



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS SÃO RAIMUNDO NONATO
CURSO TECNOLOGIA EM GASTRONOMIA

ARLITA GUEDES DE SOUZA

KOMBUCHA DE CAJUÍNA: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *in vitro*

SÃO RAIMUNDO NONATO

2022

ARLITA GUEDES DE SOUZA

**KOMBUCHA DE CAJUÍNA: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia)
apresentado como exigência parcial para obtenção do
diploma do Curso de Tecnologia em Gastronomia do
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do
Piauí, Campus São Raimundo Nonato.

Orientador: Prof. Me. Armênio André de Carvalho
Almeida da Silva
Co-orientadora: Profª Drª Dayanne Lopes Gomes de
Oliveira

SÃO RAIMUNDO NONATO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Souza, Arlita Guedes de
S719k Kombucha de cajuína : produção e avaliação da atividade antioxidante in vitro / Arlita Guedes de Souza. - 2022.
38 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Gastronomia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus São Raimundo Nonato, 2022.

Orientador : Prof Me. Armênio André de Carvalho Almeida da Silva.

Coorientador : Prof Dr. Dayanne Lopes Gomes de Oliveira.

1. Antioxidante in vitro. 2. Chá verde. 3. Chá preto. 4. Cajuína. I. Título.

CDD - 641.5

Elaborado por Josué de Moura Costa CRB 3/1130

ARLITA GUEDES DE SOUZA

**KOMBUCHA DE CAJUÍNA: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia)
apresentado como exigência parcial para obtenção do
diploma do Curso de Tecnologia em Gastronomia do
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do
Piauí, Campus São Raimundo Nonato.

Aprovada em: 19 / 12 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Armênio André de Carvalho Almeida da Silva (Orientador)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI)

Profa. Dra. Dayanne Lopes Gomes de Oliveira (Co-Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI)

Marianna Barros Silva (Membro-PPGbqBM-UFRN)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI)

Prof. Dr. Rusbene Bruno Fonseca, de Carvalho (Membro Ead-UFPI)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI)

Dedico esta obra

A DEUS, que iluminou todos os meus passos, me amparando nos momentos mais difíceis, me dando forças quando fraquejei, fazendo um caminho de luz onde havia escuridão, recuperando meu corpo, quando a saúde preocupou e sendo o meu tudo quando eu não tinha nada.

Aos meus pais, Arlinda Guedes de Souza e Joaquim Reis de Souza, que sempre me apoiaram, incentivaram e estiveram à minha espera nessas idas e vindas, sendo meu porto seguro e fortaleza.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pois suas misericórdias se renovam a cada manhã, me permitindo o aprendizado necessário para concluir esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Arlinda Guedes de Souza e Joaquim Reis de Souza, que por muitas vezes renunciaram alguns de seus sonhos para dar prioridade a minha formação moral, física e acadêmica.

Aos meus irmãos Hipólito, Hipolitiana, Poliana, João Emílio, Franciana, Fabriciana e Gustavo, meus sobrinhos, cunhadas e cunhados, por serem meu núcleo de apoio, fonte de alegrias e a certeza de que sempre estarão comigo.

Ao meu orientador Armênio André de Carvalho Almeida da Silva e toda a banca que se fez presente, obrigada pela credibilidade e confiança comigo. A contribuição e o reconhecimento de vocês foram muito importantes.

À minha querida orientadora e amiga Professora Dra. Dayanne Lopes Gomes, que me acolheu com muito carinho, abrindo as portas do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – BIOPOL – Natal, depositando a confiança que eu não tinha, agradeço também toda a sua compreensão, seu discernimento, sua humanidade, seu exemplo de professora, pesquisadora e mãe maravilhosa, pois orientar não é só criar uma lista de afazeres a ser dita ou enviar um e-mail cheio de tarefas, existem humanos trabalhando ali, e a senhora é um exemplo a ser seguido!

Ao Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha e o Prof. Dr. Wesley Paiva meu muito obrigada pelo acolhimento e ensinamento durante meus dias no BIOPOL/UFRN.

À minha professora e amiga Cynthia Brasil da Nóbrega e a todos os professores que tive na minha trajetória acadêmica no IFPI-Campus São Raimundo Nonato-PI, que me acolheram com muito carinho. Obrigada pela confiança que eu não tinha, agradeço suas compreensões, seus discernimentos, suas humanidades, gratidão a todos!

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí Campus São Raimundo Nonato, bem como aos projetos de pesquisa financiados como o PROAGRUPAR-INFRA que fomentaram a execução de parte dessa pesquisa.

A minha turma que sempre esteve do meu lado durante essa trajetória acadêmica e em especial a minha amiga- irmã Samara Neres Moreira, que sempre esteve comigo nos momentos difíceis durante o curso. Gratidão a cada um de vocês!

Gratidão Bruno Dias, Valdirene Santos, Laíde Almeida pela companhia e solidariedade comigo, durante nossa convivência no prédio. Vocês foram minha família nos momentos de saudade de casa.

Aos meus colegas e amigos de Corrente- PI em especial ao meu médico psiquiatra Dr. Dhiogo Melo e a psicóloga Dr^a Daniela Augusta, obrigada por estarem do meu lado na etapa mais difícil de minha vida, se eu venci foi graças a Deus e a cada um que estiveram do meu lado.

E, por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu Muito Obrigada!

Agradeço a Deus pelo que conquistei até agora, mas peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais! (Mr. Jokinha)

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente
descansará.
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele
confiarei.”

Salmos 91:1,2

RESUMO

O kombucha consiste numa bebida fermentada feita com chá verde (CV) ou preto (CP) açucarado, acrescentada a uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras chamada SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts). O resultado é uma bebida doce, ácida e gaseificada. Há relatos, de que a bebida possui propriedades desintoxicantes e de prevenção a males digestivos e circulatórios. A cajuína (CAJ), também é um produto valorizado pelo seu potencial antioxidante, além do seu precioso paladar. É uma bebida tipicamente produzida no estado do Piauí, através da clarificação do suco de caju puro, sem adição de açúcar e conservantes. Esse estudo propõe produzir kombucha de CV e CP, adicionando à CAJ a partir de uma segunda fermentação e avaliar os efeitos na atividade antioxidante dos produtos. Após preparo do CV ou CP, os mesmos foram açucarados e acrescentados ao SCOBY para fermentação inicial (7 dias) e secundária com CAJ (3 dias). As amostras liofilizadas foram diluídas em diferentes concentrações para avaliação do potencial antioxidante *in vitro*: capacidade antioxidante total (CAT), poder redutor, sequestro de radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), sequestro de radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e quelação cúprica. Foram obtidos: kombucha de chá verde (KCV); kombucha de chá preto (KCP) e kombucha de cajuína de chá verde (KCCV). O KCV apresentou CAT de aproximadamente 300 mg EAA/g., porém, o valor de CAT em KCCV foi menor que seu kombucha controle, sem cajuína (KCV). Contudo, no teste de poder redutor, o KCCV mostrou-se mais potente que KCV nas diferentes concentrações testadas (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL). No ensaio antioxidante de sequestro de $\text{O}_2\cdot^-$ os valores variaram entre 20% para CV e 30% para KCV (0,5 mg/mL). Nesta mesma concentração todas as amostras apresentaram altas porcentagens de sequestro de $\text{OH}\cdot$ chegando a valores para KCCV próximos à 100%. Em relação à atividade quelante de íons de cobre observou-se atividade de cerca de 40% para o KCCV e 90% nas demais amostras, sem diferença estatística entre elas. Portanto, a capacidade doadora de elétrons (poder redutor), o sequestro de $\text{OH}\cdot$ e a quelação cúprica foram considerados os principais mecanismos dos kombucha produzidos (KCV, KCCV). O estudo aponta para a necessidade de investigações mais aprofundadas no âmbito fitoquímico e biológico dos produtos formados na fermentação.

Palavras-Chave: antioxidantes *in vitro*; chá verde; chá preto.

ABSTRACT

Kombucha consists of a fermented beverage made with sweetened green (CV) or black (CP) tea, added to a symbiotic culture of bacteria and yeast called SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts). The result is a sweet, acidic and carbonated drink. There are reports that the drink has detoxifying properties and prevents digestive and circulatory problems. Cajuína (CAJ), is also a product valued for its antioxidant potential, in addition to its precious taste. It is a drink typically produced in the state of Piauí, through the clarification of pure cashew juice, without adding sugar or preservatives. This study proposes to produce CV and CP kombucha, adding to CAJ from a second fermentation and to evaluate the effects on the antioxidant activity of the products. After preparing the CV or CP, they were sugared and added to the SCOBY for initial fermentation (7 days) and secondary fermentation with CAJ (3 days). The lyophilized samples were diluted in different concentrations to evaluate the *in vitro* antioxidant potential: total antioxidant capacity (TAC), reducing power, hydroxyl radical (OH•) scavenging, superoxide radical (O₂•-) scavenging and cupric chelation. The following were obtained: green tea kombucha (KCV); black tea kombucha (KCP) and green tea cashew kombucha (KCCV). KCV had a CAT of approximately 300 mg EAA/g. However, the CAT value in KCCV was lower than its control kombucha without cashew (KCV). However, in the test of reducing power, KCCV was more potent than KCV in the different concentrations tested (0.25 mg/mL; 0.5 mg/mL; 1 mg/mL). In the antioxidant assay of O₂•- sequestration, values varied between 20% for CV and 30% for KCV (0.5 mg/mL). At this same concentration, all samples showed high percentages of OH• sequestration, reaching values for KCCV close to 100%. Regarding the chelating activity of copper ions, an activity of about 40% was observed for KCCV and 90% for the other samples, with no statistical difference between them. Therefore, the electron donating capacity (reducing power), OH• sequestration and cupric chelation were considered the main mechanisms of produced kombucha (KCV, KCCV). The study points to the need for more in-depth investigations in the phytochemical and biological scope of the products formed in fermentation.

