



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
COLEGIADO DE NUTRIÇÃO



CAMILA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA KOMBUCHA RELACIONADO A
MICRORGANISMOS PATÓGENOS ENCONTRADOS EM ALIMENTOS**

**Ouro Preto
2023**

CAMILA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA KOMBUCHA RELACIONADO A
MICRORGANISMOS PATÓGENOS ENCONTRADOS EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso
de Nutrição da Universidade Federal
de Ouro Preto, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Bacharel em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Tereza de Freitas

**Ouro Preto
2023**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila de Oliveira

Potencial antimicrobiano da kombucha relacionado a microrganismos patogênicos encontrados em alimentos

Monografia apresentada ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Nutricionista

Aprovada em 31 de março de 2023.

Membros da banca

Profa Dra. Maria Tereza de Freitas - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa Dra. Camila Carvalho Menezes Salierno - Membro da Banca Examinadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa Dra. Natália Caldeira de Carvalho - Membro da Banca Examinadora - Universidade Federal de Ouro Preto

Maria Tereza de Freitas, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 31/07/2023



Documento assinado eletronicamente por **Maria Tereza de Freitas, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/08/2023, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0565074** e o código CRC **06A3FE9A**.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o final de um curso e da vivência a qual faço parte, uma mescla de realidade e sonho. Agradeço a Deus por me conduzir pelo caminho da vida, com perseverança e fé de que colhemos o que semeamos. Aos meus pais e irmã, Laurineide, Marco Antônio e Isabelle, por todo suporte e confiança para chegar até aqui, vocês são tudo para mim. Agradeço também àqueles que tenho orgulho em dizer que tudo que sou, é porque nós somos: Vó Carmozina, Vô José Barboza (*in memoriam*), Vó Izaldina, Vô José Ancelmo (*in memoriam*), Tia Adriana, Tia Andréia e André.

À professora Maria Tereza, que dentre tantas participações em minha vida nos últimos anos, fez jus à palavra “orientadora” e me norteou excepcionalmente do início ao fim. Sou grata por todo aprendizado e sintonia.

À República Quarto Crescente, lar de mulheres fortes, onde fui acolhida, vivi e amadureci desde que cheguei nas bandas ouro-pretanas. É uma honra fazer parte desta egrégora e ser cercada por mulheres tão empoderadas.

À Camila Hume por em tempos tão difíceis de pandemia, ter sido a melhor companhia que o destino poderia me encarregar. Aos técnicos Andréia, Gabriela, Rafael e Gustavo pelo auxílio nos muitos dias de laboratório. À professora Camila Menezes pelo apoio no empréstimo de vidrarias. À professora Karina Queiroz pelas análises estatísticas. Ao Henrique Soares pelo apoio na formatação do trabalho.

Agradeço às professoras Camila Menezes e Natália Caldeira por terem aceitado participar da banca examinadora.

Aos amigos que contribuíram no curso e no caminhar deste trabalho de alguma forma: Gabriella, Kenai, Camila Cirilo, Izabella, Boçal, Spot, Miixo, Kafona, Alice e Chorró. As nutrimigas: Luana, Gabriela, Paula, Julia, Vanessa, Yara, Camila K., Camila S., Juliana B., Nicolly F., Larissa, Adanne e Midian.

Fisicamente, habitamos um espaço, mas, sentimentalmente, somos habitados por uma memória. O que a memória ama fica eterno. O passado não reconhece o seu lugar: está sempre presente.

Mario Quintana

RESUMO

A kombucha é uma bebida milenar, com efeito probiótico, popularmente associada a propriedades benéficas curativas e de bem-estar. É produzida por meio da fermentação do chá verde ou preto em simbiose com uma película celulósica flutuante que é composta de bactérias e leveduras. Por conter ácidos orgânicos, como o acético e catequinas em seu líquido, possui capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e negativas. Em virtude desta relação, este estudo pretendeu avaliar a ação antimicrobiana dos sobrenadantes da kombucha produzida de forma caseira e de uma marca de kombucha comercializada em Ouro Preto – MG, frente a microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. A atividade antimicrobiana foi verificada por meio da técnica de ensaio de difusão em ágar adaptada, método de difusão em disco e microdiluição. As cepas testadas pertencem ao banco de culturas do laboratório de microbiologia de alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 10536; *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 14458. Os testes realizados pelas duas primeiras técnicas não demonstraram nenhum grau de inibição frente aos microrganismos testados, mas a técnica de microdiluição utilizando o sobrenadante dos microrganismos isolados dos dois tipos de Kombucha apresentou resultados de inibição. Os sobrenadantes de leveduras foram capazes de inibir, em diferentes tempos, as bactérias *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e *B. cereus*, com melhores resultados para a kombucha comercial, já que a caseira não inibiu a *E. coli*. Os sobrenadantes das bactérias ácido lácticas tiveram um potencial antimicrobiano muito baixo com inibição em apenas um tempo da *E. coli* e *Salmonella* (sobrenadante da kombucha comercial) e inibição também em apenas um tempo, de *S. aureus* pelo sobrenadante da kombucha caseira. Embora tenha sido identificado um potencial antimicrobiano dos microrganismos isolados, sugere-se a continuidade das análises, visando a identificação completa dos isolados e dos compostos presentes nos sobrenadantes para melhor compreensão de seus mecanismos de inibição.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Bactérias. Fermentação. Leveduras. Probióticos.

ABSTRACT

Kombucha is an ancient drink, with a probiotic effect, popularly associated with beneficial healing and well-being properties. It is produced by fermenting green or black tea in symbiosis with a floating cellulosic film that is composed of bacteria and yeast. Because it contains organic acids, such as acetic acid and catechins in its liquid, it has the ability to inhibit the growth of Gram-positive and negative bacteria. Due to this relationship, this study aimed to evaluate the antimicrobial action of the supernatants of kombucha produced at home and of a brand of kombucha commercialized in Ouro Preto - MG, against pathogenic and food spoilage microorganisms. The antimicrobial activity was verified using the adapted agar diffusion test technique, disc diffusion method and microdilution. The strains tested belong to the culture bank of the food microbiology laboratory of the School of Nutrition at the Federal University of Ouro Preto. The strains of *Escherichia coli* ATCC 10536; *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Staphylococcus aureus* ATCC 14458. The tests carried out by the first two techniques did not demonstrate any degree of inhibition against the microorganisms tested, but the microdilution technique using the supernatant of the isolated microorganisms of the two types of Kombucha showed inhibition results. Yeast supernatants were able to inhibit, at different times, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* and *B. cereus* bacteria, with better results for commercial kombucha, since homemade kombucha did not inhibit *E. coli*. The lactic acid bacteria supernatants had a very low antimicrobial potential with only one time inhibition of *E. coli* and *Salmonella* (commercial kombucha supernatant) and also only one time inhibition of *S. aureus* by the homemade kombucha supernatant. Although an antimicrobial potential of the isolated microorganisms has been identified, it is suggested that the analyzes continue, aiming at the complete identification of the isolates and the compounds present in the supernatants for a better understanding of their inhibition mechanisms.

Keywords: Antimicrobials. Bacteria. Fermentation. Yeasts. Probiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras de SCOBY, doação nativa de Ouro Preto (A) e da empresa Fermentare® (B) ..	19
Figura 2 - Kombucha artesanal com 7 dias de fermentação.....	20
Figura 3 - Amostras de kombucha comercializada em Ouro Preto-MG.....	21
Figura 4 - Leitura das densidades ópticas por meio espectrofotômetro leitor de placas de microtitulação.....	25
Figura 5 - Exemplos de resultados do potencial antimicrobiano dos sobrenadantes de Kombucha caseira.....	26
Figura 6 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias lácticas.....	28
Figura 7 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias acéticas.....	29
Figura 8 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das leveduras.....	29
Figura 9 - Análise do crescimento da <i>E.coli</i> frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das kombuchas comercial e caseira.....	31
Figura 10 - Análise do crescimento da <i>Salmonella</i> frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das Kombuchas comercial e caseira.....	33
Figura 11 - Análise do crescimento da <i>S. aureus</i> frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das Kombuchas comercial e caseira.....	35
Figura 12 - Análise do crescimento do <i>B. cereus</i> frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das Kombuchas comercial e caseira.....	37
Figura 13 - Análise do crescimento da <i>E. coli</i> frente aos sobrenadantes das BAL isoladas das Kombuchas comercial e caseira.....	39
Figura 14 - Análise do crescimento da <i>Salmonella</i> frente aos sobrenadantes das BAL isoladas das Kombuchas comercial e caseira.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Composição química de kombuchas.....08

Quadro 2 - Código de microrganismos isolados utilizados para microdiluição.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536.....	30
Tabela 2 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.....	31
Tabela 3 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458.....	34
Tabela 4 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778.....	35
Tabela 5 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias ácido lácticas isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536.....	36
Tabela 6 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias ácido lácticas isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.....	38
Tabela 7 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias lácticas isoladas das Kombuchas caseira e comercial sobre o patógeno <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458.....	40
Tabela 8 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias lácticas isoladas das Kombuchas caseira e comercial sobre o patógeno <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABKOM - Associação Brasileira de Kombucha
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC - *American Type Culture Collection*
B1 - Tiamina
B12 - Cobalamina
B2 - Riboflavina
B6 - Piridoxina
BAA - Bactérias ácido acéticas
BAL - Bactérias ácido láctica
BDA - Ágar Batata Dextrose
BHI - Brain Heart Infusion
BOD - Biochemical Oxygen Demand
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos
EE - enterotoxinas estafilocócicas
ENUT – Escola de Nutrição
g - grama
IN - Instrução Normativa
ISO - *The International Organization Standardization*
KCA - Kombucha caseira
KCO - Kombucha comercial
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEP - Manitol Gema de Ovo Polimixina
MDO - Média das Densidade Ópticas
MG - Minas Gerais
MH - Ágar Müller-Hinton
MIC - concentração inibitória mínima
MRS - Man, rogosa e sharpe
CCM - Célula de combustível microbiana
p/v - Peso por volume
PH - Potencial Hidrogeniônico
PM - Peso Molecular
PIQ - Padrão de Identidade e Qualidade
RPM - Rotações por minuto
SBLIKCA - Sobrenadante de bactéria láctica isolada da Kombucha caseira
SBLIKCA - Sobrenadante de bactéria láctica isolada da Kombucha comercial
SCOBY - Cultura simbiótica de bactérias e leveduras
SLIKCA - Sobrenadante de levedura isolada da Kombucha caseira
SLIKCO - Sobrenadante de levedura isolada da Kombucha comercial
SOD - Superóxido dismutase
SUBSP. - Subespécie
UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto
YPD - *Yeast Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2.1	Kombucha.....	6
2.1.1	Composição química e microbiológica da kombucha PAREI AQUI	6
2.2	Padrão de Identidade e Qualidade.....	10
2.3	Kombucha e benefícios atribuídos ao seu consumo.....	10
2.4	Potencial antimicrobiano	13
2.5	Microrganismos patogênicos em alimentos	15
2.5.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Typhimurium	16
2.5.2	<i>Escherichia coli</i>	16
2.5.3	<i>Bacillus cereus</i>	17
2.5.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Geral	18
3.2	Específicos.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Amostras.....	19
4.2	Cepas alvo e condições de cultivo	21
4.3	Atividade antimicrobiana	21
4.3.1	Difusão em ágar adaptado	21
4.3.2	Método de difusão em disco.....	22
4.3.3	Método de microdiluição.....	22
4.4	Análise Estatística.....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Avaliação do efeito antimicrobiano dos sobrenadantes pelas técnicas de difusão em ágar e de difusão em discos.....	26
5.2	Resultados do teste de microdiluição em placas	27
5.2.1	Caracterização dos isolados	27
5.2.2	Método de microdiluição.....	29
6	CONCLUSÃO	43

1 INTRODUÇÃO

A Kombucha ou kombuchá é uma bebida probiótica de origem asiática, levemente alcoólica e efervescente, adocicada e fermentada. É tradicionalmente preparada a partir da infusão das folhas da planta *Camellia sinensis* (chá verde ou preto), adoçado e fermentado com a adição do SCOBY - *Symbiotic Colony Of Bacteria and Yeast* (SANTOS, 2016). O SCOBY é também conhecido como “Kombucha mãe”, “cogumelo manchuriano”, “fungo japonês” ou *Medusomyces gisevii* (KAPP; SUMNER, 2019). O registro mais antigo de consumo de Kombucha aponta o ano de 220 a.C, no nordeste da China, durante a dinastia Tsin (“Ling Chi”), por suas propriedades desintoxicantes e energizantes (JAYABALAN *et al.*, 2014; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

No Brasil, há o consumo da bebida tanto preparada de forma caseira como também de forma comercial. Assim, o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa (IN) nº 41, de 17 de setembro de 2019 que estabelece o padrão de identidade e qualidade da bebida que se aplica somente à kombucha submetida a processos industriais tecnologicamente adequados e destinada ao consumo humano como bebida (BRASIL, 2019).

