

Universidade Federal de Uberlândia - UFU

MARCO TÚLIO SIMÃO

Análise de metabólitos em kombuchas caseiras e comerciais por meio de Ressonância Magnética Nuclear.

Uberlândia - MG

2023

MARCO TÚLIO SIMÃO

Análise de metabólitos em kombuchas caseiras e comerciais por meio de Ressonância Magnética Nuclear.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao curso de licenciatura em química da Universidade Federal de Uberlândia a ser utilizado como requisito para obtenção do título em licenciado em química.

Orientador: Dr. Welington de Oliveira Cruz

Uberlândia - MG

2023

MARCO TÚLIO SIMÃO

Análise de metabólitos em kombuchas caseiras e comerciais por meio de Ressonância Magnética Nuclear.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao curso de licenciatura em química da Universidade Federal de Uberlândia a ser utilizado como requisito para obtenção do título em licenciado em química.

Banca examinadora

Professor. Dr. Deivid Márcio Marques

Doutorando Raul Marques Novaes

Uberlândia, junho de 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Curso de Graduação em Química - Uberlândia
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1A, Sala 1A235 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4103/4178 - coliq@iqufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Química: Licenciatura				
Defesa de:	GQL042 - Trabalho de Conclusão de Curso				
Data:	28/06/2023	Hora de início:	9:00	Hora de encerramento:	11:10
Matrícula do Discente:	11511QMI216				
Nome do Discente:	Marco Túlio Simão				
Título do Trabalho:	Análise de Metabólitos em Kombuchas Comerciais e Caseira por meio de Ressonância Magnética Nuclear				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala de Reuniões do Instituto e videoconferência (Google Meet), Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, assim composta: Professores: Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz (IQUFU) orientador(a) do(a) candidato(a), Prof. Dr. Deividi Marcio Marques (IQUFU), Prof. Ms. Raul Marques Novais (USP).

Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa, Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a) Nota 90

OU

Aprovado(a) sem nota.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Wellington de Oliveira Cruz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/06/2023, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Deividi Marcio Marques, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/06/2023, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raul Marques Novais, Usuário Externo**, em 29/06/2023, às 09:57, 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 https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4587633** e o código CRC **1417AD69**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e todos os meus familiares pela compreensão, paciência e ombro amigo. Aos meus amigos que se faziam mais presentes que a própria família no cotidiano e que levarei comigo para o resto da minha vida. A Deus por manter sempre viva a fé e a perseverança. Aos professores que marcaram minha trajetória, em especial ao meu orientador Wellington pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos com tanto empenho e pela colega Tiara, pelo apoio e paciência no desenvolvimento de partes desse trabalho. A todos sou muito grato, sem dúvidas vocês também fazem parte dessa conclusão!

SIMÃO, Marco Túlio. **Análise de metabólitos em kombuchas caseiras e comerciais por meio de Ressonância Magnética Nuclear**. 2023. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2023.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) os metabólitos formados em amostras de kombucha caseira e comercial ambas preparadas a partir de um mesmo substrato inicial, chá verde, porém as amostras comerciais de diferentes sabores, sendo eles: uva branca, limão com gengibre, morango com hibisco, capim limão e maracujá com açafrão e a caseira de um único sabor, capim limão. Os estudos dos metabólitos foram precedidos por estudos da proporção entre a amostra e o solvente e estudo do experimento de supressão para otimizar a obtenção de picos de maior intensidade e qualidade nos espectros de RMN e assim poder discuti-los. As particularidades de cada amostra foram confrontadas a fim de entender as diferenças existentes entre os metabólitos encontrados, diferenças essas como quantidade de açúcares, ácido acético, etanol, capacidade antioxidante. Os resultados indicaram variações sutis nos metabólitos entre as kombuchas, tanto entre os sabores comerciais, quanto entre a amostra comercial e a caseira, o que pode ser explicado pelo fato do produto utilizado para saborizar já trazer consigo metabólitos inerentes da sua natureza, porém destaca-se uma significativa diferença nos picos de etanol e ácido acético que se mostram mais expressivos na amostra comercial do que na amostra caseira, o que aliado a uma menor intensidade nos picos dos açúcares de maneira geral, indica que o processo fermentativo comercial se dá por mais tempo que o utilizado no processo caseiro. Esses achados contribuem para o conhecimento sobre a composição química das kombuchas uma vez que apesar da grande disseminação da bebida, pouco se sabe com certeza sobre suas capacidades químicas e probióticas.

Palavras-chave: Kombucha; RMN; Metabólitos.

SIMÃO, Marco Túlio. **Analysis of metabolites in homemade and commercial kombucha using Nuclear Magnetic Resonance**. 2023. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2023.

ABSTRACT

This work aimed to analyze, by means of Nuclear Magnetic Resonance (NMR), the metabolites formed in samples of homemade and commercial kombucha, both prepared from the same initial substrate, green tea, but commercial samples of different flavors, namely: grape white, lemon with ginger, strawberry with hibiscus, lemongrass and passion fruit with saffron and the homemade one with a single flavor, lemongrass. The studies of the metabolites were preceded by studies of the proportion between the sample and the solvent and the study of the suppression experiment to optimize the obtaining of peaks of greater intensity and quality in the NMR spectra and thus be able to discuss them. The particularities of each sample were confronted in order to understand the existing differences between the metabolites found, differences such as the amount of sugars, acetic acid, ethanol, antioxidant capacity. The results indicated subtle variations in the metabolites between the kombuchas, both between the commercial flavors and between the commercial and homemade samples, which can be explained by the fact that the product used for flavoring already brings with it metabolites inherent in its nature, however it stands out. if a significant difference in the peaks of ethanol and acetic acid that are more expressive in the commercial sample than in the homemade sample, which together with a lower intensity in the peaks of sugars in general, indicates that the commercial fermentation process takes place for more time than that used in the homemade process. These findings contribute to the knowledge about the chemical composition of kombuchas since, despite the wide dissemination of the drink, little is known with certainty about its chemical and probiotic capabilities.

Key-words: Kombucha; RMN; Metabolites.

Lista de abreviatura

RMN – Ressonância Magnética Nuclear;

Scooby – Symbiotic culture of bacteria and yeast;

PS – Paper spray;

MS – Espectrometria de massa;

m/z – Massa/carga;

mm – milímetro;

mL – mililitro;

μL – microlitro;

Abs – Absorbância.

Lista de figura

Figura 1: “Representação de PS modo positivo – MS da amostra de polpa de Grumixama”	14
Figura 2: “Representação de PS modo negativo – MS da amostra de polpa de Grumixama”	15
Figura 3: “Redução do radical livre DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina”	16
Figura 4: Espectro Kombucha sabor abacaxi 450/50 D2O	21
Figura 5: Espectro estudo do método de supressão noesyp1d.....	22
Figura 6: Espectro estudo do método de supressão zgpr	22
Figura 7: Espectro estudo do método de supressão zgccpr	23
Figura 8: Espectro estudo do método de supressão zggpr	23
Figura 9: Análise dos espectros dos métodos de supressão	24
Figura 10: Espectro estudo da proporção amostra/solvente 350/150	25
Figura 11: Espectro estudo da proporção amostra/solvente 400/100	26
Figura 12: Espectro estudo da proporção amostra/solvente 450/50	26
Figura 13: Análise dos espectros das proporções amostra/solvente	27
Figura 14: Espectro Kombucha uva branca	28
Figura 15: Espectro Kombucha limão com gengibre	29
Figura 16: Espectro Kombucha morango com hibisco	29
Figura 17: Espectro Kombucha capim limão	30
Figura 18: Espectro Kombucha maracujá com açafrão	30
Figura 19: Análise dos espectros dos sabores das kombuchas comerciais.....	31
Figura 20: Caracterização dos compostos amostra kombucha capim limão (I).....	32
Figura 21: Caracterização dos compostos amostra kombucha capim limão (II).....	32
Figura 22: Espectro branco chá verde	34
Figura 23: Espectro branco chá capim limão	34
Figura 24: Espectro kombucha com 7 dias de fermentação	35
Figura 25: Espectro kombucha com 10 dias de fermentação.....	36

Figura 26: Análise dos espectros do processo de fermentação por 7 e 10 dias.....	37
Figura 27: Espectro kombucha 7 dias de fermentação saborizada com chá de capim limão	38
Figura 28: Análise dos espectros branco do chá verde e da Kombucha caseira (I)	39
Figura 29: Análises dos espectros branco chá verde e da Kombucha caseira (II)	39
Figura 30: Análise dos espectros da Kombucha caseira e da Kombucha comercial (I).....	40
Figura 31: Análise dos espectros da Kombucha caseira e da Kombucha comercial (II).....	41
Figura 32: Análise dos espectros da Kombucha caseira e da Kombucha comercial (III).....	41
Figura 33: Equação da porcentagem de atividade antioxidante.....	42
Figura 34: Valores das absorbâncias e porcentagem da atividade antioxidante para amostra caseira e comercial	43

Sumário

1. Introdução	11
2. Revisão bibliográfica	13
3. Objetivo	17
4. Parte experimental	17
4.1. Materiais e métodos	17
4.2. Procedimento experimental	18
4.2.1. Preparo da kombucha caseira	18
4.2.2. Preparo das amostras	18
4.2.3. Experimento de supressão	19
4.2.4. Proporção amostra/solvente	19
4.3. Análise das amostras	19
4.3.1. Análise da kombucha comercial	19
4.3.2. Análise da kombucha caseira	19
4.4. Análise do perfil antioxidante	19
5. Resultados e discussões	20
5.1. Estudo do experimento de supressão	20
5.2. Estudo da proporção amostra/solvente	24
5.3. Análise das amostras	27
5.3.1. Estudo e análise da kombucha comercial	28
5.3.2. Estudo e análise da kombucha caseira	33
5.3.3. Considerações finais	40
5.4. Análise do perfil antioxidante	42
6. Conclusão	43
7. Referências bibliográficas	45

1. Introdução

O kombucha, bebida milenar que ganhou popularidade em grupos de vida saudável como uma alternativa ao refrigerante comercial, se trata de um fermentado originalmente produzido a partir da infusão de folhas da espécie *Camellia sinensis*, podendo ou não conter teor alcoólico e ser consumido puro ou saborizado. O processo fermentativo é efetuado em duas etapas por uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias denominada Scoby (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast ou do português Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras), sendo uma etapa alcoólica e outra acética, o que concede sabor ácido de aromas variados e baixo teor calórico. Apesar de ganhado o gosto popular pela relativa facilidade de preparo e consumo despretensioso, a bebida possui limites baixos e pouco conhecidos de doses diárias, assim como legislação própria para padrão de identidade e qualidade. (LIMA, Mariele e KIKUTI, Elaine. 2021) (MENDONÇA, Gislane Romano e col. 2020)

As plantas, como seres autótrofos, produzem uma série de componentes vitais à sua sobrevivência, os quais são conhecidos como metabólitos primários sendo indispensáveis no ciclo de vida do vegetal, alguns deles são proteínas, ácidos graxos, polissacarídeos e clorofila. O conhecimento dos metabólitos formados no processo de produção da kombucha se faz indispensável não somente no intuito de conhecer características nutricionais e no seu potencial probiótico, mas também para caracterização real e eficaz da classe do produto, quantidade máxima de consumo, público indicado e regulamentação dentro da legislação específica. Estudos recentes indicam que o produto entregue ao consumidor pode conter mais de 5% v/v de etanol, levando assim à necessidade de regulamentação em concordância com bebidas alcoólicas. (EDWARDS, John C. 2016)

O estudo do metabolismo vegetal abrange uma ampla gama de domínios inerentes as atividades humanas e, portanto, se faz necessário um melhor entendimento da composição e como se dá esse processo metabólico. A espectroscopia de RMN, possui ampla variedade de abordagens experimentais que contribuem amplamente para o estudo do metabolismo primário e o especializado de

plantas de diversas maneiras (DEBORDE, Catarina e col. 2017), como exemplo a caracterização dos metabólitos existentes em um meio, de forma exata e rápida podendo até mesmo, segundo estudos mais atuais, fornecer dados quantitativos dos metabólitos através de uma análise dos picos. (THAI, Thanh. 2018). Sendo essa uma abordagem utilizada na elaboração do processo conhecido como “*fingerprint*” de bebidas alcoólicas comuns como cervejas e vinhos, mas também de fermentados como a Kombucha e tudo isso passível de aplicação rápida e pouco exigentes quanto a preparação prévia utilizando, de maneira simplória, somente um padrão de sinal interno. (EDWARDS, John C. 2016)

Este trabalho objetiva a caracterização de metabólitos presentes em amostras de kombucha de uma marca comercial amplamente encontrada no comércio local e de sabores variados, assim como os metabólitos de amostras de kombucha caseira preparada pelo autor com receita popularmente conhecida e difundida, apresentando uma comparação entre os componentes formados no processo caseiro durante o tempo de preparo e entre o produto caseiro e comercial. Para tal foi utilizado um equipamento RMN. Por fim um teste de perfil antioxidante foi aplicado em ambas as amostras para determinar qual apresentava caráter mais significativo.

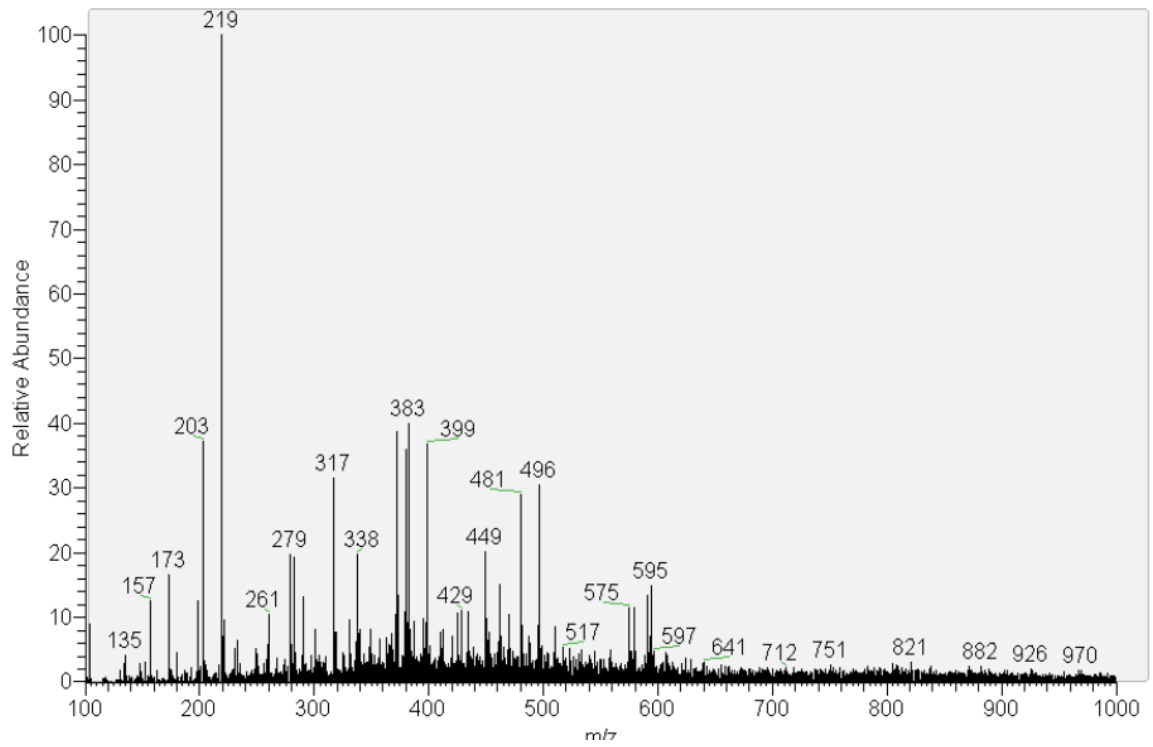
Os chamados radicais livres, ou apenas radicais, podem ser controlados de maneiras diferentes nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ser provenientes da dieta alimentar dentre outras fontes, como exemplo tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides. A indisponibilidade de antioxidantes pode gerar um estresse oxidativo no organismo podendo desencadear outros problemas. Antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar esses radicais livres antes que ataquem o organismo. Dentre as várias possibilidades de avaliar a capacidade antioxidante de um composto o método mais utilizado é o DPPH que se baseia na capacidade de um composto em doar elétrons para o radical livre DPPH, que possui uma cor roxa intensa. Quando um composto antioxidante reage com o radical, ocorre uma redução, resultando em uma mudança de cor de roxo para amarelo pálido. (SOUZA e col. 2007)