Key words: *in vitro*; antioxidants; green tea; black tea.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	KOMBUCHA: HISTÓRIA, PRODUÇÃO E BENEFÍCIOS	13
2.2	CAJUÍNA: O FRUTO, PRODUÇÃO E HISTÓRIA	16
2.3	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E RADICAIS LIVRES	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	MATERIAIS E REAGENTES	20
3.1.1	MATERIAIS UTILIZADOS NESTES PROCESSO DE PRODUÇÃO	20
3.1.2	REAGENTES	20
3.2	MÉTODOS	20
3.2.1	<i>AQUISIÇÃO DO MATERIAL</i>	21
3.2.2	<i>PREPARAÇÃO DO MATERIAL</i>	21
3.2.3	<i>ENSAIOS DE AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE</i>	22
3.2.3.1	Capacidade antioxidante total	22
3.2.3.2	Poder redutor	22
3.2.3.3	Sequestro do radical superóxido (O ₂ -•)	22
3.2.3.4	Sequestro do radical hidroxila (OH•)	23
3.2.3.5	Quelação de cobre	23
3.2.4	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	PREPARO DE KOMBUCHA DE CAJUÍNA	24
4.2	ENSAIOS ANTIOXIDANTES	25
4.2.1	<i>CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)</i>	26
4.2.2	<i>PODER REDUTOR</i>	27
4.2.3	<i>SEQUESTRO DE RADICAL SUPERÓXIDO E HIDROXILA</i>	28
4.2.4	<i>QUELAÇÃO DE COBRE</i>	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O chá é sem dúvida umas das preparações mais consumidas no mundo, após a água (JUNGMIN *et al.*, 2013) Segundo McGee (2014, p. 483), o arbusto das folhas de chá, *Camellia sinenses*, é natural do sudoeste Asiático e sul da China. Suas folhas são ricas em cafeína, e já eram mascadas desde a pré-história, bem como suas folhas possuem um rico aminoácido, que só existe nele, a teanina (McGee, 2014, p.488). Nos países do Oriente o mesmo era tomado pelas suas propriedades estimulantes, desintoxicantes e medicinais, sendo considerado como uma bebida da longevidade (SANTOS, 2016).

O autor supracitado ressalta que das variedades de *Camellia sinenses*, produz diversos chá, sendo o chá preto, verde e oolong o mais consumido no mundo, tendo um sabor levemente ácido e amargo. Sua fabricação envolve várias etapas, uma delas é o processo em que as folhas após colheita, serão desidratadas, ou seja, perca de sua água por evaporação e torná-la fisicamente mais frágil, quanto mais longo o período de emurchamento, mais profundo será seu sabor, cor das folhas e da infusão feita com elas.

Com base nessas propriedades descritas, surgiu o kombucha, que consiste numa bebida fermentada geralmente feita com chá verde ou preto açucarado, na qual é acrescentada uma cultura de bactéria e leveduras chamada “SCOBY ou mãe da kombucha”. O resultado é uma bebida doce, levemente ácida e gaseificada.

Considerando algumas características organolépticas e modo de preparação, conforme descrito anteriormente, Santos (2016) relatam que os consumidores desta bebida afirmam que a mesma possui propriedades desintoxicantes probióticas e assim reduz o nível de colesterol, promove o bom funcionamento do fígado, previne problemas digestivos e circulatórios, entre outras.

Tendo em vista o modo de preparação da kombucha, surge como opção de saborização a cajuína feita do pedúnculo de caju que é uma matéria-prima rica em nutrientes e pode ser manuseado de maneira a se obter produtos com maior valor agregado e de menor perecibilidade (ABREU, 2004). Considerando que, “a cajuína não é nada mais que um suco de caju puro, clarificado, sem adição de açúcar e conservantes, acondicionados em garrafas que são colocadas por um longo período de cozimento em banho-maria, para o líquido adquirir uma coloração âmbar e um sabor característico” (ABREU; SOUZA, 2004, p.9-10).

Com isso, questiona-se se a utilização da cajuína na saborização das kombuchas de chá verde e chá preto poderia fornecer algum benefício antioxidante. Nessa perspectiva, tem-se o seguinte problema de pesquisa: a kombucha de cajuína possui atividade antioxidante superior aos kombuchas tradicionais?

1.1 OBJETIVOS

Como parte do processo de construção do trabalho a ser realizado, será necessário elencar o nosso objetivo geral e objetivos específicos.

1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar possíveis efeitos antioxidantes da kombucha de cajuína, por diferentes métodos *in vitro*.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a kombucha de chá preto e verde;
- Desenvolver a kombucha de cajuína com chá preto e verde;
- Determinar atividades antioxidantes da kombucha de cajuína, chá verde e chá preto, através de testes *in vitro*;
- Comparar as atividades antioxidantes das diferentes kombuchas.

1.2 JUSTIFICATIVA

Nesse contexto, visando enaltecer um produto típico do estado do Piauí, a cajuína, produto natural, resultante da clarificação do suco do caju, bem como a kombucha produto considerado um alimento funcional, e levando em consideração os resultados benéficos de seu consumo atribuídos ao efeito sinérgico principalmente entre as moléculas resultantes do processo de fermentação, o que torna uma bebida com potenciais propriedades benéficas para a saúde. Assim surgiu o interesse no estudo das propriedades antioxidantes. O trabalho propõe produzir kombucha de chás convencionais (preto e verde), assim adicionando a cajuína a partir de uma segunda fermentação para comparar os efeitos na atividade antioxidante dos produtos.

Por fim, a relevância deste estudo consiste em comprovar cientificamente que a kombucha de cajuína possui propriedades benéficas à saúde, propondo a divulgação em meio acadêmico dos resultados e discussões, a fim de contribuir com novos estudos e pesquisas sobre a temática.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Dando continuidade à produção da dissertação se necessário à escrita da fundamentação teórica que consiste na discursão e revisão de textos, artigos, livros, etc. Para a demonstrar o que será proposto no trabalho.

2.1 KOMBUCHA: HISTÓRIA, PRODUÇÃO E BENEFÍCIOS

Kombucha é uma bebida originária do Oriente e hoje bastante expandida no Ocidente (PALUDO, 2017). Os primeiros registros desta bebida datam de cerca de 221 a.C., onde era conhecida como “o chá da imortalidade”. De acordo com Jayabalan *et al.* (2014, p. 538) “em 414 d.C., um médico de nome Kombu teria levado a kombucha da Coréia para o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador Inkyo.”

A disseminação da kombucha ocorreu no início do século XX, com a expansão das rotas comerciais. Desse modo,

[...] a kombucha veio para o Ocidente pela Mongólia e foi introduzida na Rússia, onde depois seguiu para a Polônia durante a Primeira Guerra Mundial. Depois da guerra, a kombucha já estava presente na Alemanha e Dinamarca. Na altura da Segunda Guerra Mundial, esta bebida já era conhecida em Itália, França e Espanha, mas devido ao racionamento de provisões, nomeadamente de chá e açúcar, neste período de guerra, a kombucha deixou de ser consumida, pois não era possível a sua preparação [...] Kaufmann apud Santos (2016, p. 9).