O conjunto microbiano que a compõe não é exato, podendo variar pela fonte do inóculo usado e das condições de preparo e armazenamento. As bactérias predominantemente encontradas são as acéticas, principalmente dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, e também as lácticas, como *Lactobacillus* e *Lactococcus*. As leveduras principais pertencem aos gêneros: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera*/ *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorula* e *Mycoderma*. Geralmente, esses microrganismos apresentam características osmotolerantes, fermentativas e produtoras de ácido (SANTOS, 2016, CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

A comunidade microbiana do kombucha consiste em bactérias e leveduras que prosperam em dois compartimentos mutuamente não exclusivos, a parte líquida e o biofilme, formado de celulose bacteriana flutuando sobre ele, que é responsável pela fermentação (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016). Os principais componentes da fase líquida são o ácido acético, etanol e ácido glucônico. Outros constituintes menores, como ácido lático, ácido glucurônico, ácidos fenólicos, grupo vitamina B e enzimas também estão presentes (BATTIKH *et al.*, 2012).

Existem diferenças na composição e na atividade biológica do kombucha, devido à variedade e quantidade de folhas utilizadas, concentração e escolha do açúcar, tempo de fermentação e composição do SCOBY (JAYABALAN *et al.*, 2014). De acordo com Jayabalan *et al.* (2014) o procedimento padrão segue os passos descritos de forma resumida: (i) ferver 1 litro de água de torneira; (ii) durante a ebulição, acrescentar 50 g de sacarose; (iii) acrescentar 5 gramas de folhas de chá e removê-las por filtração após 5 minutos; (iv) despejar o líquido num recipiente esterilizado com água fervente; (v) esperar até que o líquido arrefeça à temperatura ambiente (20°C), (vi) acrescentar 24 g de SCOBY no recipiente; e (vii) cobri-lo com uma toalha de papel para protegê-lo contra os insetos.

À kombucha são atribuídos diferentes benefícios à saúde tais como atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (SUN; CHEN, 2015); ação probiótica (WATAWANA *et al.*, 2015); efeito hipoglicemiante (ZUBAIDAH *et al.*, 2018); potencial anticarcinogênico (WATAWANA *et al.*, 2015); potencial antibacteriano e antifúngico (BATTIKH; KAMEL, 2012). Sobre o papel como antimicrobiano, foi evidenciado por pesquisas a capacidade de inibição de crescimento de microrganismos como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Entamoeba cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Leuconostoc monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *Candida albicans* (SREERAMULU *et al.*, 2000; SANTOS, 2016).

Para impedir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos, várias técnicas de preservação, como tratamento térmico, salga, acidificação e secagem são aplicadas pela indústria de alimentos (DAVIDSON; TAYLOR, 2007). Nos últimos anos, por causa da maior conscientização e preocupação dos consumidores com a utilização de aditivos químicos em alimentos, houve um maior interesse por uso de antimicrobianos naturais. Para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis nos alimentos, os antimicrobianos podem ser adicionados diretamente à formulação do produto, revestir a superfície ou ser incorporado ao material de embalagem. A incorporação direta de agentes ativos resulta em uma redução imediata, em curto prazo, de populações bacterianas, enquanto os filmes antimicrobianos podem manter uma atividade por um longo período de tempo (HANUŠOVÁ *et al.*, 2009).

A capacidade da kombucha de inibir o crescimento de microrganismos patógenos é atribuída ao seu baixo pH, à presença de ácidos orgânicos, especialmente do ácido acético e catequinas, também conhecidos por inibir o crescimento de uma série de bactérias Gram-positivas e negativas, assim como outras substâncias que são produzidas durante sua fermentação, como o etanol (WATAWANA *et al.*, 2015). Battikh *et al.* (2012) demonstraram também que a atividade antimicrobiana alcançada pela kombucha não foi apenas em função da presença de ácido acético ou outros ácidos orgânicos. Outros componentes biologicamente ativos poderiam estar envolvidos na atividade observada como bacteriocinas, proteínas e enzimas além dos compostos fenólicos derivados do chá (BATTIKH *et al.*, 2012).

Diante do exposto, a análise da ação antimicrobiana de kombucha originária do preparo caseiro e de kombucha comercializada na cidade de Ouro Preto-MG, contra microrganismos patogênicos comumente encontrados em alimentos contribuirá para a ampliação do conhecimento sobre a bebida e servirá de subsídio para a aplicação na área alimentar, com a possibilidade de uso como um antimicrobiano natural.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Kombucha

A kombucha é uma bebida fermentada, gaseificada naturalmente, com sabor de chá, pouco adocicada e ácida. Este produto é resultante da fermentação de chá adocicado que pode ser preto ou verde. A fermentação é promovida por culturas simbióticas de bactérias e leveduras que recebe a denominação de SCOBY (PALUDO, 2017).

O SCOBY consiste em um biofilme flutuante sob o chá. Ele é composto de bactérias e leveduras que realizam atividades bioquímicas no decorrer do processo de fermentação com o chá, levando à produção de ácidos orgânicos, etanol, vitaminas hidrossolúveis e outros micronutrientes (JAYABALAN, 2016; SANTOS, 2018).

Historicamente, os primeiros indícios de consumo de kombucha foram documentados na China, Rússia e Alemanha. Há 200 aC, o consumo da bebida kombucha foi relatado no período da Dinastia Tsin na Manchúria, por conter supostas propriedades mágicas. Sua fama se estendeu e, devido às rotas de comércio, o consumo da kombucha foi difundido pela Rússia e Europa Oriental. Na Rússia, o chá era popularmente consumido para tratamento de doenças metabólicas, hemorroidas e reumatismo. Seu consumo aumentou devido à facilidade de ser produzida em casa e aos crescentes relatos de benefícios à saúde. Porém, apenas alguns estudos comprovaram a ação de sua atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* (testes em ratos). Além dos efeitos desejáveis, também houve casos prejudiciais documentados, como relatos de tontura e náusea após o consumo, envenenamento por chumbo e toxicidade gastrointestinal. Há relato de um casal que bebeu chá de kombucha por 6 meses, preparado em uma panela de cerâmica, e teve envenenamento por chumbo sintomático. Apesar disso, os casos relatados de toxicidade por consumo de kombucha foram muito isolados, sem estudos que evidenciassem seus potenciais de toxicidade e patologias (JAYABALAN *et al.*, 2014).

2.1.1 Composição química e microbiológica da kombucha

A composição da kombucha é influenciada por vários fatores como as condições de fermentação (tempo e temperatura); espécies microbianas presentes;

concentração inicial de microrganismos no inóculo; tipo de chá utilizado e a concentração inicial de substrato (açúcar) e os métodos analíticos usados para a quantificação (JAYABALAN *et al.*, 2014; LEAL *et al.*, 2018).

A composição química de kombucha inclui não apenas os polifenóis liberados das folhas de chá, mas também uma gama de metabólitos benéficos gerados pelas atividades das bactérias e leveduras do SCOBY durante o processo de fermentação, como ácidos orgânicos, vitaminas, nitrogênios orgânicos, enzimas, minerais e outras substâncias (LEAL *et al.*, 2018). Na TAB. 1 encontram-se as principais substâncias químicas encontradas em kombuchas a partir de diferentes estudos.

A microbiota da kombucha encontra-se dispersa no líquido e acomodada no SCOBY que é a película celulósica, flutuante, de forma bifásica, sob a fase líquida do chá ácido. A cada preparação de kombucha, uma nova película é produzida. As películas formam-se por camadas, de baixo para cima, sendo que a do topo é sempre a mais recente. As bactérias e leveduras responsáveis pela fermentação da kombucha estão alojadas no SCOBY. A composição exata dos microrganismos presentes na kombucha é variável, sendo dependente da sua origem (JAYABALAN *et al.*, 2014).

De acordo com uma revisão sobre os aspectos microbiológicos da kombucha feita por Greenwalt *et al.* (2000), haviam sido identificadas as bactérias *Acetobacter xylinum* (como produtora inicial do SCOBY), *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter*. As bactérias predominantes na kombucha são as acéticas, pertencentes principalmente aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014).

Marsh *et al.* (2014) investigaram a população bacteriana de várias culturas de kombucha de diferentes origens e verificaram que os gêneros bacterianos dominantes nas amostras analisadas foram *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*, sendo que este último era predominante. Também foram detectadas bactérias do ácido láctico como *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e, possivelmente, os lactobacilos são os *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*.

Quadro 2: Composição química de kombuchas.

Componentes	Substâncias	Referências
Ácidos orgânicos	Ácidos acético; láctico; cítrico; glucônico; glucurônico; málico; tartárico; succínico; pirúvico; oxálico; butírico	YAVARI <i>et al.</i> (2011); YANG <i>et al.</i> (2010); JAYABALAN <i>et al.</i> (2007); 4. MALBASA <i>et al.</i> (2011)
Polifénois	Catequinas, cafeína, teaflavina, tearubiginas, galotaninos	JAYABALAN <i>et al.</i> (2007); MORSHEDI <i>et al.</i> (2010); SHARMA <i>et al.</i> (2007)
Vitaminas	Vitamina B1, B2, B6, B9, B12, C	MALBASA <i>et al.</i> (2011); BAUER-Petrovska <i>et al.</i> (2000); Vitas <i>et al.</i> (2013)
Aminoácidos	Isoleucina; leucina; lisina; metionina; fenilalanina; treonina; valina; triptofano; alanina; arginina; ácido aspártico; cisteína; ácido glutâmico; glicina; histidina; prolina; serina; tirosina	JAYABALAN <i>et al.</i> (2010)
Minerais	Manganês; ferro; níquel; cobre; zinco; cobalto, nitrato; fosfato; sulfato; brometo; cloreto; iodeto; flúor	BAUER-PETROVSKA <i>et al.</i> (2000); CHU; CHEN (2006); KUMAR <i>et al.</i> (2008)
Álcool	Etanol	CHEN; LIU (2000)
Outras substâncias	Flavonoides (quercetina, kaempferol, miricetina, rutina), alcaloides, purinas, lipídios, ácido D-sacarico-1,4-lactona (DSL), dióxido de carbono	JAYABALAN <i>et al.</i> (2014)

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

Greenwalt *et al.* (2000) relataram vários gêneros de leveduras encontradas em kombuchas de origens diferentes: *Brettanomyces*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces intermedius*, *Candida*, *Candida famata*, *Mycoderma*, *Mycotorula*,

Pichia, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *aceti*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis Zygosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces rouzii*.

Os gêneros *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* ocorreram com mais frequência nas amostras domésticas alemãs estudadas (MAYSER *et al.*, 1995). Liu *et al.* (1996) isolaram as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Brettanomyces bruzellensis* de amostras de Taiwan. Herrera e Calderon-Villagomez (1989) isolaram *Brettanomyces intermedius*, *Candida famata*, *Pichia membranaefaciens*, *S. cerevisiae* subsp. *aceti*, *S. cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Z. bailii* e *Zygosaccharomyces rouxii* do chá mexicano. Roussin (1996) determinou que as leveduras típicas da Kombucha norte-americanas foram *Zygosaccharomyces* e *S. cerevisiae*.

A análise de culturas microbianas de kombucha do Canadá, Reino Unido, Irlanda e Estados Unidos detectou que o gênero *Zygosaccharomyces* era predominante, tendo sido identificadas duas espécies desta população: *Z. lentus* e *Z. bisporus*. Do gênero *Dekkera* foram identificadas *D. bruxellensis* e *D. anomala*; e do gênero *Pichia* e similares, *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, *P. membranaefaciens* e *Hyphopichia burtonii*. Foram também detectadas a presença de *Kazachstania unispora*, *Davidiella tassiana*, *Lachancea fermentati*, *Kluyveromyces marxianus*, *Naumovozyma castelli*, *Wallemia sebi* e *Leucosporidiella fragaria* (MARSH *et al.*, 2014).

