

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIENVELHECIMENTO DA KOMBUCHA EM
Drosophila melanogaster

Rafael Bernardes Ferreira

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AValiação da Atividade Antienvelhimento da Kombucha em
Drosophila melanogaster

Rafael Bernardes Ferreira

Carlos Ueira Vieira

Serena Mares Malta

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AValiação da Atividade Antienvelhimento da Kombucha em
Drosophila melanogaster

Rafael Bernardes Ferreira

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
Instituto de Biotecnologia – IBTEC

MSc. Serena Mares Malta
Instituto de Biotecnologia - IBTEC

Homologado pela Coordenação do Curso
de Biotecnologia em ____/____/_____

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia – MG

Julho – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIENVELHECIMENTO DA KOMBUCHA EM
Drosophila melanogaster

Rafael Bernardes Ferreira

Aprovado pela Banca Examinadora em: ____/____/____ Nota: ____

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Uberlândia, ____ de _____ de _____

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

AGRADECIMENTOS

A Deus, causa primeira de todas as coisas, e a Jesus, por tantas razões que, se fossem escritas uma por uma, o mundo não poderia conter os livros que se escreveriam. Ao meu anjo da guarda, por me suportar em todos os momentos, mas principalmente nas horas difíceis. A cada ser bem aventurado que fez valer a oração: “Onde houver Trevas, que eu leve a Luz!”

Aos meus pais, Marinês e José Antônio, por tudo e por tanto. Enumerar cada motivo de gratidão seria impossível, ainda que, com frequência, eu não saiba me expressar a respeito. À minha irmã, Isadora, pela parceria de sempre. Aos meus avós, Dalva e Valadares[†], Maria de Lourdes[†] e Manuel (o homem mais corajoso que conheci em vida), e à minha bisavó Ercília[†], a cada um por seu exemplo de missão cumprida. Aos meus primos Fabiana, Guilherme, Miguel e Fernanda, que me acolheram em casa para que eu pudesse fazer meu primeiro estágio. A toda a minha família.

À minha amada, Laura, que por tanto tempo jurei ser “apenas” mais uma grande amiga conhecida na graduação e nada além disso. Ledo e feliz engano. Por todo o seu amor, carinho, paciência, companheirismo e apoio, meu eterno “muito obrigado!”

A todos os amigos que estiveram presentes na minha trajetória. Em especial, aos meus amigos da B16 e aos “adotados” entre eles: a Ana Flávia, a Clara, a Vitória, o Danilo, o João Marcos e a Luiza, que me foram mais próximos, e a todos os demais. Ao Grupo Espírita Universitário (GEU), que conseguiu a proeza de reanimar minha fé e me erguer de volta do Abismo em mais de uma ocasião, e a cada amizade/irmandade dele nascida. Não me atrevo a nomear uma por uma, sob pena de me arriscar a deixar nomes importantes de fora, mas vale exceção para a Fabiana Soares, que, despretensiosamente e sem qualquer expectativa a esse respeito, me apresentou o objeto de estudo deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Genética (LabGen), com destaque para: meu orientador, o prof. Carlos; a profa. Ana Maria Bonetti, que sempre me tratou como filho; a Serena, que me “recrutou” e me apoiou inestimavelmente enquanto amiga e coorientadora; e a Letícia, que participou do meu “recrutamento” e acompanhou ativamente meu início. À equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LaBiBi), que me auxiliou na realização de alguns dos experimentos aqui descritos. Ao Dr. Fábio Bueno e a toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Solos e Micorrizas da Embrapa Cerrados, por todo o apoio e acolhimento durante meu estágio.

A todos os meus professores do Colégio Maria de Nazaré, do Colégio Gabarito, da Cultura Inglesa e da Universidade Federal de Uberlândia, que não me atrevo a listar nominalmente: sem a participação de vocês na minha formação, eu certamente não seria quem sou hoje e este trabalho jamais teria sido desenvolvido.

À Paróquia São José, onde construí minhas primeiras noções de espiritualidade, e a cada um que contribuiu para o meu crescimento espiritual e confiou em mim nos momentos em que o trabalho me chamou para lá, especialmente nos RSJ. Ao Núcleo Espírita Paulo e Estêvão, por ter me aberto as portas do trabalho de sopa, que foi fundamental durante a minha graduação e nos momentos em que as trevas mais me tentaram.

À minha psicóloga, Maria Auxiliadora, sem a qual a minha saúde mental teria desabado de vez em algum momento do curso (mas não necessariamente por causa dele). Pela excelente profissional que é e por ter me permitido encontrar respostas onde sequer parecia haver perguntas, meu “muito obrigado”!

A todos que, apesar de não se encontrarem aqui nomeados, estão devidamente registrados na memória.

RESUMO

A Kombucha é uma bebida probiótica obtida pela fermentação do extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras. É comumente produzida de forma caseira, e associada a uma série de reivindicações funcionais, mas há poucos estudos a respeito de suas propriedades, nenhum em humanos. Sabe-se, no entanto, que possui uma série de compostos com atividade antioxidante, além de vários microrganismos benéficos, e que diversos perfis podem ser obtidos. Graças a isso, a Kombucha se torna um alvo interessante para estudos sobre o envelhecimento. Para tanto, pode-se usar modelos animais, e a linhagem w^{1118} de *Drosophila melanogaster* foi preferida por apresentar alterações neurológicas associadas à idade. Observou-se que indivíduos tratados com Kombucha tiveram uma expectativa de vida média e uma atividade motora maiores que a de indivíduos não tratados. Não houve diferença significativa na fertilidade dos grupos, e índices satisfatórios de atividade antioxidante foram observados *in vitro*. A Kombucha pode e deve, portanto, ser melhor estudada a fim de se caracterizar mais detalhadamente sua atividade anti-envelhecimento.

PALAVRAS-CHAVE: Kombucha; envelhecimento; *Drosophila melanogaster*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. OBJETIVO GERAL.....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1. PREPARO DA KOMBUCHA	6
3.2. ANÁLISE DO pH DA KOMBUCHA	7
3.3. EXPANSÃO E TRATAMENTO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3.4. TESTE DE SOBREVIVÊNCIA.....	8
3.5. TESTE DE ESCALADA (TESTE RING)	9
3.6. TESTE DE FERTILIDADE.....	9
3.7. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TESTE FRAP)	9
3.8. ENSAIO DPPH	10
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5. CONCLUSÃO.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1. INTRODUÇÃO

A Kombucha, comumente produzida de forma caseira, é definida pela Instrução Normativa (IN) N° 41/2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como “a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas”, que deve ter o pH entre 2.5 e 4.2 e pode ter adição de frutas ou outros vegetais antes da etapa de fermentação. Diversas receitas podem ser encontradas em comunidades dedicadas à divulgação da bebida, e são frequentemente acompanhadas de reivindicações funcionais legalmente impedidas de constar em rótulos de Kombucha comercial (IN N° 41/2019 MAPA).

Os primeiros registros do consumo de Kombucha indicam sua origem na China, na região da Manchúria, por volta do ano 220 antes da Era Comum, quando já se acreditava em suas propriedades desintoxicantes. Por volta do ano 414, teria sido introduzida no Japão, a partir de onde chegou à Rússia por meio de rotas comerciais. No período imediatamente após a Segunda Guerra Mundial, foi levada para países como Alemanha, Itália, França e suas respectivas colônias, de modo que se popularizou no Ocidente a partir da segunda metade do século XX (JÚNIOR *et al.*, 2020; JAYABALAN *et al.*, 2014; HARTMANN *et al.*, 2000).

