

MARCEL CARDOSO DE NORONHA

**KOMBUCHA DE CHÁ PRETO: ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E NO PERFIL DE FENÓLICOS DURANTE A
FERMENTAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E AVALIAÇÃO DA VIDA DE
PRATELEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Frederico Augusto R. de Barros

Coorientadores: Alexandre Fontes Pereira
Monique Renon Eller

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N852k
2021
Noronha, Marcel Cardoso de, 1994-
Kombucha de chá preto : alterações físico-químicas,
microbiológicas e no perfil de fenólicos durante a fermentação,
atividade antimalárica e avaliação da vida de prateleira / Marcel
Cardoso de Noronha. – Viçosa, MG, 2021.
105 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Camellia sinensis*. 2. Atividade biológica. 3. Compostos
fenólicos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.024

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

MARCEL CARDOSO DE NORONHA

**KOMBUCHA DE CHÁ PRETO: ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E NO PERFIL DE FENÓLICOS DURANTE A
FERMENTAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E AVALIAÇÃO DA VIDA DE
PRATELEIRA**

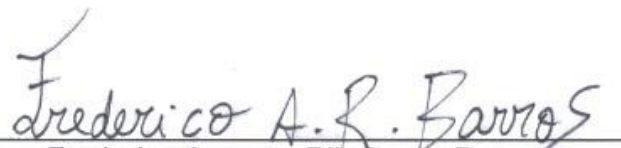
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de maio de 2021.

Assentimento:



Marcel Cardoso de Noronha
Autor



Frederico Augusto Ribeiro de Barros
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por sempre ser meu refúgio nos momentos de dificuldade e sempre iluminar meu caminho, me guiando em todas as conquistas.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor Frederico Augusto Ribeiro de Barros, pela confiança ao longo da condução deste trabalho. Agradeço também pelos conselhos, ensinamentos, amizade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus coorientadores, professores Alexandre Fontes Pereira e Monique Renon Eller, que se dispuseram a me ajudar a todo momento.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior do Departamento de estatística (UFV), por todo empenho em representar da melhor forma os dados, obedecendo as normas estatísticas.

À professora Mariana Simões Larraz Ferreira, do Laboratório de Bioativos e Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (UNIRIO), pela parceria para a realização das análises de UPLC, que foram de extrema relevância para o resultado do trabalho.

À professora Luciana Azevedo, da Faculdade de Nutrição (UNIFAL), pela parceria para a realização da análise antimetabólica, que foi importante para a validação da atividade bioativa da kombucha.

À professora Solimar Gonçalves Machado, por aceitar fazer parte da banca de defesa e colaborar com a dissertação e com minha formação.

Ao Rodrigo Rezende Cardoso, por me auxiliar no desenvolvimento de todo o projeto, além de fazer parte da banca de defesa e colaborar com suas considerações para a realização desse trabalho.

À Udielle Lacerda, graduanda de Engenharia de Alimentos pela UFV, por me auxiliar na execução dos experimentos e por toda amizade.

À Carolina Thomaz dos Santos D'Almeida, doutoranda da professora Mariana, por me recepcionar durante a ida a UNIRIO e se prontificar a explicar todo o processo

da análise de UPLC, além de me auxiliar na definição das melhores maneiras de exposição dos dados, bem como ajuste das figuras.

À Mariana Araújo Vieira do Carmo, doutoranda da professora Luciana, por me recepcionar durante a ida a UNIFAL e se prontificar a explicar todo o processo da análise da atividade antimalárica, além do auxílio na definição das melhores maneiras de exposição dos dados, bem como ajuste das figuras.

Ao grupo de pesquisa BIOCARB, por todo companheirismo, amizade e discussões, que foram muito importantes para a minha formação.

A minha mãe, Maria do Carmo, pelos ensinamentos, confiança, amor e dedicação depositados em mim por todos esses anos.

A minha noiva, Bruna, por sempre estar ao meu lado, me dando confiança, carinho, paciência, alegria e amor em todo os momentos desse curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

NORONHA, Marcel Cardoso de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Kombucha de chá preto: Alteração físico-químicas, microbiológicas e no perfil de fenólicos durante a fermentação, atividade antimalárica e avaliação da vida de prateleira.** Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros. Coorientadores: Alexandre Fontes Pereira e Monique Renon Eller.

A kombucha é uma bebida obtida da atividade simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY), utilizando como substrato chá de folhas de *Camellia sinensis*. Há trabalhos na literatura que demonstram os benefícios para a saúde do consumo de kombucha, principalmente devido a presença de compostos fenólicos. Não foram encontrados estudos sobre as alterações na composição de fenólicos da kombucha de chá preto durante a fermentação, nem sobre o potencial antimalárico do seu consumo, uma propriedade bioativa relacionada com a presença de compostos fenólicos. Além disto, não há estudos que avaliam a vida de prateleira da kombucha de chá preto sob refrigeração. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram, realizar uma revisão da literatura (capítulo 1), avaliar as alterações físico-químicas (acidez total, acidez volátil e pH), microbiológicas (contagem de leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas), a concentração de fenólicos totais, teaflavinas e tearubiginas, e o perfil de fenólicos da kombucha de chá preto durante a fermentação por 10 dias, e o potencial antimalárico da kombucha produzida após 10 dias de fermentação (capítulo 2), além de avaliar as alterações na composição físico-química, microbiológica e bioativa da kombucha de chá preto armazenada a 4°C por 180 dias (capítulo 3). No estudo de fermentação, foram coletadas amostras de kombucha para análises nos tempos 0, 1, 3, 4, 5, 7 e 10 dias, enquanto no estudo de vida de prateleira foram coletadas amostras nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. No primeiro estudo (capítulo 2), foi observado aumento da acidez com conseqüente redução do pH durante a fermentação da kombucha. A contagem de leveduras não variou durante o tempo de fermentação, mas a de bactérias acéticas reduziu e de bactérias lácticas aumentou. Não houve alterações nas concentrações de fenólicos totais, teaflavinas e tearubiginas durante a fermentação. Por meio da análise de perfil de fenólicos utilizando um UPLC-MS^E, foi observado um aumento da abundância relativa total de fenólicos com o tempo de fermentação, com destaque para o aumento da abundância relativa dos ácidos fenólicos. Podemos destacar a degradação com o tempo de

flavonoides como (+)-catequina galato, nepetina, hesperidina e catequina 5-O-galato, em detrimento ao aumento dos ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido 5-O-galloylquinico, ácido rosmarínico e ácido cinâmico. Além disto, a kombucha de chá preto apresentou atividade antiplasmódica contra as cepas 3D7 (sensível cloroquina) e W2 (resistente cloroquina), o que demonstrou o potencial antimalárico da kombucha. No segundo estudo (capítulo 3), foi demonstrado um aumento na acidez total e volátil com conseqüente redução do pH durante a vida de prateleira da kombucha de chá preto. Houve também uma redução na contagem de bactérias acéticas, lácticas e leveduras. Todas as alterações foram mais pronunciadas nos primeiros 30 dias de armazenamento, devido a presença de substratos residuais no meio. A bebida obedeceu a todos os padrões de identidade e qualidade, exigidos pela instrução normativa nº41 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), durante todo o período de vida de prateleira avaliado. Dessa forma, pode-se concluir que o processo de fermentação altera a composição físico-química e de compostos fenólicos da kombucha. No estudo da avaliação da vida de prateleira, foi observado que as alterações físico-químicas não comprometem a adequação da bebida com a legislação brasileira, quando armazenada por 180 dias a 4°C. Porém, mais estudos são necessários para avaliação sensorial da kombucha de chá preto durante a vida de prateleira.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*. Compostos fenólicos. UPLC-MS^E. Atividade bioativa.

ABSTRACT

NORONHA, Marcel Cardoso de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and phenolic profile changes during fermentation, antimalarial activity and evaluation of the shelf life.** Advisor: Frederico Augusto Ribeiro de Barros. Co-advisers: Alexandre Fontes Pereira and Monique Renon Eller.

Kombucha is a beverage obtained from the symbiotic activity of bacteria and yeasts (SCOBY), using as substrates *Camellia sinensis* leaf tea and sucrose. There are studies in the literature that demonstrate the health benefits of kombucha consumption, mainly due to the presence of phenolic compounds. No studies were found on the changes in the phenolic composition of black tea kombucha during fermentation, nor on the antimalarial potential of its consumption, a bioactive property related to the presence of phenolic compounds. In addition, there are no studies evaluating the shelf life of black tea kombucha under refrigeration. Thus, the objectives of this work were to evaluate the physicochemical changes (total acidity, volatile acidity and pH), microbiological (yeast, acetic bacteria and lactic acid bacteria count), in the concentration of total phenolics, teaflavins and tearubigins, and in the phenolic profile of black tea kombucha during fermentation for 10 days, and the antimalarial potential of the kombucha produced after 10 days of fermentation (chapter 2), besides to evaluate the changes in physicochemical, microbiological and bioactive composition of the black tea kombucha stored at 4°C for 180 days (chapter 3). In the fermentation study, samples of kombucha were collected for analysis at times 0, 1, 3, 4, 5, 7 and 10 days, whereas in the study of shelf life, samples were collected at times 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days. In the first study (chapter 2), an increase in acidity was observed, with a consequent reduction in pH during the fermentation of black tea kombucha. The yeast count did not vary during the fermentation time, but the count of acetic bacteria decreased and lactic acid bacteria count increased. There were no changes in the concentrations of total phenolics, theaflavins and thearubigins during fermentation. Through the analysis of the phenolic profile using an UPLC-MS^E, an increase in the total relative abundance of phenolics was observed with the fermentation time, with emphasis on the increase in the relative abundance of phenolic acids. We can highlight the degradation over time of flavonoids such as (+) - catechin gallate, nepetin, hesperidin and catechin 5-O-gallate, to the detriment of the increase

in phenolic acids such as gallic acid, 5-O-Galloylquinic acid, rosmarinic acid, cinnamic acid. In addition, black tea kombucha presented antiplasmodic activity against strains 3D7 (sensitive chloroquine) and W2 (resistant to chloroquine), which demonstrated the antimalarial potential of kombucha. In the second study (chapter 3), it was observed an increase in total and volatile acidity, with a consequent reduction in pH during the shelf life of the black tea kombucha. Moreover, there was a reduction in the count of acetic, lactic and yeast bacteria. All changes were more pronounced in the first 30 days of storage, due to the presence of residual substrates in the medium. The beverage followed all the identity and quality standards, required by normative instruction n°41 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), during the entire shelf life period evaluated. Thus, it can be concluded that the fermentation process alters the physicochemical and phenolic compounds composition of the black tea kombucha and that the phenolic compounds present in the beverage have great bioactive potential. In the study of the shelf life evaluation, it was observed that the physicochemical changes do not compromise the adequacy of the beverage with the Brazilian regulation, when stored for 180 days at 4°C. However, further studies are needed for sensory evaluation of black tea kombucha during shelf life.

Keywords: *Camellia sinensis*. Phenolic compounds. Shelf life. Bioactive activity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	14
1. Kombucha	14
2. Produção de kombucha	15
3. Composição química	17
3.1 Ácidos	19
3.2 Vitaminas	20
3.3 Compostos fenólicos	20
4. Composição microbiológica da kombucha	22
5. Capacidade antioxidante e propriedades bioativas da kombucha	23
6. Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO 2	33
Artigo 1	33
1. Introduction	35
2. Materials and methods	37
2.1 Kombucha production	37
2.2 Kombucha characterization	38
2.2.5 Determination of the phenolic profile by UPLC-MS ^E	38
2.3 In vitro antiplasmodial test	39
2.4 Statistical analysis	40
3. Results and discussion	40
3.1 Physicochemical changes in the kombucha during fermentation	40
3.2 Microbiological changes in the kombucha during fermentation	42
3.3 Identification and quantification of phenolic compounds in the kombucha during fermentation	45
3.4 Antimalarial activity of black tea kombucha	58

4. Conclusion	61
5. References	63
CAPÍTULO 3	84
Artigo 2	84
1. Introdução	86
2. Materiais e Métodos	88
2.1 Produção de kombucha	88
2.2 Caracterização da kombucha	89
2.3 Análises estatísticas	90
3. Resultados e Discussão	91
3.1 Transformações físico-químicas na kombucha durante a vida de prateleira	91
3.2 Transformações microbiológicas da kombucha durante a vida de prateleira	94
3.3 Quantificação de compostos fenólicos da kombucha durante vida de prateleira	96
4. Conclusão	99
5. Referências	101
CONCLUSÕES GERAIS	104

INTRODUÇÃO GERAL

A kombucha originou-se no leste da Ásia por volta de 220 a.C., sendo produzida a partir do metabolismo/fermentação do chá verde ou preto com sacarose, utilizando uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) (Brasil, 2019; Jayabalan *et al.*, 2016). De acordo com Mordor Intelligence (2019), o mercado norte americano prevê o aumento no consumo e a comercialização da kombucha de 17,5% para os anos de 2019 e 2024. O aumento no consumo de kombucha vem sendo impulsionado pelo grande número de artigos científicos e notícias, relatando as diversas propriedades bioativas da kombucha, que apresenta sabor refrescante, levemente doce e ácido (Teoh *et al.*, 2004). Por meio da melhoria das técnicas de produção está sendo possível a otimização da qualidade sensorial da bebida, adaptando aos padrões de consumo de cada mercado (Tran *et al.*, 2020). O Brasil publicou, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a Instrução Normativa N° 41 de 2019, que regulamenta os padrões de identidade e qualidade da bebida para o território nacional.