2. Revisão bibliográfica

A Kombucha tradicionalmente preparada a partir da fermentação de chá adoçado por uma simbiose de bactérias e leveduras, vem ganhando popularidade nos últimos anos devido às suas potenciais propriedades probióticas e terapêuticas atrelada a uma falta de informações precisas sobre sua composição química e os metabólitos presentes (LIMA, Mariele e KIKUTI, Elaine. 2021). No contexto atual a utilização de técnicas analíticas avançadas, como a ressonância magnética nuclear (RMN), surgem como uma poderosa ferramenta para a identificação e quantificação precisa dos metabólitos, método este que oferece vantagens significativas, como a capacidade de fornecer informações estruturais e detalhadas sobre os compostos presentes, sem a necessidade de separação prévia dos componentes. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar a composição química da Kombucha por meio da análise por RMN, visando a identificação e caracterização dos principais metabólitos presentes na bebida e posterior estudo de sua capacidade antioxidante. (DEBORDE, Catarina e col. 2017)

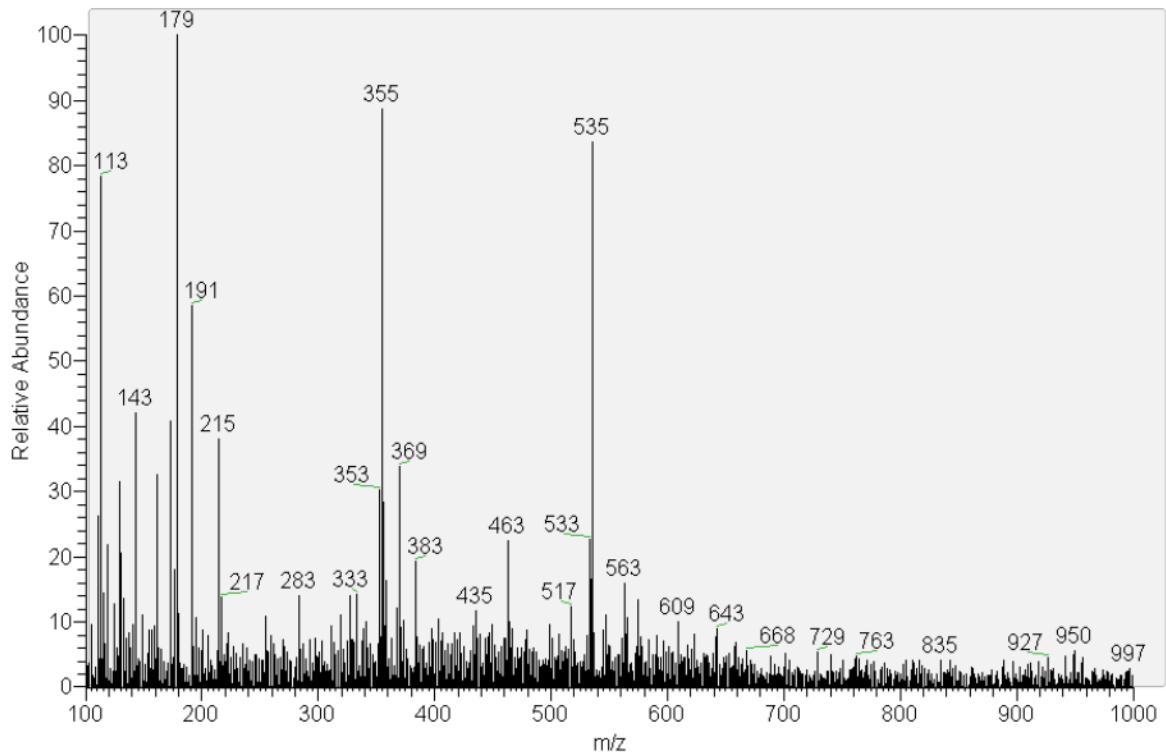
O método de “fingerprint” consiste em uma abordagem analítica amplamente utilizado na caracterização de compostos complexos, identificando e comparando padrões únicos de sinais ou espectros associados a determinadas amostras, atuando como um leitor de impressão digital do composto em questão, daí o nome. Em função de sua capacidade de identificar especificidades em amostras de maior complexidade, tem-se usado esse método na determinação da autenticidade, qualidade e a composição química de diversas substâncias, incluindo bebidas fermentadas. Em um estudo conduzido por RAMOS (2020), o método de “fingerprint” foi utilizado, atrelado a uma análise de massas, para a análise de bebidas com potencial poder probiótico possibilitando identificação de metabolitos de interesse na produção de uma bebida, conforme Figuras 1 E 2.

Figura 1: “Representação de PS modo positivo – MS da amostra de polpa de Grumixama”



Fonte: Extraído de bebida fermentada com potencial probiótico à base de extrato hidrossolúvel de soja com adição de grumixama (*Eugenia brasilienses*). RAMOS, 2020.

Figura 2: “Representação de PS modo negativo – MS da amostra de polpa de Grumixama”



Fonte: Extraído de bebida fermentada com potencial probiótico à base de extrato hidrossolúvel de soja com adição de grumixama (*Eugenia brasilienses*). RAMOS, 2020.

Dentre os metabólitos identificados a autora destaca:

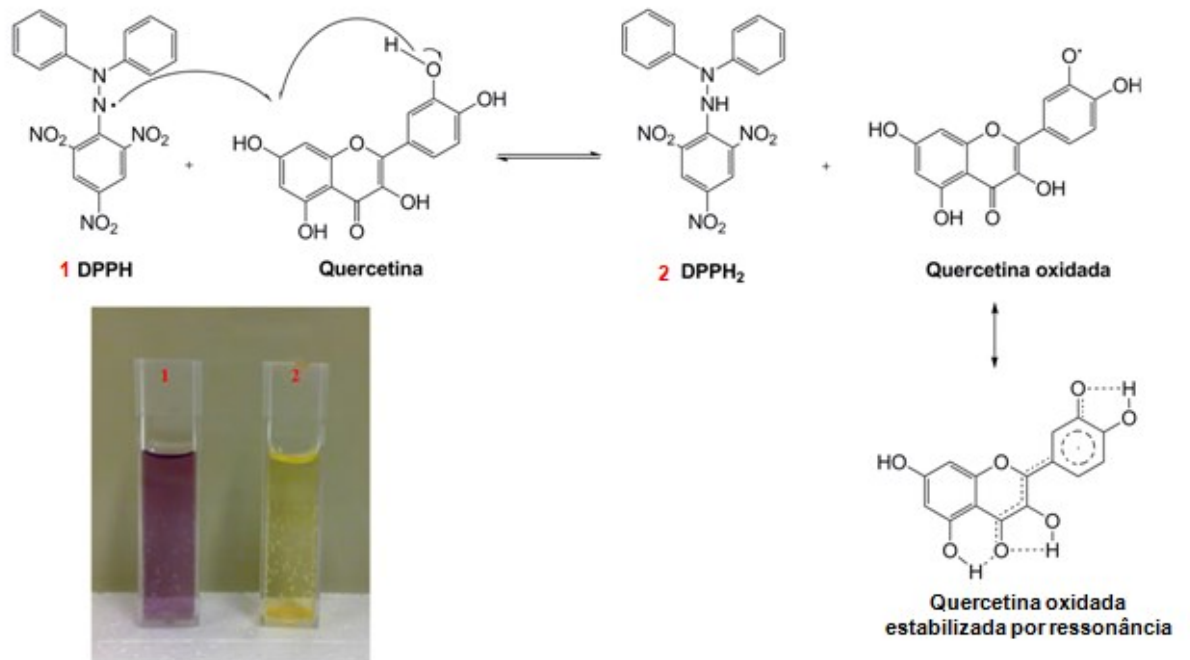
Catequina ($m/z = 291$); derivados da quercetina como monoglucuronido de quercetina ($m/z = 479$), éter dimetílico de quercetina ($m/z = 329$), 3-glucosídeo de quercetina ($m/z = 463$), hexósido de quercetina ($m/z = 463$), acetil-hexósido de quercetina ($m/z = 505$); e a galocatequina ($m/z = 305$)

A análise do perfil antioxidante é amplamente utilizada na avaliação do potencial de compostos ou produtos em combater o estresse oxidativo e os danos causados pelos radicais livres. Essa abordagem analítica desempenha um papel fundamental na determinação da capacidade antioxidante de uma substância ou matriz. Em estudos relacionados às bebidas fermentadas, incluindo a Kombucha, a análise do perfil antioxidante tem sido empregada para investigar os compostos que contribuem para as propriedades antioxidantes dessas bebidas. Diversas técnicas são utilizadas nessa análise, o mais utilizado consiste em avaliar a atividade sequestradora do

radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 - 517 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. Isso é feito preparada uma solução de DPPH em um solvente adequado, como etanol, e a amostra é adicionada. A reação é então monitorada via espectrofotômetro, medindo-se a diminuição da absorção na faixa de comprimento de onda característica do DPPH (geralmente em torno de 515 - 517 nm). Quanto maior for a diminuição na absorção, maior será a atividade antioxidante da amostra. (SILVA. 2018) (SOUZA e col. 2007)

A Figura 3 traz uma representação de uma reação entre o DPPH e a Quercetina, demonstrando o mecanismo de ação e a estrutura do DPPH em seu estado radicalar e reduzido.

Figura 3: “Redução do radical livre DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina”



Fonte: Extraído de Química Nova Interativa - SBQ

O método oferece vantagens, como simplicidade e rapidez na execução, além de permitir uma avaliação global da capacidade antioxidante de uma amostra. No entanto, é importante destacar que o resultado obtido por essa técnica não fornece

informações detalhadas sobre os compostos antioxidantes presentes na amostra, mas sim uma medida da capacidade geral de neutralização dos radicais. É importante mencionar que o método DPPH fornece apenas análise do perfil antioxidante e que a combinação de diferentes métodos pode fornecer informações mais abrangentes e precisas sobre a capacidade antioxidante de uma amostra.

Silva e col. (2018) trazem em estudo uma análise do perfil antioxidante de variedades de Kombucha revelando a presença de compostos, como ácido ascórbico, ácido tartárico e flavonoides, que contribuíam significativamente para a atividade antioxidante da bebida. Esses resultados ressaltam a importância da análise do perfil antioxidante na determinação das propriedades benéficas das bebidas fermentadas e seu potencial na promoção da saúde e prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

3. Objetivo

O trabalho tem como objetivo identificar diferentes metabólitos encontrados em amostras de kombucha comercial de sabores diversos assim como de kombucha feita a partir de um preparo caseiro e analisar a capacidade antioxidante de ambas as bebidas

4. Parte experimental

4.1. Materiais e métodos

Recipiente para fermentação de vidro ou cerâmica (evite inox ou alumínio)

Peneira

Funil

Colher

Voal ou pano poroso e leve ou papel toalha

Elásticos para prender o voal/pano Chá verde, preto, matte, branco ou de saquinho (não utilizar chás condimentados ou muito aromatizados artificialmente).

Açúcar demerara, açúcar cristal, mel, ou suco concentrado de fruta doce

Cultura de "SCOBY"

50 mL de uma kombucha previamente preparada

Equipamento Ressonância Magnética Nuclear – Bruker – Magnet System 400'54 Ascend.

Centrifuga eppendorf – centrifuge 5415 C

Ultrassom Cristófoli biossegurança

Vórtex mixer Kasvi K45-2810

Tubo de RMN 5mm

Espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis – Thermo Scientific

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Preparo da kombucha caseira

Aqueceu-se 1 litro de água filtrada até a ebulição; retirou-se do aquecimento e adicionou-se açúcar cristal e o chá verde; homogeneizou-se a mistura com auxílio da colher até total dissolução do açúcar e deixou-se em repouso com tampa por 1 minuto. Transcorrido esse tempo transferiu-se para um recipiente de vidro para resfriar. Acrescentou-se 50 mL da kombucha preparada previamente, podendo ser uma alíquota restante da última produção, homogeneizou-se, e adicionou-se a cultura de “SCOBY” (a cultura deve ficar boiando na superfície). Enfim o recipiente foi tampado com um pano limpo e preso com elástico.

Fermentou-se ao abrigo da luz em local arejado de 7 a 10 dias. Transcorrido o tempo de fermentação adicionou-se chá de capim limão, preparado de maneira análoga ao chá verde, por infusão das folhas de capim limão em 1 litro de água fervente, para saborizar e armazenou-se por 2 dias em temperatura ambiente.

4.2.2. Preparo das amostras

Retirou-se as amostras da refrigeração para equilibrar a temperatura; submeteu-se ao vórtex por 1 min, ultrassom por 5 min, e centrifuga por 15 minutos a 10 mil rpm. Feito isso pipetou-se a amostra e transferiu-a para um tubo de RMN e enfim acrescentou-se água deuterada (D_2O) e as eventuais análises foram realizadas.

4.2.3. Experimento de supressão

Para a supressão 4 experimentos foram testados, sendo eles “noesypr1d”, “zgpr”, “zgccpr” e “zggppr”. Os parâmetros mutáveis de cada experimento foram fixados a fim de manter uma base de comparação, sendo eles D1= 3 s; D8= 0,3 s; D11= 0,029 s; D12= 0,00002 s.

4.2.4. Proporção amostra/solvente

Preparou-se 3 amostras utilizando uma kombucha comercial conforme o item 3.2.2 e essas foram pipetadas para um tubo de RMN de 5 mm juntamente com o solvente deuterado nas seguintes proporções 350 µL de amostra para 150 µL de solvente; 400 µL de amostra para 100 µL de solvente e por fim 450 µL de amostra para 50 µL de solvente.

4.3. Análise das amostras

4.3.1. Análise da kombucha comercial

Executou-se os procedimentos descritos no item 3.2.2 em cada uma das amostras comerciais em cada um dos sabores analisados, sendo eles uva branca, limão com gengibre, morango com hibisco, capim limão e maracujá com açafrão. Cada amostra foi utilizada para preparar 3 tubos de RMN 5mm e então feitas as análises

4.3.2. Análise da kombucha caseira

O procedimento seguiu-se de maneira análoga ao item 3.3.1, porém somente para o único sabor da kombucha caseira, capim limão.

4.4. Análise do perfil antioxidante

Preparou-se uma solução de DPPH $40 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ com metanol até atingir absorvância de 0,999. Uma alíquota de 2,9 mL dessa solução foi adicionada a 0,1 mL da amostra de kombucha em um tubo de ensaio e deixou-se reagir no escuro por 1 hora, fez-se isso em triplicata para ambas as amostras, comercial e caseira.