Desde então, a Kombucha se tornou uma bebida bastante popular em alguns nichos, e diversas receitas podem ser encontradas em comunidades interessadas em alimentação saudável. Um método de preparo comum consiste em reservar uma infusão açucarada de chá verde ou chá preto (*Camellia sinensis*) junto a uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras conhecida como SCOBY (do inglês, *Symbiotic Consortium Of Bacteria and Yeast*), por um período de 7 a 14 dias (AMARASINGHE *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2020). Vale ressaltar, no entanto, que não existe uma receita padrão, e que, em decorrência disso, as características do

produto final são extremamente diversas, uma vez que podem ser moduladas pelo modo de produção.

Ainda que se trate de uma bebida milenar, existem relativamente poucos estudos a respeito das propriedades gerais da Kombucha. No final de maio de 2022 o banco de dados internacional PubMed retornava apenas 234 resultados brutos para a busca pela palavra-chave “kombucha” publicados até o final de 2021, sem qualquer outro filtro aplicado. Apesar disso, nota-se um aumento no interesse científico pela bebida: a partir de 2013 o número bruto de publicações anuais foi sempre crescente, atingindo seu ápice em 2021, com 61 resultados retornados só para aquele ano (cerca de 26% do total até então). Ainda assim, não foi possível localizar quaisquer estudos em humanos (*Homo sapiens*), e Kapp & Sumner (2019) observaram o mesmo em uma revisão sistemática.

Não obstante, estudos com roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) já demonstraram que o tratamento com o chá fermentado contribui para a prevenção e o alívio de condições das mais diversas, principalmente doenças cardiovasculares (BELLASSOUED et al., 2015; LOBO & SHENOY, 2015; LOBO et al., 2017) e hepáticas (WANG et al., 2014; HYUN et al., 2016; JUNG et al., 2018; LEE et al., 2019; CARDOSO et al., 2021). Pode-se citar também estudos sobre diabetes (BHATTACHARYA et al., 2013; XU et al., 2022), síndrome do intestino permeável (PAKRAVAN et al., 2019), encefalomielite autoimune (HAGHMORAD et al., 2021) e sepse (WANG et al., 2021), todos com resultados positivos.

Entende-se que uma das causas dos efeitos profilático-terapêuticos da Kombucha é sua importante atividade probiótica aliada à diversidade microbiana que há entre diferentes amostras. Enquanto algumas pesquisas relataram maior prevalência de bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, (MARSH et al., 2014; FILIPPIS et al., 2018), *Acetobacter* (COTON et al., 2017; KAASHYAP et al., 2021) ou *Komagataeibacter* (VILLARREAL-SOTO et al.,

2020), outras apontam perfis bacterianos diferentes (REVA *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2022). Em termos de leveduras, cada um desses estudos também apontou um perfil particular, praticamente único, mas incluem-se *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Starmerella* e *Zygosaccharomyces* entre os gêneros dominantes identificados.

Apesar das diferenças observadas, parece haver um relativo consenso sobre a família Acetobacteraceae abranger a maioria (geralmente > 90%) das bactérias presentes no chá fermentado (GAGGIÀ *et al.*, 2018; ARIKAN *et al.*, 2020) e no SCOBY (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; HARRISON & CURTIN, 2021), bem como a maioria das leveduras identificadas pertence à família Saccharomycetaceae. Vale destacar que muitos desses microrganismos são capazes de passar pelo sistema digestivo e colonizar o intestino, onde liberam metabólitos que inibem microrganismos potencialmente patogênicos, contribuem para uma compensação dos sinais inflamatórios e favorecem um microambiente mais saudável, constituindo-se como probióticos com significativo potencial profilático-terapêutico (KAASHYAP *et al.*, 2021; PIHUROV *et al.*, 2021).

Essa atividade probiótica impacta diretamente na saúde geral do indivíduo, e uma das vias pelas quais isso ocorre é por meio do chamado eixo microbiota-intestino-cérebro, que pode ser definido pelo conjunto de interações moleculares e fisiológicas entre o trato digestivo e o sistema nervoso central ocasionadas em parte pelos processos metabólicos da microbiota intestinal, que oferece compostos com importante atividade biológica (LIU *et al.*, 2015; AGIRMAN *et al.*, 2021). Essas substâncias produzidas pelos microrganismos da Kombucha, e que também estão amplamente presentes no chá fermentado, são a outra causa atribuível para os efeitos observados em cada pesquisa.

No entanto, assim como ocorre com o perfil microbiológico, o perfil molecular da Kombucha também pode ser extremamente variado. Diferentes estudos obtiveram diferentes

resultados a esse respeito, mas os ácidos glicurônico, glucônico, D-sacárico-1,4-lactona (DSL), ascórbico, acético, succínico, láctico, cítrico e gálico figuram entre os identificados (KAEWKOD *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2020; DEGIRMENCIOGLU *et al.*, 2020; JAKUBCZYK *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2021). Também deve-se considerar que mesmo parâmetros semelhantes podem produzir perfis distintos. Cardoso *et al.* (2020), por exemplo, relataram concentrações de ácido acético tão baixas quanto 0.32 g/L, ao passo que Jakubczyk *et al.* (2020) observaram valores tão altos quanto 7.04 g/L, ambos em Kombucha produzida a partir de chá preto, fermentada por 7 a 8 dias.

Não obstante, sabe-se que, respeitada a diversidade de composições possíveis, os compostos orgânicos presentes no chá fermentado apresentam elevada atividade antioxidante. Ivanisová *et al.* (2020) relataram que Kombucha produzida a partir de chá preto apresentou concentração de polifenóis equivalente a cerca de 2,3 vezes a do chá *in natura*, e que sua atividade antioxidante foi multiplicada por cerca de 3,8 após a fermentação. Em função dessas características, a Kombucha se torna um alvo de interesse para a avaliação de propriedades terapêuticas relacionadas ao estresse oxidativo, que por sua vez é um dos principais fenômenos bioquímicos associados ao envelhecimento e está intimamente ligado a uma série de condições classicamente associadas à idade, a exemplo das doenças de Alzheimer e de Parkinson (YAN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020).

É sabido que o envelhecimento também é marcado por uma série de alterações fisiológicas e pela maior propensão ao desenvolvimento de diversas doenças ou disfunções, com destaque para as cardiovasculares, neurológicas, metabólicas e imunológicas (MARUZS *et al.*, 2019; LENNICKE & COCHEMÉ, 2020; LANANNA & MUSIEK, 2020). A Kombucha já foi avaliada no tratamento de muitas dessas condições em modelos animais, conforme anteriormente citado, mas foram encontrados poucos estudos que se propuseram a avaliá-las enquanto consequência do envelhecimento, e aqueles que o fizeram se utilizaram de

receitas com substratos pouco usuais (LUKASZEWSKA *et al.*, 2020; PERMATASARI *et al.*, 2021) ou partiram de uma perspectiva cosmética (PAKRAVAN *et al.*, 2018; ZIEMLEWSKA *et al.*, 2022).