Mais um amplo espectro de leveduras foi citado por Jayabalan, *et al.* (2014), como a *Dekkera*, *Kloeckera*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomycoides ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *B. clausenii*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis* sp.n., *Candida guilliermondii*, *Candida obusei*, *Candida stellata*, *Candida colliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* e *Kluyveromyces africanus*. Os estudos têm demonstrado que as kombuchas não apresentam um conjunto universal de leveduras, no entanto, elas são comumente osmotolerantes, fermentativas e produtoras de ácido (TEOH *et al.*, 2004).

2.2 Padrão de Identidade e Qualidade

A kombucha é uma bebida relativamente nova no mercado brasileiro. Em 2018, foi fundada a ABKOM - Associação Brasileira de Kombucha, que atuou ativamente para incluir a kombucha na legislação brasileira junto aos órgãos competentes (ABKOM, 2018). Como resultado, em setembro de 2019 foi publicada a Instrução Normativa nº 41 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esta legislação estabeleceu o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da Kombucha em todo o território nacional, prescrevendo a padronização da denominação, listagem da composição de ingredientes, aditivos, teor alcoólico, parâmetros analíticos (como pH e acidez titulável), e vedando o uso de alegações funcionais e de saúde não autorizadas pela legislação específica da ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2019).

Alencar *et al.* (2020) analisaram a adequação de rótulos de 12 marcas de kombuchas comercializadas no Brasil de acordo com a legislação vigente. Das amostras selecionadas, 20,8 % não apresentaram rotulagem nutricional; 91,6 % não identificaram a linhagem dos microrganismos presentes na kombucha; 79,2 % não declararam a porcentagem alcoólica; 100 % não descreveram o pH da bebida e 8,4 % das bebidas alegaram erroneamente propriedades funcionais na embalagem. Concluíram que são necessárias adequações nas legislações para que haja uma abordagem melhor das características e processos de fabricação, comercialização e armazenamento das kombuchas, e relataram que muitas kombuchas comercializadas pelo Brasil não apresentavam rotulagem de acordo com as legislações vigentes, além de não abordarem as características e processos de produção, teor alcoólico, comercialização e armazenamento das bebidas (ALENCAR *et al.*, 2020)

2.3 Kombucha e benefícios atribuídos ao seu consumo

O uso e a procura do chá fermentado da kombucha vem se tornando cada vez mais visível, podendo ser uma boa opção de substituição de refrigerantes, por ser natural e mais saudável, seu sabor e sua gaseificação, o torna agradável ao paladar e a tendência é que sua aceitação se efetive por diversos públicos (SILVA, 2019). Os benefícios da kombucha à saúde humana têm sido avaliados e amplamente discutidos. De acordo com Bishop *et al.* (2022) a popularidade e disponibilidade de

Kombucha nos Estados Unidos foi, em parte, impulsionada pelas mídias sociais, destacando os benefícios positivos para a saúde que poderiam ser alcançados com o consumo regular, como exemplo, foram sugeridos que a kombucha pode aumentar a vitalidade, combater acne, melhorar a constipação, aumentar a perda de peso, aliviar a artrite, aumentar a resposta imune. Entretanto, as pesquisas científicas publicadas, que atribuem esses efeitos ao consumo de kombucha, ainda são limitadas (Bishop *et al.*, 2022).

Um trabalho de revisão sobre os estudos recentes de confirmação dos inúmeros aspectos promotores de saúde da kombucha, concluiu que a bebida pode atuar de forma a reduzir os riscos de desenvolvimento de doenças devido a quatro propriedades principais: desintoxicação, poder antioxidante, potencial energizante e promoção de imunidade. A revisão teve como foco os compostos ativos presentes na bebida e os mecanismos de suas ações (VINA *et al.*, 2014).

Leal *et al.* (2018) também realizaram uma revisão focada nas descobertas recentes sobre os efeitos benéficos do kombucha e seus compostos químicos. Os autores encontraram que a bebida é fonte de componentes bioativos, como polifenóis e ácido glucurônico e que os resultados benéficos do consumo de kombucha são atribuídos ao efeito sinérgico entre esses componentes, tornando-se uma bebida com potenciais propriedades benéficas para a saúde, quando elaborada em condições higiênicas adequadas. Evidenciaram que seu consumo pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente devido ao seu conteúdo de polifenóis que inibem a oxidação do LDL, regula o metabolismo do colesterol e previne a hipertensão arterial, promovendo o relaxamento do músculo liso (LEAL *et al.*, 2018).

O ácido glucurônico, um dos principais componentes da kombucha, desempenha um papel na desintoxicação hepática xenobiótica e eliminação endobiótica, potencializando assim as funções hepáticas. Também enfatizaram que a concentração dos componentes ativos da bebida vai variar dependendo do SCOBY e dos métodos de obtenção (LEAL *et al.*, 2018).

A relação da kombucha com a atividade antioxidante é devido à presença de polifenóis na infusão da *Camelia sinensis* (L.), principalmente as catequinas, que são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio. A presença do ácido glicurônico em sua composição também tem destaque, pois possui propriedades desintoxicantes,

capazes de eliminar substâncias tóxicas, como poluentes, produtos químicos exógenos, excesso de hormônios esteroidais e bilirrubina do corpo humano via sistema urinário (NGUYEN *et al.*, 2015).

Alguns estudos relacionaram o uso de kombucha na redução de riscos de comorbidades devido ao seu potencial antioxidante (MEDEIROS; CECHINEL-ZANCHETTI, 2019; OFORI, 2015; SUN *et al.*, 2015).

O efeito probiótico, que é o mais citado na literatura, é fornecido pela presença dos microrganismos vivos (bactérias e leveduras) que ao serem consumidos contribuem para manter o equilíbrio da microbiota intestinal. Estes microrganismos são capazes de produzir substâncias bacteriostáticas que competem com patógenos e suas toxinas no intestino, auxiliando o indivíduo na redução do risco de enfermidades gastrointestinais, como diarreias, câncer do cólon, doença de Crohn, intolerância à lactose e síndrome do intestino irritável, e atuando também, de forma benéfica, no controle do colesterol e aumento da imunidade (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A kombucha apresenta função regulatória para a microbiota intestinal humana por conter bactérias e leveduras que atuam como um insumo probiótico e um simbiótico, definido como uma combinação de prebióticos e probióticos, além de possuir alto teor de vitamina C (BRUSCHI *et al.*, 2018; WATANA *et al.*, 2015; HRNJEZ *et al.*, 2014).

De acordo com a Unidade Central de Pesquisa Oncológica da Rússia e a Academia Russa de Ciências, a ingestão diária de kombucha está relacionada com a redução do risco de desenvolvimento de câncer (WATANA *et al.*, 2015). A relação é devida a polifenóis presentes na infusão, e metabólitos secundários produzidos na fermentação, que sugerem que a bebida pode contribuir na redução do risco, uma vez que tais componentes são capazes de inibir mutações genéticas, proliferação de células cancerígenas e induzir a apoptose em células tumorais (WATANA *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2016).

Há também relação com efeitos hipoglicemiantes, pois compostos fenólicos presentes na bebida, como já citado, são capazes de aumentar a secreção de insulina das células beta-pancreáticas. Tanto os compostos fenólicos, quanto os ácidos orgânicos, auxiliam na diminuição da absorção de glicose do sistema digestivo. Esta redução dos níveis de glicose no sangue pode também ser correlacionada à atividade

do ácido acético, que auxilia a suprimir a ação da dissacaridase e a diminuir o tempo de esvaziamento gástrico (ZUBAIDAH *et al.*, 2018).

Apesar de não haver estudos clínicos testados em humanos, um estudo experimental realizado com animais induzidos à diabetes por estreptozotocina mostrou a capacidade da kombucha fermentada por *Salacca zalacca*, em reduzir o estresse oxidativo e modular a hiperglicemia, reduzindo entre 30-59% a glicemia em jejum dos animais. Além disso, os níveis de superóxido dismutase (SOD) plasmáticos aumentaram e a análise imuno-histológica demonstrou que células beta-pancreáticas se regeneraram nos animais tratados com kombucha (ZUBAIDAH *et al.*, 2018).

Em relação às contraindicações, Jayabalan *et al.* (2014) descreveram um caso de insuficiência renal aguda, com acidose láctica e hipertermia após a ingestão da bebida, e à presença de microrganismos patogênicos como *Bacillus anthrax* e bolores como *Penicillium* e *Aspergillus* no preparado de kombucha em condições anti-higiênicas.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) determina que um consumo diário de 4 onças (cerca de 118 mL) de kombucha não apresenta risco para a saúde do consumidor. Em relação às mulheres grávidas, como um parâmetro de segurança, o consumo é contraindicado por riscos de contaminação por microrganismos indesejáveis e pelo possível conteúdo de heparina (componente glicosaminoglicano) no chá, pois inibe proteínas do sistema de coagulação do sangue, sendo prejudicial durante o terceiro trimestre da gravidez. Deve ser mencionado que os autores afirmam que a presença de heparina não foi comprovada em amostras analisadas. No entanto, o consumo da bebida poderia favorecer sua produção no organismo, por isso é preciso cautela (RUBIO DELGADO, 2015; LEAL *et al.*, 2018).

2.4 Potencial antimicrobiano

O potencial antimicrobiano diz respeito à habilidade de determinado microrganismo, aspecto ou componente químico inibir o crescimento de um microrganismo patogênico. Há vários estudos relativos às propriedades antimicrobianas da kombucha (MEDEIROS; CECHINEL-ZANCHETTI, 2019).

Sreeramulu *et al.* (2000) testaram o efeito da bebida em culturas dos microrganismos patogênicos *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Bacillus cereus, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* e *Candida albicans*. Foi verificado que, na maior parte dos casos, havia maior inibição do crescimento destes microrganismos com amostras de kombucha fermentadas durante mais tempo. Apesar do poder antimicrobiano ser comparável ao do ácido acético (com exceção em *C. albicans*), a kombucha também apresentou ação inibitória no crescimento de *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. sonnei*, *Campylobacter jejuni* e *C. albicans*, mesmo com pH neutro, e com tratamento térmico, significando que o ácido não é o único responsável pelo poder antimicrobiano da kombucha. Isto evidencia a existência de outros compostos com ação antimicrobiana na composição da bebida fermentada que não sejam proteínas (pois não resistiriam ao tratamento térmico), nem catequinas (compostos fenólicos presentes em abundância no chá), dado que as amostras de chá não fermentado não apresentaram ação inibitória para nenhum dos microrganismos com exceção de *Campylobacter jejuni* (SREERAMULU *et al.*, 2000).

Um estudo sobre a atividade antibacteriana e antifúngica da kombucha de chá preto e verde constatou que o potencial antibacteriano da bebida preparada a partir do chá verde é maior. Foram realizados também testes em chás não fermentados, e ele não exibiu propriedades antimicrobianas, portanto, outros componentes biologicamente ativos podem estar envolvidos na atividade analisada, como bacteriocinas, proteínas e enzimas, além dos compostos fenólicos derivados do chá (BATTIKH *et al.*, 2011).

Existem diferentes metodologias aplicáveis à análise do potencial antimicrobiano de compostos, tais como difusão em placas ou ágar; perfuração em ágar; difusão em disco e microdiluição (BARRY & THORNSBERRY, 1991; ELOFF, 1998; PINTO *et al.*, 2003; OSTROSKY *et al.*, 2008;).

O teste de difusão em ágar é um método físico, em que há o uso do microrganismo teste e da substância com potencial antimicrobiano em meio de cultura sólido. O potencial antimicrobiano é determinado de acordo com o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado frente à concentração da substância analisada (PINTO *et al.*, 2003).

O teste de difusão em disco refere-se à aplicação do antimicrobiano em discos de papel de filtro depositados sobre a superfície do meio de cultura com diferentes cargas microbianas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; KARAMAN *et al.*, 2003). Os discos devem ser dispostos em uma distância maior que 15 mm em relação à lateral da placa para não sobrepor as zonas de inibição ao seu redor. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm (BARRY & THORNSBERRY, 1991).

O método de microdiluição em caldo permite avaliar de forma quantitativa a atividade *in vitro* de determinado antimicrobiano frente a um isolado bacteriano. Esta técnica é realizada com uso de placas de microdiluição, previamente esterilizadas, contendo quantidades pré-determinadas do meio de cultura adicionado dos antimicrobianos. Nestas diluições se aplicam inóculos de suspensões bacterianas previamente padronizadas (KRUGER, 2006).

