, E. E. *et al.* Early-life sugar consumption affects the rat microbiome independently of obesity. **Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 147, n. 1, p. 20–28, 2017.
- NURERK, P.; JUNDEN, S. Product development based sensory evaluation and physicochemical characterization of cashew apple bagasse jam and technology transfer to community. **Trends in Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 22, 2021.
- OWOLABI, I. O. *et al.* Gut microbiota metabolism of functional carbohydrates and phenolic compounds from soaked and germinated purple rice. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 66, p. 103787, 2020.
- OYEWOLE, O. A. *et al.* Microbial conversion of agro-wastes for lactic acid production. **Scientific African**, [s.l.], v. 22, 2023.
- PAIXÃO, L. M. N. *et al.* Cold Plasma Effects on Functional Compounds of Siriguela Juice. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 110–121, 2019.
- PALMNÄS-BÉDARD, M. S. *et al.* The human gut microbiota and glucose metabolism: a scoping review of key bacteria and the potential role of scfas. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 116, n. 4, p. 862-874, 2022.

- PANT, K. *et al.* The Role of Gut Microbiome-Derived Short-Chain Fatty Acid Butyrate in Hepatobiliary Diseases. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 193, n. 10, p. 1455-1467, 2023.
- PEI, J. *et al.* Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. **Food Control**, [s.l.], v. 110, 2020.
- PHUNG, L. T. *et al.* Changes in the chemical compositions and biological properties of kombucha beverages made from black teas and pineapple peels and cores. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 7859, 2023.
- PIYASENA, K. G. N. P. , *et al.* Evaluation of inherent fructose, glucose and sucrose concentrations in tea leaves (*Camellia sinensis* L.) and in black tea. **Applied Food Research**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 100100, 2022.
- PORTO, E. *et al.* Ozone and plasma processing effect on green coconut water. **Food Research International**, [s.l.], v. 131, 2020.
- QUADROS, L. Ascorbic Acid and Performance: A Review. **Vitamins & Minerals**, [s.l.], v. 05, n. 01, 2016.
- ROBERFROID, M. *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 104, n. 2, p. 1-63, 2010.
- RODRIQUEZ-SAAVEDRA, M. *et al.* Simulated gastrointestinal digestion of beer using the simgi model. Investigation of colonic phenolic metabolism and impact on human gut microbiota. **Food Research International**, [s.l.], v. 173, p. 113228, 2023.
- RUFINO, M. do S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- SARKAYA, P.; AKAN, E.; KINIK, O. Use of kombucha culture in the production of fermented dairy beverages. **LWT**, [s.l.], v. 137, 2021.
- SHAH, V. *et al.* Composition Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. **Journal of Diabetes and Obesity**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 108–114, 2015.
- SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948.
- SHARMA, P. *et al.* Valorization of cashew nut processing residues for industrial applications. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 152, 2020.
- SHARPE, E. *et al.* Effects of brewing conditions on the antioxidant capacity of twenty-four commercial green tea varieties. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 192, p. 380–387, 2016.
- SHI, S. *et al.* Microbial metabolic transformation and antioxidant activity evaluation of polyphenols in kombucha. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 51, 2023.

SHON, W. J. *et al.* Sugar-sweetened beverages exacerbate high-fat diet-induced inflammatory bowel disease by altering the gut microbiome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 113, 2023.

SILVA, K. A. *et al.* Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 34, 2021.

SILVA JÚNIOR, J. C. da *et al.* Traditional and flavored kombuchas with pitanga and umbu-cajá pulps: Chemical properties, antioxidants, and bioactive compounds. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 44, 2021.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, [s.l.], v. 163, p. 688, 1949.

SU, J. *et al.* Research progress on alternative kombucha substrate transformation and the resulting active components. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 14, p. 1-17, 2023.

SORI, N. *et al.* In vitro fermentation of kodo and kutki millets by human gut microbiota: gut microbiota and metabolomic analysis. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 56, p. 103343, 2023.

SWAIN, S. *et al.* Bio-accessibility of phenols, flavonoid and antioxidant capacity of tropical leafy vegetables through in-vitro gastro-intestinal digestion. **Food Bioscience**, [s.l.], p. 104491, 2024.

SZLISZKA, E. *et al.* Ethanolic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis- Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. **Molecules**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 738–754, 2009.

THIYONILA, B. *et al.* Characterization of Apple Juice Clarified by Tannase from *Serratia marcescens* IMBL5 Produced using Agro-industrial Waste Materials. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 514–525, 2022.