A fim de avaliar os efeitos da Kombucha sobre o estresse oxidativo e o envelhecimento, pode-se utilizar modelos animais como a *Drosophila melanogaster*, também conhecida como mosca do vinagre ou mosca das frutas. Trata-se de um organismo modelo com baixo custo de manutenção, ciclo de vida curto, genoma compacto já mapeado e fácil manejo (PALUFF *et al.*, 2017; CHA *et al.*, 2019). Atualmente é empregada em estudos de múltiplas áreas, e diversas linhagens foram desenvolvidas para esse fim (PANCHAL & TIWARI, 2019; YI *et al.*, 2021; CHAOUHAN *et al.*, 2022). Apesar disso, até onde foi possível averiguar, não existem estudos publicados que se utilizam de *D. melanogaster* como modelo para avaliação da Kombucha.

Para ser empregada no referido estudo, chama atenção a linhagem w^{1118} , que apresenta perda da pigmentação vermelha típica dos olhos devido a uma mutação espontânea no gene *white*. Sabe-se que essa mutação produz também efeitos relacionados a alguns atributos neurológicos e ao processo de envelhecimento da mosca. Vale citar: degeneração progressiva da retina associada à idade (FERREIRO *et al.*, 2018), dificuldade de formação de memória olfativa, possivelmente relacionada a uma homeostase disfuncional do colesterol (MYERS *et al.*, 2021), e um padrão de deslocamento e locomoção mais constante em relação às linhagens propriamente selvagens (QIU & XIAO, 2018; XIAO & QIU, 2021), além de recuperação acelerada após anoxia (QIU *et al.*, 2017; XIAO & ROBERTSON, 2017). Essas características contribuem para tornar o modelo tão interessante e adequado ao estudo do envelhecimento.

Quando se considera o impacto do envelhecimento a nível individual e a dificuldade em se tratar uma parcela significativa dos elementos relacionados a ele, urge buscar por maneiras

eficazes de preveni-los e remediá-los. Nesse cenário, os produtos fermentados oferecem campo fértil para pesquisas, e entre eles a Kombucha se mostra particularmente promissora por ser já um alimento popular e não contar com derivados do leite, restritos a uma parcela da população (SZILAGYI & ISHAYEK, 2018). Isso posto, este estudo se propôs a avaliar a eficácia da Kombucha na melhoria da qualidade de vida durante o envelhecimento. Apesar de o modelo utilizado não ser vertebrado, a homologia entre a fisiologia humana e de *D. melanogaster* confere relevância ao estudo, e espera-se que os resultados obtidos contribuam positivamente na qualidade de vida de todos que tomarem conhecimento deles.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antienvelhecimento da Kombucha em *D. melanogaster*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o pH da Kombucha utilizada se enquadra nos padrões normativos;
- Avaliar se o consumo crônico de Kombucha interfere na longevidade da linhagem w^{1118} de *D. melanogaster*;
- Avaliar se o consumo crônico de Kombucha interfere nas capacidades motoras (habilidade de escalada) da linhagem w^{1118} de *D. melanogaster*;
- Avaliar se o consumo crônico de Kombucha interfere na fertilidade e na taxa de eclosão da linhagem w^{1118} de *D. melanogaster*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da Kombucha.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PREPARO DA KOMBUCHA

O método de preparo da Kombucha foi baseado no protocolo descrito por Urrutia *et al.* (2021), com modificações, e se assemelha a muitas receitas popularmente difundidas. Para a

primeira etapa do processo, foram preparados 1,8 L de infusão de chá verde (*Camellia sinensis*) contendo açúcar de cana a 100 g/L. Toda a infusão foi filtrada com algodão hidrófilo e acondicionada em recipientes de vidro contendo, cada um, um SCOBY e 0,2 L de Kombucha já pronta, utilizada como iniciador (10% do volume final), obtidos a partir de um mesmo cultivo caseiro. Por 168 horas, os recipientes foram mantidos abertos, cobertos apenas por um tecido *voil*, a fim de permitir que seu conteúdo permanecesse em condições aeróbias.

Passado esse período, iniciou-se a segunda etapa: 1,8 L do líquido obtido foram acondicionados em garrafas de vidro previamente esterilizadas por meio de autoclavagem e adicionadas de 200 gramas de banana (*Musa acuminata x Musa balbisiana*) madura picada. As garrafas foram então fechadas e lacradas, de modo a estabelecer condições anaeróbias em seu interior. Após 72 horas, foram resfriadas e mantidas a cerca de 6 °C até a utilização de seu conteúdo. A Kombucha obtida após esses procedimentos foi denominada, para fins experimentais, “Kombucha integral” (KI), e possui todos os microrganismos e compostos biologicamente ativos produzidos durante o preparo.

Para obtenção de um tratamento que apresentasse a mesma composição bioquímica da Kombucha e um teor reduzido de microrganismos em suspensão, alíquotas de Kombucha Integral foram coletadas em tubos Falcon de 15 ml e de 50 ml e centrifugadas por 10 minutos a 2400 rpm imediatamente antes do uso. O *pellet* formado foi desprezado, e o sobrenadante foi então coletado e utilizado nos experimentos, de modo que foi denominado, para fins experimentais, “Kombucha centrifugada” (KC).

3.2. ANÁLISE DO pH DA KOMBUCHA

No início e no fim da temporada de experimentos uma amostra de 50 ml de KI foi coletada em um Becker de vidro e testada com o uso de um pHmetro de Bancada com Compensação Automática de Temperatura (ATC) da marca Kasvi ®, com eletrodo de plástico

com sonda de temperatura, sensível à faixa de pH de 0 a 14, previamente calibrado com soluções padrão de pH 7,0 e 4,0, em temperatura ambiente.

3.3. EXPANSÃO E TRATAMENTO DE *Drosophila melanogaster*

As *D. melanogaster* da linhagem w^{1118} foram obtidas a partir de matrizes adquiridas do *Bloomington Drosophila Stock Center* com número de acesso BL#3605, e cultivadas em frascos de vidro de 325 ml contendo cerca de 75 ml de meio de fubá (fubá 73 g/L, fermento biológico seco 18 g/L, farinha de soja 10 g/L, ágar bacteriológico 6 g/L) adicionado de solução ácida (ácido propiônico 286,3 ml/L, ácido fosfórico 85% 28,8 ml/L) e de solução de Nipagin (Nipagin 100 g/L, ácido fosfórico 85% 2 ml/L, etanol q.s.p.). Os frascos contendo as moscas foram armazenados em estufa com fotoperíodo de 12 horas a 25 ° C.

Para realização dos experimentos, moscas com idade de até 72 horas pós-eclosão foram coletadas, distribuídas em grupos contendo 30 indivíduos cada um, e acondicionadas em frascos cilíndricos de plástico translúcido de 8 cm de altura por 3 cm de diâmetro. Cada frasco continha também 1 g de meio de purê enriquecido (purê de batata em pó Yoki 187,5 g/L, extrato de levedura 37 g/L, glicose 23,3 g/L, Nipagin 2 g/L). O grupo controle recebeu apenas o meio de purê enriquecido hidratado com 5 ml de água destilada (veículo), enquanto os grupos de tratamento receberam o meio de purê enriquecido hidratado com 5 ml de KC ou KI, respectivamente. A cada 48 horas as moscas sobreviventes foram transferidas para frascos com meio de tratamento novo.

3.4. TESTE DE SOBREVIVÊNCIA

Para o teste de sobrevivência, as moscas foram separadas por sexo, distribuídas e tratadas conforme descrito, em quintuplicata. A cada 48 horas, nas ocasiões de troca dos frascos, os indivíduos mortos foram manualmente contados, e os números obtidos foram registrados em valores de mortalidade diária absoluta até que não restaram espécimes vivos.