A técnica se destaca por ser considerada robusta, oferecer reprodutibilidade de resultados, ser 30 vezes mais sensível do que outros métodos utilizados na literatura, e requerer uma pequena quantidade de amostra, que pode ser usada para um grande número de amostras, não requer alto níveis de habilidade, deixa um registro permanente e demanda pouco tempo de análise (ELOFF, 1998).

Eloff (1998), ao testar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas, considerou que havia problemas associados à técnica de difusão em ágar e então testou a técnica de microdiluição usando microplacas de 96 poços. Analisou o potencial antimicrobiano do extrato de *Combretum molle* em relação à bactéria *S. aureus* e verificou que a técnica de microdiluição foi 32 vezes mais sensível do que as técnicas de difusão em ágar. Comparando as técnicas, Eloff (1998) concluiu que para determinar a atividade antibacteriana de extratos, a difusão em ágar funciona bem com inibidores definidos, mas quando examinando extratos contendo componentes desconhecidos, são problemas que levam a resultados falsos positivos e falsos negativos.

2.5 Microrganismos patogênicos em alimentos

As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) constituem-se em um problema de saúde pública mundial. Estas doenças são causadas pela ingestão de

água e/ou alimentos contaminados. Existem mais de 250 tipos de DTHA no mundo, causadas por bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas intestinais oportunistas ou substâncias químicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 600 milhões de pessoas adoecem e 420.000 morrem todos os anos devido às DTHA, resultando na perda de 33 milhões de anos de vida saudáveis. As crianças menores de 5 anos, carregam 40% da carga de DTHA, com 125.000 mortes a cada ano (OMS, 2023).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), centro de vigilância de doenças dos Estados Unidos, estima que 48 milhões de pessoas adoecem anualmente, 128 mil são hospitalizadas e 3 mil morrem anualmente devido a DTHA. No Brasil, no período de 2007 a 2020, foram notificados, por ano, uma média de 662 surtos de DTHA, com o envolvimento de 156.691 doentes (média de 17 doentes/surto), 22.205 hospitalizados e 152 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Dentre os agentes etiológicos identificados nos surtos, a bactéria *Escherichia coli* representa 29% do total, seguido de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, com 17% e 16%, respectivamente, no período de 2009 a 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

2.5.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium

A bactéria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium tem morfologia de bastonetes Gram negativos e pertence à família *Enterobacteriaceae*. Por meio das fezes, pode contaminar o solo e a água, permanecendo nas fezes por até mesmo anos. Por meio de solos e efluentes de água, a *Salmonella* também pode infectar produtos agrícolas *in natura*, como hortaliças e frutas, e de origem animal, como as carnes cruas, o leite e os ovos, levando a Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – DTHA, como quadros entéricos agudos ou crônicos, infecções septicêmicas, osteomielite e artrite, hepatite (BRASIL, 2011).

2.5.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria bastonete Gram-negativo, que compõem a microbiota intestinal de humanos e animais. Existem várias linhagens patogênicas responsáveis por DTHA, pois ao ser eliminada do corpo, pode contaminar o solo, a água e os alimentos. As linhagens patogênicas estão associadas a enterite aguda e doenças extra-intestinais, como infecção do trato urinário e meningite neonatal, e também, surtos por *E. coli* diarreiogênica que podem ser fatais. A transmissão pode ocorrer por água, vegetais frescos, carnes, arroz, feijão e saladas (FAÚLA, 2016).

2.5.3 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positivo, formadora de esporos, de morfologia bacilos, que produz toxinas responsáveis por intoxicações alimentares, devido a isto, é identificado como um microrganismo que causa DTHA. Suas toxinas podem causar síndromes de tipo diarreica e emética, por meio da ingestão de alimentos que contenham células vegetativas de *Bacillus cereus* que produzirão enterotoxinas (síndrome diarreica) ou suas toxinas pré-formadas nos alimentos (síndrome emética). Os alimentos mais envolvidos em surtos são farináceos, leite em pó e temperos (LENTZ, 2014).

2.5.4 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* é Gram-positiva, de forma similar a esferas (cocos). A intoxicação alimentar causada por este microrganismo é uma das DTHA mais prevalentes e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos. As intoxicações estafilocócicas podem ser desenvolvidas por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou de portadores sadios, destacando-se os portadores nasais de *S. aureus*, que ao manipularem alimentos podem se tornar importantes fontes de contaminação. Os sintomas são de gastroenterite aguda, como vômitos, diarreias e febre aguda (FEITOSA *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano de kombuchas de origens caseira e comercial sobre microrganismos patogênicos comumente encontrados em alimentos.

3.2 Específicos

- Testar o potencial antimicrobiano dos sobrenadantes obtidos de kombuchas caseira e comercial por diferentes técnicas.
- Isolar e caracterizar microrganismos das amostras de kombucha caseira e comercial e obter o sobrenadante dos isolados.
- Testar o potencial antimicrobiano dos sobrenadantes dos isolados das kombuchas caseira e comercial.

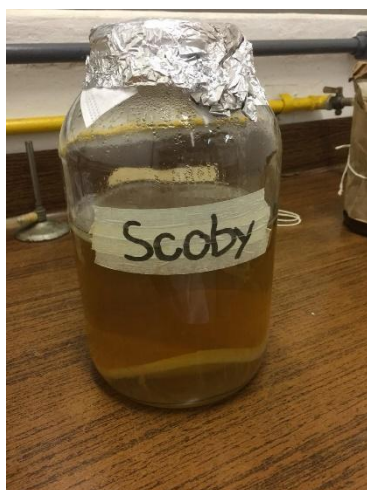
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de kombucha preparada de forma caseira e obtida no comércio de Ouro Preto-MG. As amostras do SCOBY e do chá fermentado da kombucha caseira foram obtidas de uma doação nativa de Ouro Preto – MG e, posteriormente, foi necessária a utilização de outra fonte de inóculo, adquirido da empresa Fermentare®.

Na FIG. 1 estão representados o SCOBY obtido de doação de kombucha caseira de Ouro Preto-MG (A) e o SCOBY adquirido da empresa Fermentare® (B). Para os testes com os sobrenadantes foi necessário obter uma nova fonte de amostra de kombucha, pois a amostra de kombucha de doação, utilizada anteriormente, havia sido contaminada.

Figura 1 - Amostras de SCOBY, doação de Ouro Preto (A) e da empresa Fermentare® (B)



A



B

Fonte: (Autora, 2023)

A obtenção da kombucha caseira foi realizada no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto-MG. Para o preparo da bebida, utilizou-se 1 litro da água e chá verde (*Camellia sinensis*) a 10% (p/v) com 20% de sacarose (p/v) em ebulição por 15 minutos. O chá foi deixado em repouso até que atingisse a temperatura ambiente. Em seguida, ele foi coado com

uma peneira de alumínio esterilizada e transferido para um béquer de vidro estéril, com capacidade para 2 L. No mesmo béquer contendo o chá, acrescentou-se o SCOBY, composto por duas porções: uma camada de película celulósica flutuante e o caldo líquido que contém os principais microrganismos envolvidos no processo de fermentação. Este processo foi realizado em triplicata. Os béqueres foram cobertos e deixados para fermentação em três períodos diferentes: 7; 10 e 21 dias, em temperatura ambiente, protegidos da luz. Após o período de fermentação, os caldos foram centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos, e os sobrenadantes foram utilizados para as análises.

Na FIG. 2 está representada a kombucha caseira com 7 dias de fermentação.

Figura 2 - Kombucha artesanal com 7 dias de fermentação.



Fonte: (Autora, 2023)

Foi adquirida a kombucha industrializada comercializada em lojas de produtos naturais em Ouro Preto – MG, de uma mesma marca e lote (FIG. 3), e o sobrenadante para análise foi obtido da mesma forma descrita anteriormente.

Figura 3 - Amostras de kombucha comercializada em Ouro Preto-MG



Fonte: (Autora, 2023)

4.2 Cepas alvo e condições de cultivo

As cepas testadas pertencem ao banco de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 10536; *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Staphylococcus aureus* ATCC 14458. As cepas bacterianas foram reativadas e mantidas em placas de ágar Müller-Hinton (MH) a 37 °C por 18 h e, em seguida, submetidas ao teste de atividade antimicrobiana.

4.3 Atividade antimicrobiana

4.3.1 Difusão em ágar adaptado

A atividade antimicrobiana dos sobrenadantes obtidos das kombuchas foi testada pelo ensaio de difusão em ágar adaptado de Sreeramulu *et al.* (2001).

Os sobrenadantes estéreis das amostras de kombucha caseira nos diferentes períodos de fermentação (7; 10 e 21 dias) foram obtidos por filtração com uso de um

filtro estéril de 0,20 µm de poro. O ágar Mueller Hinton (MH), marca TM MEDIA®, foi usado para avaliação das atividades antibacterianas. Suspensões das cepas-alvo previamente incubadas por 24 h foram espalhadas uniformemente nas superfícies do ágar e, posteriormente, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro com auxílio de uma ponteira estéril. Foram inoculados 100 µL dos sobrenadantes estéreis das amostras de kombucha caseira nos poços das placas contendo ágar MH previamente inoculadas com as cepas alvo. As placas foram mantidas primeiramente a 4°C por 2 h para permitir a pré-difusão do sobrenadante do chá e depois incubadas a 37°C. Após 18 h de incubação foi feita a observação da formação de zona de inibição ao redor dos poços, para confirmar a ação antimicrobiana. Cada experimento foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras da kombucha comercial.

4.3.2 Método de difusão em disco

O potencial antimicrobiano dos sobrenadantes da kombucha foi testado também pelo método de difusão em discos conforme descrito por Ivanišová *et al.* (2019). Os procedimentos adotados foram os mesmos descritos para a técnica de difusão em disco, porém os poços foram substituídos por discos de papel filtro embebidos nos sobrenadantes das kombuchas caseira e industrializada.

4.3.3 Método de microdiluição

Utilizou-se apenas a kombucha fermentada por 10 dias para esta análise. Para a execução desta técnica, inicialmente, foram realizados o isolamento e a caracterização dos grupos de microrganismos usualmente presentes na kombucha, ou seja, bactérias ácido lácticas, acéticas e leveduras.

4.3.3.1 Isolamento e caracterização dos microrganismos

O isolamento das bactérias ácido lácticas (BAL) foi realizado de acordo com a metodologia da *The International Organization Standardization* (ISO, 1998). Foi realizado o plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em ágar *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), marca TM MEDIA®, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos,

sendo inoculadas as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} das amostras da kombucha caseira e da industrializada. As placas foram colocadas na jarra de anaerobiose e incubadas em BOD Cienlab® a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

Para isolar as bactérias ácido acéticas (BAA) foi realizado o plaqueamento em superfície (*spread plate*) das diluições em ágar MEP, elaborado conforme recomendação de Camu *et al.*, 2007. Foram inoculadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} das kombuchas artesanal e industrializada e as placas foram incubadas em BOD Cienlab a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3 a 4 dias.

O isolamento de leveduras foi realizado por plaqueamento em superfície (*spread plate*) das diluições em Ágar Batata Dextrose (BDA), marca Ion Cult® acidificado com solução de ácido tartárico 10% para cada 100 mL (MORTON, 2001). Foram inoculadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} da kombucha artesanal e industrializada. Incubaram-se as placas em aerobiose a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ C por 4 dias.

Após os períodos de incubação foram selecionadas colônias com características diferentes para a realização dos testes de catalase e coloração de Gram. Os microrganismos identificados foram inoculados novamente nos caldos MRS (bactérias lácticas), MEP (bactérias acéticas) e YPD (levedura) e, após crescimento, houve a transferência de 1 mL do caldo com crescimento para *eppendorfs* estéreis, adicionando-se em seguida, 1 mL de glicerina 20% esterilizada. Posteriormente, os *eppendorfs* foram estocados a -80°C em *ultra freezer Skadi® Green line Europe* da Escola de Nutrição, para a realização da técnica de microdiluição.

4.3.3.2 Padronização dos inóculos

Para a padronização da densidade do inóculos dos patógenos a serem testados foi utilizado o método de suspensão direta de colônias, considerado o método mais conveniente para a preparação de inóculos nesse tipo de experimento, podendo ser usado para a maioria dos microrganismos (CLSI, 2012). Para cada microrganismo obteve-se uma suspensão em 9 mL de solução salina esterilizada, com turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland (concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL) (CLSI, 2012).