A composição físico-química da kombucha é caracterizada pela presença de ácidos orgânicos como: ácidos acético, láctico, glicônico e glicurônico (Blanc, 1996, Chen e Liu, 2000, Jayabalan *et al.*, 2007), além de compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e catequinas. No chá preto, além dos compostos fenólicos de baixo peso molecular, a condensação oxidativa da etapa de preparo da folha, gera compostos fenólicos poliméricos tais como teaflavinas e tearubiginas (Jayabalan *et al.*, 2007), que podem sofrer diversas reações de biotransformação durante a fermentação/armazenamento originando diversos outros compostos fenólicos (Jayabalan *et al.*, 2007; Watawana *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2020).

A kombucha de chá preto apresenta maior capacidade antioxidante, diversidade e abundância de compostos fenólicos comparado com a kombucha de chá verde (Cardoso *et al.*, 2020). Durante a fermentação o perfil de compostos fenólicos da kombucha pode sofrer alterações e a abundância total aumentar, sem provocar alterações significativas do conteúdo de fenólicos totais. Cardoso *et al.* (2020) identificaram 27 compostos fenólicos na kombucha de chá preto que não estavam presentes no chá preto e 1 composto fenólico na kombucha de chá verde que não estava presente no chá verde, após a fermentação por 10 dias a 25°C. Também se relatou a identificação de 127 compostos fenólicos, sendo, 70,2% de flavonóides e 18,3% de ácidos fenólicos. Porém, não foram encontrados trabalhos que detalhassem as possíveis alterações do perfil de fenólicos em kombuchas durante a fermentação.

Alterações na composição microbiológica e bioquímica da kombucha acontecem durante a fermentação (Tran *et al.*, 2020) e também podem acontecer durante sua vida de prateleira. De acordo com Fu *et al.* (2014), a kombucha de chá verde refrigerada a 4°C apresentou uma redução moderada no conteúdo de bactérias acéticas e acentuada no conteúdo de bactérias lácticas durante o armazenamento por 14 dias. Não existem estudos na literatura avaliando as alterações na composição físico-química, microbiológica e de fenólicos totais durante o armazenamento sob refrigeração por 180 dias.

Devido ao seu perfil fenólico e a grande abundância dos seus compostos, a kombucha possui diversas propriedades bioativas relatadas, como por exemplo: redução de inflamação, dos níveis de triglicerídios, além de potencial antioxidante, antimicrobiano e anticancerígeno (Jayabalan *et al.*, 2011; Aloulou *et al.*, 2012; Bhattacharya *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2020). Alguns trabalhos relataram a capacidade dos compostos fenólicos de outras fontes na inibição do plasmódio

causador da malária. Como por exemplo, Carmo *et al.* (2020) relataram efeitos de flavonóides presentes em camu-camu na inibição do plasmódio causador da malária e Lima *et al.* (2015) observaram efeito sinérgico entre compostos fenólicos associado ao efeito antiplasmódico. Dessa forma, há um potencial da kombucha em combater a malária devido a presença de diversos compostos fenólicos.

Dessa forma, os objetivos desse estudo foram avaliar as transformações físico-químicas, microbiológicas e do perfil de compostos fenólicos durante a fermentação, e a atividade antiplasmódica da kombucha de chá preto. Além disto, avaliou-se as alterações físico-químicas, microbiológica e de compostos fenólicos durante a vida de prateleira da kombucha de chá preto, acompanhando as alterações durante o prazo de 180 dias e verificando a compatibilidade da bebida com a legislação brasileira.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1. Kombucha

“A kombucha é a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por meio de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)” (Brasil, 2019). A bebida apresenta sabor refrescante, levemente doce e ácida, e é consumida em todo o mundo (Teoh *et al.*, 2004).

De acordo com Blanc (1996), a kombucha originou-se no leste da Ásia, especificamente no nordeste da China (Manchúria), onde foi premiada durante a dinastia Tsin ("Ling Chi"), cerca de 220 a.C., por suas propriedades desintoxicantes e energizantes. Em 414 d.C., o médico Kombu trouxe o “fungo do chá” para o Japão e o usou para curar os problemas digestivos do imperador Inkyo (Jayabalan, 2014). À medida que as rotas comerciais se expandiram, a kombucha (antigo nome comercial “Mo Gu”) chegou à Rússia (como Cainiigrib, Cainii kvass, Japonskigrib, Kambucha, Jsakvasska) e depois a outras áreas da Europa Oriental, aparecendo na Alemanha (como Heldenpilz, Kombuchaschwamm) por volta da virada do século XX. Nos anos 1950, chegou à França e também ao norte da África, sendo que na França tornou-se bastante popular (Blanc, 1996). O hábito de beber chá fermentado tornou-se aceitável em toda a Europa até a Segunda Guerra Mundial. Nos anos pós-guerra, a paixão da sociedade italiana pela bebida chamada “funkochinese” atingiu o pico na década de 1950 (Jayabalan, 2014).

Atualmente, o consumo da kombucha vem aumentando em todo o mundo, especialmente no continente americano devido à disseminação e comprovação dos

seus benefícios à saúde (Blanc, 1996; Jayabalan, 2014; Cardoso, 2019). Entre as principais alegações podemos destacar sua atividade como agente antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno e antidiabético (Jayabalan *et al.*, 2011; Aloulou *et al.*, 2012; Bhattacharya *et al.*, 2013; Cardoso, 2019).

Os benefícios a saúde da kombucha estão relacionados com a presença de compostos fenólicos provenientes dos chás verde ou preto e formados durante o processo de fermentação (Cardoso *et al.*, 2020). Os chás são produzidos a partir das folhas de *Camellia sinensis* e são classificados em preto, verde e oolong (Tanaka & Kouno, 2003). A diferença na produção do chá verde e chá preto está no momento em que as enzimas foliares são inativadas durante o processamento. Na fabricação do chá verde, as enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) (Haslan, 2003) e catalase (Dix *et al.*, 1981) são inativadas imediatamente após a colheita das folhas (Tanaka & Kouno, 2003). Portanto, a composição de compostos fenólicos no chá verde tende a ser semelhante à das folhas frescas. Na produção do chá preto, a PPO promove a oxidação das catequinas e outros compostos fenólicos simples e formação de compostos fenólicos poliméricos tais como teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas (Tanaka & Kouno, 2003).

2. Produção de kombucha

A kombucha é tipicamente preparada a partir de chá preto ou verde e sacarose, sendo inoculada por um SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) (Reiss, 1994), que consiste em uma película de celulose impregnada de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras adequadas para fermentação alcoólica, acética e lácticas, inócuas à saúde humana (Brasil, 2019). De acordo com Jayabalan *et al.* (2010), a composição do SCOBY consiste basicamente em proteínas e fibras, sendo inclusive sugerido o uso como suplemento proteico devido ao seu teor de proteína

bruta. Durante cada fermentação se pode observar a sedimentação do SCOBY usado para inocular a bebida e a formação de um novo SCOBY na superfície do líquido fermentado. Os micro-organismos presentes no SCOBY podem estar presentes na bebida final, sendo vedada a adição dos mesmos após o processo de fermentação da bebida (Brasil, 2019).

O substrato é incubado sob condições aeróbicas por 10 a 12 d a 20 a 28 °C (Blanc, 1996, Reiss, 1994, Sievers *et al.*, 1995). A fermentação da kombucha é uma combinação de fermentação alcoólica, láctica e acética, sendo iniciado por micro-organismos osmotolerantes e finalizada por espécies ácido tolerantes. A fermentação é influenciada por muitos fatores, como temperatura, pH, quantidade de oxigênio, CO₂ dissolvido, bem como a natureza e composição do meio (Marsh *et al.*, 2014). Qualquer variação nesses fatores pode afetar a taxa de fermentação, o desempenho, as propriedades sensoriais, a qualidade nutricional e outras propriedades físico-químicas do produto (Wolfe & Dutton, 2015).

Os micro-organismos presentes no SCOBY transformam a sacarose em etanol, CO₂, ácidos orgânicos (glicônico, glicurônico, acético e láctico) e celulose. A produção desses compostos representa cerca de metade do consumo dos substratos (glicose e frutose) durante os 10 primeiros dias de fermentação. Após esse tempo se observa o declínio desses compostos em favor de outras fontes alternativas de carbono, possivelmente do chá ou do sistema simbiótico (Kallel *et al.* 2012).

O pH do meio sofre uma redução acentuada durante os 7 primeiros dias de fermentação, após isso se observa um efeito tamponante devido à formação de ácidos orgânicos (Jayabalan *et al.*, 2008 , Lončar *et al.*, 2000 , Malbaša, 2004 , Sreeramulu *et al.*, 2001). A acidez titulável aumenta gradualmente até o 20º dia, quando se observa o esgotamento dos substratos fermentativos (Kallel *et al.* 2012). A

fermentação prolongada não é recomendada devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, que podem atingir níveis perigosos para o consumo direto (Greenwalt *et al.*, 1998).

Devido ao abaixamento do pH e elevação da acidez titulável, a composição microbiológica do meio sofre alterações durante a fermentação, logo que, com o decorrer do processo fermentativo os micro-organismos ácido tolerantes tendem a ser privilegiados devido as condições do meio (Hur *et al.*, 2014). Pode-se observar que após alguns dias de fermentação a bebida apresenta condições de pH e acidez que conferem proteção contra micro-organismos patogênicos (Liu *et al.*, 1996).

Um grande desafio para a produção de kombucha comercial consiste na expansão do processo de fermentação em escala de laboratório para a escala comercial. O desafio é devido à dificuldade em avaliar os fatores que afetam o processo de expansão durante a produção (Hsu & Wu, 2002). Os processos em escala de laboratório são realizados em frascos com menos de 0,5L (Steinkraus *et al.*, 1996; Teoh *et al.*, 2004) ou até 1 L de líquido (Chen e Liu, 2000, Sreeramulu *et al.*, 2001). Para uso comercial esses volumes devem ser expandidos para pelo menos 100L. De acordo com Malbaša *et al.*, (2006) a expansão pode ser realizada sob certas circunstâncias, isto é, se um nível adequado de similaridade entre sistemas pequenos e grandes for garantido, principalmente área interfacial. Visto que ela influencia no acesso a fontes de oxigênio pelas bactérias acéticas.

3. Composição química

A kombucha contém principalmente os ácidos acético, láctico, glicônico e glicurônico, e os álcoois etanol e glicerol (Blanc, 1996, Chen e Liu, 2000, Jayabalan *et al.*, 2007). A kombucha também contém compostos fenólicos, que constituem cerca de um terço da massa seca de chá (Dufresne & Farnworth, 2001). Os flavonóides são os compostos fenólicos mais abundantes nas kombuchas, e o conteúdo e a

composição da fração fenólica variam consideravelmente, dependendo da variedade do chá e dos parâmetros de processamento e fermentação (Cardoso *et al.*, 2020). Compostos como aminoácidos, alcalóides metilxantina (cafeína, teofilina e teobromina), proteínas e vitaminas (C, B2, B6) que são produzidas durante a fermentação, podem ser identificadas na bebida (Malbaša *et al.* 2011).

A composição e a concentração de metabólitos dependem da fonte do inóculo (Nguyen, Nguyen, Nguyen e Le, 2015), das concentrações de açúcar e chá (Watawana *et al.* 2017), do tempo de fermentação (Chen e Liu, 2000) e da temperatura utilizada (Jayabalan *et al.*, 2008). Qualquer alteração nas condições de fermentação pode afetar o produto final. Durante a fermentação da kombucha, os compostos presentes no chá, como flavonóides, aminoácidos e ácidos fenólicos (Naveed *et al.*, 2018), juntamente com a sacarose, sofrem uma série de transformações pela ação de leveduras e bactérias o que dificulta a caracterização da composição química da bebida.