3.5. TESTE DE ESCALADA (TESTE RING)

O protocolo de escalada foi adaptado a partir do teste *Rapid Iterative Negative Geotaxis* (RING) proposto por Gargano *et al.* (2005). Machos foram distribuídos e tratados conforme descrito, em triplicata. No tempo de 21 dias após o início do tratamento, os grupos foram alocados em frascos vazios presos a uma raque e deixados por 20 minutos em aclimação em ambiente silencioso com iluminação direta. Em seguida, a raque contendo os frascos foi batida por 4 vezes contra a bancada e observada por 30 segundos. Esse procedimento foi filmado e repetido por 5 vezes, com 1 minuto de intervalo entre cada uma. Ao final, com uso do programa QuickTime Player ®, foi determinado o quadro exato de cada vídeo em que a raque estabilizou sobre a bancada. A partir desse quadro, por exatamente 8 segundos (480 quadros), foram contadas as moscas que atingiram a marca de 5 cm em cada frasco.

3.6. TESTE DE FERTILIDADE

Para o teste de fertilidade, as moscas foram distribuídas e tratadas conforme descrito, na proporção de machos:fêmeas igual a 1:1, em triplicata. Para a avaliação dos grupos sob tratamento agudo, a exposição ao tratamento foi de 24h, e foi considerada a oviposição realizada nesse período. Já para a avaliação dos grupos sob tratamento crônico, a exposição ao tratamento foi de 7 dias, com análise da oviposição nas 24 horas seguintes, em meio tratado. Após remoção das moscas adultas, os frascos foram preservados e, após 7 dias, foram contadas as pupas formadas em cada um. Após mais 3 dias, foram contadas as moscas eclodidas, e calculada a razão percentual entre o número de moscas adultas eclodidas e o número de pupas formadas.

3.7. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TESTE FRAP)

A capacidade antioxidante total foi determinada a partir de um protocolo adaptado do teste *Ferric Reducing Ability of Plasma* (FRAP) proposto por Benzie & Strain (1996), que avalia a capacidade da amostra de reduzir íons de Ferro, quantificada por espectrofotometria.

O ensaio foi realizado com o auxílio de uma microplaca de 96 poços translúcida, com cada amostra em quadruplicata. Foram adicionados 10 µL de KI e KC nos poços correspondentes e em seguida foram acrescentados 25 µL de água destilada e 250 µL de reagente FRAP (10 volumes de tampão acetato + 1 volume de TPTZ + 1 volume de Fe³⁺). Foi preparada também uma curva padrão de antioxidante Trolox e um branco, além de controles ácido ascórbico (Ác. Asc.) e ácido gálico (Ác. Gál.), ambos a 0,25 mg/mL.

Em seguida, a placa foi incubada por 6 minutos a 37 °C ao abrigo da luz, e a absorbância em cada poço foi lida em espectrofotômetro no comprimento de 593 nm. Após a leitura, os valores obtidos para o Trolox foram plotados de modo a se obter a equação da reta. A atividade antioxidante das amostras foi estabelecida em função de concentração (µmol) de Trolox equivalente por meio do cálculo a seguir, sendo A e B correspondentes à equação da curva padrão, e Abs_{amostra} o valor de cada amostra testada.

$$(\mu M Trolox eq) / L = \frac{Abs_{amostra} - B}{A}$$

3.8. ENSAIO DPPH

O ensaio DPPH realizado foi adaptado a partir do protocolo proposto por Sharma & Bhat (2009), que avalia a capacidade da amostra de inibir a atividade oxidante do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), quantificada por espectrofotometria.

O teste foi realizado com o auxílio de uma microplaca de 96 poços translúcida, com cada amostra em quadruplicata. Foram adicionados 75 µL de amostra (KI, KC, Ác. Asc. a 0,25

mg/mL ou Ác. Gál. a 25 mg/mL) nos poços correspondentes e em seguida foram acrescentados 225 µL de DPPH em cada um. O controle negativo foi feito com 75 µL de água destilada e 225 µL de DPPH. Também foram preparados brancos contendo 200 µL de água e 50 µL da amostra equivalente. A placa foi então incubada por 30 minutos a 30 °C ao abrigo da luz. Em seguida, os valores de absorbância na placa foram lidos em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm. A atividade antioxidante foi estabelecida em função da porcentagem de DPPH neutralizado, por meio da fórmula a seguir, sendo $Abs_{controle-}$ a absorbância do controle negativo e $Abs_{branco eq.}$ a absorbância do branco equivalente à amostra avaliada.

$$DPPH(\%) = \left[\frac{Abs_{controle-} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco eq.})}{Abs_{controle-}} \right] \times 100$$

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados no *software* GraphPad Prism ® (versão 8.0). As curvas produzidas para o teste de sobrevivência foram analisadas considerando o teste de Mantel-Cox, e a análise dos demais resultados foi realizada por ANOVA, com comparações múltiplas feitas pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH da Kombucha foi avaliado antes do início dos experimentos e após o término dos testes, a fim de atestar o padrão de qualidade do lote utilizado. Desprezado o segundo algarismo após a vírgula, nas duas medições o pH estabilizou em 3.5. Por não ter sido feita a titulação da acidez volátil, nem avaliada a graduação alcoólica, não é possível inferir que as amostras utilizadas se enquadram nos critérios definidos pela IN N° 41/2019 MAPA, que rege a produção de Kombucha comercial no Brasil. Vale ressaltar, no entanto, que o SCOBY e o iniciador empregados foram obtidos a partir de um cultivo caseiro estabelecido e não

representam uma produção industrial, de modo que o lote utilizado neste estudo não se encontra legalmente sujeito à referida instrução normativa.

Além disso, em um estudo sobre a manutenção das características da Kombucha após longos períodos de armazenamento, La Torre *et al.* (2021) consideraram que a faixa segura do pH da bebida destinada ao consumo humano vai de 2,5 a 4,2, o mesmo intervalo estabelecido pela IN N° 41/2019 MAPA. Complementarmente, o pH detectado foi considerado ideal no estudo conduzido por Mas *et al.* (2022) acerca das variações microbiológicas de Kombucha produzida industrialmente, o que permite concluir favoravelmente à sanidade do material utilizado. Em estudos futuros, no entanto, sugere-se que a acidez volátil e a graduação alcoólica também sejam analisadas.

Relativamente às análises *in vivo*, foi observado que as moscas tratadas com Kombucha tiveram uma taxa de sobrevivência maior que as do grupo tratado com água (controle), mas que não há diferença significativa entre os grupos tratados com KI e KC ($p > 0,05$). A curva de sobrevivência sob tratamento com KI foi significativamente diferente da curva de sobrevivência do grupo controle pelo teste de Mantel-Cox ($p < 0,001$), e resultado similar foi encontrado comparando KC e o controle ($p < 0,05$).

A diferença se torna graficamente observável a partir do tempo de 14 dias de tratamento, quando há cerca de 44% de sobrevivência nos grupos tratados, mas apenas 32% no grupo controle, e dura até o tempo de 30 dias, quando os grupos tratados com KI e KC apresentam cerca de 17% e 16% de sobrevivência, respectivamente, contra 6% no grupo controle. A maior diferença percentual é notada no tempo de 20 dias de tratamento, quando o grupo tratado com KI apresenta 38% de sobrevivência, contra cerca de 15% do grupo controle, conforme apresentado na Figura 1.