4.3.3.3 Preparo do sobrenadante

A separação do sobrenadante foi adaptada de Lin *et al.* (1999). Culturas dos isolados das kombuchas em caldo MRS foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi filtrado através de filtro estéril com poros de 0,22 µm (Millipore, Bedford, Massachusetts).

4.3.3.4 Testes de inibição dos sobrenadantes frente aos patógenos

O método utilizado foi a microdiluição em caldo em placas de microtitulação de 96 poços, segundo Kruger *et al.* (2006). Cada cavidade das placas de microtitulação foi preenchida com 100 µL de BHI, 100 µL de sobrenadante da cultura de cada isolado das kombuchas e 1 µL de cultura da bactéria indicadora. Como controle, o sobrenadante foi substituído por 100 µL de caldo MRS. As densidades ópticas (DO) foram lidas após 0, 2, 4, 6 e 8 horas de incubação a 37°C em espectrofotômetro leitor de placas de microtitulação Epoch®, utilizando comprimento de onda de 540 nm (FIG. 4). Os testes foram realizados em triplicatas.

Figura 4 - Leitura das densidades ópticas por meio espectrofotômetro leitor de placas de microtitulação.



Fonte: (Autora, 2023)

4.4 Análise Estatística

Os resultados da técnica de microdiluição foram avaliados pelo *software GraphPad Prism® 6*, utilizando testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Para os dados paramétricos, foi aplicada ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), ao nível de significância de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do efeito antimicrobiano dos sobrenadantes pelas técnicas de difusão em ágar e de difusão em discos

Os resultados do teste da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes tanto da kombucha caseira quanto da kombucha comercial, frente às quatro cepas de bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*), utilizando-se o ensaio de difusão em ágar, não apresentou nenhum resultado positivo.

Diante destes resultados, realizou-se uma modificação na metodologia, usando-se a técnica de difusão em discos e, novamente não foi observada nenhuma inibição. Todos os testes foram realizados também com os períodos distintos de fermentação para a kombucha caseira: 7 dias; 10 dias e 21 dias, no entanto, não houve nenhuma inibição. Na FIG. 5 encontram-se ilustrados os exemplos de resultados das duas metodologias utilizadas demonstrando ausência de halos de inibição ao redor dos poços e dos discos.

Figura 5 - Exemplos de resultados do potencial antimicrobiano dos sobrenadantes de Kombucha caseira.



(A) Placa com poços de Kombucha caseira com inóculo de *E. coli*.

Fonte: (Autora, 2023).



(B) Placa com mini filtros onde adicionou-se a Kombucha caseira e inoculou-se a *Salmonella*.

Fonte: (Autora, 2023).

No método de difusão em ágar, a substância em análise se difunde em um meio de cultura sólido inoculado com o microrganismo teste. Caso a amostra testada

apresente atividade antimicrobiana, observa-se após a sua difusão uma zona de inibição de crescimento do microrganismo, cujo diâmetro é uma função da concentração da amostra. Sua desvantagem encontra-se no fato de que substâncias que apresentam baixa difusibilidade (PM) e hidrossolubilidade produzem pequenos halos de inibição, o que reduz a precisão dos resultados (SOLANO, 2008).

Contrariamente aos resultados do presente estudo, Battikh *et al.* (2012) identificaram o efeito antimicrobiano de kombuchas obtidas de chás verde e preto, fermentados por 21 dias, contra *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria. monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (zona de inibição 18 mm), utilizando a técnica de difusão em ágar. A bebida kombucha de chá preto também mostrou inibição para *Candida krusei* CCM 8271, *C. glabrata* CCM 8270, *C. albicans* CCM 8186, *C. tropicalis* CCM 8223, *Haemophilus influenzae* CCM 4454 e *Escherichia coli* CCM 3954 com uso da técnica de difusão em disco (IVANIŠOVÁ *et al.*, 2019).

O método de difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro leva à formação de um halo de inibição ao crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (MIC). Esta análise é qualitativa, ou seja, proporciona classificar a amostra bacteriana em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano. O teste de disco-difusão é um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido. Os reagentes são relativamente econômicos, não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados. Entretanto, este método apresenta algumas limitações, como a dificuldade na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos que se difundem mal através do ágar, como, por exemplo, a polimixina, evaporação precoce do antimicrobiano nos discos e apresentam dificuldades na interpretação de microrganismos anaeróbios ou fastidiosos (SEJAS *et al.*, 2003).

5.2 Resultados do teste de microdiluição em placas

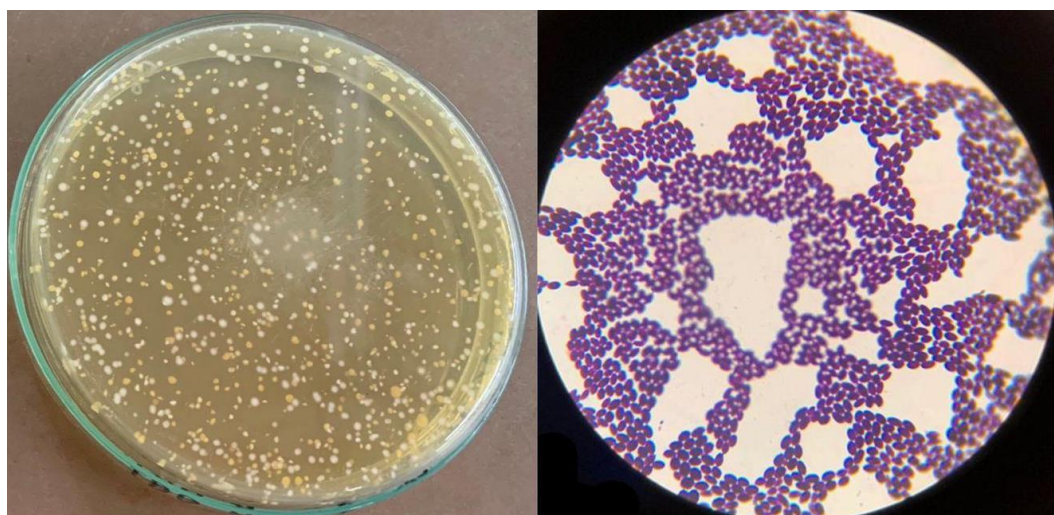
5.2.1 Caracterização dos isolados

Os isolados receberam códigos de identificação e foram armazenados em *ultrafreezer* a -80°C. A partir dos isolados de ambas as amostras de kombucha, foram

selecionadas cinco colônias de cada tipo, que apresentaram as características típicas para a caracterização como leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias acéticas. De acordo com a literatura, as bactérias lácticas são catalase negativa e Gram-positivas, as bactérias acéticas são Gram-negativas e catalase positiva e as leveduras são Gram-positivas e catalase positiva (ANDRES BARRAO *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2019).

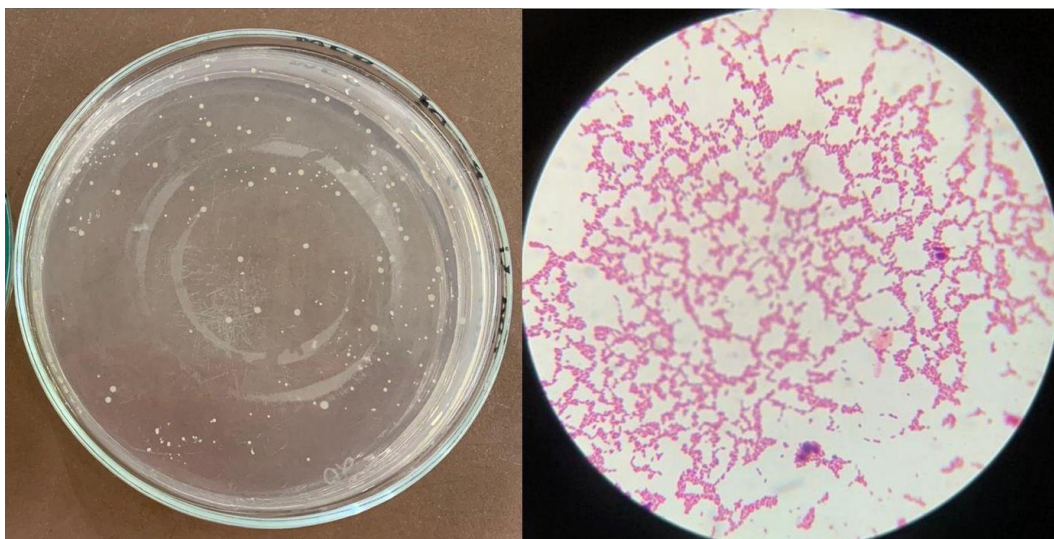
Nas FIG. 6, 7 e 8 estão ilustradas as placas com os microrganismos isolados e seus respectivos testes de coloração de Gram.

Figura 6 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias lácticas.



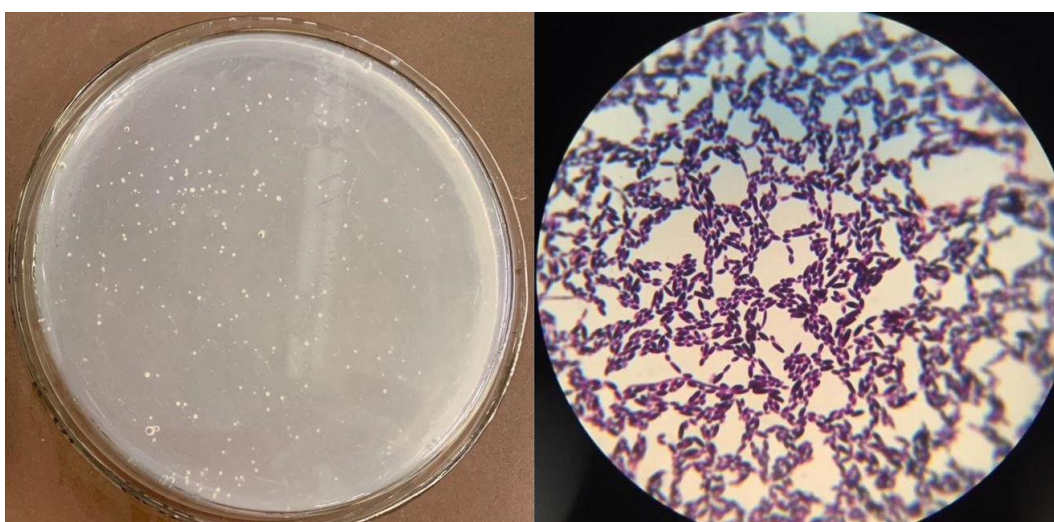
Fonte: (Autora, 2023).

Figura 7 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias acéticas.



Fonte: (Autora, 2023).

Figura 8 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das leveduras.



Fonte: (Autora, 2023).

5.2.2 Método de microdiluição

Devido às características semelhantes dos isolados para cada grupo, foram testados um tipo de cada bactéria para as kombuchas caseira e comercial que receberam os códigos, conforme Quadro 2. Ressalta-se que, embora as bactérias acéticas tenham sido isoladas, não foi possível realizar o teste de microdiluição, uma vez que os isolados não apresentaram crescimento no dia da análise.

Quadro 2: Código de microrganismos isolados utilizados para microdiluição

Amostra Kombucha Caseira	Código	Amostra Kombucha Comercial	Código
Levedura	SLIKCA	Levedura	SLIKCO
Lática	SBLIKCA	Lática	SBLIKCO

SLIKCA - Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira

SLIKCO - Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial

SBLIKCA - Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Caseira. SBLIKCO

- Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Comercial.

Fonte: (Autora, 2023).

Nas TAB. 1 e 2 estão apresentados os resultados das leituras de Médias das Densidades Ópticas (MDO) dos Sobrenadantes de Leveduras Isoladas das Kombuchas Caseira (SLIKCA) e Comercial (SLIKCO) e dos patógenos testados, respectivamente: *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*.

Tabela 1 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno *Escherichia coli* ATCC 10536.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536			
Tempo (h)	Controle (MDO ± DP)*	SLIKCO (MDO ± DP)*	SLIKCA (MDO ± DP)*
2	0,47 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,01 ^a
4	1,07 ± 0,21 ^a	0,62 ± 0,04 ^b	0,88 ± 0,06 ^{a,b}
6	1,23 ± 0,22 ^a	0,77 ± 0,03 ^b	1,00 ± 0,07 ^{a,b}
8	1,20 ± 0,18 ^a	0,87 ± 0,02 ^b	1,08 ± 0,06 ^{a,b}

MDO: Média das Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

*Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Fonte: (Autora, 2023).