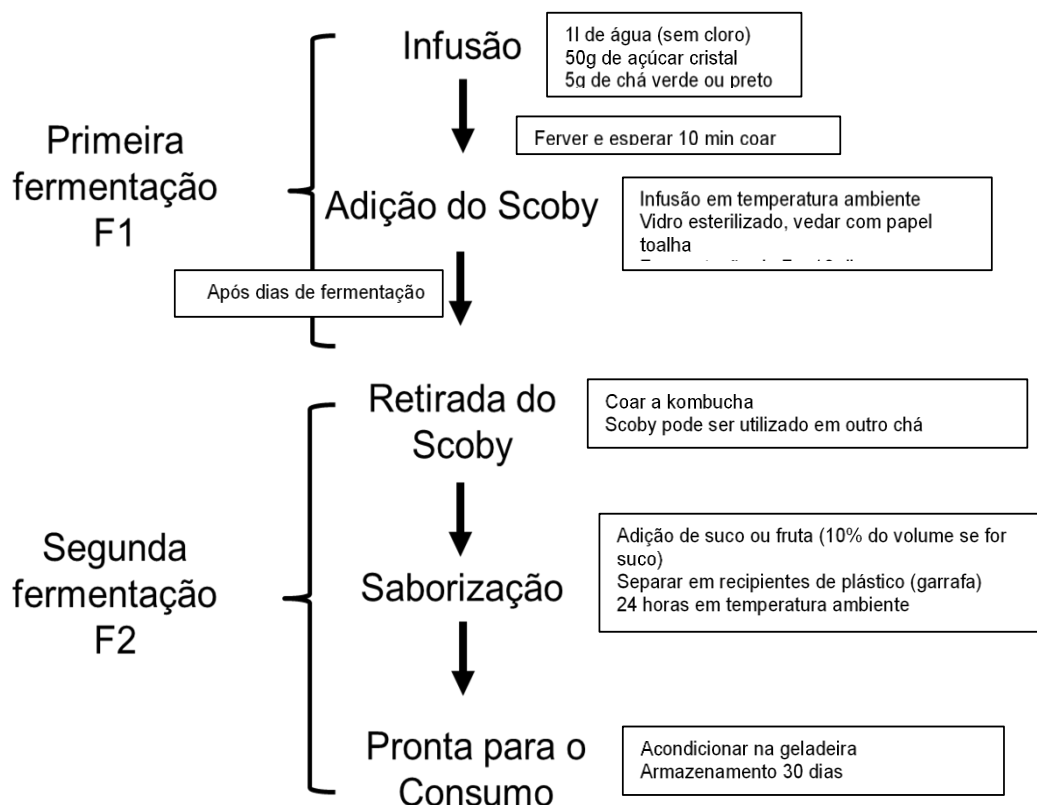
Nos anos 60, a kombucha retornou ao mercado, quando os *hippies* usavam remédios naturais e após o desastre de Chernobyl, quando descobriu-se que um grupo de consumidores bebiam para reduzir os efeitos da radiação. Nos Estados Unidos a bebida ganhou popularidade durante a epidemia do HIV, nos anos 80, uma vez que seus consumidores acreditavam que a bebida pudesse fortalecer o sistema imunológico. Com a crescente pesquisas nas áreas de alimentos e bebidas funcionais, a kombucha ressurgiu no início do século XXI, em países como os Estados Unidos, Canadá, Austrália e recentemente no Brasil (SUHRE, 2020).

O preparo da bebida (Figura 1) é feito basicamente a partir de uma base feita de chá (verde/preto) açucarado, após resfriamento o líquido será transferido a um vidro de boca larga, em seguida é adicionado o SCOBY “mãe kombucha” e 10 ou 20%

da kombucha já fermentada. O recipiente é então coberto com gazes limpas, evitando contaminação e ao mesmo tempo permitindo a entrada de ar. A preparação é então levada, sem agitação para um ambiente com temperatura (20 a 22° C), o período de fermentação é variado, dependendo do estado da bebida, resultado pretendido, entre outros fatores. Durante esse período é importante a vistoria evitando sua contaminação. Após alguns dias a bebida cria-se uma nova película, que se não for usada poderá ser guardada junto a uma parte do líquido dessa fermentação (F1) (SANTOS, 2016).

A bebida resultante (F2) deverá ser filtrada, para só então ser consumida, devendo estar refrigerada. A essa preparação pode-se adicionar uma fruta, suco ou açúcar mesmo, numa segunda fermentação para carbonatação. No decorrer desse período a bebida deverá estar dentro de recipiente de plástico vedado e deixado à temperatura ambiente, para só então ser consumida. Ao longo da produção deverão ser observadas algumas características organolépticas do líquido fermentado, o aspecto da kombucha ou se a mesma apresenta bolor, devendo ser descartada, caso haja contaminação.

Figura 1 - Fluxograma de produção artesanal de kombucha



A cultura utilizada para a fermentação do kombucha, SCOBY “mãe kombucha”, tem uma variável composição microbiológica de acordo com a sua origem, o clima, localização geográfica e meio utilizada para o processo de fermentação (WATAWANA *et al.*, 2015). Nessa bebida, os procariontes mais abundantes na cultura simbiótica pertencem às bactérias *Acetobacter* e *Gluconobacter* gênero (JAYABALAN *et al.*, 2014).

O biofilme de microorganismos permanece flutuando na superfície do chá com uma aparência muito semelhante a um cogumelo cap, é por isso que geralmente recebe esse nome (WATAWANA *et al.*, 2015). Esses simbioses possuem capacidade de oxidar o ânion acetato em dióxido de carbono, conferindo aspecto gaseificado à bebida.

O período de fermentação (F2) do kombucha é tipicamente conhecido por requerer mínimo de 3 dias a um máximo de 60 dias, dependendo das práticas culturais. O fato de a fermentação ocorrer à temperatura ambiente, otimiza o tempo de fermentação e gera grande variação de tempo necessário à fermentação a depender de onde esteja sendo produzido. A sacarose é usada como a principal fonte de carbono em uma concentração de 5 a 20%, fornecendo a energia e os nutrientes necessários para o desenvolvimento de microorganismos (WATAWANA *et al.*, 2015).

Segundo Vĩna *et al.* (2013), as variáveis do processo fermentação, como tempo, temperatura e concentração de sacarose, determinará a concentração final de substâncias orgânicas como ácidos e pH. Ácidos orgânicos produzidos durante este processo de fermentação diminui o pH do chá, o que leva a uma falta de oxigênio induzida pela acidez. Devido a isso, o número de patogênicos possíveis das células microbianas, se houver, diminuem, resultando em uma bebida segura para consumo, apesar de ter origem microbiana (WATAWANA *et al.*, 2015).

Dentre as propriedades investigadas a kombucha possui a capacidade de inibir células cancerígenas. Jayabalan e colaboradores em 2011 estudaram algumas dessas propriedades e verificaram:

[...] propriedades citotóxicas e anti-invasivas de frações de kombucha extraídas por diferentes solventes, contra células cancerígenas A 549 (carcinoma pulmonar humano), U2OS (osteossarcoma humano) e 786-O (carcinoma renal humano). A fração extraída por acetato de etilo foi a mais eficaz e foi determinado que esta continha malonato de dimetil 2-(2-hidroxi-2-metoxipropilideno) e vitexina, que possivelmente serão os compostos responsáveis pelas propriedades anticancerígenas da kombucha[...] Jayabalan *et.al. apud* Santos (2016, p. 17-18).

Com base nisso, observa-se que o consumo da kombucha está associado não somente às peculiaridades de seu sabor, mas também com a preocupação com saúde. Numa sociedade onde a longevidade é algo muito pesquisado, é normal que o consumo dessa bebida venha crescendo. Bastante consumida nos Estados Unidos, essa bebida gera uma grande movimentação no mercado de produtos alimentícios (SANTOS, 2016).

No Brasil, o consumo da kombucha chegou de forma artesanal, onde as pessoas desenvolvem sua bebida em casa como uma espécie de hobby. O Portal do Agronegócio que trata da multiplicação de kombucha no Brasil relata que umas das fábricas mais tradicionais é a Companhia dos Fermentados em São Paulo, onde atualmente a fabricação da empresa gira em torno de 10 mil garrafas por mês, em 2018 e pretende alcançar em 2019 uma média de 200 mil garrafas por mês. Outro grande fabricante é a Tao Kombucha, Porto Alegre, atualmente a marca atende 22 capitais brasileiras, sua produção gira em torno de 35 a 40 mil garrafas por mês. O preço varia entre R\$ 10,00 a R\$ 15,00 por garrafas de 300 mililitros. Com essa vasta diversidade de sucos de frutas e especiarias que há no mercado brasileiro, uma grande quantidade de sabores e combinações é produzida para atender os mais diversos consumidores (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2018).

2.2 CAJUÍNA: O FRUTO, PRODUÇÃO E HISTÓRIA

O caju (*Anacardium occidentale* L.), fruta originária do Nordeste brasileiro, foi descoberto pelos índios, que o usava em diversas formas, seja *in natura*, o uso da bebida feita por prensagem manual ou como uma bebida fermentada (o caoi ou caoim), a qual era utilizada em comemorações e em ocasiões especiais (ABREU; SOUZA, 2004).

O fruto é composto pelo pedúnculo, que é o pseudo ou falso fruto e a castanha, o fruto propriamente dito. Como isso,

O pedúnculo de estrutura carnosa e suculenta é muito rico em vitamina C e fibras. Um copo de suco de caju supre todas as necessidades diárias de vitamina C de uma pessoa adulta. O suco apresenta ainda teores consideráveis de açúcares redutores e minerais, principalmente o ferro (ABREU; NETO, 2007, pág. 9).

Sabe-se que essas propriedades já mencionadas estão associadas à nossa alimentação que fornece não apenas nutrientes, mas a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas C, A e E, e de compostos fenólicos como os flavonóides presente nos alimentos (GONÇALVES, 2008).

Além de ser consumido *in natura*, como fruto fresco, com o pedúnculo faz os doces e bebidas, tendo destaque no Nordeste na produção de cajuína. O Piauí é o estado que mais produz a bebida. A cajuína é o suco fresco, clarificado, obtido por prensagem de pedúnculos maduros, são e recém-colhidos, que são tratados por processo tecnológico adequado, em que se tornam límpidos e, posteriormente, passam por um tratamento rigoroso térmico e adquirem a coloração característica e a estabilidade microbiológica para ser assim, consumido como um produto sem conservantes e de sabor agradável (SOUSA *et al.*, 2018).