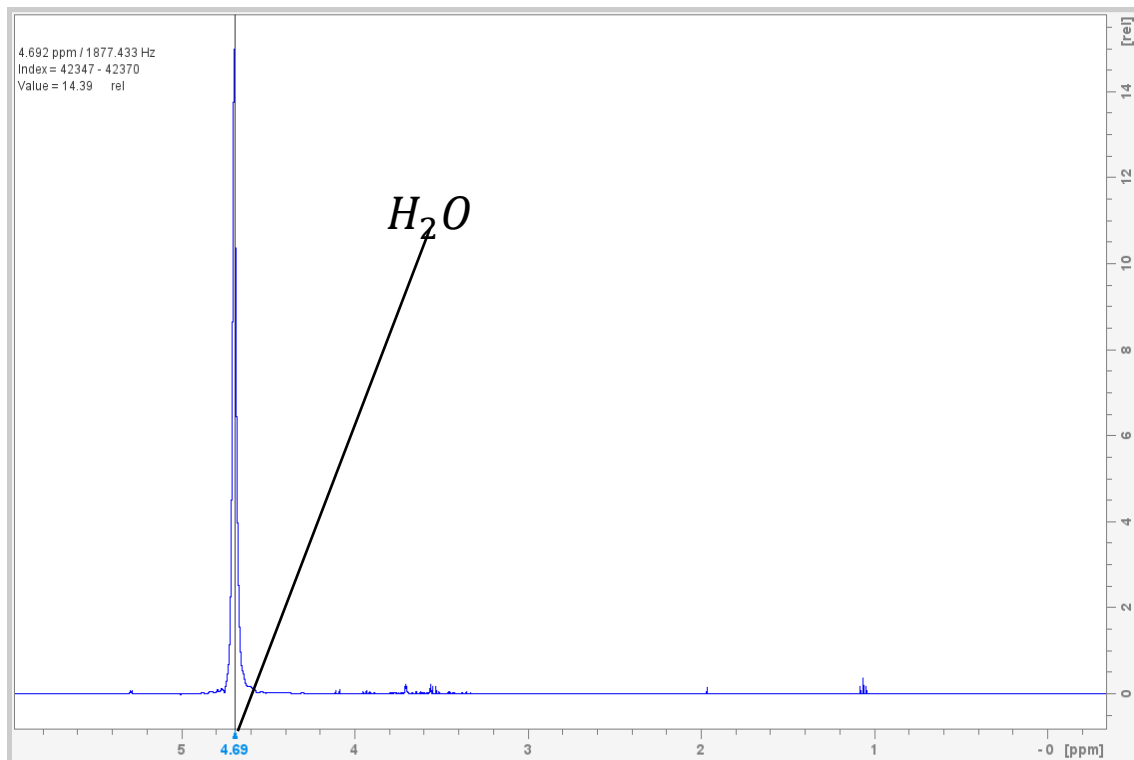
Após o tempo de reação fez-se a leitura das amostras em espectrofotômetro registrando-se a absorvância de cada amostra no comprimento de 517 nm. Fez-se uma análise do branco a partir de uma amostra contendo 0,1 mL de amostra de Kombucha e 2,9 mL de metanol e uma análise controle a partir de uma amostra contendo 0,1 mL de água destilada e 2,9 mL de metanol.

5. Resultados e discussões

5.1. Estudo do experimento de supressão

Os experimentos de supressão permitem a seleção e a eliminação seletiva de sinais indesejados como o excesso de água, a fim de melhorar a qualidade dos espectros obtidos, isso se dá utilizando pulsos de radiofrequência específicos para excitar ou suprimir sinais em regiões específicas do espectro. Pelo fato de as amostras serem preparadas com adição de água, já que essa é uma etapa da produção, os espectros apresentam um pico muito expressivo (Figura 4). (GUIMARÃES, Caine Alves. 2019) (JUNIOR, Luiz Henrique Keng Queiroz. 2011)

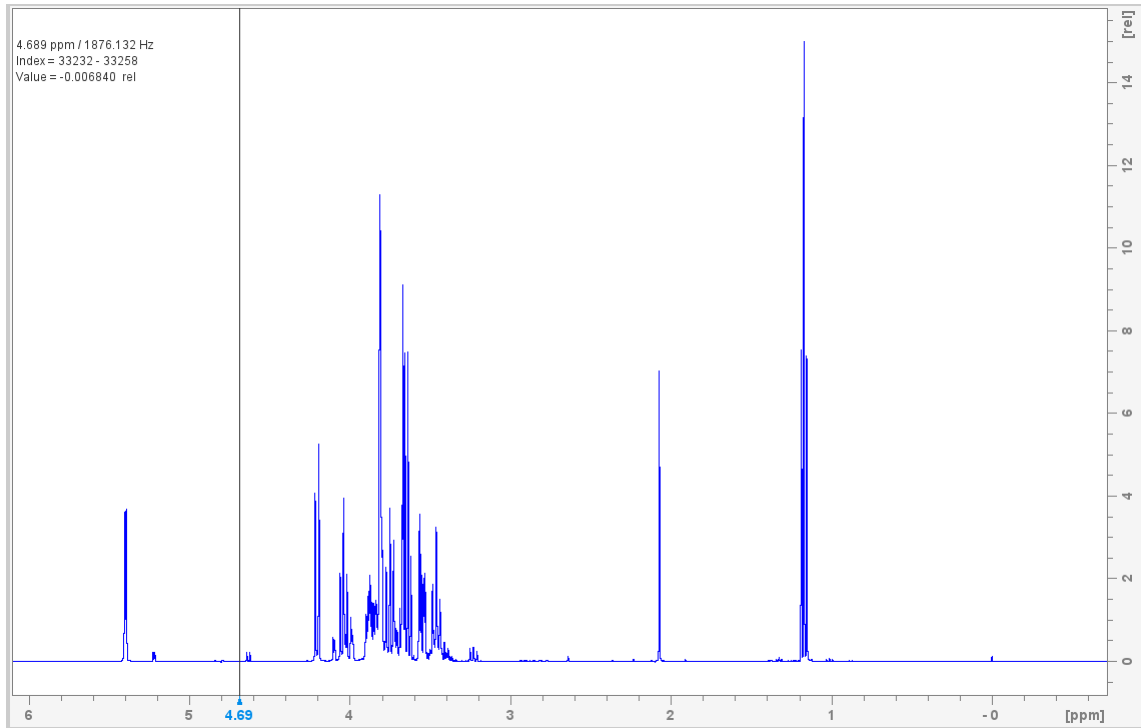
Figura 4: Espectro Kombucha sabor abacaxi 450/50 D2O



Fonte: Próprio autor (2023)

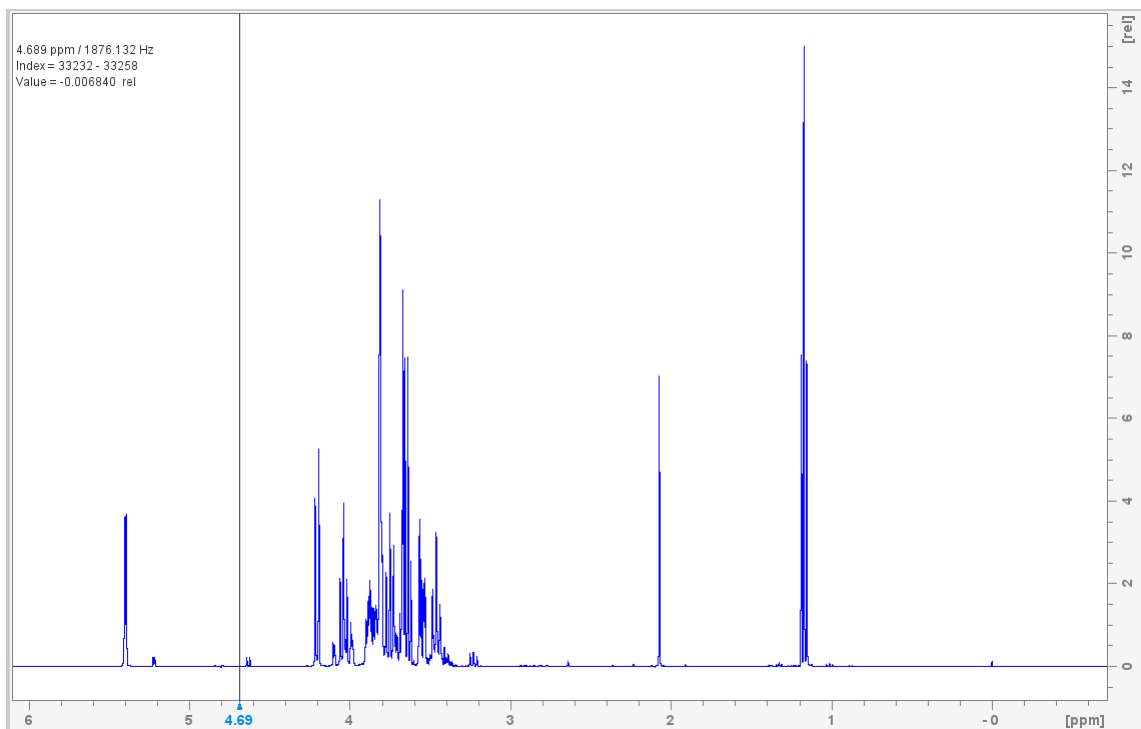
O sinal na região 4,69 ppm, bem significativo em função da maior quantidade de água presente na amostra, inviabiliza uma análise mais detalhada dos sinais dos demais compostos, sendo assim necessária a aplicação de uma técnica de supressão, foram testados 4 métodos e estes estão dispostos da seguinte maneira: “noesypr1d” (Figura 5), “zgpr” (Figura 6), “zgccpr” (Figura 7) e “zggppr” (Figura 8).

Figura 5: Espectro estudo do método de supressão noesy1d



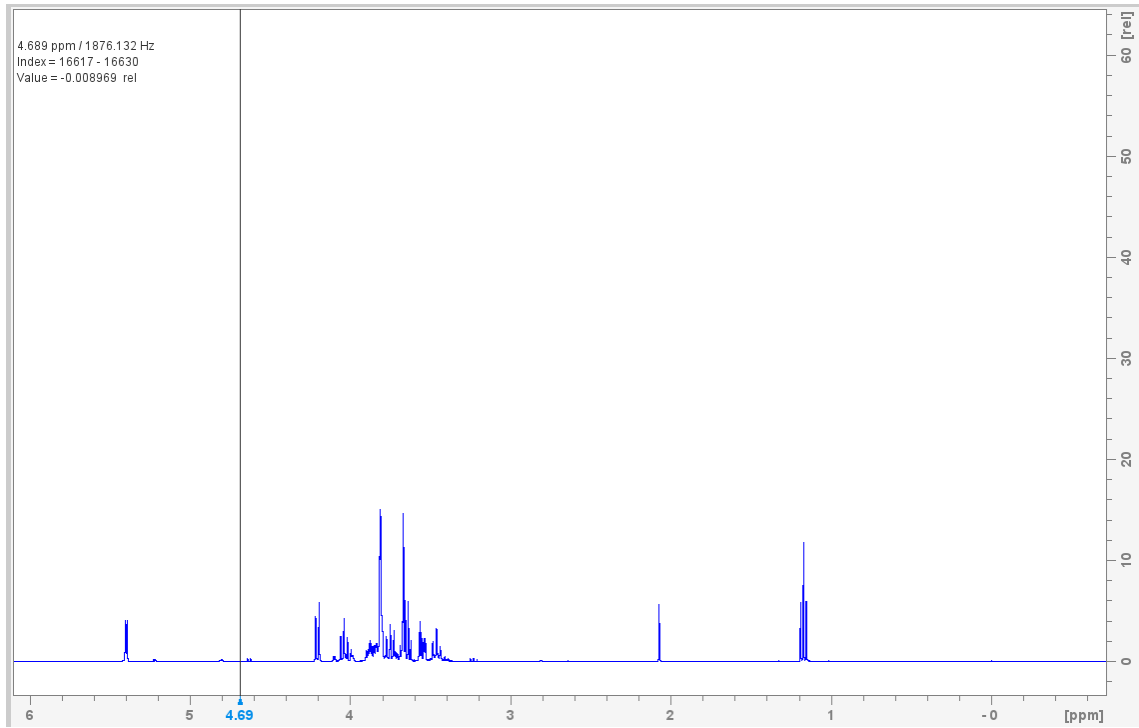
Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 6: Espectro estudo do método de supressão zgpr



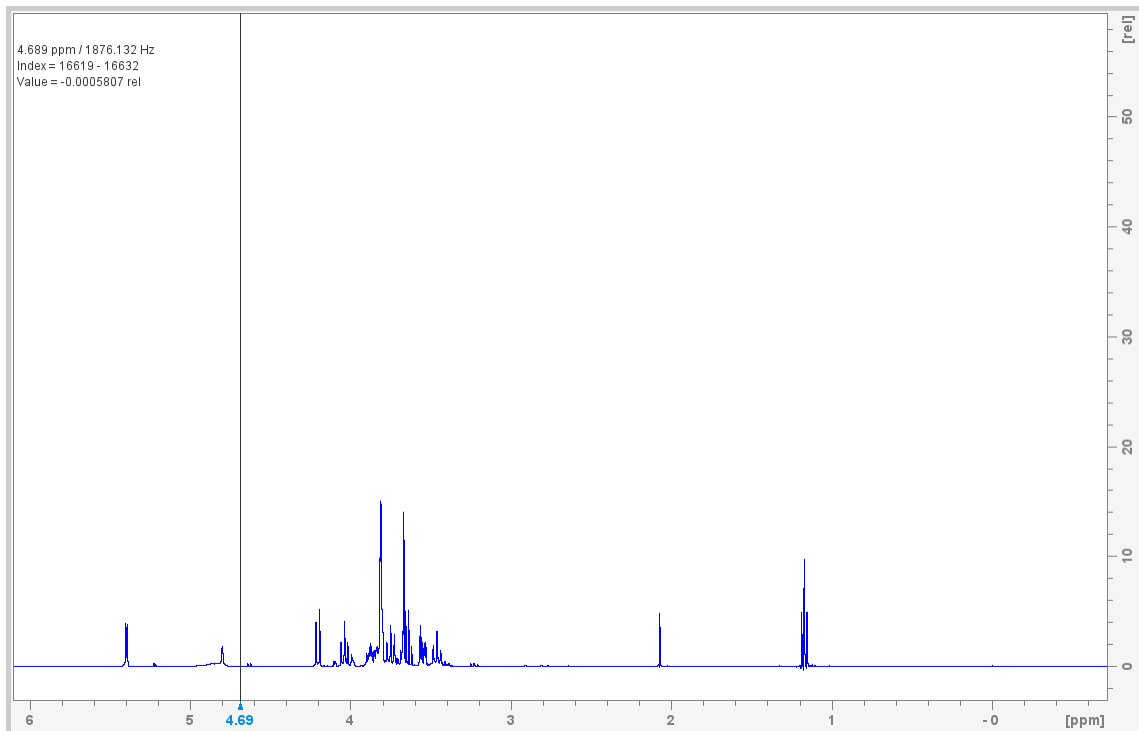
Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 7: Espectro estudo do método de supressão zgpcpr



Fonte: Próprio autor

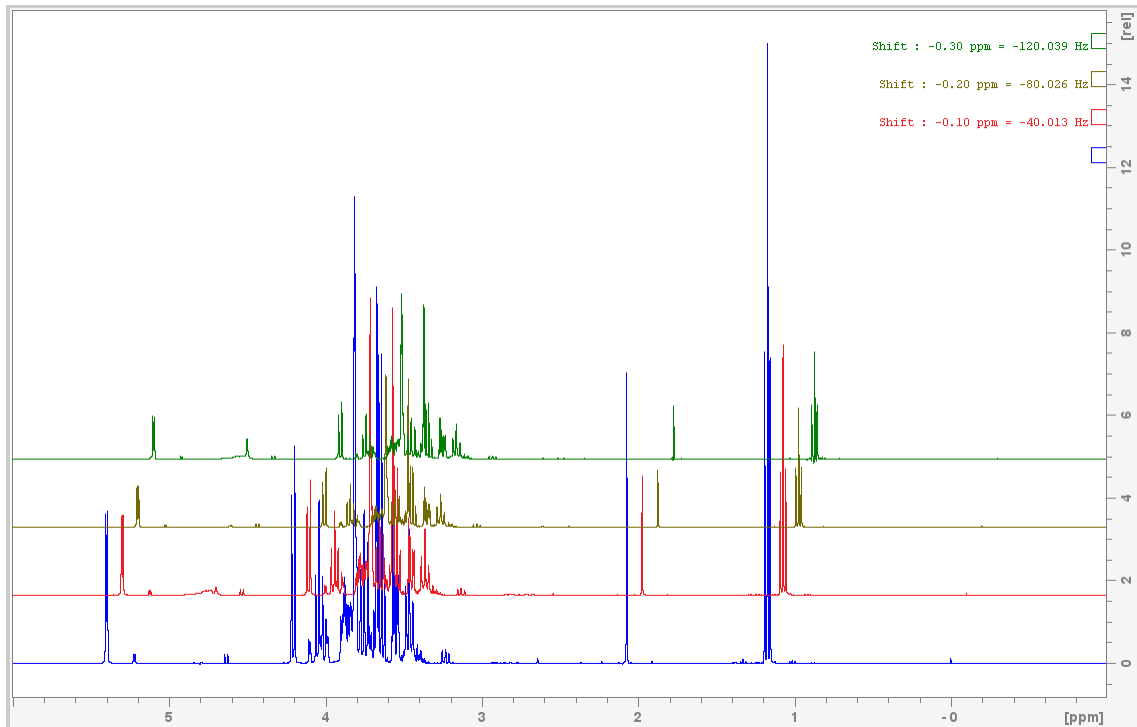
Figura 8: Espectro estudo do método de supressão zgppr



Fonte: Próprio autor

A Figura 9 traz um compilado dos 4 métodos de supressão testados, a fim de melhorar a visualização das diferenças em cada um deles.