As propriedades bioativas apresentadas pelos chás preto e verde são principalmente devido à presença de compostos fenólicos (Cardoso, 2019). Porém, alguns estudos demonstraram que durante a fermentação da kombucha pelo SCOBY se observa melhoria da composição microbiológica e bioquímica da bebida, devido à formação de moléculas como ácido d-sacárico-1,4-lactona e a degradação de alguns compostos fenólicos complexos em moléculas de menor peso molecular com maior biodisponibilidade (Wang *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2010, Cardoso *et al.*, 2020), alterando dessa forma a composição da bebida e obtendo compostos que não são encontradas no chá (Cardoso *et al.* 2019; Wang *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2010).

3.1 Ácidos

Na literatura já foram relatados diversos ácidos orgânicos na kombucha. Os principais são os ácidos acético, glicônico, glicurônico, láctico, tartárico, málico e em menor proporção, ácido cítrico. Todos esses ácidos são responsáveis pelo abaixamento do pH durante a fermentação e pela elevada acidez característica do produto (Jayabalan *et al.*, 2007). Além disto, os ácidos orgânicos presentes na bebida possuem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, proporcionando proteção contra a contaminação do SCOBY (Liu *et al.*, 1996).

O ácido acético é predominante na bebida e é capaz de estimular a produção de etanol, por meio da redução do pH do meio, que favorece a atividade fermentativa de leveduras alcoólicas. O etanol produzido, por sua vez, estimula a produção de ácido acético, por servir de substrato para as bactérias acéticas, especialmente *Acetobacter* (Liu *et al.*, 1996).

O ácido glicurônico é um importante composto encontrado na kombucha devido à sua ação desintoxicante, pois no fígado humano pode se ligar as toxinas, tornando-as solúveis em água e, portanto, mais fáceis de serem eliminadas (Loncar *et al.*, 2000; Kumar & Joshi, 2016).

As bactérias acéticas convertem a glicose em ácido glicônico e glicurônico por meio da oxidação na posição C-1 e C-6 respectivamente, e convertem a frutose e o etanol em ácido acético (Loncar *et al.*, 2000). O ácido láctico pode ser formado pelas bactérias lácticas a partir do etanol e do ácido acético (Dufresne & Farnworth, 2000).

3.2 Vitaminas

As vitaminas B1, B2, B6, B12 e C foram identificadas durante e após a fermentação da kombucha (Bauer *et al.*, 2000; Malbaša *et al.*, 2011), e são metabólitos intracelulares dos micro-organismos presentes no SCOBY.

Foi identificado que o processo de fermentação do chá preto aumenta o teor de vitaminas solúveis em 161% para vitamina B1 e em 231% da vitamina B12 (Bauer *et al.*, 2000). Malbaša e *et al.* (2011) constataram que o teor de vitamina C aumenta durante a fermentação e um máximo de 28,98 mg / L no décimo dia de fermentação foi obtido.

3.3 Compostos fenólicos

A kombucha possui alta concentração de compostos fenólicos, que constituem cerca de um terço da massa seca do chá (Dufresne & Farnworth, 2001). O conteúdo e a composição dos fenólicos na kombucha variam consideravelmente, dependendo principalmente da variedade do chá. Os principais compostos fenólicos presentes nas kombuchas de chás verde e preto são: epicatequina, epicatequina-3-galato, epigallocatequina, epigallocatequina-3-galato (Cardoso *et al.*, 2020; Villarreal-Soto, 2019). Na kombucha de chá preto, além de compostos fenólicos de baixo peso molecular, a condensação oxidativa de epicatequinas e galocatequinas gera compostos fenólicos poliméricos tais como teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas. As principais teaflavinas, responsáveis pela coloração e brilho vermelho-alaranjado, são: teaflavina, teaflavina-3-galato, teaflavina-3'-galato e teaflavina-3-3'- digalato (Owuor *et al.*, 2006). As teasinensinas são incolores, dímeros formados pelo acoplamento oxidativo da epigallocatequina ou galato-epigallocatequina (Hashimoto *et al.*, 1988). As tearubiginas possuem estruturas complexas e heterogêneas e possuem

como precursores a epigalocatequina e a galato-epigalocatequina, e possuem coloração marrom-ferrugem (Haslam, 2003). A combinação desses produtos de condensação oxidativa resulta em uma adstringência típica, brilho e cor da bebida de chá preto (Obanda *et al*, 2004).

A composição de fenólicos totais pode sofrer alterações durante a fermentação. Kallel *et al* (2012) observaram que no chá preto, onde teaflavinas e tearubiginas são os principais compostos fenólicos, as teaflavinas aumentam moderadamente e as tearubiginas diminuem acentuadamente, indicando uma possível formação de teaflavinas a partir de tearubiginas. Essa conversão pode causar a mudança na cor da kombucha de marrom avermelhado para marrom claro com a progressão da fermentação (Kallel *et al.*, 2012). Alguns estudos relatam aumentos progressivos da composição fenólica com o tempo de fermentação (Chu e Chen, 2006, Jayabalan *et al.*, 2008a, Jayabalan *et al.*, 2008b). Este aumento no conteúdo total de fenólicos pode ser devido à degradação de polifenóis complexos do chá em moléculas menores por enzimas liberadas por micro-organismos presentes no SCOBY e baixo pH, o que aumenta a capacidade antioxidante da kombucha (Cardoso *et al.*, 2020; Jayabalan *et al.*, 2007).

Cardoso *et al.*, (2020) identificaram 127 compostos fenólicos em kombuchas do chá verde e preto sendo que, a maioria pertencia à classe dos flavonóides (70,2%), seguidos dos ácidos fenólicos (18,3%), outros polifenóis (8,4%), lignanos (2,3%) e estilbenos (0,8%). Além disso, eles observaram a mudança no perfil de compostos fenólicos, com o aparecimento de 27 novos compostos fenólicos na kombucha de chá preto que não estavam presentes no chá preto, e 1 composto fenólico na kombucha de chá verde que não estava presente no chá verde.

4. Composição microbiológica da kombucha

A composição microbiológica da bebida fermentada depende diretamente da composição do SCOBY ou “fungo do chá”. Além disso, pode se observar variação da composição microbiológica entre as fermentações e tipo de chá utilizado, mesmo aquelas que utilizam o mesmo SCOBY para inoculação (Chakravorty *et al.*, 2016; Coton *et al.*, 2017). No entanto, várias espécies são encontradas na maioria das culturas de kombucha, especialmente bactérias acéticas (gêneros AAB; *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter*) (Roos & Vuyst, 2018), bactérias láticas (LAB; *Lactobacillus*, *Lactococcus*) (Marsh, Hill, Ross & Cotter, 2014) e leveduras (*S. pombe*, *S. ludwigii*, *K. apiculata*, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, *B. bruxellensis*) (Coton *et al.*, 2017).

Coton *et al.* (2017) analisaram a variação na composição microbiológica durante a fermentação utilizando chá verde e preto, e identificaram, que as leveduras *Dekkera* spp. e *Hanseniaspora valbyensis* foram predominantes na fermentação tanto do chá verde como o preto. Porém, as comunidades bacterianas foram diferentes de acordo com o tipo de chá, sendo que bactérias láticas estavam presentes principalmente durante a fermentação de chá verde, enquanto bactérias acéticas dominavam a fermentação de chá preto. A principal justificativa encontrada para essa diferença foi devido ao processamento das folhas de chá, mas, considerando a composição, isso leva principalmente a diferenças relacionadas à concentração e composição de compostos fenólicos (Graham, 1992).

A composição do SCOBY depende das condições geográficas e climáticas, bem como das espécies locais de leveduras e bactérias selvagens que podem explicar as diferenças nas bebidas obtidas nos diversos trabalhos presentes na literatura (Mayser *et al.*, 1995).

A bactéria do ácido acético, *Acetobacter xylinum* reclassificado como *Gluconacetobacter xylinus* produz o biofilme flutuante de celulose presente na superfície do líquido de fermentação. O biofilme é o metabólito secundário da fermentação na produção da kombucha, mas também uma das características únicas da cultura (Markov *et al.*, 2003; Strap *et al.*, 2011).

A compreensão da cinética de fermentação da kombucha depende dos micro-organismos presentes e das interações entre eles (Markov *et al.*, 2003). No entanto se pode observar que com o aumento de certos produtos de fermentação certos tipos de leveduras sofrem autólise e liberam vitaminas e outros nutrientes que estimulam o crescimento de bactérias ácido tolerantes.

A maioria das espécies presentes no meio excreta produtos metabólicos que podem estimular ou inibir a taxa de crescimento específica de outras espécies, estabelecendo interações comensalistas ou amensalísticas que precisam ser extensivamente analisadas para alcançar a compreensão desse fenômeno de coexistência. Alguns grupos de bactérias e leveduras possuem atividade bem estabelecidas na fermentação. No entanto, ainda existem muitas espécies cujos papéis não foram amplamente caracterizados, nem as interações entre elas (Chakravorty *et al.*, 2016). No caso da kombucha, as diferentes espécies de leveduras e bactérias atuam em paralelo, produzindo dois produtos finais diferentes: o chá fermentado e o biofilme.

5. Capacidade antioxidante e propriedades bioativas da kombucha

A elevada capacidade antioxidante da kombucha é promovida devido a presença de compostos fenólicos (especialmente as catequinas, que pertencem ao grupo dos flavonóides) provenientes das folhas dos chás verde e preto (Graham, 1992). Além de metabólitos produzidos pelos micro-organismos presentes no SCOBY, como ácido

cítrico, ácido glicurônico, vitamina C, B2, B6 e catalase (Jayabalan, 2014) que podem agir sinergisticamente com os antioxidantes.

Os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados por seus efeitos antioxidantes e cardio-protetores, por meio da modulação do estresse oxidativo (Duffy et al., 2001). A atividade antioxidante dos flavonóides, em particular, é atribuída à presença de grupos orto-hidroxila, devido à sua capacidade de eliminar e evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) por deslocalização de elétrons (Vazquez-Cabral *et al.*, 2014). As catequinas e outros compostos fenólicos presentes na kombucha podem atuar na prevenção de doenças neurodegenerativas, redução da pressão arterial, atividade antioxidante, efeito hipoglicêmico, atividade de desintoxicação e além de auxiliar a prevenção ao câncer (Vina *et al.*, 2014).

Um estudo realizado pela “Unidade Central de Pesquisa Oncológica” e pela “Academia Russa de Ciências em Moscou” em 1951, descobriu que o consumo diário de kombucha poderia promover efeito protetivo ao câncer (Dufresne & Farnworth, 2000). Alguns estudos posteriores foram feitos utilizando células cancerosas para estudar as atividades antiproliferativas e antiangiogênicas do chá preto, verde e de suas respectivas kombuchas (Jayabalan *et al.*, 2011; Cardoso, 2019; Villarreal-Soto, 2019). Cardoso (2019) demonstrou que as kombuchas de chás verde e preto apresentaram ótima atividade antiproliferativa perante linhagens de células cancerosas (células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar, células de adenocarcinoma colorretal ileocecal humano e células epiteliais de adenocarcinoma colorretal).

Jayabalan *et al.*, (2008b) relataram as habilidades de eliminação de radicais livres dos compostos fenólicos presentes no kombucha, preparados a partir de chá

verde e chá preto. Nesse estudo foi observado que com o aumento do tempo de fermentação ocorreu a diminuição da capacidade de eliminação de radical hidroxila (EDTA com ácido ascórbico e ferro) e da capacidade de peroxidação anti-lipídica. Além disso, foi observado um aumento da atividade de eliminação do radical DPPH, do superóxido e da atividade inibitória contra o ácido linoléico mediado pelo radical hidroxila.

Além da capacidade antioxidante, a kombucha possui atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias (Greenwalt *et al.* 1998; Sreeramulu *et al.* 2001; Cardoso *et al.* 2020). Essa atividade está associada ao baixo pH da bebida, devido a presença de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico, ácido glicônico e ácido glicurônico) (Greenwalt *et al.* 1998), além da presença dos compostos fenólicos que podem apresentar atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, patogênicas (Sreeramulu *et al.* 2001).