Os fatores determinantes para qualidade da cajuína são a variedade do caju, o ponto de maturação do pedúnculo, além do tipo de prensagem. Uma prensagem mais vigorosa resultará em um suco mais adstringente enquanto uma prensagem mais branda o suco é livre de excesso de taninos, dando a cajuína uma validade melhor após sua fabricação (ABREU; SOUZA, 2004).

Além dos fatores citados acima o suco clarificado, ou cajuína, para se tornar uma bebida pronta para o consumo deve obedecer às seguintes características e composições: a cor - varia do incolor ao amarelo translúcido; sabor - levemente ácido e adstringente; aroma - próprio da fruta. Os sólidos solúveis a 20 °C – mínimo de 10 °Brix, a acidez total expressa em ácido cítrico – mínimo de 0,25 g/100 g, o ácido ascórbico – mínimo de 60 mg/100 g e os açúcares totais, naturais do caju – máximo de 15 g/100 g (NETO *et al.*, 2004).

Cada cajuína produzida se difere umas das outras, seja por suas características organolépticas (sabor, cor, aroma), pela variedade do caju, qualidade do fruto, nutrientes ou pela técnica que cada família utiliza para produzir. Muitos são os comentários em torno da qualidade da bebida. Inseridas na nossa alimentação como um símbolo de hospitalidade, qualidade essa atribuída às mulheres, que em sua maioria estão à frente dessas produções, seja pelo seu cuidado e capricho na produção. A bebida vem ganhando seu espaço no mercado brasileiro como nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, principalmente na cidade de São Paulo e no Distrito

Federal, onde há uma grande concentração de habitantes de origem nordestina (ABREU; NETO, 2007).

De acordo com o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional– IPHAN (2009) a cajuína era feita em sua maioria artesanalmente por pequenas famílias em suas residências e levava o nome de um membro que a produzia. Seu consumo era destinado a datas especiais, em especial quando os filhos que moravam fora e vinham visitar seus familiares. Também eram servidas aos parentes, consumidos durante as festas de casamentos e aniversários.

Quanto à origem da produção existem duas vertentes, uma que a bebida originou no Ceará, conforme cita o IPHAN (2009), que na década do século XIX o Dr. Rodolfo Teófilo, médico e farmacêutico, já havia sido reconhecido publicamente como inventor da cajuína. Por outro lado, existe relato da Dra. Júlia Geracilda, química radicada depois de adulta em Teresina, que, em sua infância em Fortaleza, só se lembra da cajuína trazida por seu pai do município de Esperantina (PI).

Independentemente de sua origem, a cajuína seja de forma artesanal ou industrial, seguem padrões de qualidade e propriedades o que difere de outras bebidas. Além de seu potencial nutritivo e funcional, esse alimento representa um simbolismo cultural que é fortemente caracterizado pela produção familiar e trabalhadores de forma associativa por meio cooperativas com apoio dos governos Federal e Estadual do Piauí, representando uma importante fatia da renda familiar (ABREU, 2004; IBGE, 2017).

2.3 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E RADICAIS LIVRES

O desenvolvimento do estudo de doenças crônicas e sua prevenção colocaram em evidência termos como radicais livres e antioxidantes. O termo radical livre designa átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados (COSTA *et al.*, 2010), conferindo-lhe, dessa forma, alta reatividade. Os radicais podem ter carga positiva, negativa ou neutra. Eles são formados como intermediários necessários em uma variedade de reações bioquímicas normais, mas quando gerada em excesso ou não devidamente controlada, os radicais podem causar estragos em uma ampla gama de macromoléculas. Uma característica proeminente dos radicais é que eles têm muito alta reatividade química, o que explica não só as suas atividades biológicas normais, mas como eles causam danos nas células (CUZZOCREA *et al.*, 2001).

Os agentes oxidantes que mais contribuem para o desenvolvimento de enfermidades são as espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS), estas são produzidas de forma endógena por mitocôndrias, atividade da xantina oxidase, inflamação, peroxissomos, exercício físico e isquemia, dentre outros; de forma exógena, ou melhor dizendo, devido a fontes exógenas como poluição e radiação ionizante. ROS incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\bullet$), oxigênio singlet, dentre outros. Essas espécies podem interagir com moléculas (proteínas, DNA, lipídeos) causando danos a sua estrutura e função normais (NEHA *et al.*, 2019). Alguns metais como ferro e cobre atuam também como intermediários que catalisam processos formadores ROS, esse papel é pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Apesar da relevância do metal cobre na formação de radicais livres pela reação de Haber-Weiss, o ferro torna-se mais importante devido a sua abundância nos organismos

Os radicais em excesso são combatidos pelos antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta. Nesse sentido, definem-se antioxidantes como sendo uma substância natural ou sintética, que retarda a atividade oxidante, por meio de um ou mais mecanismo, como a inibição ou redução dos radicais livres (AMORIM, 2016). Por exemplo, ao reagir com o DNA os radicais livres podem modificar as bases púricas e pirimídicas que o compõem, gerando mutações ou inativando genes importantes. Já com proteínas, as espécies reativas são capazes de oxidar grupos sulfidrilas (SH) a pontes dissulfeto (S-S), alterando a conformação e consequentemente a função das proteínas. Ou ainda, pode haver a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares, proporcionando mudanças estruturais e funcionais de tais lipídios (VALKO *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante de compostos bioativos também já é bem relatado em frutas, inclusive no pedúnculo de caju rico em vitamina C e fibras, como também na cajuína, que embora seja submetida a um processo físico de clarificação deve obedecer a padrões especificados para suco de fruta (ABREU; NETO, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do trabalho a necessidade de relacionar os materiais e métodos que é todo o planejamento detalhado do que será realizado na pesquisa, sendo necessário a descrição dos materiais e reagentes, bem como o método a ser utilizado nos testes.

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Materiais e reagentes são elementos necessários para produção os testes, com isso se faz necessário as descrições desses elementos na produção textual.

3.1.1 *MATERIAIS UTILIZADOS NESTES PROCESSO DE PRODUÇÃO*

Cajuína (maria flor), Açúcar (pérola), Chá-preto (ervas naturais), Chá-verde (ervas naturais) e Água mineral (água fina)

Além desses, os utensílios como colher, jarra, peneira, balança, bowl, papel toalha, elástico de látex foram adquiridos com a verba do projeto PROAGRUPAR-INFRA – IFPI 2018 e ficaram disponíveis no Laboratório de Biologia - IFPI/campus São Raimundo Nonato para futuras utilizações.

3.1.2 *REAGENTES:*

Para realização dos ensaios antioxidantes foram utilizados os seguintes reagentes: EDTA, Água ultrapura, Cloreto de ferro tetra hidratado, Ferrozina, Ácido Acético, Acetato de sódio, Violeta de pirocatecol, Sulfato de cobre pentahidratado, Ferricianeto de potássio, Fosfato de sódio monobásico, Fosfato dibásico, TCA (Ácido Tricloroacético), Cloreto de ferro 2, Ácido ascórbico, Metionina, Riboflavina, Nbt (Cloreto de Nitrotetrazólio Azul), Fosfato de sódio, Salicilato de sódio, Sulfato de ferro II, entre outros, todos do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – BIOPOL – Natal.

3.2 MÉTODOS

Como continuidade de todo o processo dissertativo nos métodos são elencados elementos como aquisição do matérias e processo de produção do material a ser preparado, para que seja compreendido a metodologia descrita neste trabalho.

3.2.1 AQUISIÇÃO DO MATERIAL

Para realização do teste *in vitro* foi utilizado a cajuína, chá preto e chás verdes ambos comprados no mercado local, o SCOBY probiótico natural foi comprado no site Companhia dos Fermentados. Os testes foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – BIOPOL – Natal.

3.2.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Os chás foram preparados com água mineral levada à fervura, aos quais foram adicionados, separadamente, o chá verde e preto após chegar a aproximadamente 80 °C. A quantidade de chá usada para cada litro de água foi de 5g. A esses chás foram adicionados açúcar na concentração de 50g/L, que ficaram em infusão por aproximadamente 15 minutos até arrefecer. Posteriormente, foram peneirados e distribuídos em jarras esterilizadas, e após atingir a temperatura ambiente foi acrescentada a solução iniciadora (derivada de uma fermentação anterior) e o SCOBY (de aproximadamente 15 cm de diâmetro). A bebida foi coberta com folhas de papel toalha para evitar uma possível contaminação (física, química e microbiológica) porém permitir a entrada de oxigênio para ser realizada a primeira fermentação (F1) que teve duração de 7 dias.

Após a F1 com chás verde e preto, foram retiradas alíquotas dos kombuchas formados (800 mL) e a eles acrescentados a cajuína (200 mL) para que desse início a uma segunda fermentação (F2) que durou 3 dias.

Assim, ao final desse processo obtivemos como amostras testes para avaliação das atividades antioxidantes: i) a cajuína (CAJ) e os chás verde (CV) e preto (CP) que foram usados como brancos; ii) os kombuchas de chá verde (KCV) e preto (KCP) foram obtidos a partir da primeira fermentação; iii) os kombuchas formados a partir da segunda fermentação com cajuína (KCCV e KCCP). As amostras utilizadas na

avaliação da atividade antioxidante foram liofilizados e preparadas soluções para posteriores análises.