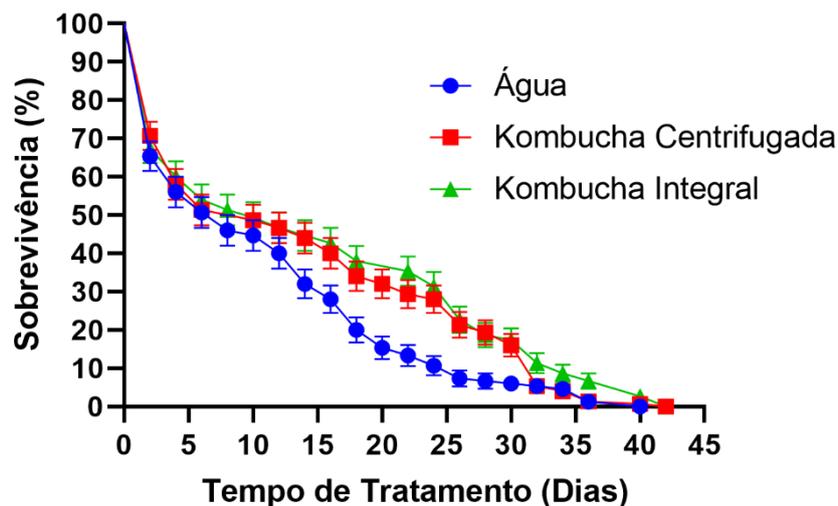


Figura 1: Curvas de sobrevivência de *D. melanogaster* tratadas com água (controle), Kombucha centrifugada (KC) e Kombucha integral (KI), com o erro padrão para cada dia de tratamento graficamente representado. Pode ser observada diferença estatística na sobrevivência de KC ($p < 0,05$) e de KI ($p < 0,001$) em relação ao controle, a qual é graficamente distinguível entre os tempos de 14 e de 30 dias. Análise feita pelo teste de Mantel-Cox.

Tendo em vista que a Kombucha apresenta uma série de compostos biologicamente ativos e uma diversidade de microrganismos com atividade probiótica, é possível supor que os efeitos observados no teste de sobrevivência possam ser atribuídos a um desses dois elementos de sua composição ou à atuação conjunta de ambos (IVANISOVÁ *et al.*, 2020; KAASHYAP *et al.*, 2021; PIHUROV *et al.*, 2021). No caso deste experimento, os resultados levam a crer que o componente bioquímico seja mais relevante que o microbiológico, já que não houve diferença significativa entre os resultados produzidos por KI e por KC.

Sabe-se que a Kombucha é rica em compostos fenólicos e ácidos orgânicos relacionados ao controle do estresse oxidativo, e que a presença dessas moléculas em produtos fermentados é uma das causas de suas propriedades biológicas. Algumas delas estão diretamente relacionadas aos processos fisiológicos de desintoxicação, e podem, em teoria, remediar processos nocivos relacionados ao envelhecimento e à toxicidade do ambiente quando administrados cronicamente (KAEWKOD *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2020; DEGIRMENCIOGLU *et al.*, 2020; JAKUBCZYK *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2021). O exemplo mais emblemático talvez seja o do ácido glicurônico, que já foi detectado em diferentes

amostras de Kombucha, e está diretamente relacionado ao metabolismo secundário de toxinas e outros xenobióticos, além de contribuir para a inibição de microrganismos potencialmente patogênicos (ANSARI *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-LEAL *et al.*, 2020).

Além do ácido glicurônico, pode-se citar também os ácidos glucônico, DSL, ascórbico, acético, succínico, láctico, cítrico e gálico (KAEWKOD *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2020; ZOU *et al.*; 2021), mas uma vez que as amostras de Kombucha utilizadas não foram testadas para determinar quais dessas substâncias estão presentes, não é possível afirmar com certeza qual ou quais delas foram mais importantes nos resultados obtidos. Análises qualitativas e quantitativas dos compostos presentes na Kombucha devem ser consideradas em estudos futuros, tendo em vista que mesmo lotes produzidos com parâmetros semelhantes podem apresentar perfis bioquímicos distintos, a exemplo dos resultados obtidos por Cardoso *et al.* (2020) e por Jakubczyk *et al.* (2020).

Relativamente ao teste de escalada, houve diferença significativa na comparação entre o grupo tratado com KI e o controle ($p < 0,01$), e entre os tratamentos com KI e KC ($p < 0,05$). Contrariamente ao observado no teste de sobrevivência, porém, não houve diferença entre KC e o controle ($p > 0,05$), de modo que apenas o grupo tratado com KI teve um desempenho maior em relação aos demais. Foi observada uma taxa de escalada média de 20,89% no grupo controle e de 24,22% no grupo tratado com KC, contra 34,89% no grupo tratado com KI, conforme ilustrado na Figura 2.

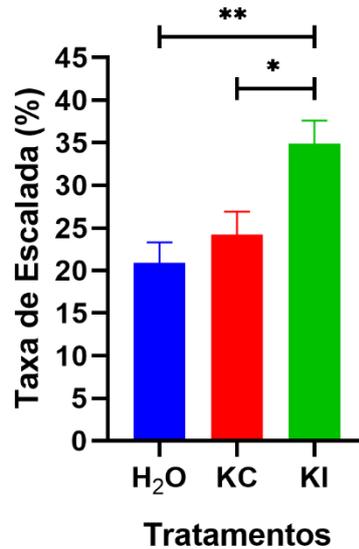


Figura 2: Comparação dos índices de escalada para cada grupo de tratamento no tempo de 21 dias. Não ocorre diferença entre o controle (H₂O) e o grupo tratado com Kombucha centrifugada (KC), mas o grupo tratado com Kombucha integral (KI) apresenta diferença em relação aos outros dois. Análise realizada por ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Tukey. Na comparação, * indica $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$.

Esse resultado aponta para uma maior importância da atividade microbiológica da bebida na atividade motora. Uma possibilidade é que o efeito produzido pelas moléculas orgânicas da Kombucha seja suficiente para aumentar a longevidade das moscas, mas com pouco impacto aparente na qualidade de vida, a qual deve contar com a presença dos microrganismos da bebida para sofrer influência. Isso poderia ser explicado pela relação direta existente entre o trato digestivo e o sistema nervoso, o chamado eixo microbiota-intestino-cérebro, e pela diversidade de microrganismos com atividade probiótica que compõem a Kombucha (IANNONE *et al.*, 2020; KAASHYAP *et al.*, 2021; PIHUROV *et al.*, 2021).

Ao colonizar o intestino, esses microrganismos contribuem para evitar a colonização por microrganismos patogênicos ou de qualidade inferior, bem como fornecem metabólitos relacionados à redução da inflamação e a um melhor aproveitamento de moléculas presentes nos alimentos (KAASHYAP *et al.*, 2021; PIHUROV *et al.*, 2021; AGIRMAN *et al.*, 2021). Em conjunto, tais efeitos são capazes de promover um relativo bem estar fisiológico, e diversos estudos já comprovaram a eficácia da administração crônica de probióticos no alívio

de condições neurológicas tão diferentes quanto doença de Alzheimer (BATISTA *et al.*, 2021; MALTA *et al.*, 2022) e epilepsia refratária (GÓMEZ-EGUÍLAZ *et al.*, 2018; IANNONE *et al.*, 2020). Apesar disso, este estudo não avaliou a composição microbiológica da Kombucha utilizada, de modo que essa se torna uma análise importante para estudos futuros.