Alguns estudos avaliaram a atividade da kombucha e seus polifenóis e suas propriedades de inibição contra agentes patogênicos entéricos, tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Plesiomonas shigelloides* (Toda *et al.*, 1989), *Salmonella typhi*, *S. tiphimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae* e *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* (Toda *et al.*, 1989; Toda *et al.*, 1991; Mitscher *et al.*, 1997), *Campylobacter jejuni* e *C. coli* (Diker *et al.*, 1991), *Streptococcus mutans* (Sakanaka *et al.*, 1989), *S. sobrinus* (Sakanaka *et al.*, 1990) e *Porphyromonas gingivalis*, bactérias responsáveis pela cárie dentária (Kakuda *et al.*, 1994; Sakanaka *et al.*, 1996). Existem também estudos que sugerem que as catequinas do chá são agentes potencialmente antivirais e antiprotozoários (Gutman e Ryu, 1996). Mitscher *et al.* (1997) observaram que a catequina EGCG inibe os vírus influenza A e B na cultura de células animais. Foi observado uma atividade antiviral contra enzimas do

vírus HIV e contra rotavírus e antero vírus na cultura de células de macaco quando tratados previamente com EGCG (Mitscher *et al.*, 1997).

Além disso, foi observado que a kombucha pode promover o crescimento de bifidobactérias no intestino grosso humano, auxiliando na promoção do equilíbrio bacteriano na microbiota intestinal e consequente prevenção do câncer de cólon (Okubo e Juneja, 1997).

Uma possível propriedade bioativa da kombucha ainda não explorada é a sua atividade antimalárica. A bebida possui um extenso perfil fenólico e alguns trabalhos correlacionam produtos ricos em compostos fenólicos a atividade antiplasmódica. O protozoário da malária se desenvolve em três fases (Anel, trofozoíto e esquizonte), de acordo com a fase ele apresenta diferentes níveis de resistência aos tratamentos.

Carmo *et al.* (2020) observaram que as cepas W2 (Resistente a cloroquina) e 3D7 (Sensível a cloroquina) sofreram inibição devido aos flavonoides presentes em extratos de camu-camu. Sendo que na cepa resistente a cloroquina (W2) a fase anel foi o estágio mais sensível. Por outro lado, a estirpe sensível a cloroquina (3D7), a fase trofozoíto foi a mais vulnerável. Como também, Ferreira *et al.* (2019) avaliaram a eficácia antimalárica de três frações fenólicas do açaí; fenólicos totais, fenólicos nonantocianina e antocianinas totais. *In vitro*, apenas a fração de fenólicos nonantocianina inibiu moderadamente o crescimento do parasita *Plasmodium falciparum* nas cepas sensível à cloroquina (HB3) e multirresistente (Dd2). *In vivo*, a fração de fenólicos totais, apesar de não apresentar atividade *in vitro*, por meio do tratamento oral com 20 mg / kg, reduziu a parasitemia em 89,4% em camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi* e prolongou a sobrevivência. O contraste das atividades *in vitro* e *in vivo* da fração de fenólicos totais, sugere papéis antiplasmódicos importantes para os metabólitos dos polifenóis.

6. Referências Bibliográficas

- Aloulou A, Hamden K, Elloumi D, Ali MB, Hargafi K, Jaouadi B, Ayadi F, Elfeki A, Ammar E. 2012. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 12:63–71.
- B.D. Vazquez-Cabral, S.M. González-Herrera, R.F. González-Laredo, M.R. Moreno-Jiménez, I.T. Córdova-Moreno, J.A. Gallegos-Infante, N.E. Rocha-Guzmán. 2014. Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with kombucha consortium at different processing conditions. *Nutrafoods*, 13:169-178.
- Bauer-Petrovska B, Petrushevska-Tozi L. 2000. Mineral and water-soluble vitamin contents in the kombucha drink. *Int J Food Sci Technol* 35:201–5.
- Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. 2013. Effect of kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 60:328–340.
- Blanc PJ. 1996. Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol Lett* 18:139–142.
- Brasil. Instrução Normativa n. 41 de 17 de setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Brasília, 18 set. 2019. Seção 1, p.13.
- Carmo, M.A.V., Fidelis, M., Sanchez, C.A., Castro, A.P., Camps, I., Colombo, F.A., Marques, M.J., Myoda, T., Granato, D., Azevedo, L. (2020). Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomal properties. *Food Research International*. V. 136, 109334, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109334>.
- Cardoso, R. R. 2019. Perfil de compostos fenólicos de kombuchas de chás verde e preto e seus efeitos antiproliferativo *in vitro* e nas alterações metabólicas *in vivo*. Tese- Universidade Federal de Viçosa.
- Cardoso, R.R., Neto, R.O., D'Almeida, C.T.S., Nascimento, T.P., Pressete, C.G., Azevedo, L., Martino, H.S.D., Camerone, L.C., Ferreira, M.S.L., Barros, F.A.R. 2020. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* 128, 108782. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220:63–72.
- Chen C, Liu BY. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* 89:834–9.

- Chu SC, Chen C. 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chem* 98:502–7.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., & Coton, E. 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *Fems Microbiology Ecology*, 93(5), 1–16.
- Diker, K. S., Akan, M., Hascelik, G., & YurdakoÈk, M. (1991). The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 12, 34±35.
- Dix, M.A. et al. 1981. Fermentation of tea in aqueous suspension: influence of tea peroxidase. *Journal of Food, Agriculture and Environment, Helsinki*, v.32, n.4, p.920-932.
- Dufresne C, Farnworth E. 2001. Tea, kombucha, and health: a review. *Food Res Int* 33:409–21.
- Ferreira, L.T., Venancio, V.P., Kawano, T., Abrão, L.C.C., Tavella, T.A., Almeida, L.D., Pires, G.S., Bilsland, E., Sunnerhagen, P., Azevedo, L., Talcott, S.T., Mertens-Talcott, S.U., Costa, F.T.M. (2019). Chemical Genomic Profiling Unveils the in Vitro and in Vivo Antiplasmodial Mechanism of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenols. 2470-1343, <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02127>
- Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F. e Lin, J. 2014. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in probiotic content during storage. *Food Sciences Technology*, 34, 123 - 126.
- Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 21:334–50.
- Greenwalt CJ, Ledford RA, Steinkraus KH. 1998. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT Food Sci Technol* 31:291–6.
- Gutman, R. L., & Ryu, B.-H. (1996). Rediscovering tea. An exploration of the scientific literature. *HerbalGram*, 37, 33-48.
- Haslam, E. 2003. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry, New York*, v.64, n.1, p.61-73.
- Hashimoto, F. et al. 1988. Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B,B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Tokyo*, v.2, n.36, p.1676-1684.
- Hsu and Wu, 2002. A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*, 11 (2002), pp. 123-130

- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., & Kim, G.-B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346–356.
- Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* 102:392–8.
- Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K. 2008a. Changes in free radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* 109:227–34.
- Jayabalan R, Marimuthu S, Thangaraj P, Sathishkumar M, Binupriya AR, Swaminathan K, Sei EY. 2008b. Preservation of kombucha tea effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. *J Agri Food Chem* 56:9064–71.
- Jayabalan R, Baskaran S, Marimuthu S, Swaminathan K, Yun SE. 2010a. Effect of kombucha tea on aflatoxin B1-induced acute hepatotoxicity in albino rats—prophylactic and curative studies. *J Appl Biol Chem* 53:407–16.
- Jayabalan R, Malini K, Sathishkumar M, Swaminathan K, Yun SE. 2010b. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Sci Biotechnol* 19:843–7.
- Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, Thangaraj P, Swaminathan K, Yun SE. 2011. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian J Biotechnol* 10:75–82.
- Jayabalan, R., Malbařsa, R. V., Loncar, 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*, 13(4), 538–550.
- Jayabalan, R., Malbařsa, R. & Sathishkumar, M. 2016. Kombucha. Reference Module in Food Science.
- Kallel, L. et al. 2012. Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 226-232.
- Kumar, V., & Joshi, V. K. 2016. Kombucha: Technology, microbiology, production, composition and therapeutic value. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 6(1), 13.
- L.A. Mitscher, M. Jung, D. Shankel, J.-H. Dou, L. Steele, S. Pillai. 1997. Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of

- green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. *Medicinal Research Reviews*, 17, pp. 327-365.
- Liu CH, Hsu WH, Lee FL, Liao CC. 1996. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiol* 13:407–15.
- Loncar ES, Petrović SE, Malbaša RV, Verac RM. 2000. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung* 44:138–9.
- Malbaša RV. 2004. Investigation of antioxidant activity of beverage from tea fungus fermentation [Ph.D. Thesis], University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia.
- Malbaša R, Lončar E, Djurić M, Došenović I. 2006. Scale-Up of Black Tea Batch Fermentation by kombucha 84: 193-199
- Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Čanadanović-Brunet JM. 2011. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chem* 127:1727–31.
- M. Naveed, J. BiBi, A.A. Kamboh, I. Suheryani, I. Kakar, S.A. Fazlani, X. FangFang, S.A. kalhor, L. Yunjuan, M.U. Kakar, M.E. Abd El-Hack, A.E. Noreldin, S. Zhixiang, C. LiXia, Z. XiaoHui. 2018. Pharmacological values and therapeutic properties of black tea (*Camellia sinensis*): a comprehensive overview *Biomed. Pharmacother.*, 100, pp. 521-531.
- Markov, S., Jerinic, V., Cvetkovic, D., Loncar, E., & Malbasa, R. 2003. Kombucha - functional beverage: Composition, characteristics and process of biotransformation. *Hem Ind*, 57(10), 456–462.
- Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* 38:171–8.
- Mayser P, Fromme S, Leitzmann C, Gründer K. 1995. The yeast spectrum of “tea fungus kombucha”. *Mycodes* 38:289–95.
- P. Mayser, S. Fromme, C. Leitzmann, K. Gruender. 1995. The yeast spectrum of tea fungus kombucha. *Mycoses*, 38 (7–8) (1995), pp. 289-295
- Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., & Le, P. H. 2015. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1149–1155.
- Obanda M, Owuor PO, Mang'oka R, Kavoi MM. 2004. Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *Food Chem* 85:163-173.

- Okubo, T., & Juneja, R. (1997). Effects of green tea polyphenols on human intestinal microflora. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, D.-C. Chu, & M. Kim, *Chemistry and Applications of Green Tea* (pp.109±122). Salem: CRC Press LLC
- Owuor, P.O. et al. 2006. The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa. *Food Chemistry*, London, v.97, n.4, p.644-653.
- Reiss J. 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters For* 198:258–61.
- Roos, J. D., & Vuyst, L. D. 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 115–119.
- S.J. Duffy, J.F. Keaney Jr., M. Holbrook, N. Gokce, P.L. Swerdloff, B. Frei, J.A. 2001. Vita. Short-and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104 (2), pp. 151-156.
- Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., & Yamamoto, T. 1989. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Bio-logical Chemistry*, 53, 2307±2311.
- Sakanaka, S., Sato, T., Kim, M., & Yamamoto, T. 1990. Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic *Streptococci*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 2925±2929.
- Sakanaka, S., Aizawa, M., Kim, M., Yamamoto, T. 1996. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, pp. 745-749.
- Villarreal-Soto, S. A., Sandra Beaufort, Jalloul Bouajila, Jean-Pierre Souchard, Thierry Renard, Serge Rollan, Patricia Taillandier. 2019. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. Volume 83: 44-54.
- Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M. 1995. Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Syst Appl Microbiol* 18:590–4.
- Sreeramulu G, Zhu Y, Knol, W. 2001. Characterization of antimicrobial activity in kombucha fermentation. *Acta Biotechnol* 21:49–56.
- Steinkraus KH, Shapiro KB, Hotchkiss JH, Mortlock RP. 1996. Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage. *Acta Biotechnol* 16:199–205.