É possível observar que os sobrenadantes de leveduras isoladas de ambas os tipos de Kombuchas demonstraram potencial de inibição de crescimento frente às duas cepas patogênicas testadas: *E. coli* e *Salmonella Typhimurium*. A partir de 4 horas, em relação ao Controle, os SLIKCO apresentaram redução significativa no crescimento da *E. coli* ($p < 0,05$), já os SLIKCA não apresentaram valores significativos em nenhum dos quatro tempos analisados (FIG. 9).

Tabela 2 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028

<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028			
Tempo (h)	Controle (MDO $\pm$ DP)*	SLIKCO (MDO $\pm$ DP)*	SLIKCA (MDO $\pm$ DP)*
2	0,59 $\pm$ 0,15 ^a	0,35 $\pm$ 0,01 ^b	0,34 $\pm$ 0,02 ^b
4	0,82 $\pm$ 0,11 ^a	0,56 $\pm$ 0,01 ^b	0,37 $\pm$ 0,04 ^b
6	1,01 $\pm$ 0,08 ^a	0,8 $\pm$ 0,46 ^a	0,81 $\pm$ 0,08 ^a
8	1,18 $\pm$ 0,08 ^a	0,92 $\pm$ 0,08 ^b	0,95 $\pm$ 0,05 ^b

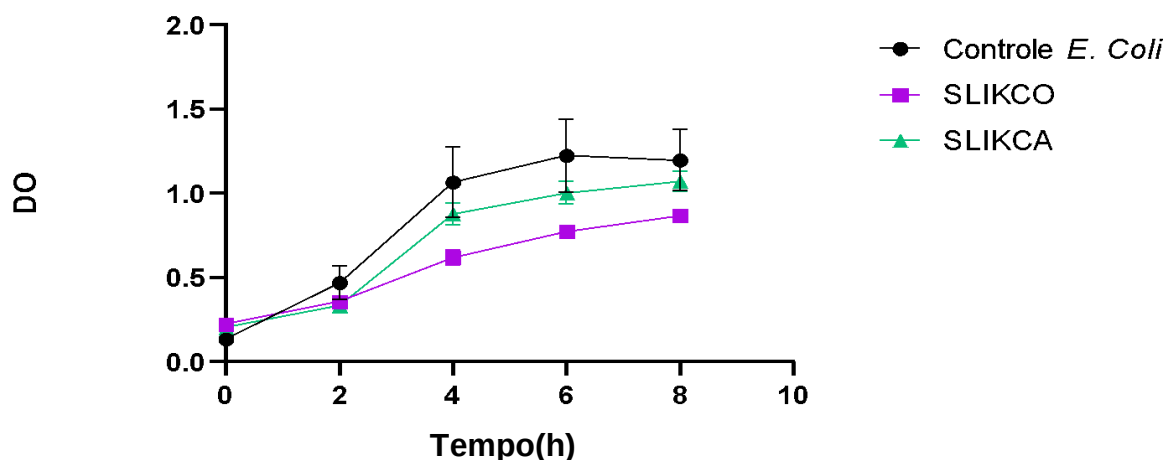
MDO: Média das Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

*Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: (Autora, 2023).

De acordo com a FIG. 9, confirmou-se a maior inibição do crescimento de *E. coli* promovida pelo SLIKCO em relação ao Controle, embora os sobrenadantes não tenham apresentado diferenças estatísticas entre si.

Figura 9 - Análise do crescimento da *E.coli* frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das kombuchas comercial e caseira.



SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

Fonte: (Autora, 2023).

A atividade antimicrobiana de algumas leveduras foi atribuída à capacidade de secretarem toxinas, as chamadas “leveduras assassinas”, que têm efeitos inibidores sobre o crescimento de outros microrganismos. Cepas de *S. cerevisiae* foram relacionadas à secreção de algumas toxinas como k1 e k28 e a produção dessas toxinas tem sido estudada entre outros gêneros de leveduras, incluindo *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (SCHMITT & BREINIG, 2002) – gêneros também já identificados em kombuchas (SANTOS, 2016; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

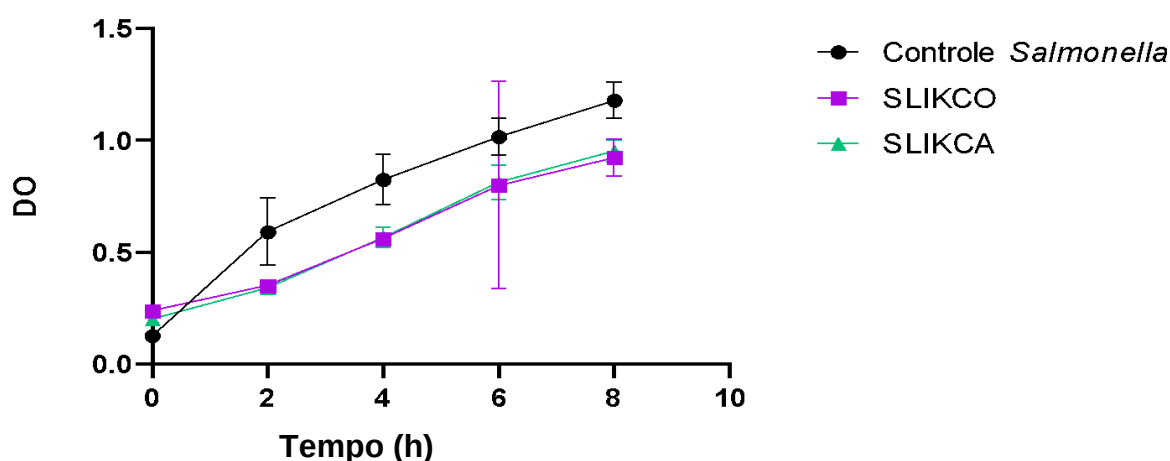
Younis *et al.* (2017) isolaram leveduras de amostras de leite cru, produtos lácteos (iogurtes, queijos e manteiga) e carne processada (linguiça) coletadas aleatoriamente de vendedores e supermercados localizados em New Damietta City, Damietta, Egito. Os isolados foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, e concluíram que alguns tipos de leveduras possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos que podem inibir algumas bactérias patogênicas e deteriorantes e essa atividade antimicrobiana das leveduras permite que elas sejam

um dos novos agentes em potencial no controle da deterioração dos alimentos (YOUNIS *et al.*, 2017).

Em relação à *Salmonella*, os resultados foram diferentes, pois tanto o SLIKCO quanto o SLIKCA inibiram seu crescimento nos mesmos períodos, ou seja, em 2, 4 e 8 horas em relação ao Controle (TAB. 2 e FIG. 10).

França (2011) testou o potencial probiótico da levedura *Pichia pastoris*, *in vitro* e realizou um teste de inibição do crescimento de enteropatógenos em meios de cultura. Constatou que a levedura *Pichia pastoris* inibiu a *Salmonella* Typhimurium e *E. coli*, sendo que a *E. coli* foi mais sensível que *S. Typhimurium* à presença de *P. pastoris*.

Figura 10 - Análise do crescimento da *Salmonella* frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das Kombuchas comercial e caseira.



SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

Fonte: (Autora, 2023).

Embora os sobrenadantes tenham sido obtidos de leveduras, não foi feita a identificação, não sendo possível saber se são do mesmo gênero e espécie, além das kombuchas terem sido obtidas de forma diferentes, o que também pode levar a uma variação dos tipos de microrganismos presentes. De acordo com diferentes estudos, não existe um conjunto universal de microrganismos presentes nas kombuchas, mas entre os isolados de leveduras comumente encontrados, são citados diferentes espécies dos gêneros *Brettanomyces*; *Candida*; *Mycoderma*; *Mycotorula*; *Pichia*; *Saccharomyces*; *Schizosaccharomyces*; *Torula*; *Torulaspora*; *Torulopsis*;

Zygosaccharomyces; *Dekkera*, *Kloeckera*; *Saccharomycoides*; *Kloeckera*; *Kluyveromyces*; *Ludwigii* (GREENWALT et al., 2000; JAYABALAN, et al. 2014).

O potencial antimicrobiano dos sobrenadantes em relação às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* está demonstrado nas TAB. 3 e 4, respectivamente.

A bactéria *S. aureus* foi inibida por ambos sobrenadantes das leveduras, porém a SLIKCO apresentou inibição de crescimento nos quatro tempos de análise, e o SLIKCA a partir do tempo quatro. Os SLIKCO e SLIKCA também promoveram resultados significativos ($p < 0,05$) de inibição de crescimento em relação ao Controle de o *B. cereus* a partir das 4 horas de análise. Os sobrenadantes não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 3 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 14458.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458			
Tempo (h)	Controle (MDO $\pm$ DP)*	SLIKCO (MDO $\pm$ DP)*	SLIKCA (MDO $\pm$ DP)*
2	0,23 $\pm$ 0,02 ^a	0,26 $\pm$ 0,01 ^b	0,25 $\pm$ 0,01 ^{a,b}
4	0,56 $\pm$ 0,18 ^a	0,29 $\pm$ 0,00 ^b	0,29 $\pm$ 0,00 ^b
6	0,90 $\pm$ 0,30 ^a	0,33 $\pm$ 0,01 ^b	0,31 $\pm$ 0,01 ^b
8	1,05 $\pm$ 0,28 ^a	0,38 $\pm$ 0,03 ^b	0,33 $\pm$ 0,01 ^b

MDO: Média da Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

*Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: (AUTORA, 2023).

A inibição do *B. cereus* ocorreu a partir de 4 horas de análise não havendo diferenças estatísticas entre os sobrenadantes (TAB. 4).

Tabela 4 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das leveduras isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno *Bacillus cereus* ATCC 11778

<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778			
Tempo (h)	Controle (MDO ± DP)*	SLIKCO (MDO ± DP)*	SLIKCA (MDO ± DP)*
2	0,23± 0,04 ^a	0,26±0,00 ^a	0,22± 0,01 ^a
4	0,60±0,12 ^a	0,28 ±0,00 ^b	0,23±0,01 ^b
6	0,86 ± 0,28 ^a	0,30±0,17 ^b	0,25±0,00 ^b
8	0,97 ± 0,31 ^a	0,35±0,01 ^b	0,27±0,01 ^b

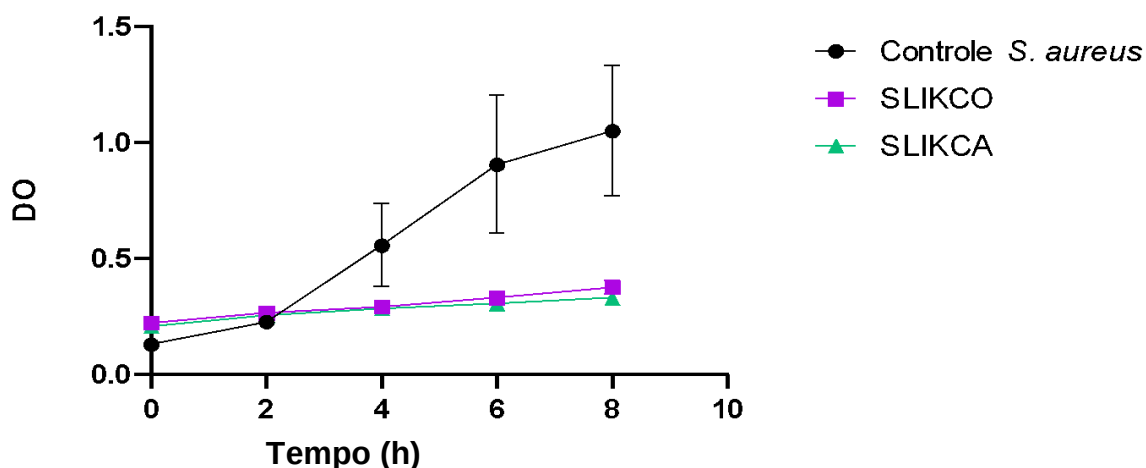
MDO: Média da Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

*Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Fonte: (Autora, 2023).

As FIG. 11 e 12 ilustram, respectivamente, o comportamento do *S. aureus* e do *B. cereus* na presença dos sobrenadantes. Salienta-se que a inibição do *S. aureus* por ambos sobrenadantes foi mantida durante todo o período de análise.

Figura 11 - Análise do crescimento da *S. aureus* frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das Kombuchas comercial e caseira.