Curiosamente, e contrariamente ao sugerido pelos demais ensaios *in vivo*, no teste de fertilidade não foi observada qualquer diferença significativa entre os controles e os tratamentos, fossem agudos ou crônicos ($p > 0,05$). O número de pupas formadas em cada frasco se manteve próximo entre os tratamentos de um mesmo tempo de análise. Na ordem de tratamentos apresentada na Figura 3, foram cerca de 45, 36, 37, 187, 263 e 228 pupas por frasco, respectivamente. Já as taxas de eclosão média por frasco foram, na mesma ordem de tratamentos, 89,40%, 96,88%, 100%, 91,79%, 86,68% e 94,84%, respectivamente.

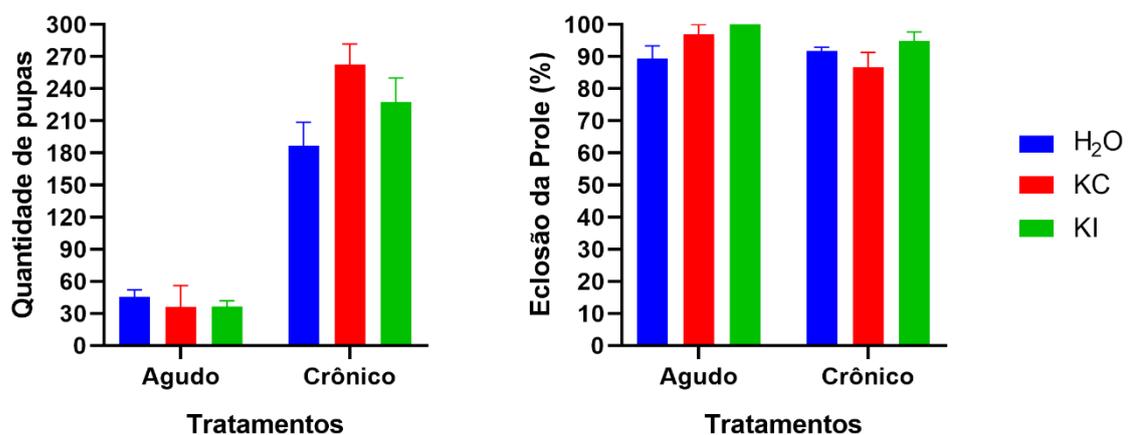


Figura 3: No gráfico à esquerda, comparação entre o número absoluto de pupas formadas em frascos de diferentes grupos de tratamento, quando tratados aguda ou cronicamente. No gráfico à direita, comparação entre as taxas de eclosão da prole de diferentes grupos de tratamento, quando tratados aguda ou cronicamente. Não há diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de avaliação ($p > 0,05$). Análises realizadas por ANOVA.

Relativamente à aparente falta de efeito, positivo ou negativo, da Kombucha sobre a fertilidade das moscas, pode-se considerar duas hipóteses. A primeira delas diz respeito à possibilidade de que a Kombucha de fato não exerça qualquer influência direta sobre a aptidão reprodutiva dos indivíduos tratados. Isso implicaria em assumir que nem os

compostos presentes no produto da fermentação e nem os microrganismos típicos dele atuam de forma benéfica ou nociva sobre o sistema reprodutor dos parentais tratados ou sobre a sobrevivência dos ovos e larvas imersos no meio tratado.

Outra hipótese bastante provável diz respeito aos tempos escolhidos para a avaliação. Apesar de os testes de sobrevivência e de escalada terem produzido resultados positivos, ambos foram analisados levando em conta períodos de tratamento de ao menos 21 dias, já que tempos menores produziram diferenças muito discretas ou estatisticamente desprezíveis no caso do teste de sobrevivência. Para o teste de fertilidade, optou-se por um intervalo de tratamento crônico menor, dado o temor de que a mortalidade associada à idade das moscas pudesse alterar significativamente a proporção de machos e fêmeas em cada frasco, de modo a produzir resultados distorcidos. No entanto, o tempo de tratamento mais curto pode justamente ter ocultado um possível efeito da Kombucha sobre a fertilidade das moscas, que só viria a se tornar detectável em um intervalo de tratamento maior. A fim de avaliar essa possibilidade, estudos futuros devem considerar maneiras de tratar os indivíduos por períodos mais longos.

Já os testes FRAP e DPPH tiveram por objetivo analisar diretamente a atividade antioxidante da Kombucha *in vitro*. No teste FRAP, foi observada uma atividade redutora de cerca de 452,17 ($\mu\text{mol Trolox eq.}$)/L na KC, ao passo que para KI o valor obtido foi cerca de 462,01 ($\mu\text{mol Trolox eq.}$)/L. Não houve diferença significativa entre as duas amostras ($p > 0,05$), e a atividade delas foi significativamente menor que a do ácido ascórbico ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). O ácido gálico a 25 mg/mL teve atividade redutora de 893,15 ($\mu\text{mol Trolox eq.}$)/L, apresentando uma diferença significativa em relação a todos os outros tratamentos, inclusive o ácido ascórbico ($p < 0,0001$).

Já no teste DPPH, tanto os tratamentos quanto os controles apresentaram elevada atividade de inibição do DPPH, com KI apresentando o menor valor, de 86,80%. KC apresentou inibição de 91,62%, ao passo que o ácido ascórbico a 25 mg/ml e o ácido gálico a 25 mg/ml inibiram o DPPH em 95,51% e 94,48%, respectivamente. Não há diferença significativa entre essas três amostras, mas a diferença entre elas e KI é significativa, seja na comparação com KC ($p < 0,05$) ou com os controles ($p < 0,001$). O resultado dos testes FRAP e DPPH estão ilustrados na Figura 4.