3.2.3 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE

Para melhor compreensão de todo o processo metodológico, se faz necessário a descrição dos testes que foram utilizados para o processo de avaliação das amostras após as preparações.

3.2.3.1 Capacidade antioxidante total

O ensaio é baseado na redução do Mo^{+6} para Mo^{+5} , com formação final de um complexo esverdeado fosfato/molibdênio em pH ácido. Amostras de chás e kombucha em triplicatas foram adicionadas em uma solução reagente que foi mantida a 100 °C por 90 minutos e depois resfriada. A leitura foi feita a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR. 1999). Como padrão de leitura, foi utilizado o ácido ascórbico. O resultado é expresso em equivalentes de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/g de amostra).

3.2.3.2 Poder redutor

O poder redutor foi quantificado de acordo com metodologia descrita por Athukorala; Kim e colaboradores (2006). 4 mL das amostras de chás e kombucha em triplicatas e diferentes concentrações (0,25; 0,50 e 1,00 mg/mL) foram misturadas em tampão fosfato (0,2M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1%) e incubados por 20 min a 50 °C. Após esse período a reação é interrompida pela adição de TCA (ácido tricloroacético) a 10%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 700 nm.

3.2.3.3 Sequestro do radical superóxido (O_2^-)

Este método baseia-se na capacidade da amostra teste em inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) em um sistema riboflavina-luz-NBT (CÂMARA *et al.*, 2011). As amostras (0,5 mg/mL) foram incubadas com uma solução reagente sob iluminação com lâmpada fluorescente por 10 min. A produção do azul

de formazan foi monitorada pelo aumento da absorbância a 560 nm.

3.2.3.4 Sequestro do radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$)

O ensaio de sequestro do radical hidroxila é baseado na reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$). Os radicais hidroxila foram gerados utilizando 10 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de EDTA, 2 mM de salicilato de sódio, 30% de H_2O_2 e amostra teste (cajuína, chás e kombucha) na concentração de 0,5 mg/mL. No controle, tampão fosfato de sódio substitui o H_2O_2 . As soluções foram incubadas a 37° C durante 1 h, e a presença do radical hidroxila foi detectada através do monitoramento da absorbância a 510 nm.

3.2.3.5 Quelação de cobre

A avaliação da capacidade das FRFs em quelar cobre foi realizada conforme metodologia descrita por Fernandes-Queiroz e colaboradores (2017). O método se baseia na capacidade do violeta de pirocatecol em se associar a íons de cobre e formar um complexo colorido, quando o cobre é quelado, impede a formação desse complexo e consequentemente a intensidade da coloração da solução é menor. O teste foi realizado em microplaca, e em cada poço foram adicionadas amostras em diferentes concentrações (0,1 – 2,0 mg/mL), violeta de pirocatecol (4 mM) e sulfato de cobre II pentahidratado (50 µg/mL), sendo a mistura homogeneizada após a adição de cada item. A absorbância foi medida a 632 nm.

3.2.4 Análise estatística ANÁLISE

A análise estatística foi realizada com o Instat 3 (GraphPad InStat versão 3.1, CA, USA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os resultados e discussões foi elencado elementos que apresentasse a solução dos testes realizados, bem como a interpretação e discussão dos dados coletados pós testes.

4.1 Preparo de Kombucha de Cajuína

As preparações variam muito, no que diz respeito aos insumos para a produção de kombucha, tanto no tipo de infusão quanto nas quantidades de folhas e concentração de sacarose por litro.

Para esta produção foram utilizados os chás preto e verde, que foram levados separadamente à fervura com água mineral a uma temperatura de 80 °C, a quantidade utilizada de cada chá foi de 5 g/L de água. A esses chás foram adicionados 50 g/L de açúcar demerara, que ficaram em infusão por 15 minutos até esfriar. Após isso os chás foram distribuídos em jarras esterilizadas e adicionado o SCOBY (cultura) que irá fazer a primeira fermentação. As jarras foram tampadas com papel toalha para evitar contaminação, porém permitir a entrada de oxigênio. Essa primeira fermentação F1 teve duração de 7 dias. Após a F1 com chás verde e preto, foram retiradas alíquotas dos kombuchas formados (800 mL) e a eles acrescentados a cajuína (200 mL) para que desse início a uma segunda fermentação (F2) que durou 3 dias.

Em recente trabalho de revisão, Miranda e colaboradores verificaram que os chás ou infusões podem ser preparados em uma ampla gama de concentrações variando de aproximadamente 1,0 a 100 g/L. A sacarose, que é a principal fonte de carbono para o crescimento de microrganismos utilizada, pode ser utilizada na concentração de 1 a 20%. O SCOBY e o líquido da fermentação anterior, em concentrações em torno de 0,25–10% e 3–30%, respectivamente, devem ser usados como cultura inicial para F1 (MIRANDA *et al.*, 2022). A adição do líquido fermentado precedente tem a função de auxiliar na ativação das bactérias acéticas devido à diminuição do pH (Leal *et al.*, 2018).

Sobre o pH, segundo Velicanski e colaboradores (2014) a kombucha atinge uma acidez ótima no quarto dia da fermentação, alguns outros estudos realizados com

a bebida tradicional, apresentaram a acidez ótima entre o quarto e o oitavo dia. Essas diferenças nos parâmetros químicos básicos e na duração do processo em diferentes estudos podem ser esperadas, porque as culturas de kombucha são originárias de diferentes localizações geográficas, não possuem composições microbiológicas e químicas padronizadas (VELICANSKI *et al.*, 2014).

Jayabalan *et al.*, (2014), em seu experimento testou o chá preto como base de sua kombucha, para cada litro de água acrescentou 1,2% de folhas, com tempo de infusão de 5 minutos, após este tempo adicionou 10% de sacarose, resfriou, acondicionou em vidros esterilizados previamente com água fervente. Na infusão, acrescentou o SCOBY juntamente o chá de arenque (chá onde estava o SCOBY por um período de 14 dias) este tempo varia muito de cada produtor. Este experimento especificamente foi deixado fermentar em três tempos, 7, 14 e 21 dias. Após analisou-se cada fermentação, e encontrou-se composições diferentes, entre eles, mesmo sendo usadas as mesmas bases, os SCOBY da mesma matriz, e mesma concentração de sacarose. O que determinou a diferença entre os produtos foi o tempo de fermentação, quanto mais tempo fermentando, maior a concentração dos componentes que se encontra nas kombuchas como as vitaminas, minerais e os aminoácidos tanto as essenciais (isoleucinas, leucinas, fenilalanina e valina) quanto os não essenciais (alanina, prolina e ácido aspártico) (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Para nosso estudo, o foco foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* com um único tempo de fermentação de 7 dias, considerando que nessa fase da fermentação já era o suficiente para modificação da composição química caracterizadora da bebida. Foi levado em consideração também o fato de que a taxa de fermentação na temperatura ambiente da cidade de São Raimundo Nonato/PI seria maior que a média e poderia acelerar o processo. Lončar e colaboradores (2006) analisaram a cinética da sacarose na fermentação da kombucha e concluíram que a melhor faixa de temperatura de fermentação é de 22 a 30 °C e a melhor faixa de duração da fermentação é de 3,5 a 5 dias. Com essa variedade de possibilidades em produção e estudos avaliando possíveis atividades biológicas, é visto de forma geral que a extensão da atividade de eliminação de radicais livres depende do tempo de fermentação, do tipo de material do chá e da microbiota normal da cultura kombucha, que por sua vez determina a natureza dos metabólitos (JAYABALAN *et al.*, 2014; RAHMANI *et al.*, 2019).

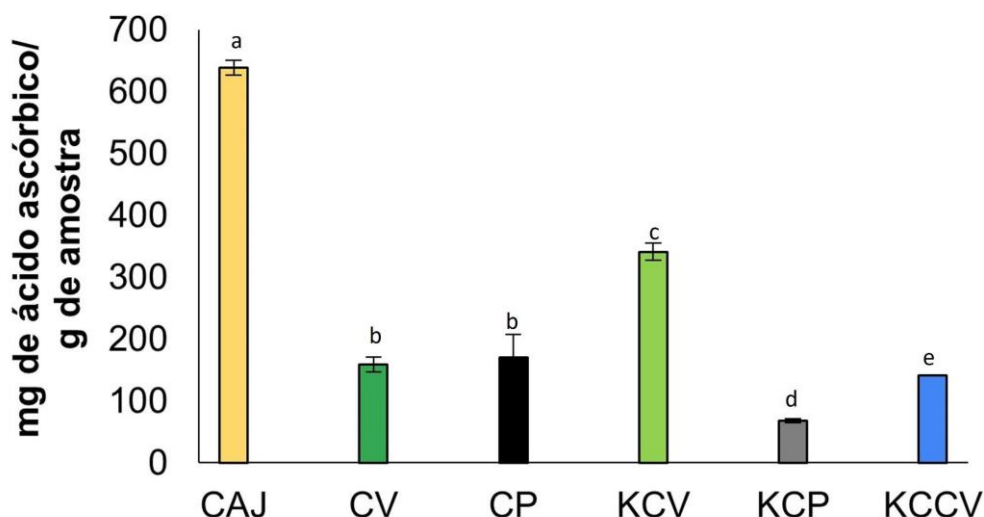
4.2 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Existem diversos métodos para a determinação das atividades antioxidantes. Por isso, a verificação do potencial antioxidante das amostras produzidas foi avaliado por diferentes ensaios *in vitro*: capacidade antioxidante total (CAT), poder redutor, quelação cúprica, sequestro do radical hidroxila e sequestro do radical superóxido. Os teste de CAT e Poder Redutor são baseados na capacidade da amostra em doar elétrons e estabilizar moléculas de forma mais ampla, portanto, esses testes foram realizados com todos os chás e kombuchas produzidos, inclusive em diferentes concentrações, para que seus resultados fossem guias na escolha de qual kombucha e concentração seria mais promissor/adequado na realização dos testes seguintes quando foram tratados os radicais de oxigênio mais específicos (sequestro de radical hidroxila e superóxido e quelação cúprica). É importante ressaltar que foram realizados “brancos das amostras” para as amostras que apresentaram coloração que pudesse interferir na quantificação colorimétrica. Os valores dessas leituras foram descontados antes da realização dos cálculos de porcentagem de cada teste, evitando assim um viés no resultado.