Figura 9: Análise dos espectros dos métodos de supressão



Fonte: Próprio autor (2023)

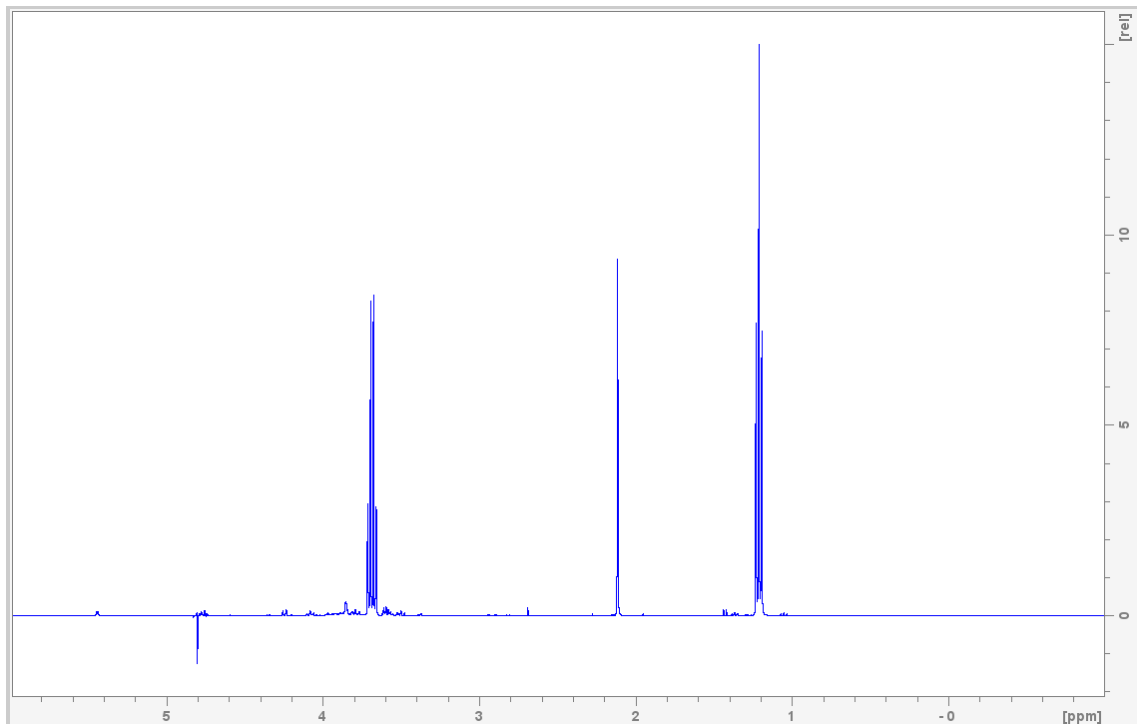
A partir da análise da Figura 9 é possível perceber que o método de supressão “Noesypr1d”, que se destaca na cor azul, se mostrou mais eficiente pois não causou um desvio grande na linha de base na região de 4,69 ppm, que é a região onde a supressão ocorreu, assim como ressaltou de maneira satisfatória o comportamento dos picos dos demais compostos presentes. Isso não ocorreu de forma satisfatória com os métodos zggppr, zgccpr e zgpr que se destacam respectivamente nas cores vermelho, amarelo e verde. Essa má supressão pode acarretar uma camuflagem nos compostos ao redor daquela região assim como uma proporcional diminuição do pico gerado pelos compostos a serem estudados.

5.2. Estudo da proporção amostra/solvente

Uma vez escolhido o método que melhor forneceu os dados nas condições de trabalho em questão, para determinar a melhor proporção de amostra e solvente que

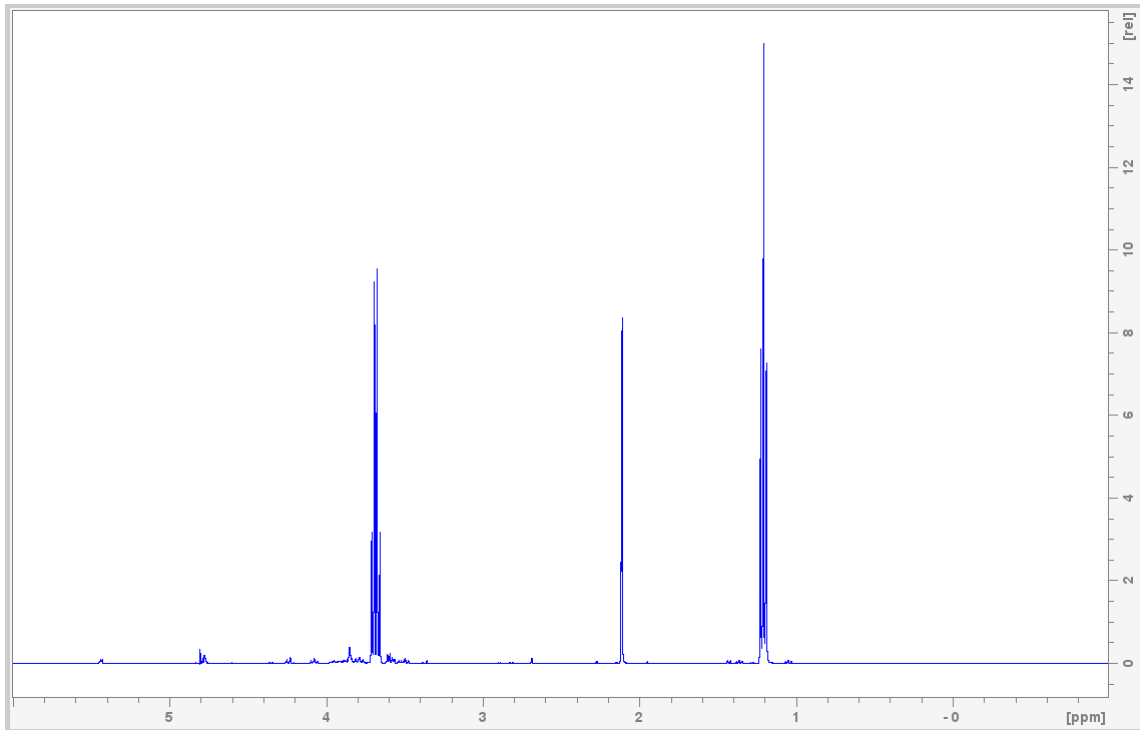
devia ser preparada para que fossem feitas análises foram executadas 3 análises com proporções diferente de amostra de kombucha e solvente deuterado, respectivamente, a fim de verificar o que apresentasse melhor relação sinal/ruído, resolução e assimetria, sendo elas: 350/150 (Figura 10), 400/100 (Figura 11) e 450/50 (Figura 12). Todas as figuras representam os espectros tratados com o devido método de supressão descrito no item 4.1.

Figura 10: Espectro estudo da proporção amostra/solvente 350/150



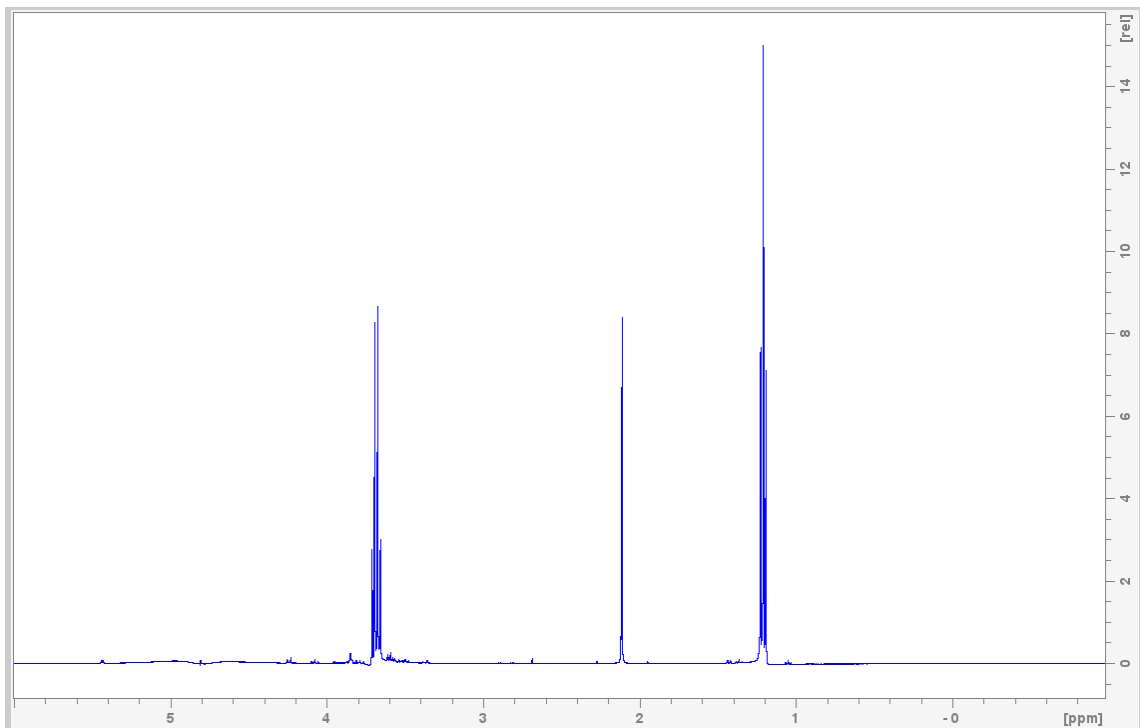
Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 11: Espectro estudo da proporção amostra/solvente 400/100



Fonte: Próprio autor

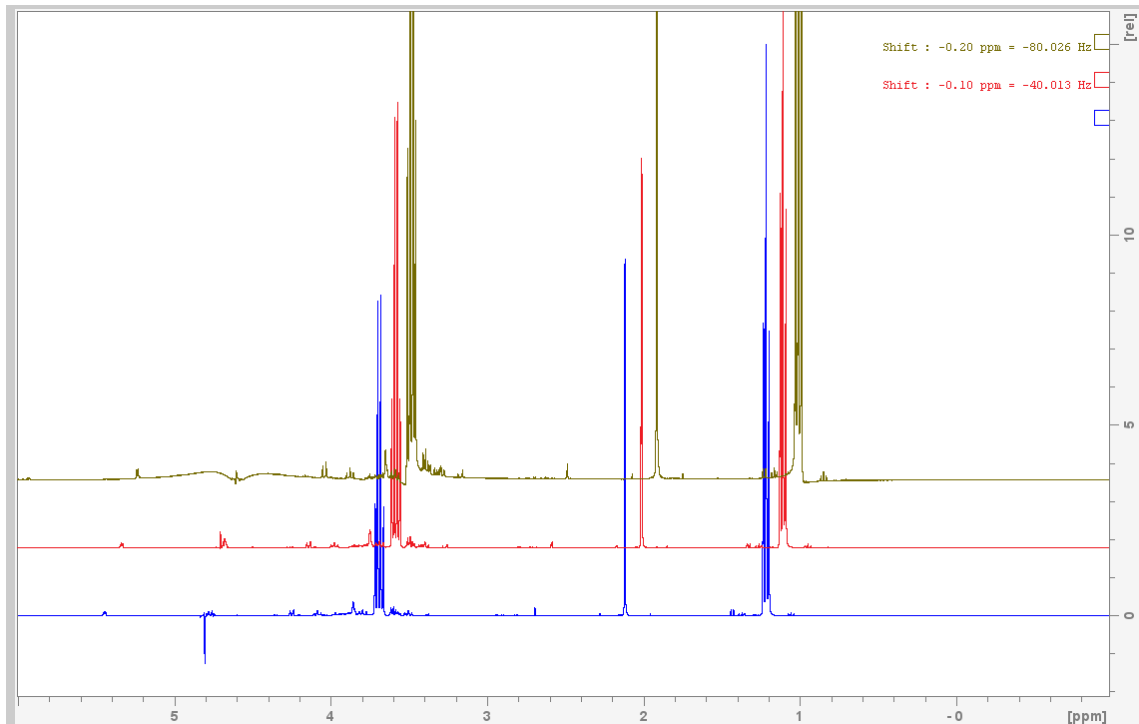
Figura 12: Espectro estudo da proporção amostra/solvente 450/50



Fonte: Próprio autor (2023)

A Figura 13 traz um compilado das 3 proporções de amostra/solventes testadas.

Figura 13: Análise dos espectros das proporções amostra/solvente



Fonte: Próprio autor (2023)

A partir da análise da Figura 13 observa-se que a proporção 400/100, destacada em vermelho, apresenta melhor estabilidade na linha de base que as proporções 350/150 e 450/50 que se destacam respectivamente nas cores azul e amarelo; o que já seria um fator importante para a escolha corroborado com o fato de que o comportamento similar dos picos só se deu devido ao fato de um ajuste manual de *shimming* o que não se fez necessário com tanto rigor no espectro gerado a partir da amostra preparada na proporção 400/100 sendo essa então a escolhida.

5.3. Análise das amostras

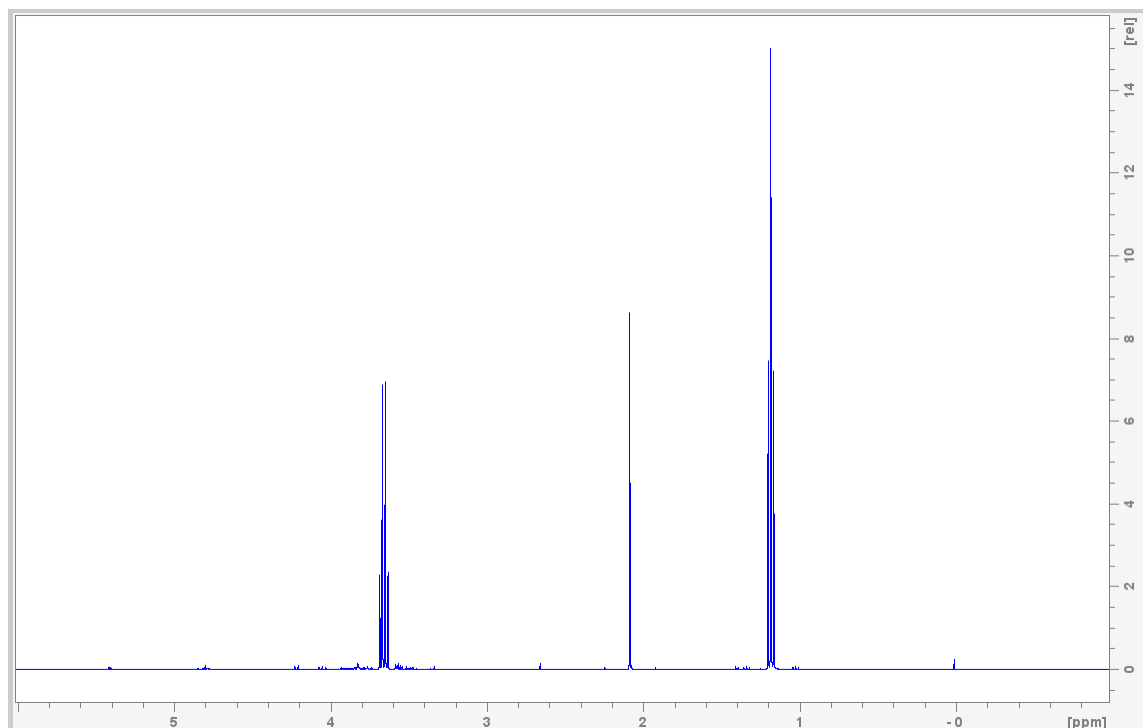
A análise das amostras foi feita em duas frentes sendo a primeira para a kombucha comercial e a segunda para a kombucha caseira. O procedimento foi executado imediatamente após as etapas descritas no item 3.2.2 em triplicata. O volume não utilizado no processo era descartado, sendo aberta uma nova garrafa no

caso da amostra comercial, e uma nova produção conforme item 3.2.1, sendo que essa amostra caseira era analisada sempre no mesmo dia em que se findava o processo de fabricação. A amostra de kombucha comercial é uma bebida gaseificada enquanto a caseira não, como o gás pode acarretar erros nas leituras, implantou-se uma etapa de retirada do gás para ambas as amostras, com intuito de não gerar erros experimentais. As amostras eram mantidas em repouso e refrigeradas conforme orientação do produtor até o momento da análise.