- Strap, J. L.; Latos, A.; Shim, I.; Bonetta, D. T. 2011. Characterization of pellicle inhibition in *Gluconacetobacter xylinus* 53582 by a small molecule, pellicin, identified by a chemical genetics screen. PLoS One, v. 6, n. 12, p. e28015.
- T. Kakuda, T. Takihara, I. Sakane, K. Mortelmans. 1994. Antimicrobial activity of tea extracts against periodontopathic bacteria. Nippon Nogeikagaku Kaishi (Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan), 68, pp. 241-243.
- Tanaka, T.; Kouno, I. 2003. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. Food Science and Technology Research, Tsukuba, v.9, n.2, p.128-133.
- Teoh AL, Heard G, Cox J. 2004. Yeast ecology of kombucha fermentation. Int J Food Microbiol 95:119–26.
- M. Toda, S. Okubo, H. Ikigai, T. Suzuki, Y. Suzuki, T. Shimamura. 1991. The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* 01. Journal of Applied Bacteriology, 70, pp. 109-112.
- M. Toda, S. Okubo, R. Hiyoshi, S. Tadakatsu. 1989. The bactericidal activity of tea and coffee. Letters in Applied Microbiology, 8, pp. 123-125.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Ranasinghe, S. J., & Waisundara, V. Y. 2017. Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of kombucha. Journal of Food Processing and Preservation, 41(1).
- Watawana, M. I., Jayawardena, N. Gunawardhana, V.Y. Waisundara. 2015. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. J. Chem., 2015.
- Wang K, Gan X, Tang X, Wang S, Tan H. 2010. Determination of d-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci 878:371–4.
- Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. 2015. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. Cell, 161(1), 49–55.
- Yang Z, Zhou F, Ji B, Li B, Luo Y, Yang L, Li T. 2010. Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. Appl Biochem Biotechnol 160:446–55.
- Vina J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V, et al. 2014. Pharmacological Properties of Physical Exercise in the Elderly; 167: 1-12.

CAPÍTULO 2

Artigo 1

Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and comprehensive phenolic profile changes during fermentation, and antimalarial activity

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the changes in physicochemical and microbiological composition, and in the phenolic profile of black tea kombucha during fermentation. In addition, the antimalarial potential of the kombucha was evaluated. An increase in the total relative abundance of phenolics was observed with the fermentation time, with emphasis on the increase in the relative abundance of phenolic acids. We highlight the degradation over time of flavonoids such as nepetin, hesperidin and catechin 5-O-gallate, to the detriment of the increase in phenolic acids such as gallic acid and cinnamic acid. In addition, black tea kombucha presented antiplasmodic activity against the strains 3D7 (sensitive chloroquine) and W2 (resistant to chloroquine). Therefore, important changes in the black tea kombucha phenolic profile take place during fermentation, which may help in the development of kombuchas with greater bioactive potential and contribute to a better understanding of the kombucha fermentation process.

Keywords: bioactive compounds, metabolomics, UPLC-MS^E, antiplasmodial activity

1. Introduction

The search for foods with bioactive properties has been increasing due to greater concern among consumers with disease prevention and a better quality of life (Araujo *et al.*, 2021; Morales, 2020). Kombucha is an ancient beverage of Chinese origin produced by fermenting green or black tea brewed from *Camellia sinensis* leaves using a symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY) (Jayabalan *et al.*, 2014). The beverage has a refreshing, acidic, and slightly sweet taste (Teoh *et al.*, 2004). Kombucha consumption has been associated with a reduction in inflammation and triglyceride levels. In addition, the beverage has antioxidant, antimicrobial, and anticancer potential (Morales, 2020; Villarreal-Soto *et al.*, 2020; Cardoso *et al.*, 2020).

Cardoso *et al.* (2020) identified 127 phenolic compounds in green and black tea kombuchas, most of which (70.2%) belong to the flavonoid class. Of these compounds, 27 phenolics have been identified exclusively in black tea kombucha, while only one was found exclusively in green tea kombucha. Black tea kombucha also showed greater antioxidant capacity and antiproliferative activity against cancer cells. Notable phenolic compounds present in kombucha include phenolic acids, theaflavins (TFs), thearubigins (TRs), and catechins (Cardoso *et al.*, 2020; Villarreal-Soto, 2019). Black tea kombucha also contains organic acids such as acetic acid, lactic acid, gluconic acid, glucuronic acid, tartaric acid, malic acid, and, to a lesser extent, citric acid (Jayabalan *et al.*, 2007; Jakubczyk *et al.*, 2020).

The microbiological composition of kombucha depends mainly on the composition of the SCOBY, the fermentation process variables (e.g., fermenting vessel geometry, time, and temperature), and the ingredients used (e.g., sugar concentration and tea type) (Chakravorty *et al.*, 2016; Coton *et al.*, 2017). The main microorganisms found in SCOBY and kombucha are acetic acid-producing bacteria (e.g. *Acetobacter*

spp., Bacterium spp., Gluconacetobacter spp., Gluconobacter spp., Komagataeibacter spp. and Tanticharoenia spp.), lactic acid-producing bacteria (e.g. Lactobacillus spp. and Lactococcus spp.) and yeasts (e.g. Candida spp., Debaryomyces spp., Saccharomyces spp., Saccharomycopsis spp., Zygowilliopsis spp. and Zygotoruspora spp.) (Morales, 2020). In addition to their role in producing ethanol, CO₂, organic acids, and cellulose, the activity of these microorganisms is associated with changes in the phenolic composition of the kombucha (Cardoso *et al.*, 2020; Jayabalan *et al.*, 2007; Kallel *et al.*, 2012; Jakubczyk *et al.*, 2020).

The concentration of total phenolics in kombuchas can increase with fermentation due to the catabolic and anabolic reactions carried out by the microorganisms using the beverage components (Jayabalan *et al.*, 2007; Chen & Sang, 2014; Jakubczyk *et al.*, 2020), resulting in a greater antioxidant capacity relative to tea (Chu & Chen, 2006). However, no studies to date have precisely detailed the possible changes in the phenolic profile of kombuchas during fermentation. The study of the profile of phenolic compounds during the fermentation of black tea can help develop kombuchas with greater bioactive potential, enabling the optimization of the concentration of phenolic compounds and microorganisms of interest and contributing to a better understanding of the role of the fermentation process.

Phenolic compounds have many biological activities and their presence in foods has been associated with health promoting properties. One bioactive property of the kombucha that has not yet been explored is its antimalarial activity, though some studies have demonstrated the antiplasmodic effect of phenolic compounds (Carmo *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2015; El Babili *et al.*, 2010; Sannella *et al.*, 2006). Carmo *et al.* (2020) demonstrated the promising effects of flavonoids present in extracts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) in the fight against malaria, while Lima *et*

al. (2015) noted that the synergism between phenolic compounds present in an extract is associated with an antiplasmodic effect *in vitro*. This study therefore aims to evaluate the physical, chemical, microbiological, and phenolic compound transformations using UPLC-MS^E during fermentation and the antiplasmodic activity of black tea kombucha.

2. Materials and methods

2.1 Kombucha production

Kombucha was produced from black tea leaves according to the methodology used by Cardoso et al. (2020). Black tea (Darjeeling Gielle FTGFOP1 Second Flush) was purchased at Tea Shop, a local retailer located in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The kombucha was stored in glass containers (fermenters) of 24 cm in height and 14 cm in diameter.

2.1.1 Fermentation

Kombucha fermentation was carried out in three batches at 25 °C for 10 days in a bio-oxygen demand (BOD) incubator. During each batch, aliquots were collected by a tap located at the bottom of the fermenter at zero, one, three, four, five, seven, and 10 days after the beginning of fermentation. These samples were analyzed for microbiological activity, pH, and total acidity. Aliquots were also collected and transferred to microtubes, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and stored at -18 °C until the analyses of total phenolics, TF and TR content, and phenolic compound profiles were performed.

After the fermentation process (tenth day), the aliquots were collected, the SCOBY was removed, and the remaining beverage was lyophilized. The lyophilized kombucha was used in the antimalarial activity test.

2.2 Kombucha characterization

2.2.1 Total acidity and pH

Total acidity was determined by titration with standardized 0.01 N NaOH and phenolphthalein as indicator, and the result was expressed as % (w/v) acetic acid (IAL, 2005). The pH was determined by a previously calibrated pH meter.

2.2.2 Microbiological characterization

The count of acetic and lactic acid bacteria, and yeast was determined according to Cardoso *et al.* (2020). The results were expressed as CFU/mL.

2.2.3 Total phenolics

The concentration of total phenolics was determined according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method, using gallic acid as standard (Singleton & Rossi, 1965). The absorbance was measured at 760 nm. The results were expressed as *mg* of gallic acid equivalent per mL of kombucha (mg GAE/mL).

2.2.4 Theaflavin and thearubigin

The concentration of theaflavins and thearubigins was estimated according to the spectrophotometric method by Jayabalan *et al.* (2007). The results were expressed as % (w/v).

2.2.5 Determination of the phenolic profile by UPLC-MS^E

The phenolic profile was performed in an ultra-performance liquid chromatography system coupled to mass spectrometry using an electrospray source and multiplex acquisition method (UPLC-MS^E), as described by Cardoso *et al.* (2020) with modifications. The kombucha aliquots collected during fermentation and stored at

-18 °C were lyophilized and transported to the phenolic profile analysis location. Lyophilized kombuchas were resuspended in 1.5 mL of 2% Methanol (grade LC-MS), 5% Acetonitrile (grade LC-MS) and 93% Milli-Q water, filtered through a hydrophilic PTFE filter 0.22 µm and stored in vials. Besides the injection of the chemical standards, a set of quality control (QC) samples was also prepared by pooling equal volumes of each kombucha extracts. QC samples were injected after each batch of six runs of kombucha samples to monitor the instrument's stability.

Data processing was performed with the software Progenesis Q1 (Waters) and the identification was performed as previously described by Cardoso *et al.* (2020), based on chemical standards runs parameters but also by comparison with customized database built from PubChem. In addition, only compounds present in all the three technical replicates (3/3) and CV <30% were considered as tentatively identified, following the identification levels according to Shymanski *et al* (2014) and Schrimpe-Rutledge (2016).

The processed data were exported to the XLSTAT software (Addinsoft, France), where the values of ion abundance obtained from mass spectra were used to relative quantification and for statistical analysis (one-way Anova, post-test Tukey, $p < 0.05$) and multivariate analysis, such as principal component analysis (PCA). The other multivariate data generated from the UPLC-MS^E, such as hierarchical cluster analysis (HCA), heat map and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA, s-plot), were performed by Metaboanalyst 3.0 web server and EZinfo 3.0 (Waters).

2.3 *In vitro* antiplasmodial test

The antiplasmodial effect *in vitro* was carried out from a solution of 0.03 g/mL of the lyophilized black tea kombucha. The analyses were conducted for the three replicates, with each replicate measured four times. The antiplasmodial effect was

evaluated using the W2 (resistant to chloroquine) and 3D7 (sensitive to chloroquine) strains and focused on the ring, schizont, and trophozoite phases. The methodology used was described by Carmo et al. (2020).

Multiple linear regressions were performed on the data, with CI-50 values defined based on the difference in the fluorescence emission by the samples.

2.4 Statistical analysis

The data obtained in the analyzes of total acidity, pH, microbiological characterization, theaflavins, thearubigins and total phenolics were tabulated by means of three batches, by fermentation time. Subsequently, linear and non-linear regression analyzes were performed as a function of the fermentation time, according to the best adjustment defined by the coefficient of determination (R^2). The version 4.0.2 of the R software (R CORE TEAM, 2020) was used.

The data obtained in the antiplasmodial test were obtained in quadruplicate and the analysis of the dose–response was determined by nonlinear regression (curve fit) using GraphPad Prism software.