4.2.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

O teste da CAT avalia a habilidade que uma amostra tem em doar elétrons, ou seja, se oxidarem e assim neutralizar espécies reativas, como EROs. No caso deste ensaio, a molécula alvo de redução foi o molibdênio +6, que ao se tornar +5 pela doação de elétrons por compostos antioxidantes formam complexos de coloração verde. Todos os chás e kombuchas produzidos exibiram atividade neste ensaio (Figura 2), que tem seu resultado expresso em mg de equivalentes de ácido ascórbico/g de amostra. Não houve diferença estatística significativas entre os valores de atividade apresentados para os chás verde e preto, com atividade equivalente a 160 mg de ácido ascórbico.

Figura 2 - Capacidade Antioxidante Total da cajuína, chás e kombuchas produzidos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022). Legenda: Chá verde (CV); Chá preto (CV), Kombucha de chá verde (KCV), Kombucha de chá preto (KCP), Kombucha de cajuína chá verde (KCCV) e Cajuína (CAJ). Esses resultados são expressos como equivalentes de ácido ascórbico (mg) por grama de amostra. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. a,b,c,d,e indicam diferença significativa ($p < 0.01$) entre as diferentes amostras.

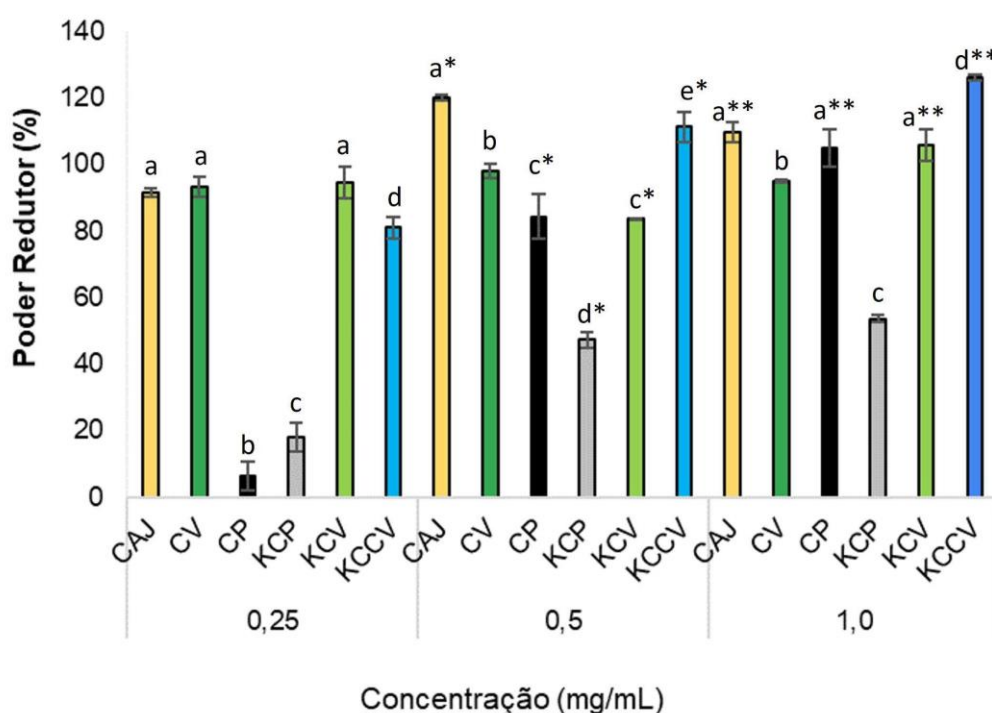
No entanto, dentre os kombuchas produzidos há destaque para KCV com atividade antioxidante superior ao dobro da encontrada para seu chá separadamente. Surpreendentemente, KCP apresentou atividade de CAT inferior ao CP, que possivelmente pode ser explicado pelo fato das amostras serem submetidas a altas temperaturas durante o teste e isso seja responsável pela diminuição de moléculas com capacidade doadora de elétrons. Quando avaliamos o KCCV verificou-se que cada grama de Kombucha de Chá Verde Saborizado com Cajuína teria equivalência ao valor de CAT de aproximadamente 142 miligramas de ácido ascórbico. Esse valor ainda é inferior ao visto para KCV, o que demonstra que para esse caso, a atividade encontrada em CAJ não foi somada ao KCV o que iria potencializar a referida atividade.

4.2.2 PODER REDUTOR

O ensaio do poder redutor também avalia a capacidade da amostra em doar elétrons. Apesar de ter o mesmo objetivo que o teste de CAT, estes são realizados em condições de reação diferentes (pH neutro e temperatura até 50 °C), o que afeta a

capacidade da amostra em atuar como agente redutor, podendo gerar um resultado diferente do encontrado para o teste de CAT. Como aconteceu neste estudo, que o KCV teve atividades próximas as encontradas para o CAJ em todas as concentrações testadas e ainda, o KCCV foi superior a todas as amostras na concentração de 1,0 mg/mL. Tanto CP como KCP apresentaram poder redutor de até 50%, resultados muito abaixo dos encontrados para CV e KCV que ficaram em torno de 100% em todas as concentrações testadas. Por esse motivo, foi escolhida a saborização com cajuína apenas com o KCV, KCCV, que chegou até 125,98% de poder redutor. É importante lembrar que o resultado deste ensaio é expresso em porcentagem de atividade mostrada pelo ácido ascórbico na concentração de 0,1 mg/mL e, por esse motivo, em alguns casos é possível verificar atividades superiores a 100%. Esta análise permitiu identificar a concentração de 0,5 mg/mL uma concentração mínima para que a maioria das amostras chegasse a uma atividade antioxidante máxima e por isso essa concentração foi a escolhida para utilização nos testes seguintes (Sequestro de Radical Superóxido, Hidroxila e quelação de cobre).

Figura 3 - Poder redutor da cajuína, chás e kombuchas produzidos.



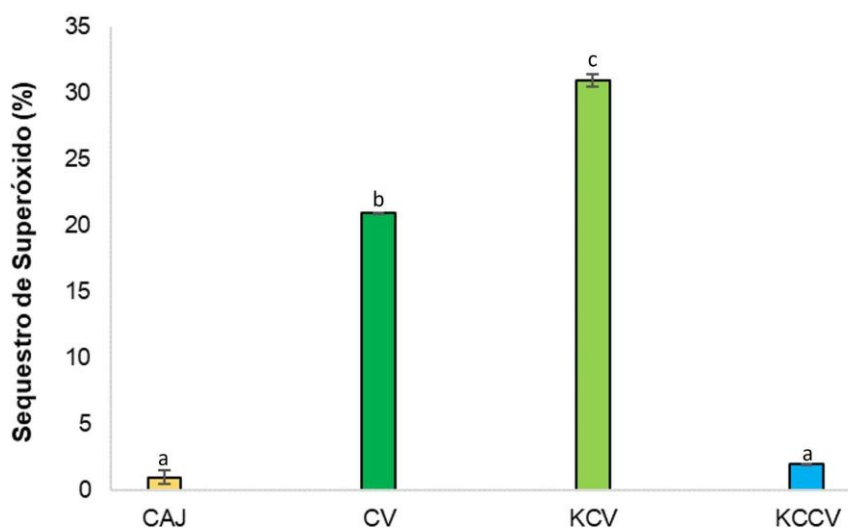
Fonte: Elaborado pelo autor (2022). Legenda: Chá verde (CV); Chá preto (CV), Kombucha de chá verde (KCV), Kombucha de chá preto (KCP), Kombucha de cajuína chá verde (KCCV) e Cajuína (CAJ). Poder redutor é expresso em porcentagem de atividade mostrada em 0,1 mg/mL de ácido ascórbico. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. a,b,c,d,e indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras de mesma concentração. *,** indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre a

mesma amostra em concentrações diferentes.

4.2.3 SEQUESTRO DE RADICAL SUPERÓXIDO E HIDROXILA

Um agente antioxidante pode atuar não somente como doador de elétrons, mas também, como sequestrador de substâncias reativas. Por esse motivo avaliou-se a habilidade sequestradora dos radicais superóxido e hidroxila pelas amostras de cajuína, dos chás verde e seu respectivo kombucha, além do kombucha de chá verde saborizado com cajuína, todos na concentração de 0,5 mg/mL. Os resultados expressos em porcentagem revelam que para o sequestro de radicais superóxido (Figura 4) pode ser considerado baixo para CAJ e KCCV (~2%) e moderado para CV e KCV (~25%).