5.3.1. Estudo e análise da kombucha comercial

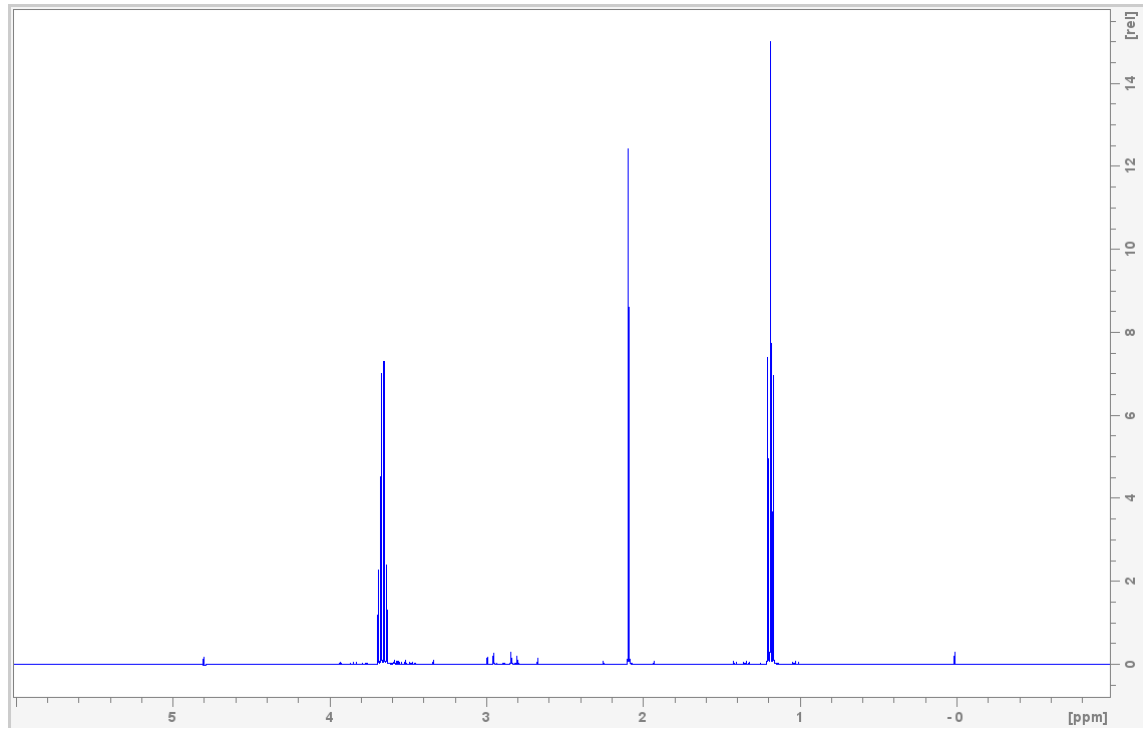
O estudo das amostras comerciais foi feito utilizando 5 sabores diferentes de kombucha, sendo eles uva branca, limão com gengibre, morango com hibisco, capim limão e maracujá com açafrão. Todos os sabores citados são referentes ao segundo processo de saborização da bebida sendo todos feitos da mesma base, chá verde. Sendo esses sabores uva branca (Figura 14), limão com gengibre (Figura 15), morango com hibisco (Figura 16), capim limão (Figura 17) e maracujá com açafrão (Figura 18).

Figura 14: Espectro Kombucha uva branca



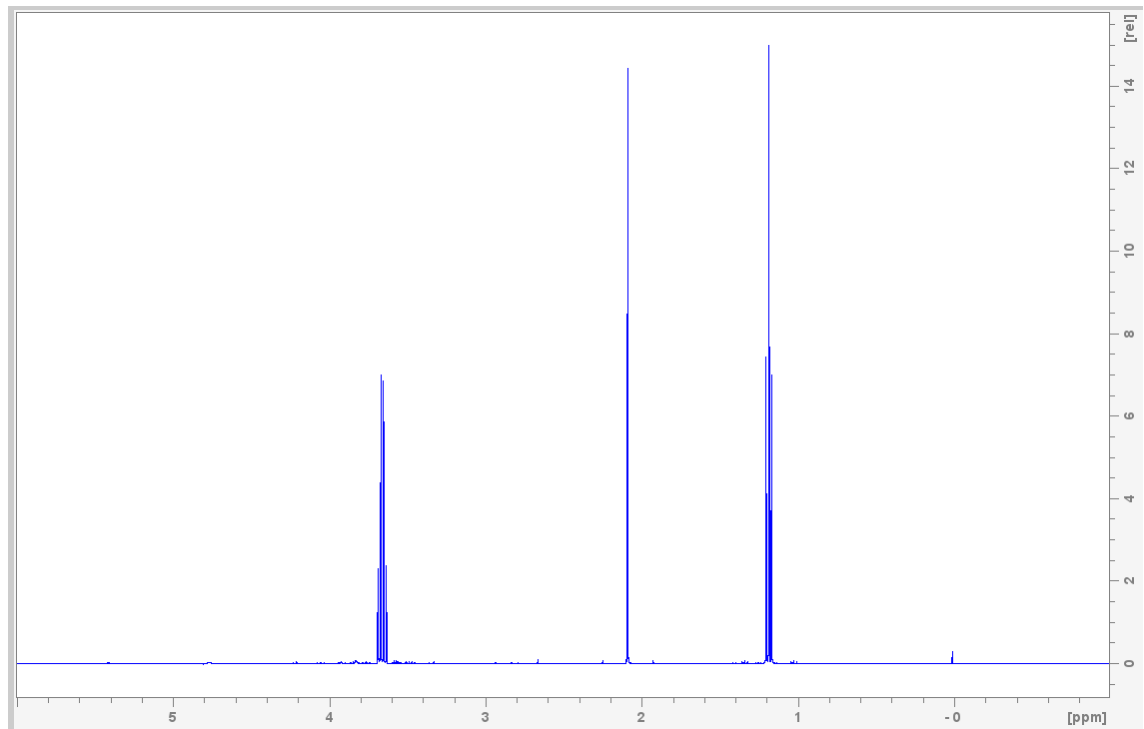
Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 15: Espectro Kombucha limão com gengibre



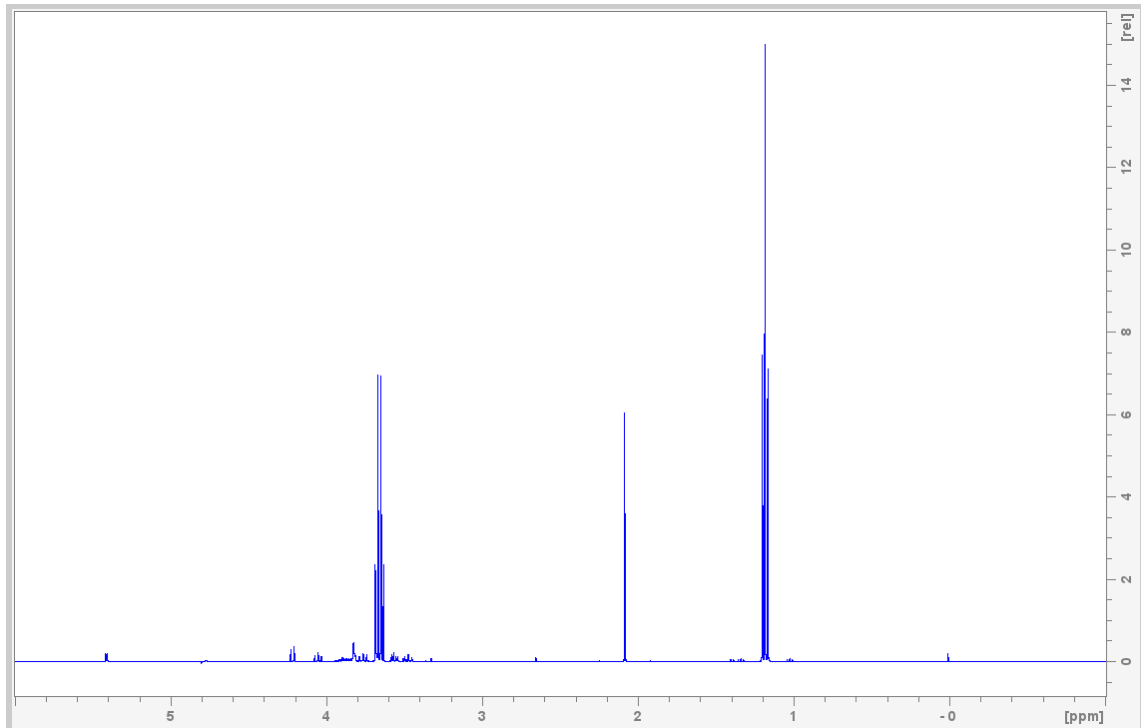
Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 16: Espectro Kombucha morango com hibisco



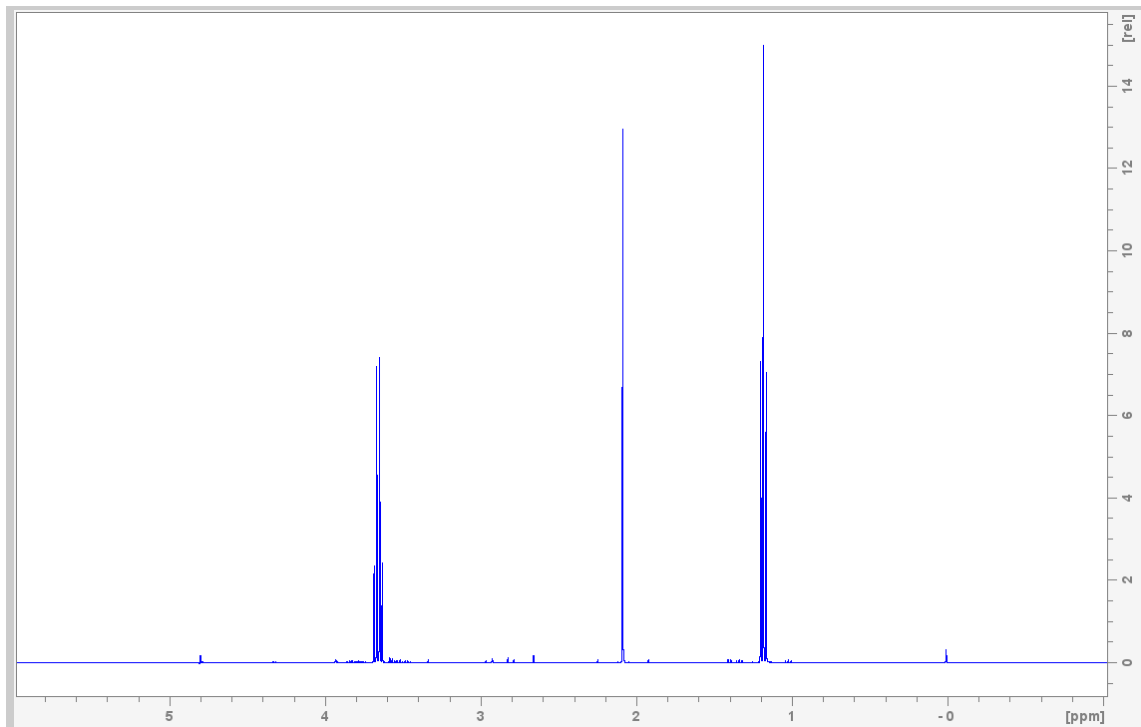
Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 17: Espectro Kombucha capim limão



Fonte: Próprio autor (2023)

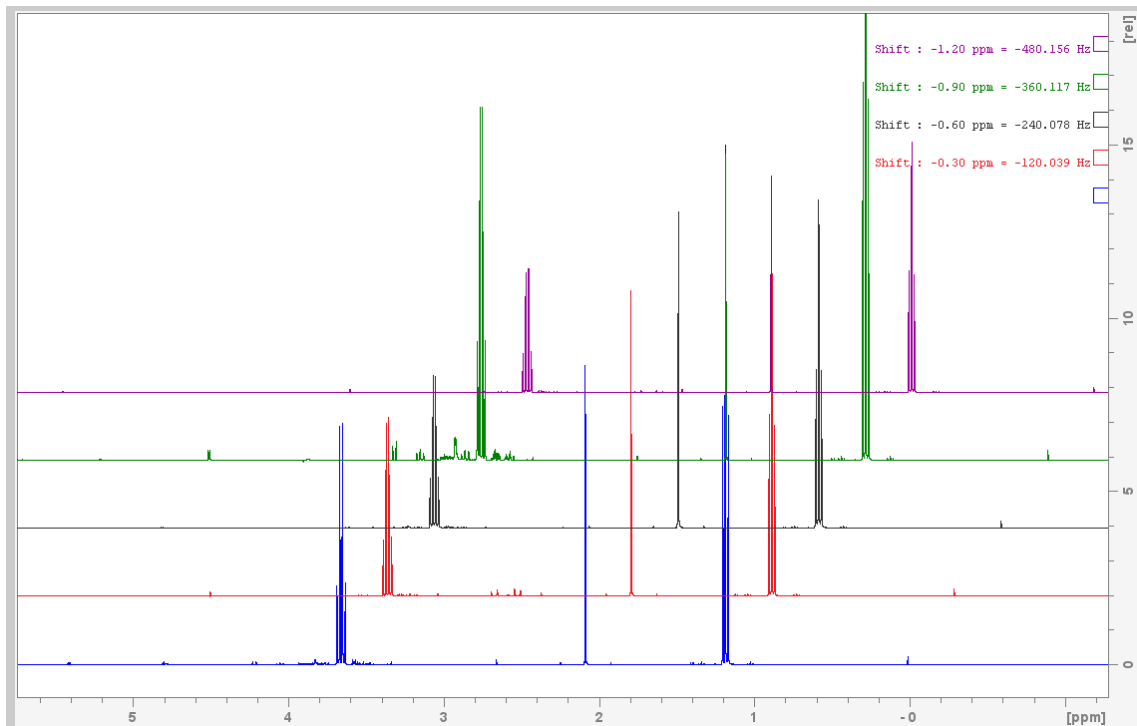
Figura 18: Espectro Kombucha maracujá com açafrão



Fonte: Próprio autor (2023)

A Figura 19 traz um compilado dos 5 sabores de kombucha comercial analisados, sendo eles destacados da seguinte maneira: uva branca – azul; limão com gengibre – vermelho; morango com hibisco – preto; capim limão – verde; maracujá com açafrão – roxo.