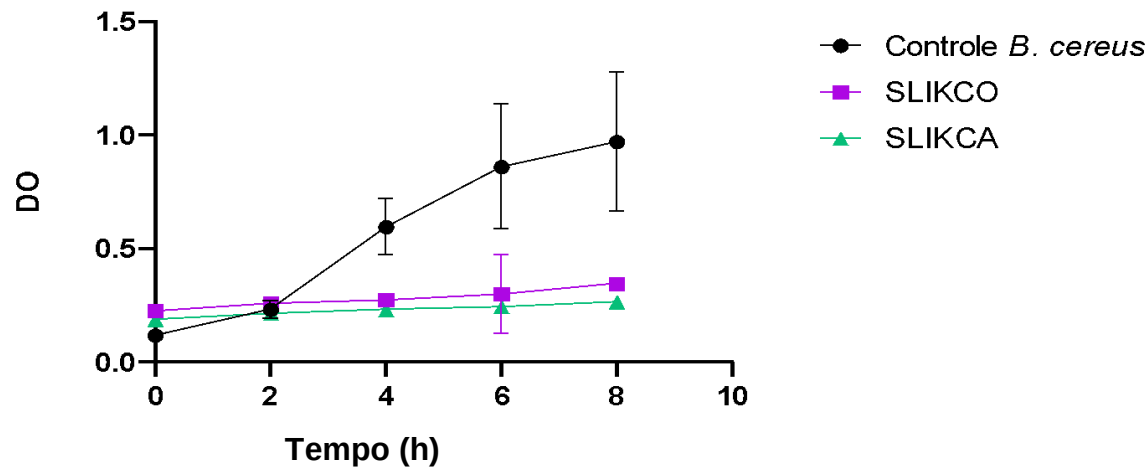
SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

Fonte: (Autora, 2023).

Younis *et al.* (2017) também demonstraram o potencial antimicrobiano da *S. cerevisiae* contra *S. aureus*, mas alegou que houve baixa atividade antimicrobiana.

Andrade Neto (2015) identificou um potencial antimicrobiano de extratos oriundos de espécies de leveduras isoladas de diferentes biomas no Ceará contra *S. aureus* resistente à metilicina (antibiótico betalactâmico de pequeno espectro pertencente ao grupo das penicilinas). Concluiu que um dos seus mecanismos de ação seria a produção de metabólitos secundários que promoveram a fragmentação do DNA bacteriano, levando à morte celular por apoptose. Os metabólitos identificados foram o hexahidro-3-(fenilmetil)-pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-dione e o ácido láurico (ANDRADE NETO, 2015).

Figura 12 - Análise do crescimento do *B. cereus* frente aos sobrenadantes das leveduras isoladas das Kombuchas comercial e caseira.



SLIKCO: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Comercial; SLIKCA: Sobrenadantes de Levedura Isolada da Kombucha Caseira.

Fonte: (Autora, 2023).

A atividade dos sobrenadantes de bactérias do ácido lático (BAL), apresentadas nas TAB. 5 e 6, demonstraram que o SBLIKCO obteve valor significativo ($p < 0,05$) de redução de crescimento em relação aos controles de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium somente no tempo de 2 horas.

Tabela 5 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias ácido lácticas isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno *Escherichia coli* ATCC 10536.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536			
Tempo (h)	Controle (MDO ± DP)*	SBLIKCO (MDO ± DP)*	SBLIKCA (MDO ± DP)*
2	0,47 ± 0,10 ^a	0,29 ± 0,01 ^b	0,36 ± 0,03 ^a
4	1,07 ± 0,21 ^a	0,89 ± 0,07 ^{a,b}	1,25 ± 0,01 ^{a,b}
6	1,23 ± 0,22 ^a	1,25 ± 0,07 ^a	1,45 ± 0,01 ^a
8	1,20 ± 0,18 ^a	1,35 ± 0,03 ^a	1,47 ± 0,01 ^b

MDO: Média das Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SBLIKCA: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Caseira. SBLICKO: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Comercial.

*Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: (Autora, 2023).

Tabela 6 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias ácido lácticas isoladas das Kombuchas Caseira e Comercial sobre o patógeno *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028			
Tempo (h)	Controle (MDO $\pm$ DP)*	SBLIKCO (MDO $\pm$ DP)*	SBLIKCA (MDO $\pm$ DP)*
2	0,59 $\pm$ 0,15 ^a	0,34 $\pm$ 0,02 ^b	0,44 $\pm$ 0,06 ^{a,b}
4	0,82 $\pm$ 0,11 ^a	0,90 $\pm$ 0,10 ^a	0,99 $\pm$ 0,03 ^a
6	1,01 $\pm$ 0,08 ^a	0,94 $\pm$ 0,06 ^a	1,17 $\pm$ 0,03 ^{a,b}
8	1,18 $\pm$ 0,08 ^a	1,29 $\pm$ 0,02 ^a	1,38 $\pm$ 0,02 ^b

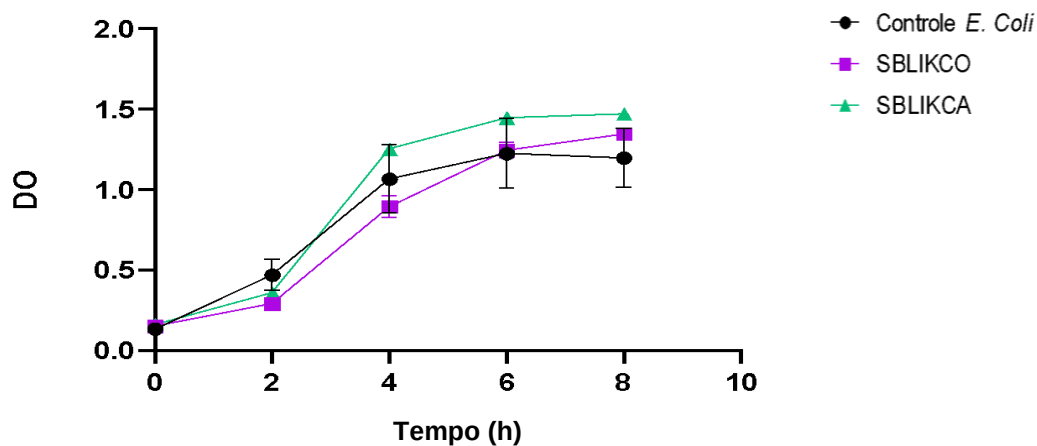
MDO: Média das Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SBLIKCA: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Caseira. SBLICKO: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Comercial.

*Para cada patógeno, valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si.

Fonte: (Autora, 2023).

O SBLIKCA não inibiu o crescimento de *E. coli* e *Salmonella* em nenhum momento, sendo que no tempo de oito horas, diferiu significativamente dos controles, apresentando maior crescimento para ambos os patógenos (FIG. 13 e 14).

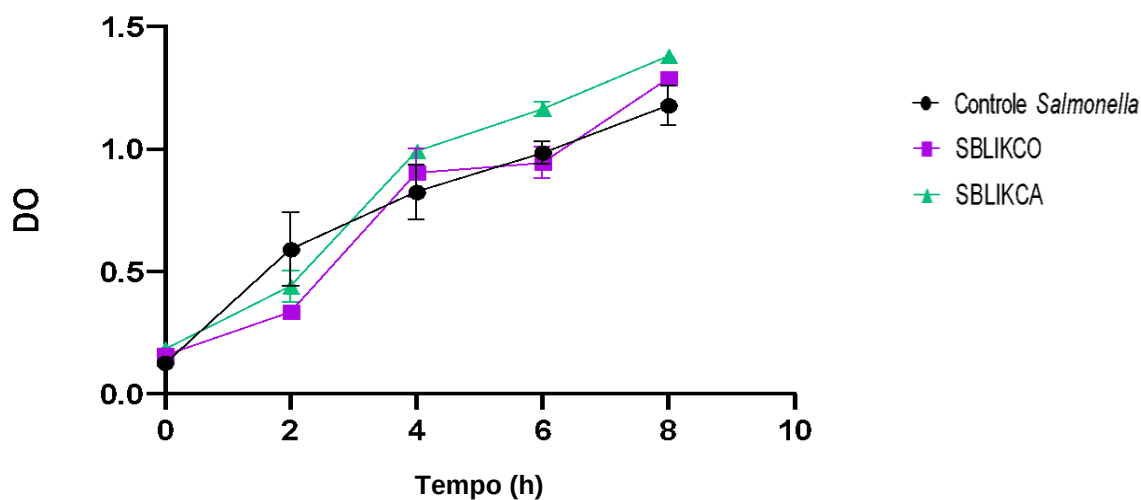
Figura 13 - Análise do crescimento da *E. coli* frente aos sobrenadantes das BAL isoladas das Kombuchas comercial e caseira.



SBLIKCA: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Caseira. SBLICKO: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Comercial.

Fonte: (Autora, 2023).

Figura 14 - Análise do crescimento da *Salmonella* frente aos sobrenadantes das BAL isoladas das Kombuchas comercial e caseira.



SBLIKCA: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Caseira. SBLICKO: Sobrenadantes de Bactéria ácido Lática Isolada da Kombucha Comercial.

Fonte: (Autora, 2023).

Na TAB. 7 verificou-se que o SBLIKCO não inibiu o crescimento de *S. aureus* e SBLIKCA inibiu apenas com 2 horas de análise.

Tabela 7 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias lácticas isoladas das Kombuchas caseira e comercial sobre o patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 14458.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458			
Tempo (h)	Controle (MDO ± DP)*	SBLIKCO (MDO ± DP)*	SBLIKCA (MDO ± DP)*
2	0,23 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,04 ^b
4	0,56 ± 0,18 ^a	0,48 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,20 ^a
6	0,90 ± 0,30 ^a	0,81 ± 0,05 ^a	0,65 ± 0,20 ^a
8	1,05 ± 0,28 ^a	1,03 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,02 ^a

MDO: Média das Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SBLIKCA: Sobrenadantes de Bactéria ácido Láctica Isolada da Kombucha Caseira. SBLICKO: Sobrenadantes de Bactéria ácido Láctica Isolada da Kombucha Comercial.

*Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Fonte: (Autora, 2023).

Pelos resultados de inibição de crescimento para *B. cereus* demonstrados na TAB. 8, verificou-se que não houve nenhum valor significativo para os SBLIKCO e SBLIKCA.

Tabela 8 - Valores Médios das Densidades Ópticas (MDO) e Desvio padrão (DP) do Controle (patógeno) e dos sobrenadantes obtidos das bactérias lácticas isoladas das Kombuchas caseira e comercial sobre o patógeno *Bacillus cereus* ATCC 11778.

<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778			
Tempo (h)	Controle (MDO ± DP)*	SBLIKCO (MDO ± DP)*	SBLIKCA (MDO ± DP)*
2	0,23 ± 0,04 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,00 ^a
4	0,60 ± 0,12 ^a	0,49 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,02 ^a
6	0,86 ± 0,28 ^a	0,91 ± 0,03 ^a	0,68 ± 0,09 ^a
8	0,97 ± 0,31 ^a	1,19 ± 0,03 ^a	0,76 ± 0,09 ^a

MDO: Média das Densidade Óptica; DP: Desvio padrão; SBLIKCA: Sobrenadantes de Bactéria ácido Láctica Isolada da Kombucha Caseira. SBLIKCO: Sobrenadantes de Bactéria ácido Láctica Isolada da Kombucha Comercial.

*Para cada patógeno, valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Fonte: (Autora, 2023).

De forma geral, os sobrenadantes das BAL não apresentaram potencial antimicrobiano contra os patógenos testados, apresentando atividade bem inferior aos sobrenadantes das leveduras para os dois tipos de kombucha avaliados. Novamente a falta de identificação das BAL de ambos sobrenadantes limitam a discussão sobre os achados. Os gêneros de BAL comumente encontrados nas kombuchas são de *Lactobacillus* e *Lactococcus* (SANTOS, 2016).

O resultado do presente estudo é contrário a estudos sobre o potencial antimicrobiano por BAL (CHIODA *et al.*, 2007; TUSSOLINI *et al.*, 2009; MACHADO, 2021). De 20 cepas de BAL isoladas de grãos e de leite fermentado por kefir, 90% possuíam ação antimicrobiana com diferentes intensidades frente a cepa de *Staphylococcus aureus*. Com a *Salmonella* Thiphymurium 85% das cepas foram capazes de inibir o crescimento. Apresentando também eficiência (95%) ao teste de inibição de crescimento de *Escherichia coli* (TUSSOLINI *et al.*, 2009).