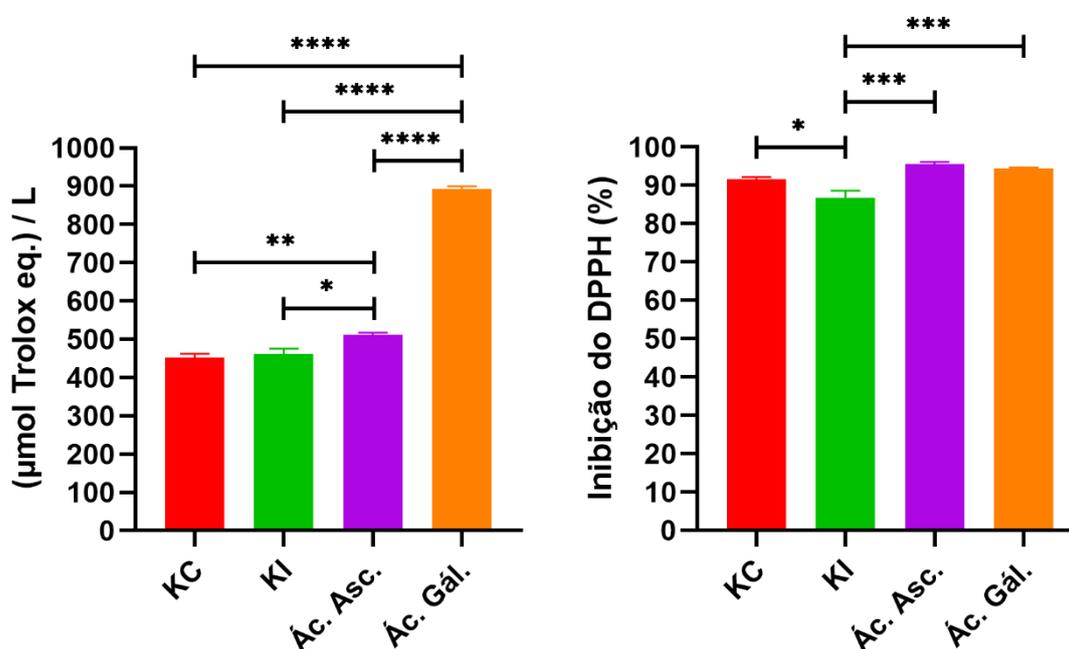


Figura 4: No gráfico à esquerda, comparação entre a atividade redutora de cada amostra, em termos de ($\mu\text{mol Trolox eq./L}$). Observa-se uma grande diferença da atividade do ácido gálico em relação a todas as outras amostras, inclusive na comparação com o ácido ascórbico. Também ocorre diferença entre o ácido ascórbico e as Kombuchas, embora menor. No gráfico à direita, comparação entre a inibição percentual do DPPH de cada amostra. Observa-se uma diferença negativa discreta, porém significativa, entre KI e todas as demais amostras. Apesar dessas diferenças, todas as amostras analisadas apresentaram elevada atividade antioxidante. Análises realizadas por ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Tukey. Nas comparações, * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ e **** indica $p < 0,0001$.

Apesar de todas as diferenças observadas, é importante notar que a Kombucha apresentou elevada atividade antioxidante, comparável à ordem de grandeza de ao menos um dos controles nos dois testes. No caso do FRAP, por exemplo, todos os tratamentos apresentaram atividade redutora maior que 450 ($\mu\text{mol Trolox eq./L}$). Complementarmente, o teste DPPH constatou uma atividade maior que 85% para todos os tratamentos, e apenas o resultado de KI

foi estatisticamente menor que os demais. Essa discrepância pode ser explicada pela presença de microrganismos no tratamento, os quais podem ter compensado parcialmente o efeito dos compostos presentes no líquido por meio de seus próprios processos fisiológicos, mas não foram encontrados estudos que deem suporte a essa hipótese, de modo que se faz necessário averiguá-la com maior profundidade em estudos vindouros.

Acerca dos elevados valores obtidos, Jakubczyk *et al.* (2020) obtiveram cerca de 88,23% de inibição do DPPH com Kombucha produzida a partir de chá verde fermentada por 14 dias, valor corroborado pelos resultados aqui apresentados. Ainda que o lote utilizado neste experimento não tenha sido testado para averiguar quais substâncias estão presentes, é possível supor que uma diversidade de moléculas presentes na bebida, principalmente compostos fenólicos e ácidos orgânicos, estejam relacionados à atividade antioxidante. No mesmo estudo conduzido por Jakubczyk *et al.* (2020), o conteúdo total de polifenóis da Kombucha de chá verde fermentada por 14 dias foi estabelecido em 320,1 mg/L, e para todos os tipos de chá empregado os valores foram diretamente proporcionais ao tempo de fermentação.

Complementarmente, Kaewkod *et al.* (2019) também avaliaram a presença de compostos antioxidantes no produto da fermentação, e observaram concentrações de cerca de 10,42 g/L de ácido acético e 41,42 g/L de ácido glucônico, além de concentrações menores de ácido ascórbico (0,61 g/L), ácido glicurônico (1,37 g/L) e DSL (3,44 g/L). O mesmo estudo avaliou a atividade antioxidante da Kombucha em termos de concentração de ácido gálico equivalente (mg GAE eq./mL), e o valor obtido para Kombucha de chá verde fermentada por 15 dias foi de cerca de 2,642 (mg GAE eq.)/mL. Esse valor contrasta com o obtido por Cardoso *et al.* (2020), que relataram cerca de 0,70 (mg GAE eq.)/mL, mas os dois experimentos chamam atenção, na medida em que o ácido gálico foi utilizado nesta pesquisa a uma concentração

consideravelmente mais baixa (0,25 mg/ml) e ainda assim não teve sua atividade alcançada pela KI.

Independente desse questionamento, no entanto, é possível supor que os resultados obtidos nos testes FRAP e DPPH sejam capazes de explicar o efeito observado no teste de sobrevivência, em que as moscas tratadas com Kombucha tiveram uma taxa de sobrevivência maior entre o 14º e o 30º dia do experimento, quando comparadas aos controles. Uma análise capaz de confirmar ou refutar essa hipótese seria um teste de atividade antioxidante *in vivo*. Sugere-se também que novos estudos acerca das propriedades antioxidantes da Kombucha levem em conta análises qualitativas e quantitativas dos compostos da bebida, a fim de que as devidas correlações possam ser traçadas de modo mais detalhado.

5. CONCLUSÃO

A Kombucha aumentou a taxa de sobrevivência e a atividade motora das moscas. Além disso, não foi observada qualquer influência na fertilidade, e pôde ser constatada uma atividade antioxidante considerável, embora inferior à dos controles utilizados. Tais resultados apontam para uma boa atividade antienvhecimento da Kombucha sobre as moscas, seja graças ao componente molecular ou pelo microbiológico, e testes mais detalhados devem ser realizados a fim de caracterizar melhor as vias pelas quais esse efeito se concretiza.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIRMAN, G. *et al.* Signaling inflammation across the gut-brain axis. **Science**, v. 374, n. 6571, p. 1087-1092, Nov. 2021.

AMARASINGHE, H. *et al.* Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, Fev. 2018.

ANSARI, F. *et al.* Evaluation of the Glucuronic Acid Production and Antibacterial Properties of Kombucha Black Tea. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 985-990, 2019.

ARIKAN, M. *et al.* Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 455-464, Fev. 2020.

BATISTA, L. L. *et al.* Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, Mai. 2021.

BELLASSOUED, K. *et al.* Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, Mai. 2015.

BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, Jul. 1996.

BHATTACHARYA, S. *et al.* Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328-340, Out. 2013.

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

CARDOSO, R. R. *et al.* Kombuchas from green and black teas reduce oxidative stress, liver steatosis and inflammation, and improve glucose metabolism in Wistar rats fed a high-fat high-fructose diet. **Food & Function**, v. 12, n. 21, p. 10813-10827, Nov. 2021.

CHA, S. J. *et al.* The Drosophila Model: Exploring Novel Therapeutic Compounds against Neurodegenerative Diseases. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 623-635, Dez. 2019.

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

CHAOUHAN, H. S. *et al.* Calycosin Alleviates Paraquat-Induced Neurodegeneration by Improving Mitochondrial Functions and Regulating Autophagy in a Drosophila Model of Parkinson's Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 222-249, Jan. 2022.

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

DEGIRMENCIOGLU, N. *et al.* Impact of tea leaves types on antioxidant properties and bioaccessibility of kombucha. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 6, p. 2304-2312, Jun. 2021.

FERREIRO, M. J. *et al.* *Drosophila melanogaster* White Mutant w^{1118} Undergo Retinal Degeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, Jan. 2018.

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

GAGGIÀ, F. *et al.* Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1-22, Jan. 2019.

GARGANO, J. W. *et al.* Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in Drosophila. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386-395, Mai. 2005.

GÓMEZ-EGUÍLAZ, M. *et al.* The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 6, p. 875-881, Dez. 2018.

HAGHMORAD, D. *et al.* Kombucha ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of Treg and Th2 cells. **Acta Neurologica Belgica**, v. 121, n. 6, p. 1685-1692, Dez. 2021.