Figura 19: Análise dos espectros dos sabores das kombuchas comerciais

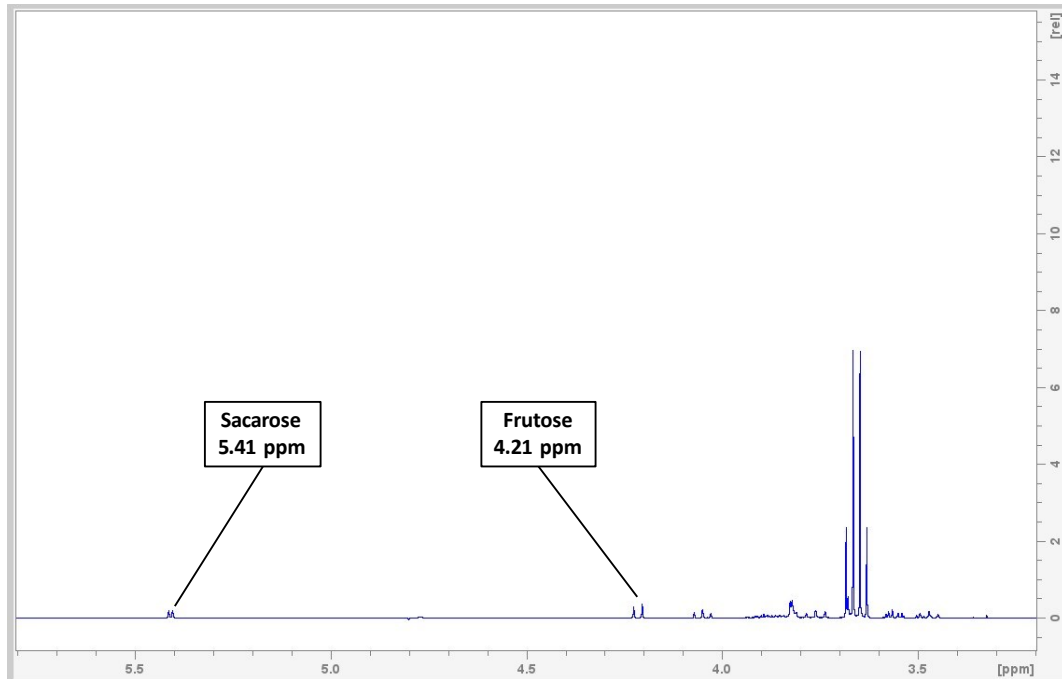


Fonte: Próprio autor (2023)

Através da análise da Figura 19 traz uma comparação entre os espectros obtidos nas análises de cada sabor de kombucha, é possível observar que sabor capim limão apresenta picos mais expressivos na maioria dos compostos, isso se dá, dentre outros fatores, pela diferença dos metabolitos específicos gerados por cada planta utilizada para saborizar a bebida, as amostras em azul, vermelho, preto e roxo são foram saborizadas com produtos que naturalmente apresentam concentrações menores de açúcar, como exemplo o limão que é uma fruta cítrica, ou o hibisco que possui um amargor característico, como o processo de saborizar a kombucha se dá após a fermentação, essas características específicas dos substratos utilizados nesse processo, se mantem como podemos observar, assim sendo, nas Figuras 20 e 21 vemos a caracterização dos compostos a partir do espectro da kombucha de capim limão, uma vez que ele traz de forma mais expressiva os picos referentes a compostos

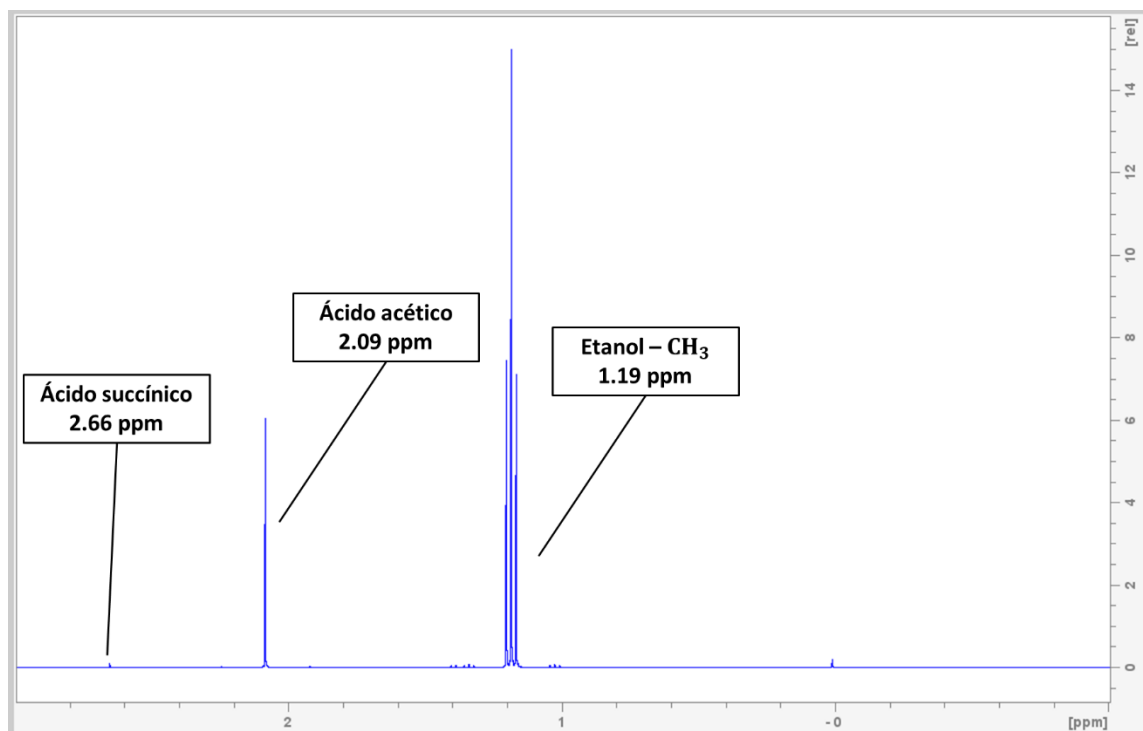
que não são tão facilmente evidenciados nos demais sabores. Essa caracterização pôde ser feita a partir de estudos realizados por EDWARD, Jhon C. (2016).

Figura 20: Caracterização dos compostos amostra kombucha capim limão (I)



Fonte: Próprio autor

Figura 21: Caracterização dos compostos amostra kombucha capim limão (II)



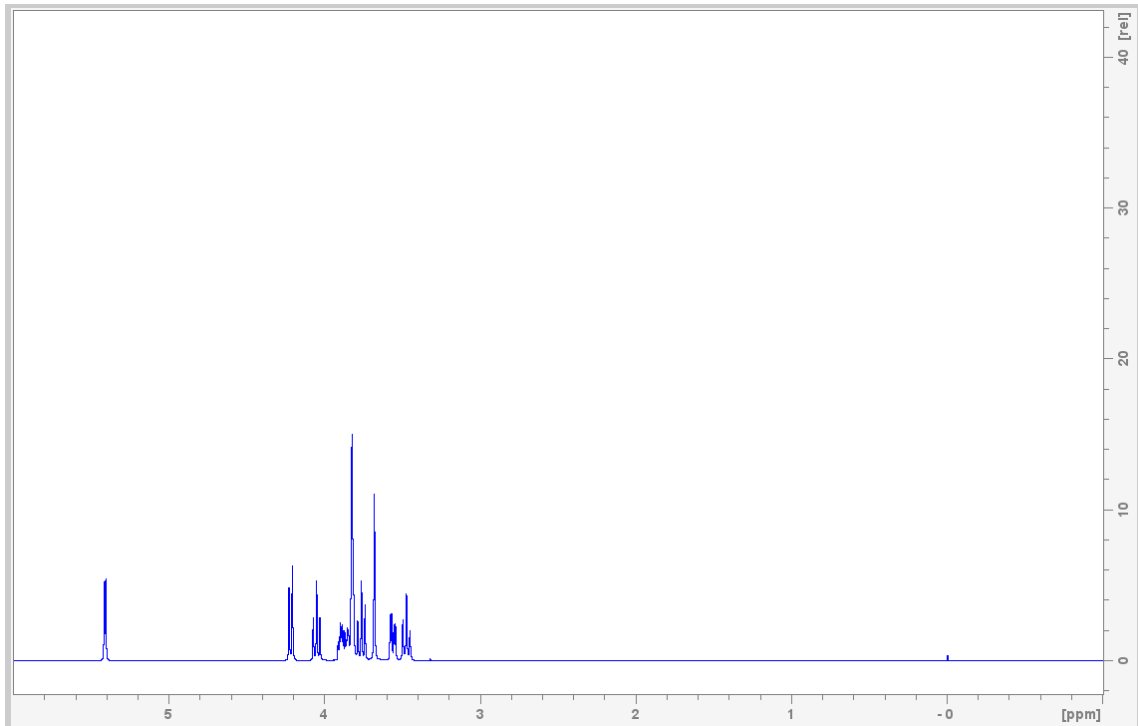
Fonte: Próprio autor

Observa-se a presença da sacarose e da frutose, que possivelmente são parte do substrato utilizado pela simbiose no processo fermentativo, como elas necessitam serem consumidas isso explica o sinal pouco representativo. Na região de 2.66 ppm podemos identificar o ácido succínico um antioxidante natural, com aplicações industriais e medicinais (OLIVEIRA, Christean Santos de – 2019). O ácido acético e o etanol também são identificados com picos expressivos, sendo ambos resultados do processo fermentativo realizado pela simbiose e, por se tratar de uma amostra industrializada, podendo o ácido acético ter sido adicionado como componente antibacteriano (MENDONÇA, Gislane Romano e col. – 2020).

5.3.2. Estudo e análise da kombucha caseira

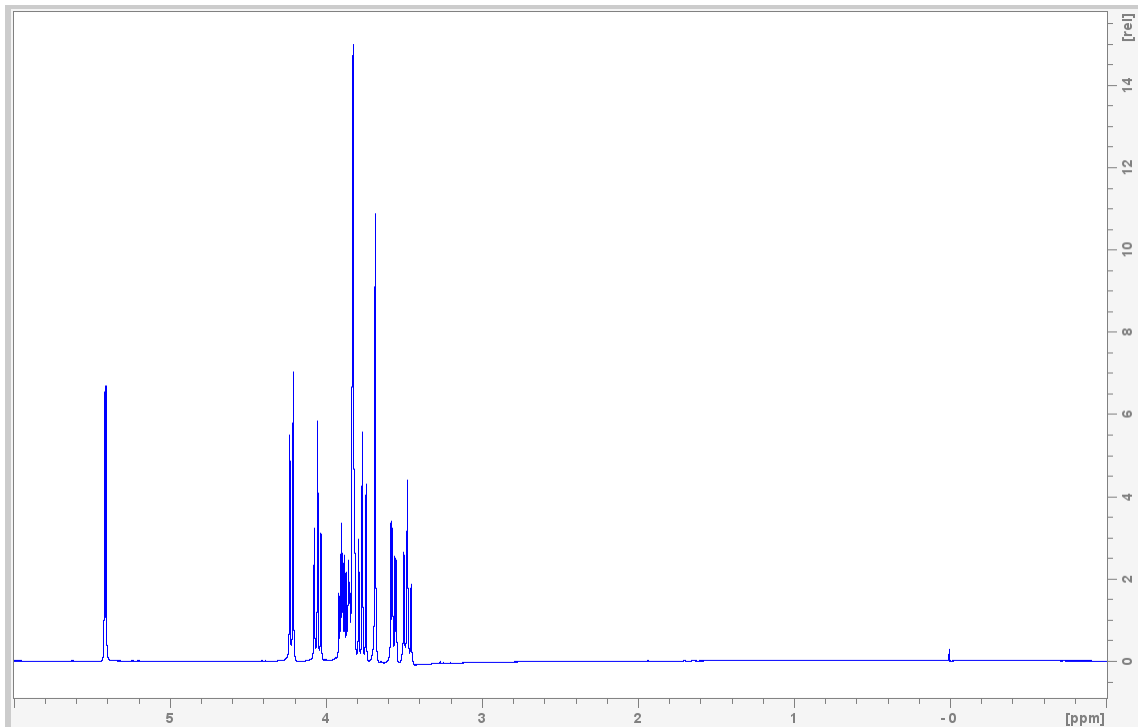
Para uma produção segura se atente sempre a limpeza de todos os utensílios utilizados no processo, eles devem ser lavados, fervidos e limpos com álcool 70%, mantendo também a higiene das mãos com muito rigor. Durante a produção o chá utilizado como substrato para a fermentação foi o chá preto, sendo assim ele já traz consigo metabólitos que serão ou não levados adiante, com o intuito de identificar os compostos formados somente pelo processo de fermentação, foi feito um branco desse chá (Figura 22), assim como do chá de capim limão, utilizado para saborizar o produto após a fermentação (Figura 23).

Figura 22: Espectro branco chá verde



Fonte: Próprio autor (2023)

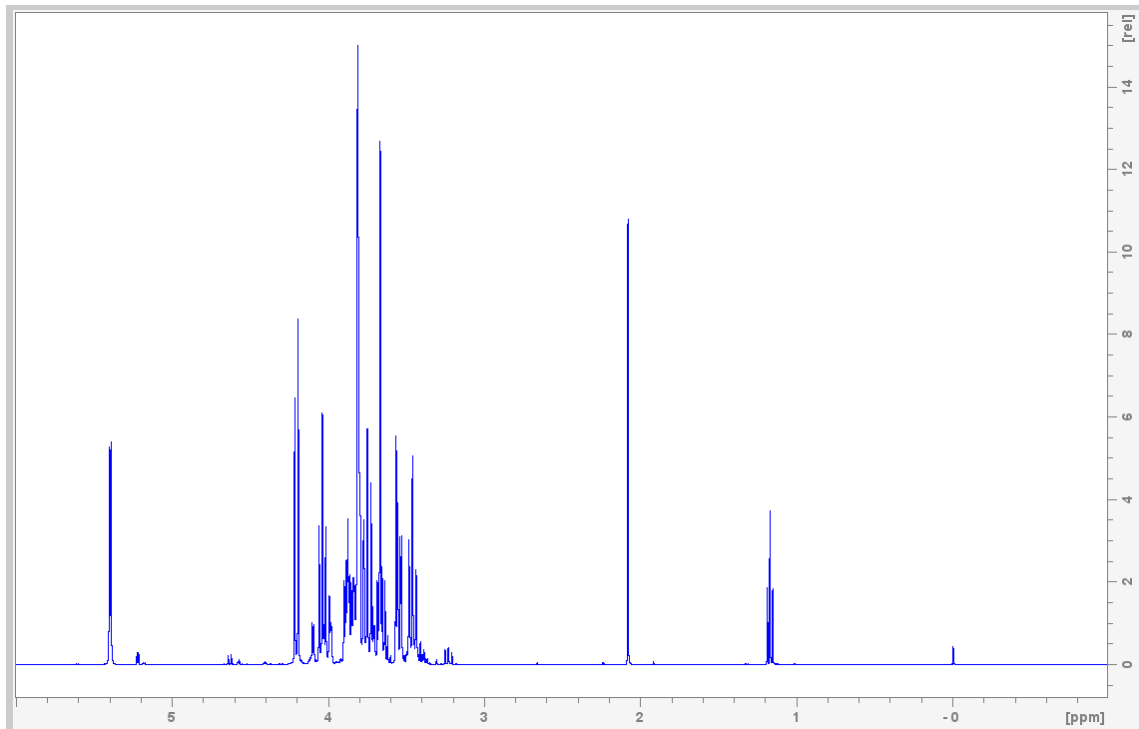
Figura 23: Espectro branco chá capim limão



Fonte: Próprio autor (2023)

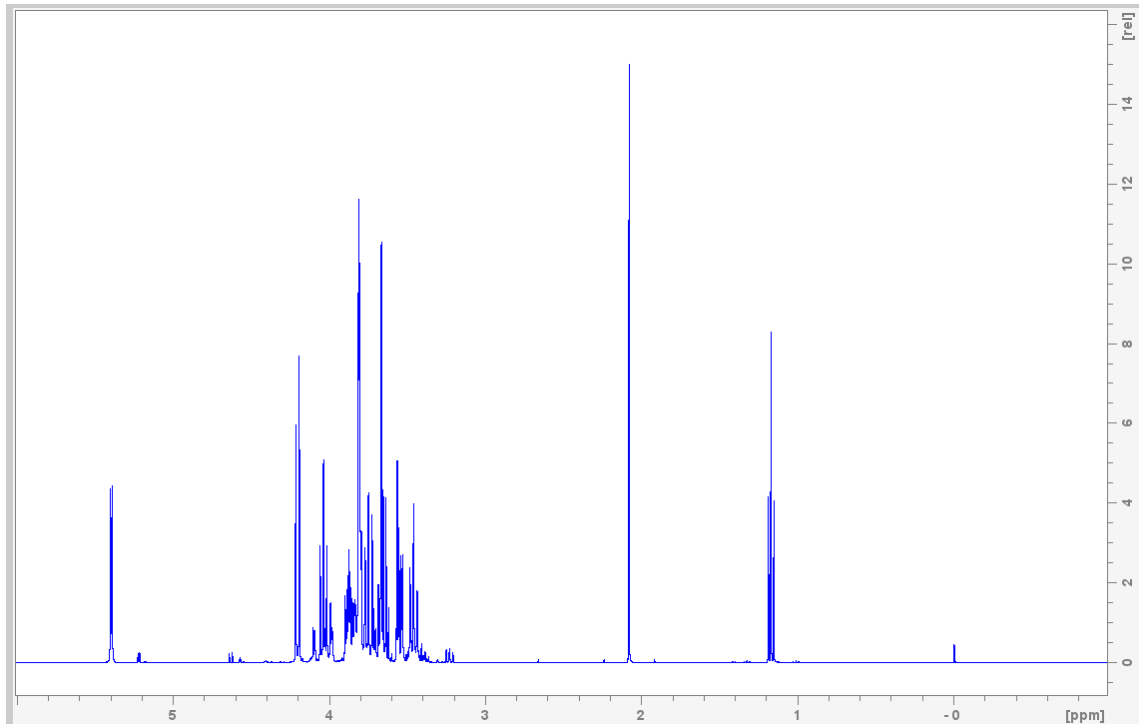
O processo de fabricação da bebida, como já citado no item 3.2.1, traz uma flexibilidade quanto ao tempo de fermentação, variando de 7 até 10 dias, para avaliar o melhor tempo e quais seriam as diferenças nos metabólitos formados foi feita uma análise em uma amostra com 7 dias de fermentação (Figura 24) e outra em uma amostra com 10 dias de fermentação (Figura 25).