Algumas espécies de BAL exercem atividade antibacteriana, devido a competição direta por nutrientes ou pela produção de compostos com efeitos antagônicos, como: ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, e bacteriocinas

(TUSSOLINI *et al.*, 2009). A capacidade da kombucha de inibir o crescimento de microrganismos patógenos é atribuída não somente ao seu baixo pH, como também à presença de ácido acético, ácidos orgânicos, catequinas, e outras substâncias que fazem parte de sua composição (WATAWANA *et al.*, 2015).

As BAL são capazes de excretar e sintetizar peptídeos com atividade antimicrobiana, as bacteriocinas. Esses peptídeos são sintetizados nos ribossomos das bactérias ácido láctica, com ação inibitória a microrganismos Gram-positivos patogênicos, como o *S. aureus* (GOMES, 2021). As bacteriocinas são em sua maioria, um grupo de substâncias proteicas geralmente termoestáveis com propriedades antimicrobianas, e acredita-se que o efeito das bacteriocinas seja baseado na ligação dos resíduos de fosfato presentes nas membranas celulares das células-alvo, criando poros e na ativação da autolisina que degrada as paredes celulares bacterianas (MACHADO, 2021).

Machado (2021) alega em seu trabalho que o ácido láctico é mais eficiente contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas, porém esta diferenciação não foi encontrada no presente estudo, uma vez que houve pequena inibição para as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *Salmonella* e para a Gram-positiva *S. aureus* e ausência de inibição para o *B. cereus* (Gram-positiva).

Chioda *et al.* (2007) estudou o efeito inibitório de *Lactobacillus acidophilus* sobre *Escherichia coli*, e relatou que a inibição do crescimento e atividade bactericida ocorreu devido à produção de ácido láctico e à redução do pH.

Vale salientar que os resultados obtidos se referem aos isolados das kombuchas e, portanto, faz-se necessário a identificação destes para maior compreensão dos mecanismos de inibição, bem como analisar a influência do pH dos sobrenadantes.

6 CONCLUSÃO

O método por microdiluição foi o único com êxito em demonstrar o potencial antimicrobiano dos microrganismos isolados da kombucha. Os sobrenadantes de leveduras foram capazes de inibir em diferentes tempos, as bactérias *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e *B. cereus*, com resultados melhores para a kombucha comercial, já que a caseira não inibiu a *E. coli*.

Os sobrenadantes das bactérias ácido lácticas tiveram um potencial antimicrobiano muito baixo com inibição em apenas um tempo da *E. coli* e *Salmonella* (sobrenadante da kombucha comercial) e inibição também em apenas um tempo, de *S. aureus* pelo sobrenadante da kombucha caseira.

Desta forma, sugere-se a continuidade das análises, inclusive testando outros isolados identificados como leveduras, bactérias ácido lácticas e acéticas, bem como a busca de identificação dos isolados para melhor compreensão de seus mecanismos de inibição.

7 REFERÊNCIAS

- ANDRADE NETO, J. B. *Atividade antimicrobiana de metabólitos secundários obtidos de leveduras ambientais do bioma cearense frente a cepas de bactérias patogênicas, incluindo Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: atividade antibacteriana e investigação do mecanismo de ação*. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- ANDRÉS-BARRAO, C.; SAAD, M. M.; CHAPPUIS, M.-L.; BOFFA, M.; PERRET, X.; ORTEGA, R. P.; BARJA, F. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. *Journal of Proteomics*, 76, 1701–1717, 2012.
- ALENCAR, B. F.; SOUZA, J. C.; OLIVEIRA, J. G. P.; SILVA, I. C. S.; BARBOSA, J. P.; TRINDADE, D. P. A.; NUNES, G. L.; TETTE, Patrícia A. S. Capítulo: Adequação de rótulos de Kombuchas comercializadas no Brasil. *Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos*, 1, 42 - 58, 2020.
- ANTOLAK, H.; KREGIEL, D. Acetic acid bacteria – taxonomy, ecology, and industrial application. *Zywnosc Nauka Technologia Jakosc*, 4, 21–35, 2015.
- BATTIKH, H.; CHAIEB, K.; BAKHROUF, A.; EMNA AMMAR, E. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha. *Journal of Food Biochemistry*, teas, 9, 1-6, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp. Brasília – DF, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019. Padrão de identidade e qualidade da Kombucha. *Diário Oficial da União*. Seção 1, Nº 181, 2019.
- BRUSCHI, J. S.; SOUSA, R. C. S.; MODESTO, K. R. O ressurgimento do chá de kombucha. *Revista de Iniciação Científica e Extensão*, 1, 162-168, 2018.
- CAMU, N.; DE WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; TAKRAMAKR, J.S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria populations involved in spontaneous heap fermentations of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1809 – 1824, 2007.
- CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A. B.; SUR, T. K.; MANDAL, S. C.; BHATTACHARYA, S. K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *J Ethnopharmacol*, 82, 229-237, 2002.
- CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72, 2016.

CHIODA, T.; SCHOCKEN-ITURRINOLL, R.; GARCIA, G.; PIGATTO, P.; RIBEIRO, C.; RAGAZZANI, A. V. F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, 37, 2, 583-585, 2007.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard—*Ninth Edition*. CLSI , M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CRETOVIC. D.; MARKOV, S.; DJURIC, M.; SAVIE, D.; VELICANSKI., A. Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. *Journal of Food Engineering*, 85, 387–392, 2008.

DAVIDSON, P.M.; TAYLOR, M.T. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 713–734, 2007.

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

ELOFF, J.N. A Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. *Planta Medica*, 64, 8, 711-713, 1998.

FAÚLA, L. L. Fatores de virulência, sorotipos e susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos no estado de Minas Gerais, Brasil. Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira. *Dissertação do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais*, 2016.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; TORRES, E. A. T.; SILVA. J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. *Revista Desafios*, 04, 2017.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. *Porto Alegre: Artmed*, p 216, 2002.

FERREIRA, G. M.; HONORATO, G. I. Os benefícios da kombucha na sociedade moderna: uma revisão da literatura. Universidade Anenhembí Morumbi. *Trabalho de Conclusão de Curso*, Bacharelado em Ciências biológicas, 2022.

FRANÇA, R. C. Avaliação do potencial probiótico da levedura *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado) - *Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial*. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection*, 63,7, 2000.

HANUŠOVÁ, K.; DOBIÁŠ, J.; KLAUDISOVÁ, K. Effect of packaging films releasing antimicrobial agents on stability of food products. *Czech J Food Sci.*, 27, 347–349, 2009.

HRNJEZ, D.; VAŠTAG, Ž.; MILANOVIĆ, S.; VUKIĆ, V.; ILIČIĆ, M.; POPOVIĆ, L. J.; KANURIĆ, K. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *J Funct Foods*, 10, 336–345, 2014.

ISO, ISO 15214/1998 - International Organization and Standardization, Microbiology of food and animal feeding stuffs – **Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria**, 1998.

IVANISOVÁ, E.; MENHARTOVÁ, K.; TERENTJEVA, M.; GODOCÍKOVÁ, L.; ÁRVAY, J.; KACÁNIOVÁ, M. Kombucha tea beverage: Microbiological characteristic, antioxidant activity, and phytochemical composition. *Acta Alimentaria*, 48, 324–331, 2019.

JAYABALAN R., MALBAŠA V., LONAR E.S, VITAS J.S; SATHISHKUMAR M. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538-550, 2014.

JUSTO, H. T. Atividade antibiótica de cepas de bactérias lácticas isoladas do kefir frente a *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* e *Salmonella Typhimurium*. UNICENTRO, 2009.

KAPP, J.M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Ann Epidemiol.*, 30, 66-70, 2019.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H., ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanolextracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol*, 85: 231-235. 2003.

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, J. H.; ESCALANTE-ABURTO, Ai. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - J Food.*,16, 390–399, 2018.

LENTZ, S. A. M. *Ocorrência de Bacillus cereus em surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados e investigados no município de Porto Alegre de 2003 a 2013*. Trabalho de Conclusão de Curso – Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

LIU, C.-H.; HSU, S.-H.; LEE F.-L.; LIAO, C.-C. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiol.*, 13,407–415, 1996.

MACHADO, J. C. Potencial probiótico e aspectos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e de kombucha. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - *Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

MALBAŠA, R.; LONCAR, E; DJURIC , M. Comparison of the products of kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem*, 106, 1039–1045, 2008.

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

MAYSER, P.; GROMME, S.; LEITZMANN, C.; GRUNDER, K. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. *Mycoses*, 38, 289 – 295, 1995.

MEDEIROS, S. C. G.; CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Kombucha: Efeitos in vivo e in vitro. *Infarma ciências farmacêuticas*, 31, 73-79, 2019.

MENDONÇA, G. R.; PEREIRA, A. L. F.; FERREIRA, A. G. N.; SANTOS-NETO, M.; DUTRA, R. P.; ABREU, V. K. G. Propriedades antioxidantes e efeitos antimicrobianos da kombucha: revisão da evidência científica. *Revista Contexto & Saúde*, 20, 40, 244-251, 2020.

MORAES, A. S. M.; SOUZA, V. R. S. Chá verde e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *REINPEC*, 2, 16, 216-225, 2016.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNESS, F. P., and K. ITO (ed), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4^a ed. American Association, Washington, D. C, 2001.

MOURA, A. B. *Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá mate*. Trabalho de conclusão do curso de nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 48 p., 2019.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT - Food Sci Technol*, 64, 2, 1149-1155, 2015.

OFORI, J.A.; OCLOOL, A.; OFORI, M.; DORLEKUL, W. P.; GBEWONYOL, W. S. K. Kombucha protects against arsenic-induced protein peroxidation in rats. *J Ghana Sci Assoc*, 16, 2, 2015.

OLIVEIRA, J. L.; ALMEIDA, C.; BOMFIM, N. S. A importância do uso de probióticos na saúde humana. *Unoesc & Ciência – ACBS.*, 8, 1, 7-12, 2017.

PALUDO, N. Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial. Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p., 2003

PURE, A. E.; MOFIDI, S. M. G.; KEYGHOBADI, F.; PURE, M. E. Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha. *Journal of Functional Foods*, 34, 347–355, 2017.

ROUSSIN, M. R. *Analyses of Kombucha ferments: report on growers*. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah, 104 p., 1996.

SANTOS, M. J. Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Gastronômicas, Universidade Nova de Lisboa, 2016.

SANTOS, Y. M. et al. Caracterização química de Kombucha a base de chás de hibisco e preto. *Revista Brasileira de Agrotecnologia.*, 8, 3, 32-37, 2018.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* , 26, 257 – 276, 2002.

SILVA, H. R.; GIANOGLU, F. M.; CAMPOS, M. F.; GRACIANO, E. M. A.; TOLEDO, R. C. C. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. *Higiene Alimentar* , 30, 262/263, 2016.

SILVA, V. S.; ORLANDELLI, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. *Revista UNINGÁ*, 56, 182 - 194, 2019.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2003.

SOLANO, A. G. R. Desenvolvimento de método microbiológico analítico para determinação de gramicidina em matéria-prima. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas*, 2009.

SOUZA, L. C. S.; FIOROTO, C. K. S. *Funcionalidade e Aplicação de kombucha em alimentos*. XI EPCC - Encontro internacional de produção científica, 2019.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2589–2594, 2000.

SUN T.; LI, J.; CHEN, C. Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *JFDA*, 23. 709-718, 2015.

TEOHA, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* , 95, 119 – 126, 2004.

TUSSOLINI, L.; JUSTO, T. H.; SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D. Atividade antibiótica de cepas de bactérias lácticas isoladas do kefir frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Typhimurim. *Anais da SIEPE – Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2009.

VINA, I.; SEMJONOV, P.; LINDE, R.; DENINA. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *J Med Food*, 17, 179-188, 2014.

WATAWANA, M.I., JAYAWARDENA, N., GUANAWARHANA, C.B.; WAISUNDARA, V.Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–11, 2015.

YOUNIS, G.; AWAD, A.; DAWOD, R. E.; YOUSEF, N. E. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary World*, 10, 8, 979–983, 2017.

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

ZUBAIDAH, E.; APRIYADI, T.E.; KALSUM, U.; WIDYASTUTI, E.; ESTIASIH, T., SRIANTA, I.; BLANC, P.J. In vivo evaluation of snake fruit kombucha as hyperglycemia therapeutic agent. *IFRJ*, 25, 453-457, 2018.