TIMMERMANS, E. *et al.* Knowledge of fermentation dynamics allows for reducing sugar levels in yeast-leavened pastry. **Journal of Cereal Science**, [s.l.], v. 109, 2023.

TORP, M. **Application of microcontainers for delivery of probiotics and antibiotics to the gut environment**. [S. l.: s. n.], 2022.

TRAN, T. *et al.* Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 2050–2070, 2020.

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

UNUSAN, N. Essential oils and microbiota: implications for diet and weight control. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 104, p. 60-71, 2020.

VACCA, M. *et al.* The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. **Microorganisms**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 573, 2020.

VARDAKOU, M. *et al.* Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 123, n. 1–2, p. 166–170, 2008.

VARGAS, B. K.; FABRICIO, M. F.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: a bibliometric and systematic review. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 44, p. 101332, 2021.

VÁZQUEZ-CABRAL, B. D. *et al.* Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l.], v. 272, p. 1–9, 2017.

VILLARREAL-SOTO, S. A. *et al.* Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 83, p. 44–54, 2019.

VISAKH, N. U. *et al.* Chemical characterisation, insecticidal and antioxidant activities of essential oils from four Citrus spp. fruit peel waste. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 50, 2022.

WANG, X. *et al.* Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Kombucha Tea by the Pure Cultured Kombucha. **LWT**, [s.l.], v. 168, 2022.

WATAWANA, M. I. *et al.* Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 41, n. 1, 2017.

WATAWANA, M. I. *et al.* Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 2015, p. 1-11, 2015.

WILDING, J. P. H. *et al.* Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 384, n. 11, p. 989–1002, 2021.

XIA, X. *et al.* Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 62, 2019.

XIAO, T. *et al.* Butyrate functions in concert with myeloid-derived suppressor cells recruited by CCR9 to alleviate DSS-induced murine colitis. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 99, 2021.

XIE, Y. *et al.* Active biodegradable films based on the whole potato peel incorporated with bacterial cellulose and curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 150, p. 480–491, 2020.

XU, L. *et al.* UHPLC analysis of major functional components in six types of Chinese teas: Constituent profile and origin consideration. **LWT**, [s.l.], v. 102, p. 52–57, 2019.

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. e09173, 2022.

YASSUNAKA HATA, N. N. *et al.* Role of Acetic Acid Bacteria in Food and Beverages. **Food Technology and Biotechnology**, [s.l.], v. 61, n. 1, 2022.

YE, Y. *et al.* Antibiotic altered liver damage induced by aflatoxin B1 exposure in mice by modulating the gut microbiota. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 343, p. 123291, 2024.

YODA, Y. *et al.* Different susceptibilities of Staphylococcus and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 55–58, 2004.

YULIANA, N. *et al.* Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. **Applied Food Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, 2023.

ZHANG, B. *et al.* Health benefits of dietary polyphenols: insight into interindividual variability in absorption and metabolism. **Current Opinion In Food Science**, [s.l.], v. 48, p. 100941, 2022.

ZHOU, D. D. *et al.* Fermentation with Tea Residues Enhances Antioxidant Activities and Polyphenol Contents in Kombucha Beverages. **Antioxidants**, [s.l.], v. 11, n. 1, 2022.

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**, [s.l.], v. 13, p. 198–203, 2018.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado como participante da pesquisa intitulada “Kombucha saborizada com resíduos agroindustriais: influência do açúcar na fermentação e na microbiota intestinal.”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

A presente pesquisa envolve o uso de fezes humanas para o estudo dos efeitos de diferentes processamentos e nutrientes na composição da microbiota intestinal. O participante será convidado a realizar a coleta das fezes de forma higiênica em local reservado e em recipiente apropriado para a coleta desse tipo de material. O material coletado será utilizado em ensaios de fermentação e em seguida as amostras serão submetidas a identificação dos micro-organismos presentes através de métodos adequados.

Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados e/ou material coletado somente para esta pesquisa.

Os doadores não receberão NENHUM PAGAMENTO POR PARTICIPAR DA PESQUISA.

A qualquer momento o participante poderá recusar a continuar participando da pesquisa e poderá retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo.

As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Endereço da responsável pela pesquisa:

Nome: Sueli Rodrigues

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Av. Mister Hull, s/n, Campus do Pici, Bloco 851,

Dept. de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Biotecnologia

Telefones para contato: 85 33669656

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00- 12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa:

Data Assinatura

Nome do pesquisador: Sueli Rodrigues

Data Assinatura

Nome do aplicador do TCLE: Thatyane Vidal Fonteles

Data Assinatura