Figura 24: Espectro kombucha com 7 dias de fermentação



Fonte: Próprio autor (2023)

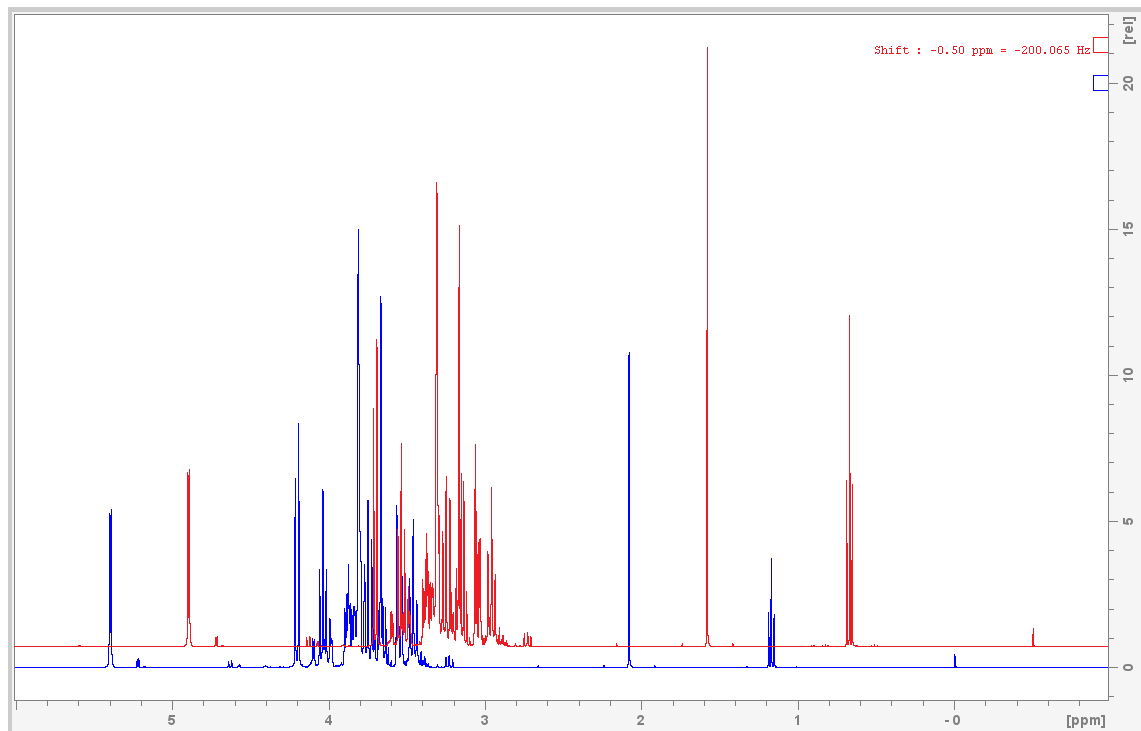
Figura 25: Espectro kombucha com 10 dias de fermentação



Fonte: Próprio autor (2023)

Os dois processos apresentam relativa similaridade, o que pode ser mais bem evidenciado na Figura 26, é que mantendo a fermentação por 10 dias (espectro destacado em vermelho), obtém-se um pico mais expressivo de ácido acético comparado ao processo de fermentação mantido por 7 dias (espectro destacado em azul). O maior teor de ácido acético pode ser produto do consumo do álcool gerado pelo próprio processo de fermentação em si, podendo trazer um sabor indesejado ao produto, diante disso o processo de fermentação por 7 dias trouxe resultados mais satisfatórios para a continuidade das análises.

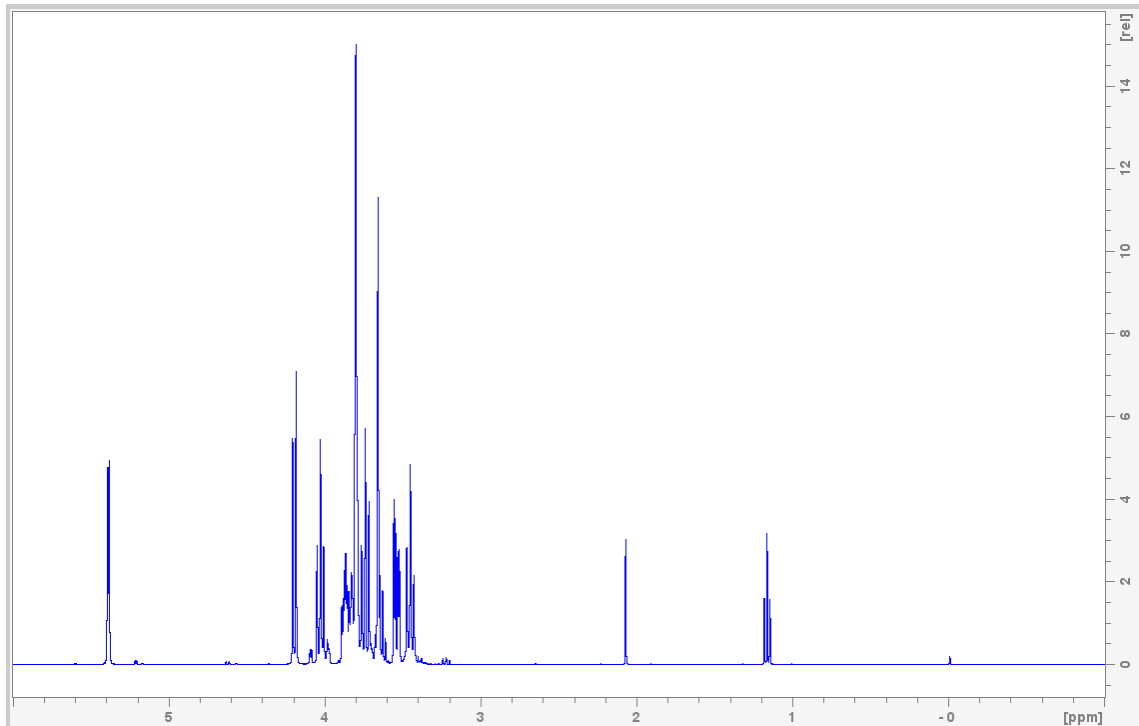
Figura 26: Análise dos espectros do processo de fermentação por 7 e 10 dias



Fonte: Próprio autor

Enfim um novo processo de fabricação de kombucha foi executado e uma nova amostra analisada de acordo com os parâmetros estudados (Figura 27)

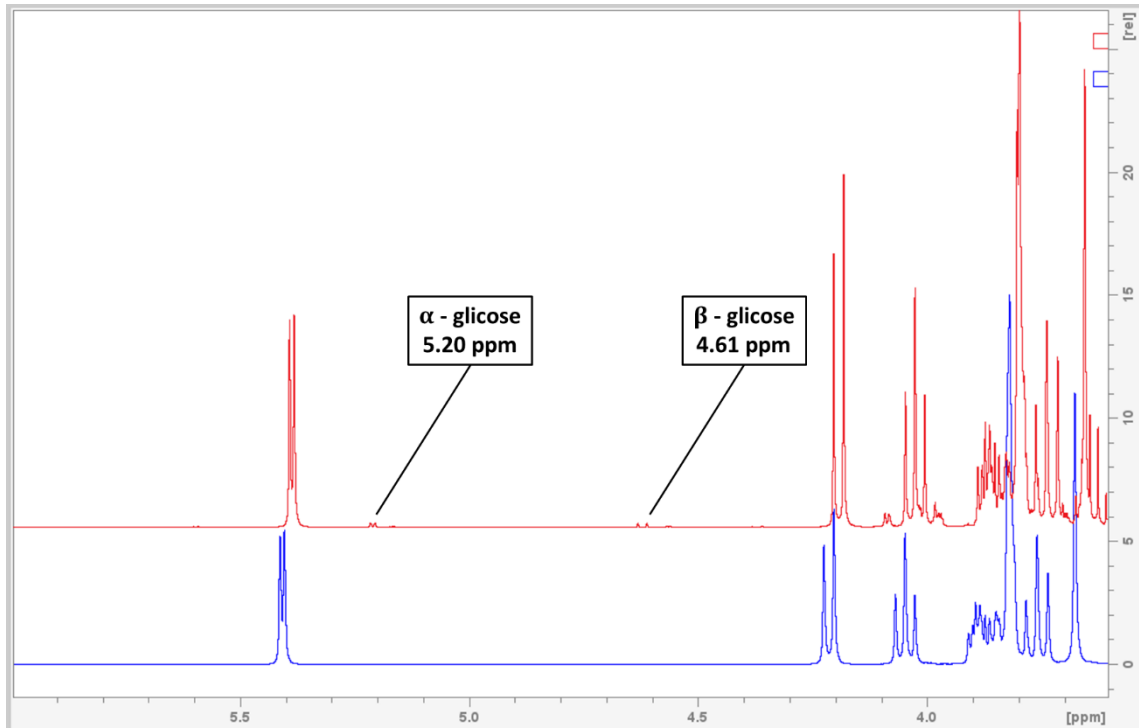
Figura 27: Espectro kombucha 7 dias de fermentação saborizada com chá de capim limão



Fonte: Próprio autor

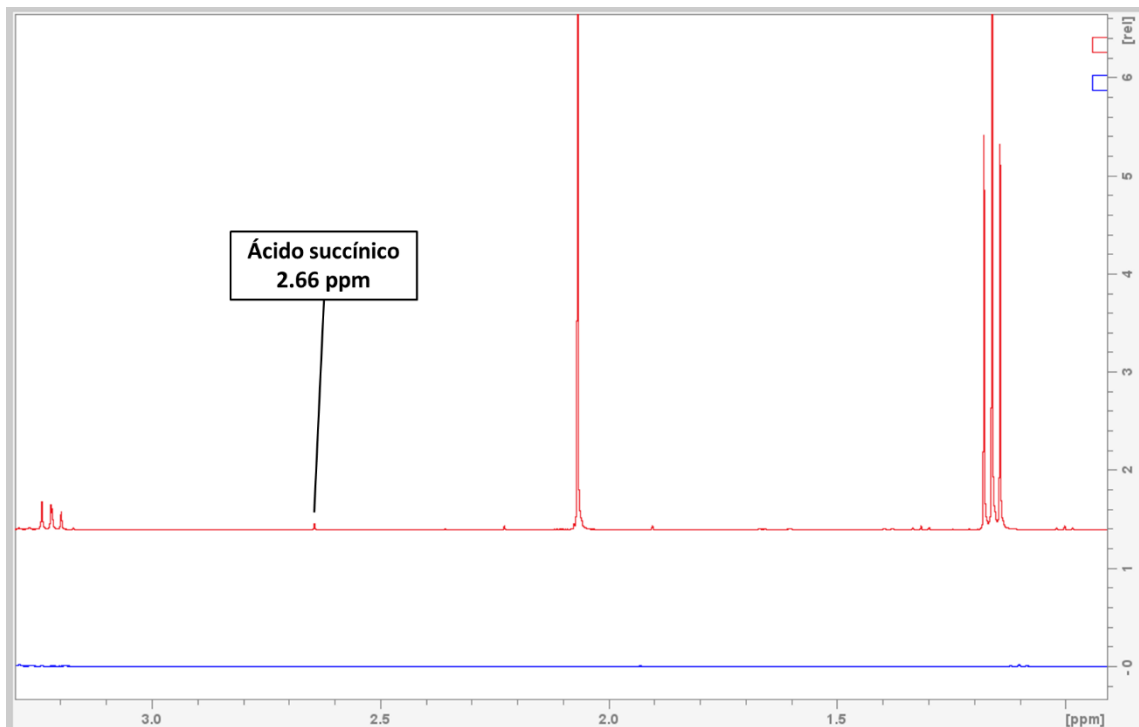
As Figuras 28 e 29 abaixo trazem uma comparação entre o espectro gerado pelo branco do chá verde (azul), que é o substrato inicial do processo de fermentação, e o espectro gerado pela kombucha caseira (vermelho). É possível notar a formação de α e β – glicose como produto do processo fermentativo, assim como ácido acético e etanol que não são observados na amostra de chá verde, destaca-se o fato de a kombucha apresentar um sinal correspondente ao ácido succínico que não era observado de maneira significativa na amostra de chá verde, o que pode corroborar com as capacidades antioxidantes da bebida.