3. Results and discussion

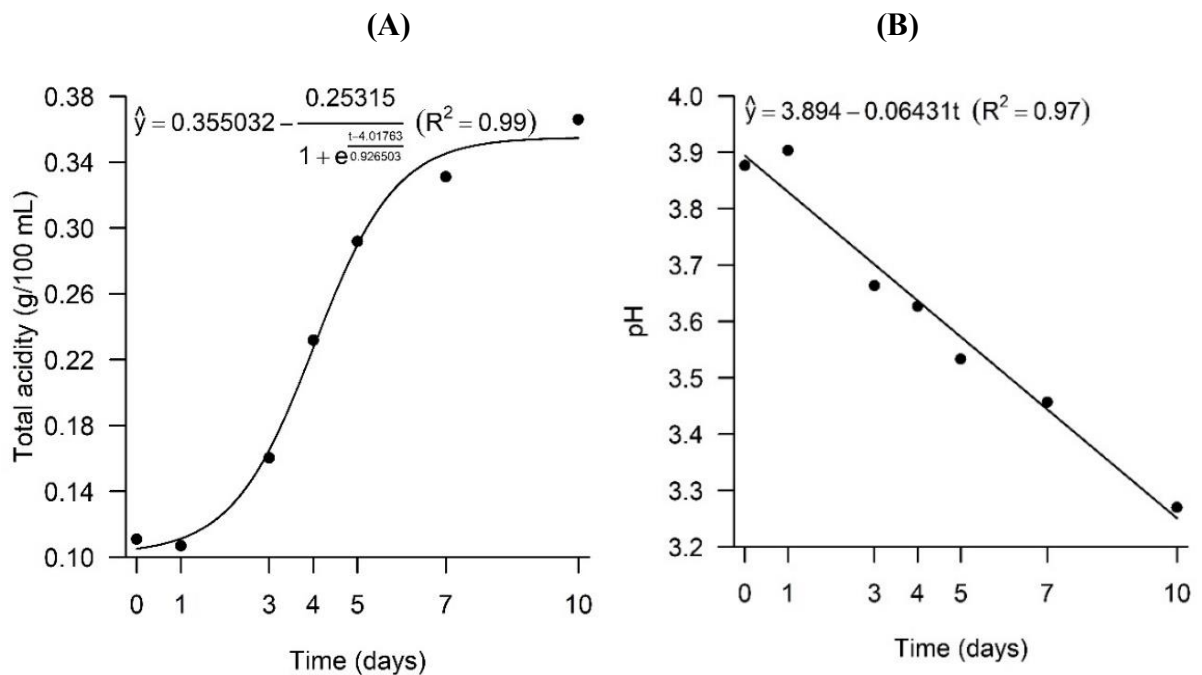
3.1 Physicochemical changes in the kombucha during fermentation

Black tea kombucha showed an increase in acidity throughout the fermentation process, varying from 0.11% (day 0) to 0.37% on the tenth day of fermentation, with the most pronounced increase occurring between days 3 and 7 (Figure 1A). This variation in acidity was due to the production of organic acids, especially acetic acid, gluconic acid, and glucuronic acid, by the acetic acid bacteria (AAB) present in the

SCOBY, which fed on the glucose and fructose present in the medium (Jayabalan *et al.*, 2007; Filippis *et al.*, 2018; Villarreal-Soto *et al.*, 2020).

The initial acidity of the tea was due to the addition of 100 mL/L of black tea kombucha from a previous batch (after ten days of fermentation) to inhibit the growth of undesirable microorganisms (Cardoso *et al.*, 2020). It also explains the average initial pH of the beverages, which was 3.89 and decreased linearly during fermentation, reaching a final pH of 3.25 on the tenth day (Figure 1B). Similar results were observed by Kallel *et al.*, (2012), Jayabalan *et al.* (2007) and Cardoso *et al.*, (2020).

Figure 1 - Changes in total acidity (A) and pH (B) during fermentation of black tea kombucha.



It is important to highlight that there was only a small increase in acidity between days 7 (0.345%) and 10 (0.355%) of fermentation (Figure 1A), with the pH decreasing from 3.44 (day 7) to 3.25 (day 10) (Figure 1B). The pH of kombucha has been shown to stabilize around the 10th day of fermentation due to the buffer effect caused by the

organic acids and carbon dioxide formed (Jaybalan et al., 2007; Kallel et al., 2012; Malbaša *et al.*, 2011).

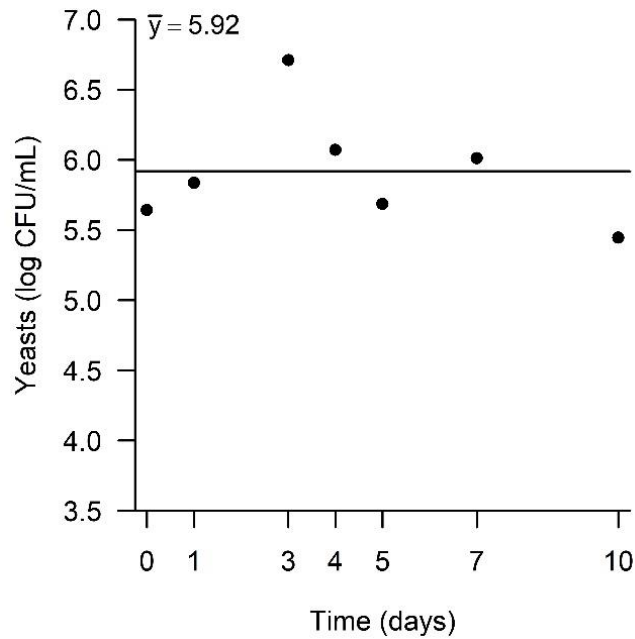
3.2 Microbiological changes in the kombucha during fermentation

The fermentation of kombucha is carried out by the joint metabolic activity of yeasts, acetic acid bacteria (AAB) and lactic acid bacteria (LAB), and is usually initiated by the activity of osmotolerant yeasts and subsequently controlled by acid-tolerant bacteria (Villareal *et al.*, 2020). The yeast count kept constant (5.92 log CFU/mL) during fermentation (Figure 2A). Although there is a tendency of the yeast count to increase in the beginning of kombucha fermentation, since yeasts hydrolyze sucrose into monosaccharides (glucose and fructose) and convert part of these monosaccharides, especially fructose, into ethanol through the fermentation process (Arikan *et al.*, 2020; Villareal *et al.*, 2018; Coton *et al.* 2017), it did not happen in our study. The remaining monosaccharides serve as a substrate for the metabolism of the AAB and LAB present in the medium.

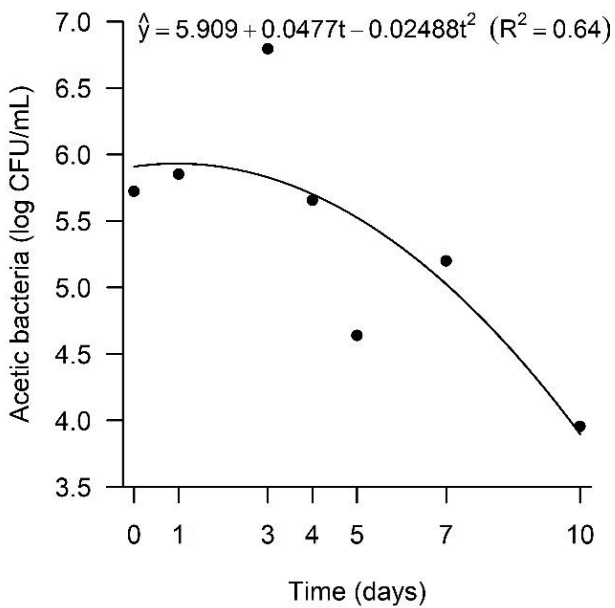
Figure 2 - Microbiological characterization of black tea kombucha during fermentation: count of yeasts (A); acetic acid bacteria (B) and lactic acid bacteria (C).

The AAB count showed similar behavior to that of yeasts at the beginning of

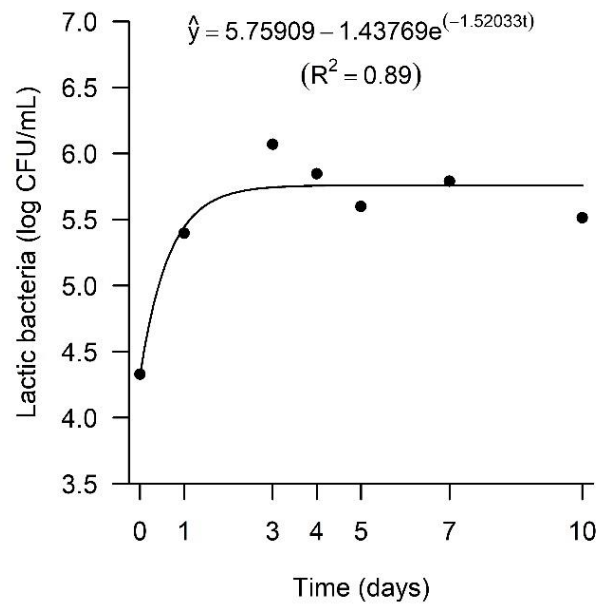
(A)



(B)



(C)



fermentation, varying from 5.91 to 5.83 Log CFU/mL in the first three days (Figure 2B).

The observed trend was for the count to decrease over time, varying from 5.83 to 3.90 Log CFU/mL from the third to the tenth day of fermentation (Figure 2B). This reduction can be caused by a decrease in available nutrients in the medium (Tran *et al.*, 2020;

Chen & Liu, 2000; Coton *et al.*, 2017; Teoh, *et al.*, 2004). In addition, AAB tend to migrate from their planktonic to sessile form, become trapped in the cellulose network they produce, and move to the top of the liquid, facilitating access to greater amounts of oxygen (Arikan *et al.*, 2020). AAB depend on large amounts of oxygen for their metabolic processes, which convert glucose into gluconic acid and cellulose (Sievers *et al.*, 1995; Jayabalan *et al.*, 2007; Jayabalan *et al.*, 2014) and ethanol into acetic acid (Dufresne & Farnworth, 2000; Jayabalan *et al.*, 2007). On the other hand, yeasts can use oxygen for their development, although several species also have anaerobic catabolic pathways for obtaining energy and monomers. In the present study, aliquots were obtained by removing the liquid through a tap at the bottom of the container, as far as possible from the cellulose film structure and where oxygenation is the lowest. This may be one of the reasons for the decrease in the presence of AAB over time.

Tran *et al.* (2020) characterized the interaction between AAB and yeasts in kombucha as non-strict parasitism and reported that, although yeasts provide oxidizable substrates, AAB co-cultures can develop and produce acetic acid in the absence of yeast. The authors showed that AAB activity affected the profile of organic acids, while yeasts were responsible for the overall microbial dynamics, the chemical composition of the beverage, and the sensory characteristics of the product.

Neffe-Skocińska *et al.* (2017) obtained higher yeast and AAB counts in kombucha (both above 7 Log CFU/mL); their yeast counts were higher beginning on the third day of fermentation, while their AAB counts were higher on the tenth day of fermentation, using the same temperature and fermentation time of our study (25 °C/10 days). Fillippis *et al.* (2018) also obtained counts in the range of 7 Log CFU/mL, although at temperatures of 20 and 30 °C. Both studies used a sucrose concentration of 100 g/L during the kombucha production, double the concentration of sucrose used

in kombucha production in our study (50 g/L), which could justify the larger population figures, as well as the differences associated with the composition of the SCOBYs used.

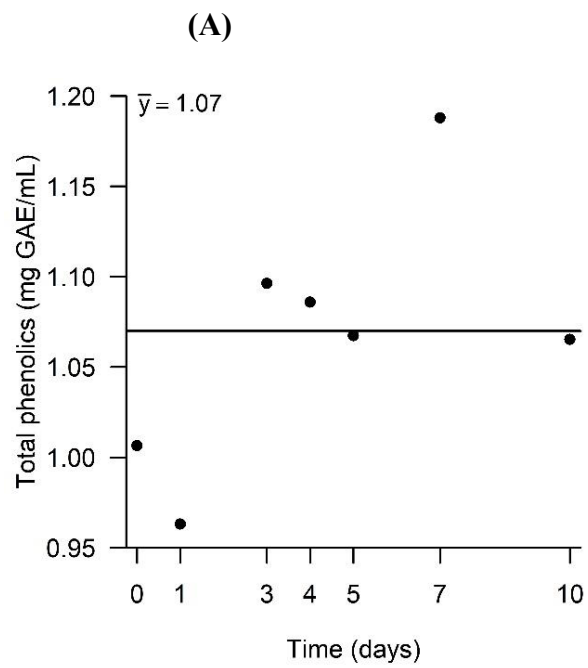
The LAB count varied and the observed trend was for the count to increase at a decreasing rate (Figure 2C). The increase in counting occurred by the second day of fermentation, varying from 4.32 to 5.69 Log CFU/mL, and was maintained afterward (Figure 2C). Similar behavior was observed by Jayabalan *et al.* (2007) and Coton *et al.* (2017).