Figura 4 - Sequestro de radicais superóxido da cajuína, chás e kombuchas produzidos

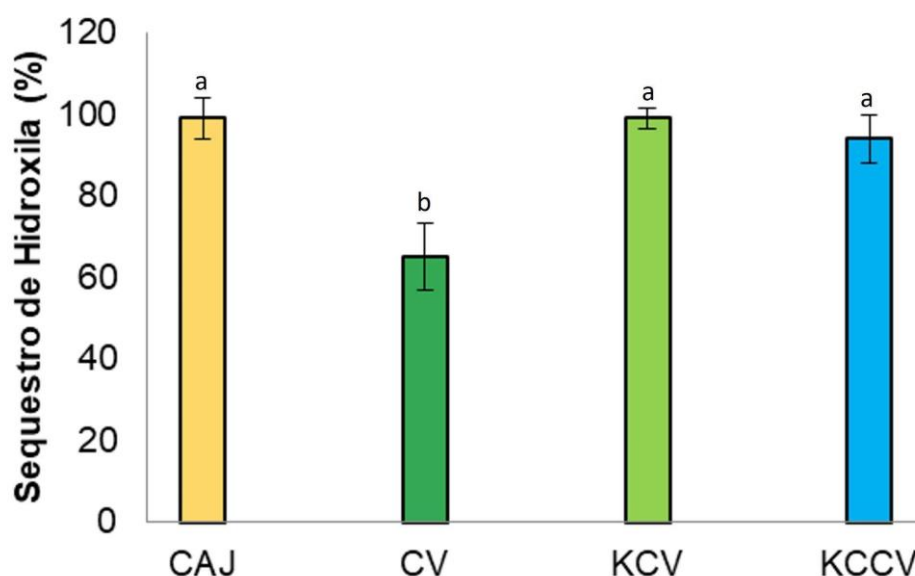


Fonte: Elaborado pelo autor (2022). Legenda: Chá verde (CV); Chá preto (CP), Kombucha de chá verde (KCV), Kombucha de chá preto (KCP), Kombucha de cajuína chá verde (KCCV) e Cajuína (CAJ). Os resultados são expressos em porcentagem da atividade quelante de íons. Os valores são representados como médias $\pm$ desvio padrão de triplicatas com $n=3$. a, b letras diferentes indicam uma diferença significativa entre as amostras ($p < 0,01$).

Os radicais ânions superóxidos atuam como um oxidante, mas são altamente instáveis uma vez que possuem meia-vida relativamente curta, e logo são decompostos numa forma extremamente reativa, a espécie reativa radical hidroxila. Dentre as espécies reativas do oxigênio, o radical hidroxila é o mais quimicamente reativo e podem, por exemplo, subtrair átomos de hidrogênio de moléculas biológicas danificando-as irreversivelmente (SUDHAKAR; SINGH, 2018).

As análises do teste de sequestro de radicais hidroxila (Figura 5) apontam que todas as amostras tiveram excelente desempenho em eliminar esses radicais, com resultados variando entre 65% para CV e aproximadamente 95% para CAJ, KCV e KCCV, não havendo, inclusive, diferenças estatísticas significativas entre estas últimas.

Figura 5 - Sequestro de radicais hidroxila da cajuína, chás e kombuchas produzidos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022). Legenda: Chá verde (CV); Chá preto (CV), Kombucha de chá verde (KCV), Kombucha de chá preto (KCP), Kombucha de cajuína chá verde (KCCV) e Cajuína (CAJ). Os resultados são expressos em porcentagem da capacidade de sequestro de radicais. Os valores são representados como médias $\pm$ desvio padrão de triplicatas com $n=3$. a, b letras diferentes indicam uma diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

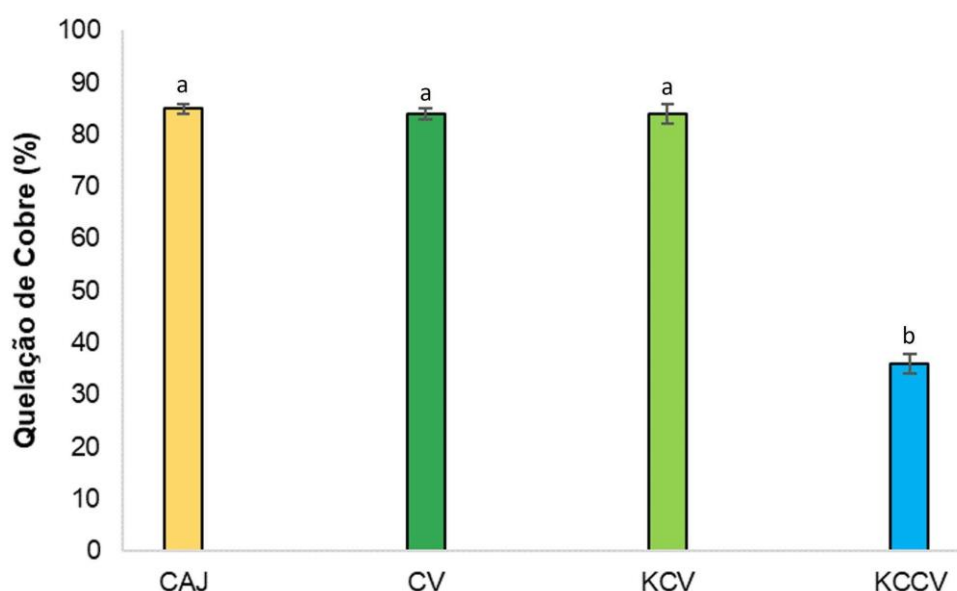
Outra forma de se combater os males provocados pelo radical hidroxila é impedir a sua formação, e o principal mecanismo que suprime a geração desses radicais é através da atividade de quelação de íons uma vez que os íons de metais de transição também podem reagir com H_2O_2 gerando o radical hidroxila (JOMOVA *et al.*, 2010). Por isso, a atividade quelante de metal é uma propriedade bastante interessante para possível alimento funcional, pois confere a ele a capacidade de impedir a formação de EROs e consequentemente o dano oxidativo (KUMAR; GANESAN; RAO, 2018).

4.2.4 QUELAÇÃO DE COBRE

Reconhecendo a importância da atividade quelante de metal, o teste de

quelação cúprica foi realizado. Neste ensaio, o método se baseia na capacidade do violeta de pirocatecol em se associar a íons de cobre e formar um complexo colorido. Fernandes-Queiroz e colaboradores (2017), quando o cobre é quelado, há impedimento da formação desse complexo e consequentemente a intensidade da coloração da solução é menor. Os resultados apresentados na figura 6 revelam que todas as amostras tiveram ótimo desempenho de quelação metálica, com resultados variando entre 36% para KCCV e aproximadamente 85% para CAJ, CV e KCV, não havendo, inclusive, diferenças estatísticas significativas entre estas últimas.

Figura 6 - Quelação cúprica da cajuína, chás e kombuchas produzidos



Fonte: Elaborado pelo autor (2022). Legenda: Chá verde (CV); Chá preto (CV), Kombucha de chá verde (KCV), Kombucha de chá preto (KCP), Kombucha de cajuína chá verde (KCCV) e Cajuína (CAJ). Os resultados são expressos em porcentagem da atividade quelante de íons. Os valores são representados como médias $\pm$ desvio padrão de triplicatas com $n=3$. a, b letras diferentes indicam uma diferença significativa entre as amostras ($p < 0,01$).

É possível perceber que as condições de teste, bem como a complexidade de moléculas presentes em cada chá ou kombucha produzido, que possuem diferentes grupos funcionais e polaridades, podem levar a resultados dispersos. A comparação entre CV e o KCV mostra que a bebida fermentada apresentou melhores resultados. Esse resultado também foi observado em outros estudos que acompanham a premissa de que o chá fermentado com a kombucha tem maior atividade antioxidante que o chá tradicional não fermentado (VIEIRA *et al.*, JAYABALAN *et al.*, 2014).

A comparação entre KCV e KCCV indica que a primeira possui melhor atividade

antioxidante para os testes realizados. Esses resultados sugerem que ao misturar pequenas quantidades de cada bebida separada (cajuína e kombucha de chá verde) para a produção da Kombucha de Chá Verde saborizado com Cajuína, a quantidade de moléculas antioxidantes da bebida resultante diminui uma vez que não houveram resultados que pudessem sugerir uma sinergia de atividade antioxidante. Esses dados são incipientes uma vez que são necessários a realização de curvas de concentração ou até de tempos de fermentação dos kombucha para afirmar categoricamente esses achados.

Diversos estudos (VIEIRA *et al.*, 2021; Villareal-Soto *et al.*, 2020; Bhattachary *et al.*, 2011) inferem que a kombucha pode atuar eficientemente na prevenção e recuperação da saúde, devido às propriedades antioxidantes e ainda sugerem que a kombucha é adequada na prevenção de distúrbios metabólicos e infecciosas de amplo espectro. Sobre as amostras que foram testadas, de forma geral, agem como doadoras de elétrons (agentes redutores), sequestrando radicais hidroxila e quelando íons metálicos, sugerindo ação nos três estágios de eventos relacionados a produção de espécies reativas: iniciação, propagação e terminação.