HARRISON, K. & CURTIN, C. Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1060-1080, Mai. 2021.

HARTMANN, A. M. *et al.* Effects of Chronic Kombucha Ingestion on Open-field Behaviors, Longevity, Appetitive Behaviors, and Organs in C57-BL/6 Mice: A Pilot Study. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 755-761, Set. 2000.

HYUN, J. *et al.* Kombucha Tea Prevents Obese Mice from Developing Hepatic Steatosis and Liver Damage. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 861-866, Jun. 2016.

IANNONE, L. F. *et al.* The potential role of interventions impacting on gut-microbiota in epilepsy. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 423-435, Abr. 2020.

IVANISOVÁ, E. *et al.* The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 5, p. 1840-1846, Mai. 2020.

JAKUBCZYK, K. *et al.* Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 447-461, Mai. 2020.

JAYABALAN, R. *et al.* A Review on Kombucha Tea - Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, Jun. 2014.

JUNG, Y. *et al.* Effect of Kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 261-267, Fev. 2019.

JÚNIOR, J. C. S. *et al.* Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 360-365, Fev. 2022.

KAASHYAP, M. *et al.* Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4446-4460, Dez. 2021.

KAEWKOD, T. *et al.* Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 700-717, Dez. 2019.

KAPP, J. M. & SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66-70, Fev. 2019.

LANANNA, B. V. & MUSIEK, E. S. The wrinkling of time: Aging, inflammation, oxidative stress, and the circadian clock in neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 139, Jun. 2020.

LA TORRE, C. *et al.* Effects of Long-Term Storage on Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Kombucha from Black Tea. **Molecules**, v. 26, n. 18, Set. 2021.

LEE, C. *et al.* Hepatoprotective Effect of Kombucha Tea in Rodent Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, Mai. 2019.

LENNICKE, C. & COCHEMÉ, H. M. Redox signalling and ageing: insights from *Drosophila*. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 2, p. 367-377, Abr. 2020.

LIU, X. *et al.* Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 36, p. 7885-7895, Set. 2015.

LOBO, R. O. & SHENOY, C. K. Myocardial potency of Bio-tea against Isoproterenol induced myocardial damage in rats. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4491-4498, Ago. 2014.

LOBO, R. O. *et al.* Bio-tea prevents membrane destabilization during Isoproterenol-induced myocardial injury. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 5, n. 3, p. 146-154, Jul.-Set. 2017.

LUKASZEWSKA, Z. N. *et al.* Effect of Fermentation Time on Antioxidant and Anti-Ageing Properties of Green Coffee Kombucha Ferments. **Molecules**, v. 25, n. 22, Nov. 2020.

MALTA, S. M. *et al.* Identification of bioactive peptides from a Brazilian kefir sample, and their anti-Alzheimer potential in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, Jun. 2022.

MARSH, A. J. *et al.* Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, Abr. 2014.

MARTÍNEZ-LEAL, J. *et al.* Recent Evidence of the Beneficial Effects Associated with Glucuronic Acid Contained in Kombucha Beverages. **Current Nutrition Reports**, v. 9, n. 3, p. 163-170, Set. 2020.

MARUZS, T. *et al.* On the Fly: Recent Progress on Autophagy and Aging in *Drosophila*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. 140, Jul. 2019.

MAS, P. *et al.* Evolution in Composition of Kombucha Consortia over Three Consecutive Years in Production Context. **Foods**, v. 11, n. 4, p. 614-627, Fev. 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Gabinete da Ministra. **Instrução Normativa nº 41/2019, de 17 de setembro de 2019**. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao->

1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-41-de-17-de-setembro-de-2019.pdf/view. Acesso em: 08 jan. 2022.

MYERS, J. L. *et al.* Mutants of the white ABCG Transporter in *Drosophila melanogaster* Have Deficient Olfactory Learning and Cholesterol Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, Nov. 2021.

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

PAKRAVAN, N. *et al.* Filtered Kombucha tea ameliorates the leaky gut syndrome in young and old mice model of colitis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1158-1165, Out. 2019.

PALUFF, K. *et al.* A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 76, n. 2, p. 145–162, Set. 2016.

PANCHAL, K. & TIWARI, A. K. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1331–1345, Mai. 2017.

PERMATASARI, H. K. *et al.* Kombucha tea from seagrapes (*Caulerpa racemosa*) potential as a functional anti-ageing food: in vitro and in vivo study. **Heliyon**, v. 7, n. 9, Set. 2021.

PIHUROV, M. *et al.* Novel Insights for Metabiotics Production by Using Artisanal Probiotic Cultures. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2184-2209, Out. 2021.

QIU, S. & XIAO, C. Walking behavior in a circular arena modified by pulsed light stimulation in *Drosophila melanogaster* w^{1118} line. **Physiology & Behavior**, v. 188, p. 227-238, Mai. 2018.

QIU, S. *et al.* Different age-dependent performance in *Drosophila* wild-type Canton-S and the white mutant w^{1118} flies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 206, p. 17-23, Abr. 2017.

REVA, O. N. *et al.* Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. **AMB Express**, v. 5, n. 35, Jun. 2015.

SHAHBAZI, H. *et al.* Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 8, p. 2568-2577, Out. 2018.

SHARMA, O. P. & BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, Abr. 2009.

SZILAGYI, A. & ISHAYEK, N. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. **Nutrients**, v. 10, n. 12, Dez. 2018.

TAN, W. C. *et al.* Influence of Storage Conditions on the Quality, Metabolites, and Biological Activity of Soursop (*Annona muricata*. L.) Kombucha. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, Dez. 2020.

URRUTIA, M. A. D. *et al.* Effects of supplementation with kombucha and green banana flour on Wistar rats fed with a cafeteria diet. **Heliyon**, v. 7, n. 5, Mai. 2021.

VILLARREAL-SOTO, S. A. *et al.* Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, n. Nov. 2020.

WANG, P. *et al.* Kombucha ameliorates LPS-induced sepsis in a mouse model. **Food & Function**, v. 12, n. 20, p. 10263-10280, Out. 2021.

WANG, X. *et al.* The Role of Exosomal microRNAs and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, Out. 2020.

WANG, Y. *et al.* Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 265-272, Jan. 2014.

XIAO, C. & ROBERTSON, R. M. White - cGMP Interaction Promotes Fast Locomotor Recovery from Anoxia in Adult *Drosophila*. **PLoS One**, v. 12, n. 1, Jan. 2017.

XIAO, C. & QIU, S. Frequency-specific modification of locomotor components by the white gene in *Drosophila melanogaster* adult flies. **Genes, Brain and Behavior**, v. 20, n. 2, Fev. 2021.

XU, S. *et al.* Kombucha Reduces Hyperglycemia in Type 2 Diabetes of Mice by Regulating Gut Microbiota and Its Metabolites. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 754-771, Mar. 2022.

YAN, M. G. *et al.* Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90-101, Set. 2013.

YANG, J. *et al.* Microbial and Chemical Profiles of Commercial Kombucha Products. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 670-686, Fev. 2022.

YI, Y. *et al.* *Drosophila* as an emerging model organism for studies of food-derived antioxidants. **Food Research International**, v. 143, Mai. 2021.

ZIEMLEWSKA, A. *et al.* Evaluation of Cosmetic and Dermatological Properties of Kombucha-Fermented Berry Leaf Extracts Considered to Be By-Products. **Molecules**, v. 27, n. 7, Abr. 2022.

ZOU, C. *et al.* Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. **Food Chemistry**, v. 363, Nov. 2021.