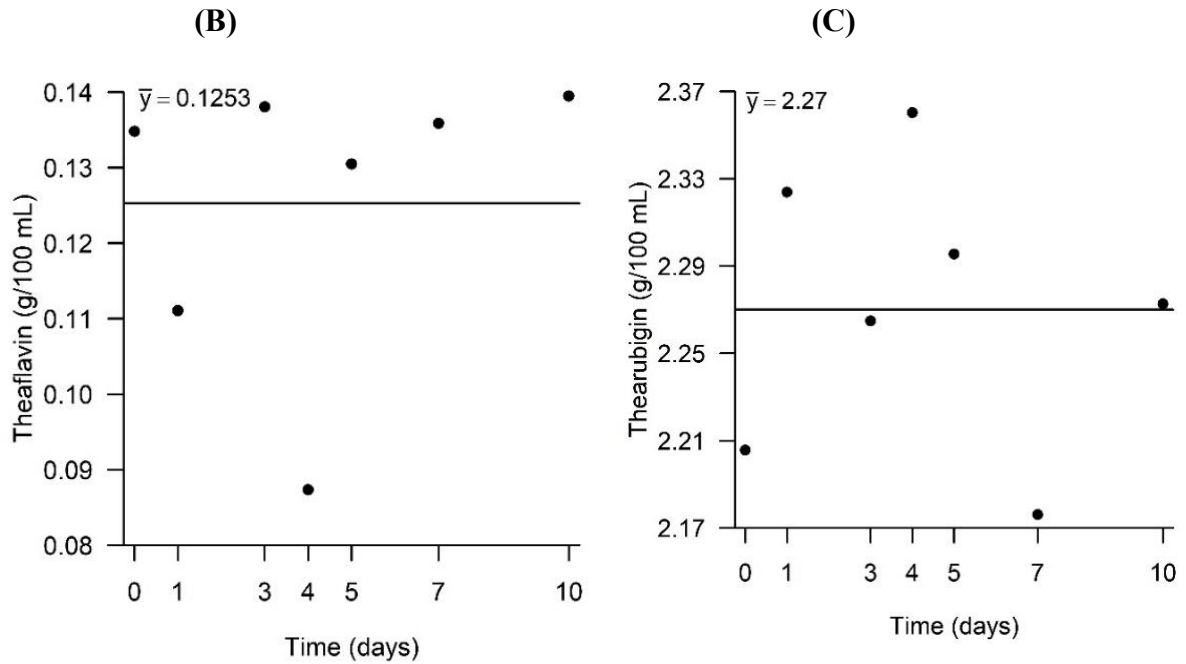
3.3 Identification and quantification of phenolic compounds in the kombucha during fermentation

3.3.1. Concentration of total phenolics, theaflavins e thearubigins

The results of changes in the concentrations of total phenolics, theaflavins (TFs) and thearubigins (TRs) during fermentation are shown in Figure 3. The concentration of total phenolics in the kombucha did not change (1.07 mg GAE/mL) during fermentation (Figure 3A). The transformations in the phenolic composition caused by the microorganisms present in the kombucha did not promote fluctuation in the concentration of total phenolics during fermentation. For example, catechins, the main phenolics present in green and black tea, can be polymerized into molecules with high molecular weights during fermentation, thus reducing the concentration of total phenolics (Chu e Chen, 2006). Meanwhile, epicatechin isomers can undergo hydrolysis, which results in increased concentrations of gallic acid, epicatechin, and epigallocatechin, increasing the total concentration of phenolics (Jaybalan *et al.*, 2008; Jaybalan *et al.* 2007).

Figure 3 - Changes in the concentration of total phenolics (A), theaflavins (B) and thearubigins (C) during fermentation





Kallel et al. (2012) and Jaybalan et al. (2008) observed a small variation in the concentration of total phenolics in kombucha up to 10 days of fermentation. In both studies, the concentration of total phenolics increased more sharply after ten days of fermentation, which can be explained by a higher rate of degradation of flavonoids and other phenolics with high molecular weights, producing phenolic compounds with low molecular weights (Rechner et al., 2004; Chen e Sang, 2014).

TR content was about twenty times greater than that of TF, and the concentration of these compounds did not vary over the fermentation period evaluated, with averages of 2.27% (TR) and 0.125% (TF) (Figures 3B and 3C). Jayabalan et al. (2007) observed small variations in the TF and TR concentrations during the production of black tea kombucha over 18 days of fermentation.

In addition to the concentration and composition of phenolics, kombucha also contains vitamin C and other metabolites produced during fermentation. Since these include organic acids, which have a reducing power, their presence can interfere with

the calculation of total phenols, which can influence the quantification of the total phenolic content of kombucha (Malbaša *et al.*, 2011).

3.3.2. Phenolic profile of black tea kombucha by UPLC-MS^E during fermentation

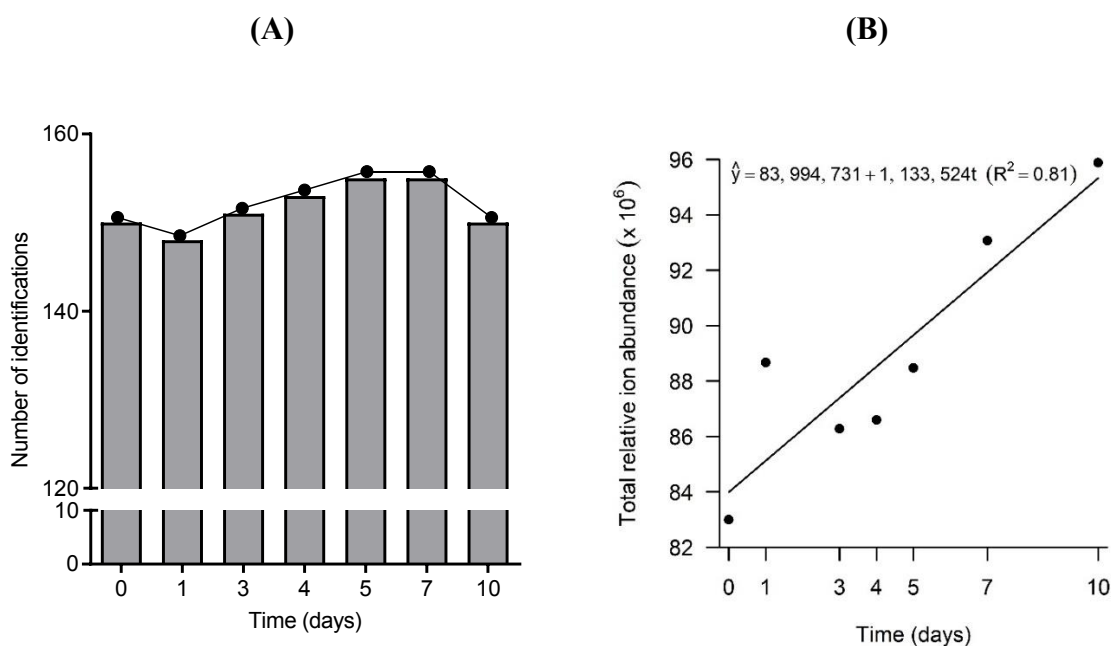
This is the first study to assess variations in the overall composition and relative abundance of phenolic compounds in black tea kombucha during fermentation using UPLC-MS^E. A total of 164 phenolic compounds were identified in black tea kombucha, with the identified classes including phenolic acids, flavonoids, lignans, stilbenes, and other polyphenols at all fermentation times evaluated (Table S1). Flavonoids were the class with the highest number of identified compounds (86), followed by phenolic acids (54) and other phenolic compounds (18), regardless of the fermentation time analyzed (Table S1), which corroborates prior findings by our research group (Cardoso *et al.*, 2020) using the same black tea kombucha (i.e., produced in the same way, with the same ingredients) after ten days of fermentation.

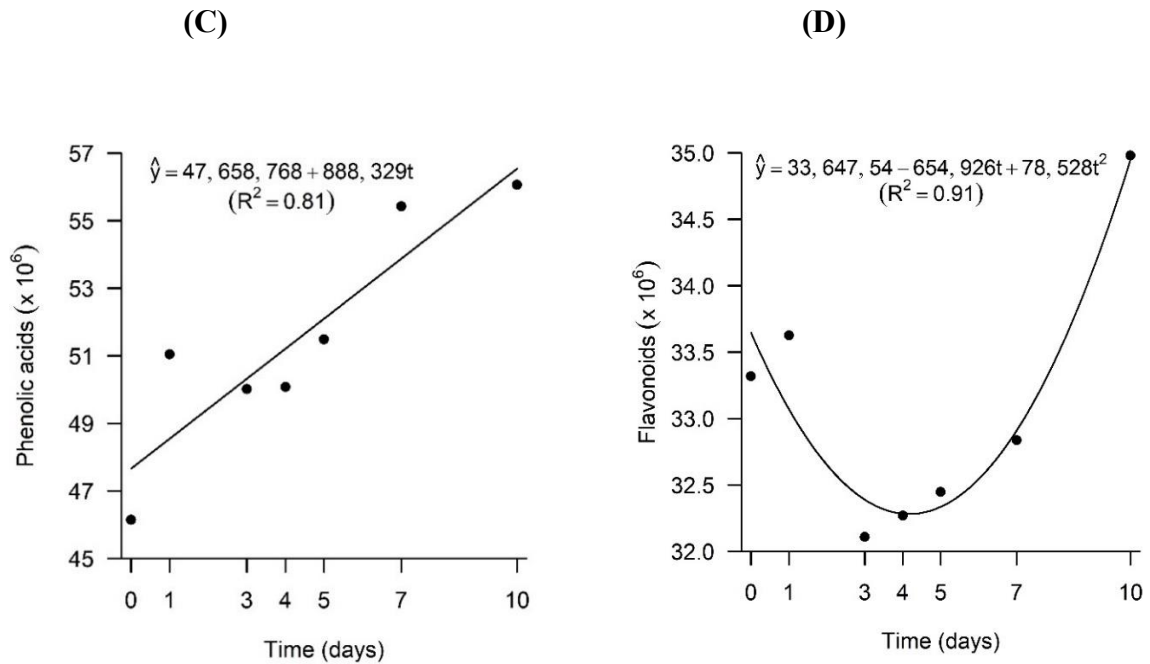
There was a small variation (1.3%) in the number of phenolic compounds identified during fermentation (Figure 4A). However, the trend observed in the relative abundance of phenolic compounds increased linearly over time (Figure 4B, Table S1). Phenolic acids were the most abundant at any fermentation time and also showed a trend of linear increase over time (Figure 4C). The relative abundance of flavonoids decreased until around the fourth day and then increased until the tenth day of fermentation (Figure 4D). This indicates that flavonoid degradation reactions by microorganisms occurred more often at the beginning of fermentation, with the resulting formation of lower molecular weight phenolics such as phenolic acids.

According to Chen & Sang (2014) and Rechner *et al.* (2004), flavonoids and polymeric phenolic compounds can be degraded by enzymes released by microorganisms, forming smaller molecules. Black tea kombucha has higher

concentrations of polymeric phenolics such as TFs and TRs than does green tea kombucha due to the oxidation reactions that occur in the process of obtaining black tea (Cardoso et al., 2020; Kallel *et al.*, 2012). However, it was demonstrated in this study that there was no variation in the concentrations of TFs and TRs during fermentation (Figures 3B and 3C). Thus, black tea flavonoids are the main phenolics that undergo transformations (e.g., hydrolysis), producing phenolic compounds with lower molecular weights (e.g., phenolic acids).

Figure 4 - Metabolomic analysis: number of identifications (A) and total relative ion abundance (B) of phenolic compounds during the fermentation period; Relative ion abundance of phenolic acids (C) and flavonoids (D) during the fermentation period.





A principal component analysis (PCA) was carried out to assess the distribution of the fermentation days according to the abundances of the identified compounds (Figure 5A). PC1 and PC2 were able to explain together 59% of the variance observed between the fermentation days, confirming changes in the abundance of phenolic compounds in the kombucha throughout the fermentation process. To better understand these differences, separate PCAs were prepared to compare each day of fermentation with day 0 (Figure S1). We observed that the longer the fermentation time compared to day 0, the greater the sum of PC1 and PC2 (from 66% for the first day to 82% for the tenth day), demonstrating that the greatest difference in the abundance of phenolics in black tea kombucha occurred in the final days of fermentation. There was no difference in the sum of PC1 and PC2 on day 0 compared to days 5, 7, or 10, so another PCA was performed to understand the influence of the initial days (G1 – days 0, 1, 3, and 4) on the final days (G2 – days 5, 7 and 10) of fermentation (Figure 5B). In this case, the sum of PC1 and PC2 was 95%, demonstrating the importance of the

final days of kombucha production (the fifth to tenth days, in our case) were crucial for the differentiation of its phenolic compounds.

The Venn diagram (Figure 6A) and the S-plot (Figure 6B) of the supervised multivariate analysis were used to better understand which phenolic compounds were responsible for the differences observed between day 0 and the final days of fermentation (D5, D7, and D10). In the Venn diagram, 140 phenolic compounds were identified as being common to days D0, D5, D7, and D10. However, five phenolics were identified exclusively on D0 (hesperidin, p-coumaric acid 4-O-glucoside isomer 5, (+)-catechin gallate, p-coumaric acid 4-O-glucoside isomer 6, and nepetin), one on D5 (unidentified compound 2), one on D7 (unidentified compound 3), and one on D10 (verbascoside) (Figure 6A).

Figure 5 - Principal component analysis (PCA) biplot of kombucha samples in (A) all samples and (B) between two groups, where: G1 is composed of D0-D4 and G2 is composed of D5-D10. The samples (symbols) are distributed according to relative intensity of identified phenolic compounds (red circles).