Em suma, se o composto antioxidante é capaz de inibir enzimas pró-oxidantes, quelar íons de metais de transição, ou atuar como sequestrador de radicais (neutralizando radicais livres), ele opera nas etapas de iniciação e propagação da reação oxidativa, e é considerado um antioxidante preventivo pois possui modo de ação indireto.

Outra possibilidade existe quando o antioxidante atua e elimina diretamente o radical (e não age na formação do radical), sendo assim referido como antioxidante bloqueador da cadeia oxidativa. Por possuir características de ambos os modos de ação, os kombucha de chá verde produzidos são promissores agentes na iniciação, e em consequência, na propagação e terminação da cadeia de formação de espécies reativas (ZHANG; YANG; TANG, 2012).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve sucesso tanto na produção dos kombucha tradicionais (KCV e KCP) quanto no kombucha saborizado com cajuína (KCCV) a partir de proporções conhecidas na literatura. Foram realizados cinco diferentes testes antioxidantes *in vitro* com as kombuchas produzidas e com CAJ, CV e CP para fins de enriquecimento de análises comparativas. Foi observado que a atividade antioxidante de KCV foi superior à KCP nas condições e testes realizados. Sugere-se que capacidade doadora de elétrons (poder redutor), o sequestro de $\text{OH}^\bullet$ e a quelatação cúprica foram considerados os principais mecanismos dos kombucha de chá verde avaliados (KCV, KCCV). O estudo aponta para a necessidade de investigações mais aprofundadas, incluindo novas condições de variáveis, inclusive no âmbito fitoquímico e biológico dos produtos formados na fermentação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. A. P. de SOUZA, A. C. R. **Cajuína**: como produzir com qualidade. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004 versão *online*. Documentos. Disponível: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br> Acesso: 10 de maio de 2019.
- ABREU, F. A. P. de; NETO, R. M. da S. **Cajuína**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. versão *online*. Disponível: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br> Acesso em: 16 de maio de 2019.
- AMORIN, F. L. **Avaliação de compostos bioativos presentes em produto a base de cascas de uvas da variedade Syrah**. 2016. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016. Disponível em: <http://www.pgalimentos.far.ufba.br/sites/pgalimentos.far.ufba.br> Acesso em: 25 de junho de 2019.
- ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Eckloniacava*. **Food Chemistry Toxicology**, England, vol. 44, n. 7, p. 1065-1074, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 06 de junho de 2019.
- BENDICH, A., LANGSETH, L. The health effects of vitamin C supplementation, a review. **Journal American College Nutrition**, vol.14, p.124-136, 1995. Disponível em: <https://www.tandfonline.com> Acesso em: 02 de julho de 2019.
- BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, C. P. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. **Fisiopatologia**, v. 18, 3 eds., p. 221-234, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21388793/> Acesso em: 20 de outubro 2022.
- CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L. T. D. B.; PEREIRA, M. S. S. C.; COSTA, L. S.; SANTOS, N. D.; ALVES, L. G.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**. vol. 9, p. 124–138, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 25 de junho de 2019.
- CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**. vol. 89, p. 834–839, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com> Acesso em: 28 de junho de 2019.
- COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B.; NOBRE, L. T.; COSTA, M. S.; ALMEIDA, L. J.; FARIAS, E. H.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. Biological activities of sulfated polysaccharides from

tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 64, p. 21–28, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 26 de junho de 2019.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological reviews**, vol. 53, n. 1, p. 135-159, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 27 de junho de 2019.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERNANDES-N., Marília et al. Antibacterial, antiproliferative, and immunomodulatory activity of silver nanoparticles synthesized with fucans from the alga *Dictyota mertensii*. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 6, 2017

GONÇALVES, A. E. DE S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 05 de junho de 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (Brasília). Pesquisa agropecuária municipal. 2017. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm. Acesso em: 20 maio 2019.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL – IPHAN (Brasília). **Produção artesanal e práticas socioculturais Associadas à cajuína no Piauí**. 2009. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br> Acesso em: 29 de junho de 2019.

JAYABALAN, R., MALBAŠA, R. V., LONČAR, E. S., VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. 2014. A review on kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 13, p. 538–550. 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com> Acesso em: 25 de junho de 2019.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biology**, [S.l.], p. 1-14, 2010.

JUNGMIN, O.; HEONJOO, J.; REUM AH, C.; SUNG-JIN, K.; JAEJOON, H. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 403–409, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.021>

KUMAR, K. Shireesh et al. World wide prevalance of osteoporosis and its

management-a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 19, p. 442 – 463, 2018.

LEAL, J M; L V SUAREZ; R J J H OROS; A ESCALANTE-ABURTO. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA - Journal of Food**, vol 16, nº 1, 390-399, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com> Acesso em: 30 de junho de 2019.

LONČAR, E. et al. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 186-192, 2006.

MCGEE, Harold. **Comida e cozinha: ciência e cultura da cultura da culinária**. 2. ed. São Paulo: Martins Fontes, 2014.

MIRANDA de JF, RUIZ, L F, SILVA CB, UEKANE TM, SILVA KA, GONZALEZ AGM, FERNANDES FF, LIMA AR. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **J Food Sci**. 2022. Feb;87(2):503-527.

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, 2019.

NETO, R. M. da S.; ABREU, F. A. P. de; PAIVA, F. F. de A. **Processamento do pedúnculo de caju: cajuína**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. versão *online*. Documentos. Disponível: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br> Acesso: 05 de maio de 2019.

NUMMER, B. A. Kombucha brewing under the food and drug administration model Food Code: Risk analysis and processing guidance. **Journal of Environmental Health**, 76, vol. 4, p. 8–11, 2013. Disponível em: <http://food-safety.guru> Acesso em: 22 de junho de 2019.

PALUDO, N. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate**: processo artesanal e escala laboratorial. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br> Acesso em: 17 de maio de 2019.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. **Produção de kombucha se multiplica no Brasil**. 2018. Disponível em: <https://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/producao-de-kombucha-se-multiplica-no-brasil-177446> Acesso em: 01 de julho de 2019.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, vol.

269, n. 2, p. 337-341, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 30 de junho de 2019.

RAHMANI, R.; BEAUFORT, S.; VILLARREAL, A. S.; TAILLANDIER, P.; BOUAJILA, J.; DEBOUBA, M. Fermentação de Kombuchá de folhas de mostarda africana (*Brassica tournefortii*): composição química e bioatividade **Food Bioscience**, v. 30, p.1004-1014, 2019. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/228207237.pdf> Acesso em: 22 de maio de 2022

SANTOS, M. J. dos. **Kombucha**: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. 2016. Dissertação (Mestre em Ciências Gastronômicas) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016. Disponível em: <https://run.unl.pt> Acesso em: 22 de maio de 2019.

SOUSA, A. V. B.; SANTOS, G. M.; PORTO, R. G. C. L.; JÚNIOR, F. das C. R.; ARAÚJO, R. S. dos R. M. Determinação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da cajuína e do mel produzidos no estado do Piauí – Brasil. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, Aracaju. vol. 6. n 2, p. 21 – 32, Fev. 2018. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br> Acesso em: 20 de maio de 2019

SUDHAKAR, K. et al. **An overview of marine macroalgae as bioresource. Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, n. May 2017, p. 165–179, 2018.

SUHRE, T. **Kombucha produzidas e comercializadas no Brasil**: características físico-química e composição microbiana. 2020. Dissertação (Pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/211888/001115269.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 25 de agosto de 2021.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, H. MAZUR, M.; Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. vol. 160, p. 1-40, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 30 de junho de 2019.

VELICANSKI, A. S.; CVETKOVIC, D. D.; MARKOU, U. S.; SAPONJAC, V. T. T.; VULIC, J. J. Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904315/> Acesso em: 28 de junho de 2022.

VILLARREAL-S., S. A.; BOUAJILA, J.; PACE, M.; LEECH, J.; COTTER, P. D.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P.; BEAUFORT, S. Metabolome- microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **Journal of Food Microbiology**,

v.16, n.333, p. 108-178, 2020. Disponível em:
[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32731153/DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32731153/DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778)

VIEIRA, E., P., O., MORAIS, K.; SANTANA, E. (2021). Análise da ação da kombucha e suas propriedades. **Enclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.18 n.38; p. 64 2021. Disponível em:
<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2021D/analise.pdf>. Acesso em: 02 de novembro 2022

VĪNA, I.; SEMJONOV, P.; LINDE, R.; PATETKO, A. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. **International Journal of Recent Research and Applied Studies**, vol. 14, 17–25, 2013. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org> Acesso em: 28 de junho de 2019.

WANG, J.; ZHANG Q.; ZHANG Z.; LI Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 42, n. 2, p. 127-132, 2008. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 19 de maio de 2019.

WATAWANA, M. I., JAYAWARDENA, N., GUNAWARDHANA, C. B., WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal Chem-NY**, vol.1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com> Acesso em: 24 de junho de 2019.

ZHANG, H.Y.; YANG D.P.; TANG G.Y. Multipotent antioxidants: from screening to design. **Drug Discovery Today**. v.11, 2006.