Figura 28: Análise dos espectros branco do chá verde e da Kombucha caseira (I)



Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 29: Análises dos espectros branco chá verde e da Kombucha caseira (II)

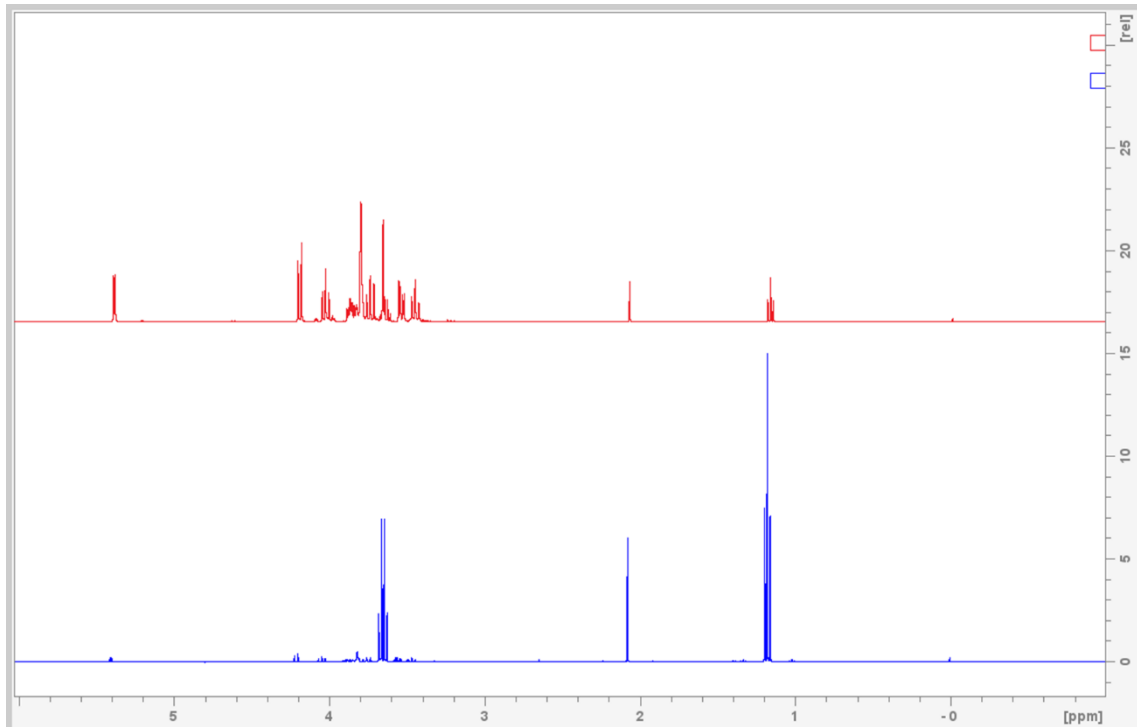


Fonte: Próprio autor (2023)

5.3.3. Considerações finais

A Figura 30 traz um compilado dos gráficos obtidos com a análise da kombucha comercial, destacada em azul e da kombucha caseira, destacada em vermelho

Figura 30: Análise dos espectros da Kombucha caseira e da Kombucha comercial (I)

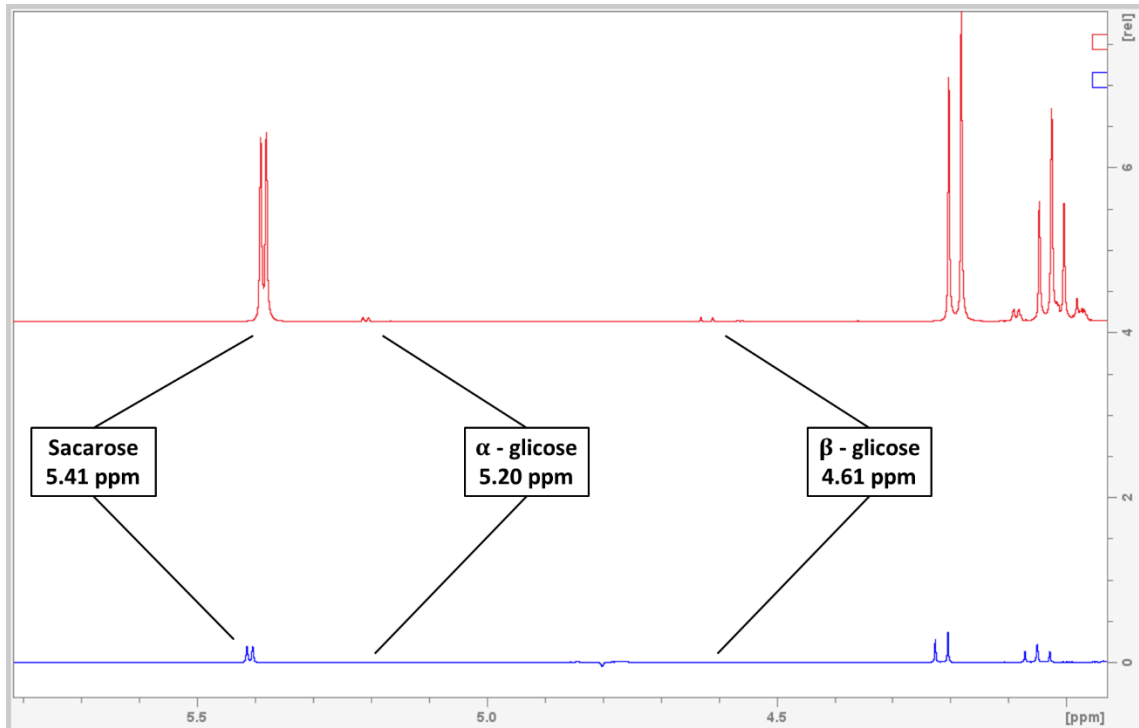


Fonte: Próprio autor (2023)

Com a observação da Figura 30 é perceptível que a amostra comercial apresenta o mesmo comportamento dos picos assim como o mesmo padrão de compostos produzido, o que se destaca é a proporção que cada composto ocupa na amostra.

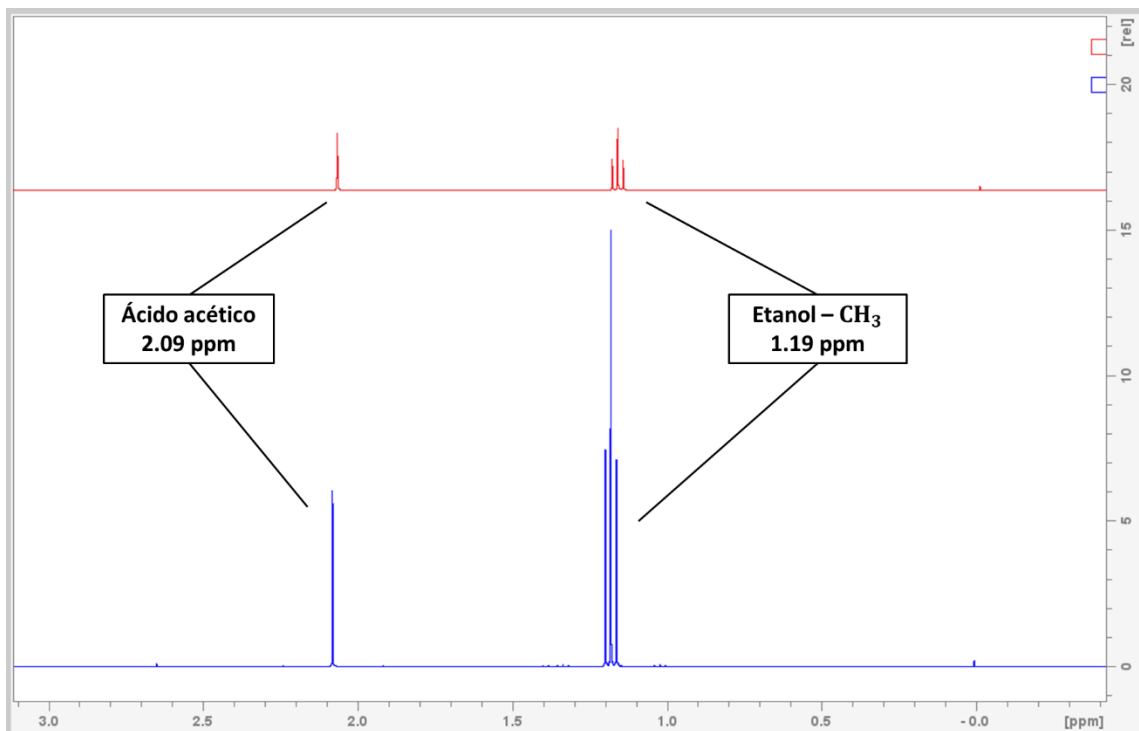
De maneira proporcional podemos evidenciar que a amostra de origem industrial apresenta picos referentes ao açúcares com baixa intensidade, isso pode ser mais bem observado na Figura 31, ao passo que os sinais obtidos para o ácido acético e o etanol muito estão mais acentuados em comparação com a amostra caseira (Figura 32).

Figura 31: Análise dos espectros da Kombucha caseira e da Kombucha comercial (II)



Fonte: Próprio autor (2023)

Figura 32: Análise dos espectros da Kombucha caseira e da Kombucha comercial (III)



Fonte: Próprio autor (2023)

Vê-se na Figura 31 que a amostra caseira apresenta sinais equivalentes a α e β glicose, e que esses sinais não são evidenciados de forma clara no espectro gerado a partir da amostra comercial, corroborando ao fato evidenciado na Figura 32 vemos que os picos de ácido acético e de etanol sofreram um expressivo aumento, isso pode se dever ao processo fermentativo imposto a amostra comercial ser mais longo, ocasionando assim uma maior produção de ácido acético e etanol se comparado ao processo caseiro. O ácido acético é um dos principais componentes antibacterianos (MENDONÇA, Gislane Romano. 2020), sendo assim, o processo de fermentação mais longo pode ser uma estratégia para gerar um componente que aumentaria tempo de validade do produto de forma natural, porém o mesmo processo ocasiona um aumento significativo no percentual de álcool da bebida. Vale ressaltar que o tempo de fermentação assim como o processo de preparo do chá verde (substrato inicial para a fermentação) ou do chá de capim limão, assim como qualquer outro composto utilizado para saborizar as kombuchas comerciais, não são informados pelo fabricante, impossibilitando a afirmação precisa das discussões feitas.

5.4. Análise do perfil antioxidante

O cálculo da capacidade antioxidante é feito a partir da equação exposta na Figura 33, onde: $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da solução metanólica e DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra), Abs_{branco} é a absorvância da amostra em metanol.

Figura 33: Equação da porcentagem de atividade antioxidante

$$AA = DPPH_{sequestrado}(\%) = \left(\frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \right) 100$$

Fonte: Extraído de composição química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato das cascas de croton urucurana. Tiara (2016)

A Figura 34 traz uma tabela onde é possível identificar a as absorvâncias das triplicadas testadas assim como o resultado da aplicação contida na Figura 33.

Figura 34: Valores das absorvâncias e porcentagem da atividade antioxidante para amostra caseira e comercial

amostra (ppm)	ABS*	MeOH + A	ABS	DPPH	DPPH	Média
				Branco	%	
Kombucha caseira	0,084	0,038		0,920	95,00	95,18
	0,080	0,034	0,046	0,920	95,00	
	0,080	0,039	0,041	0,920	95,54	
kombucha comercial	0,078	0,044	0,034	0,920	96,30	94,86
	0,079	0,041	0,038	0,920	95,87	
	0,07	0,041	0,07	0,920	92,39	

Fonte: Próprio autor (2023)

O resultado obtido mostra uma reprodutibilidade satisfatória entre as triplicatas, exibindo um alto valor da porcentagem de atividade antioxidante, em média 95,18% para a amostra caseira e 94,86% para a amostra comercial. O fato desse valor se manter abaixo de 100%, demonstra que a amostra de kombucha reagiu com o DPPH fortemente, mas ainda sim restou uma pequena concentração do radical, evidenciando que foi possível calcular a capacidade máxima de sequestro do radical que a bebida apresenta.

6. Conclusão

Feitas todas as considerações é possível concluir que o processo de fabricação caseiro da kombucha muito se assemelha ao processo industrial se comparados somente os metabólitos gerados, não se pode afirmar com precisão que o processo num todo se dá de maneira igual em função de o fabricante não expor o método de preparo dos produtos, mas é possível concluir que a amostra comercial apesar de fornecer a praticidade de estar pronta para o consumo traz características ao produto final pouco interessantes ao público consumidor, o processo de fermentação, possivelmente por um tempo maior que o utilizado na produção da Kombucha caseira deste trabalho, eleva a quantidade de ácido acético e etanol na amostra de forma significativa, podendo trazer uma alteração de sabor muitas vezes indesejada, como a acidez em função do ácido acético, e um fator mais preocupante, é o aumento expressivo da quantidade de etanol na bebida, que até o presente momento não é taxada como bebida alcoólica, porém como visto e quantificado por EDWARDS, John

C. (2016) a bebida pode conter cerca de 5% v/v de álcool, tendo assim a necessidade de uma regulamentação como bebida alcoólica visto que são extremamente difundidos os problemas do consumo de álcool.

A análise comparativa dos sabores estudados da kombucha comercial se mostraram úteis no sentido de evidenciar que as possíveis características probióticas da bebida se dão em função do substrato inicial utilizado na fermentação do produto, o segundo processo, de saborização, não altera de maneira significativa os metabolitos, somente aumentando a quantidade de açúcares caso o saborizante em questão tenha naturalmente esse componente em sua composição.

Os estudos de supressão se mostram de grande importância para a obtenção de gráficos nítidos, uma vez que sem esse tratamento não seria possível perceber consumos de metabolitos para formações de novos produtos como exemplo o demonstrado nas Figuras 31 e 32, apesar da turbidez característica da amostra e da presença de corpo de fundo remanescente do processo de fabricação de ambas as amostras, a técnica de RMN assim como os parâmetros adotados no preparo das amostras (item 3.2.2) se mostrou muito eficiente entregando resultados muito completos e espectros bem nítidos, de maneira geral não precisando de grandes tratamentos uma vez entendidos os melhores parâmetros para o estudo. Ainda oferece um grande potencial de utilização em questões que podem ser estudadas ainda no âmbito da kombucha, mas que não foram feitas por fugir ao objetivo estabelecido, como exemplo tempo de validade, principalmente para a kombucha caseira por ser um tema que traz muita divergência, mudança no substrato inicial utilizado na fermentação, assim como mudança no tipo de açúcar utilizado.

A análise do perfil antioxidante demonstra que não existe diferença significativa entre as amostras de kombucha comercial e caseira, sendo ambas fortemente antioxidantes, isso se dá pelo fato de o chá verde, substrato inicial para a fermentação, ter consigo uma capacidade antioxidante inerente, porém como evidenciado na Figura 29 item 5.3.2, o processo fermentativo da produção da Kombucha acentua a formação de compostos antioxidantes antes não evidenciados.

7. Referências bibliográficas

DEBORDE, Catherine; MOING, Annick; ROCH, Léa; ROLIN, Dominique; GIRAUDEAU, Patrick. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal Elsevier**, Paris, France, V. 1, p. 62-67, fevereiro-junho 2017.

DPPH, C18H12N5O6. Química Nova Interativa – Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: https://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6-OUaLje9-uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q

EDWARDS, John C. Quantitative ¹H NMR Analysis of “Off-the-Shelf” Commercial Kombucha Beverages. Janeiro 2016.

GUIMARÃES, Caine Alves. Aplicações de ressonância magnética nuclear (RMN) e quimiometria na Determinação da autenticidade de uísques. Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial, para obtenção do título de Mestre em Química. Goiânia. p-81. 2019

ISHMOTO, E. Y. Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters. 2008, 173 f. tese (doutorado em nutrição) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

JUNIOR, Luiz Henrique Keng Queiroz. Ressonância Magnética Nuclear Ultrarrápida: Implementação Desenvolvimento e Aplicações. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências, área de concentração: Química Orgânica. Universidade de São Carlos. São Carlos – SP. p-78. 2011.

LIMA, Marieli; KIKUTI, Elaine. Produção de Kombucha: desafios e oportunidades. Novembro 2021. Curso de produção de kombucha Universidade Federal de Uberlândia.

MENDONÇA, G. R.; PEREIRA, A. L. F.; FERREIRA, A. G. N.; SANTOS NETO, M.; DUTRA, R. P.; ABREU, V. K. G. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E EFEITOS ANTIMICROBIANOS DA KOMBUCHA: REVISÃO DA EVIDÊNCIA CIENTÍFICA. Revista Contexto & Saúde, [S. I.], v. 20, n. 40, p. 244–251, 2020. DOI: 10.21527/2176-7114.2020.40.244-251. Disponível em: <https://www.revistas.unijui.edu.br/index.php/contextoesaude/article/view/10523>.

OLIVEIRA, Christean Santos de. Atividade antioxidante e caracterização do perfil metabólico da casca, semente e polpa das variedades Margarida, Breda e Geada do abacate (*Persea americana*). 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.

RAMOS, Ana Luiza Coeli Cruz. **Bebida fermentada com potencial probiótico à base de extrato hidrossolúvel de soja com adição de grumixama (*eugenia brasilienses*)**. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 125. 2020

SILVA, Leomara Andrade da et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista, Rio de Janeiro**, v. 12, n. 2, p. 117-126, jul. 2018.

SIMÕES, C. M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. e col. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, Teresina – PI, Brasil, Vol. 30, No. 2, p. 351-355. Janeiro, 2007.

THAI, Thanh Thao Sandy. **Application of nmr analysis to determine concentration of ethanol, acids, and sugars in kombucha beverages**. A Project Paper Presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Professional Studies in Agriculture and Life Sciences Field of Food Science and Technology. Ithaca, NY, EUA. P – 49. 2018.