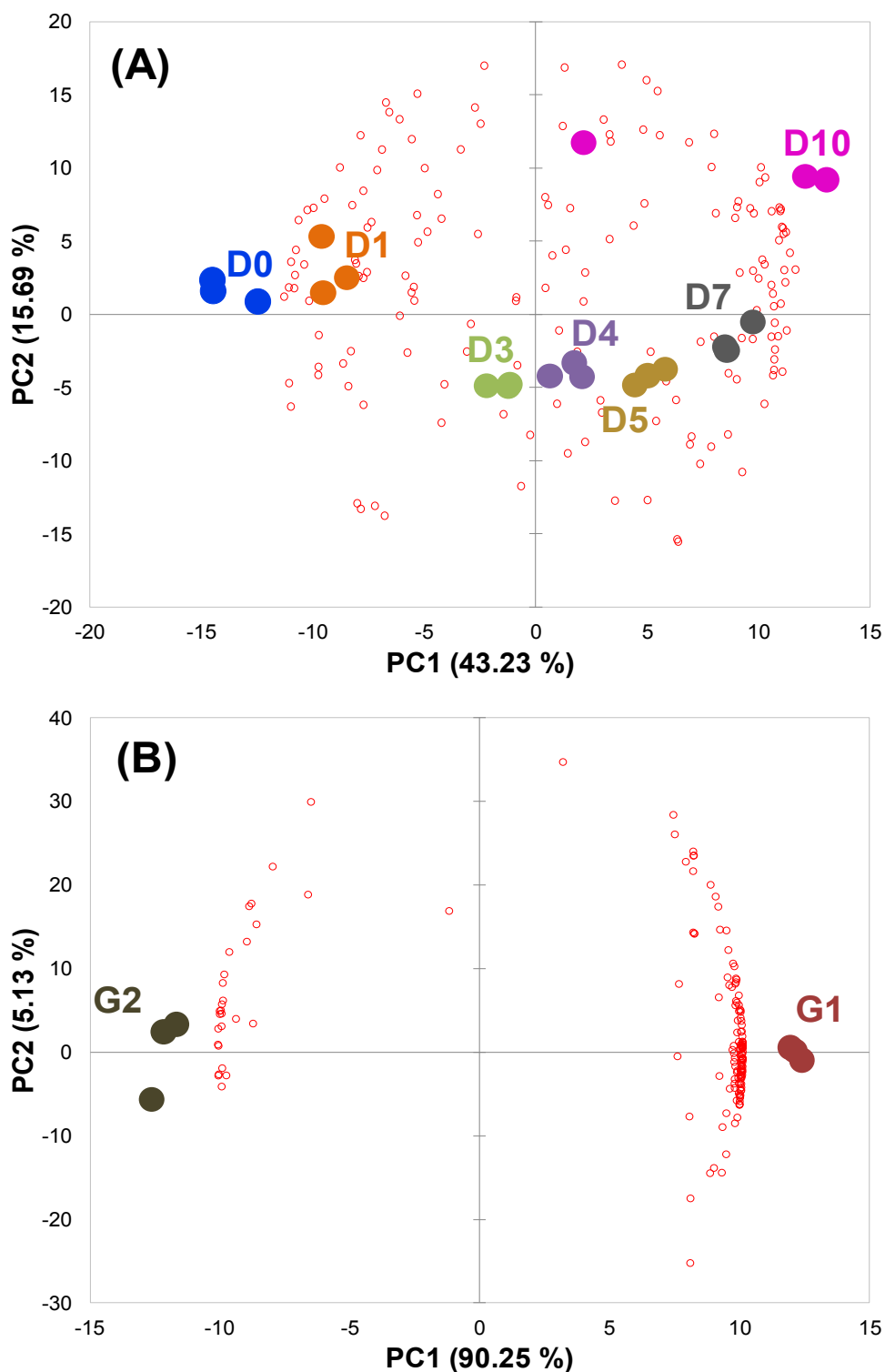
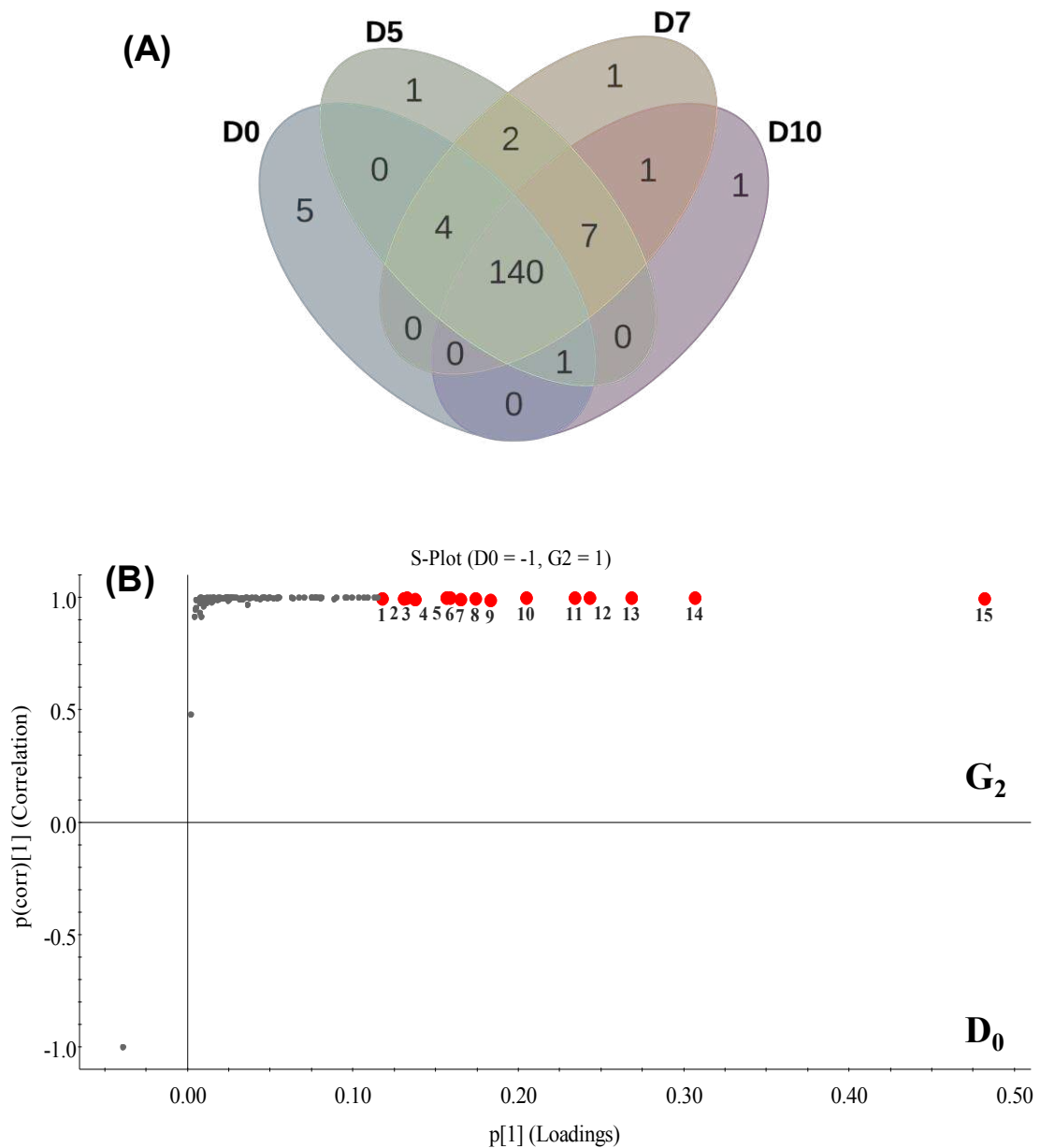


Figure 6 - Comparative analyzes between D0 and G2 (D5, D7 and D10). (A) Exclusive and in common compounds between the four samples; (B) S-plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of 140 compounds in common.

In x axis is represented the relative magnitude of variables (phenolic compounds), and in y axis, the confidence/reliability. Variables farthest from the origin in the plot are deemed significant markers of D0 (lower

square) and G2 (upper square). Insert graph represents the total relative ion abundance of discriminant compounds in red. (1) dihydroxybenzoic acid isomer 2; (2) (+)-catechin; (3) gallocatechin gallate; (4) pyrogallol; (5) (-)-epicatechin; (6) p-coumaroylquinic acid isomer 2; (7) 4-hydroxybenzoic acid; (8) esculetin; (9) gentisic acid. (10) p-coumaroylquinic acid isomer 1; (11) catechin 5-O-gallate; (12) p-coumaroylquinic acid isomer 3; (13) (-)-epigallocatechin 3-O-gallate; (14) 5-O-galloylquinic acid; and (15) gallic acid.



As mentioned above, the cumulative total number of phenolics identified across all fermentation days was 164, with 140 compounds common to both D0 and D5 to D10. This indicates that the main difference between the fermentation times, as shown in the PCAs, was not the number of exclusive phenolics but the variation in their

abundance. A typical reaction during kombucha production, for example, is the hydrolysis of epigallocatechin gallate and epicatechin gallate and the formation of gallic acid, epigallocatechin, and epicatechin (Jayabalan et al., 2007). Although these hydrolysis products were already in the beverage (Jayabalan et al., 2007; Jayabalan et al., 2008), their abundance changed due to the hydrolysis reaction. The Venn diagram also showed that the flavonoids hesperidin, (+)-catechin gallate, and nepetin were degraded over the course of fermentation, as they were not found on days 5, 7, or 10 (Figure 6A).

Although this study reports a high number of similar phenolic compounds (140), there was considerable variation in their relative abundances. A S-plot consisting of only the 140 phenolic compounds present at all stages of the fermentation process and comparing times D0 and G2 (D5, D7, and D10) is shown in Figure 6B. Fifteen compounds were selected (represented by the red circles), which showed different abundances at D0 and G2. These 15 compounds had the greatest variations in abundance, with the highest variation observed in gallic acid, followed by 5-O-galloylquinic acid, its glycosylated form, both of which increased in abundance over time (Figure 6B, Table S1). As discussed above, there was a trend toward a linear increase in the concentration of phenolic acids over the fermentation process. Among the flavonoids, epigallocatechin 3-O-gallate and catechin 5-O-gallate had the greatest variations in their abundances (Figure 6B).

To better understand the variation in the abundance of specific phenolic compounds during fermentation, a hierarchical cluster analysis (HCA) and heat map were applied to the discriminating phenolic compounds indicated in the S-plot and the compounds exclusively present in D0 or G2 (Figure 7). The greatest levels of degradation occurred among the flavonoids, and the greatest levels of synthesis

occurred among phenolic acids and other phenolics. The flavonoids (+)-catechin gallate, nepetin, hesperidin, and catechin 5-O-gallate had the greatest level of degradation over time. Meanwhile, the phenolic acids gallic acid, 5-O-galloylquinic acid, verbascoside, rosmarinic acid, cinnamic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and 3-methoxy-4-hydroxyphenyllactic acid had the largest increases in their concentration along with the flavonoids (+)-catechin and galocatechin gallate (Figure 7).

According to the online database KEGG pathway (www.genome.jp/kegg/pathway), a schematic diagram of phenylpropanoid and flavonoids pathway was created to explain the main degradation/synthesis pathways of these compounds (Figure 8). The increase in the concentration of catechins and gallic acid can be related to the hydrolysis of catechin gallate (found only on days D0–D3, Table S1, compound number 24) and catechin 5-O-gallate. The increase in catechin content during the production of black tea kombucha may also be associated with an increase in the concentration of its precursors, eriodictyol and cinnamic acid, which are associated with the degradation of naringenin and p-coumaric acid, respectively. The reduction in the naringenin concentration may be associated with the degradation of nepetin and hesperidin–flavonoids found only on day 0–and p-coumaric acid. Some important phenolics such as gallic acid, rosmarinic acid, cinnamic acid, 5-O-galloylquinic acid, and catechol may have been formed from the degradation of p-coumaric acid during fermentation (Figure 8). The phenolic acids cinnamic acid and rosmarinic acid were identified and presented high relative abundance only from days D5 and D7, respectively (Table S1, compounds number 122 and 134).

Figure 7 - Analysis of changes over the days of fermentation. (A) Hierarchical cluster analysis (HCA) and heatmap comparing the abundance of the selected compounds; and (B) classes of compounds synthesized and degraded throughout the process.

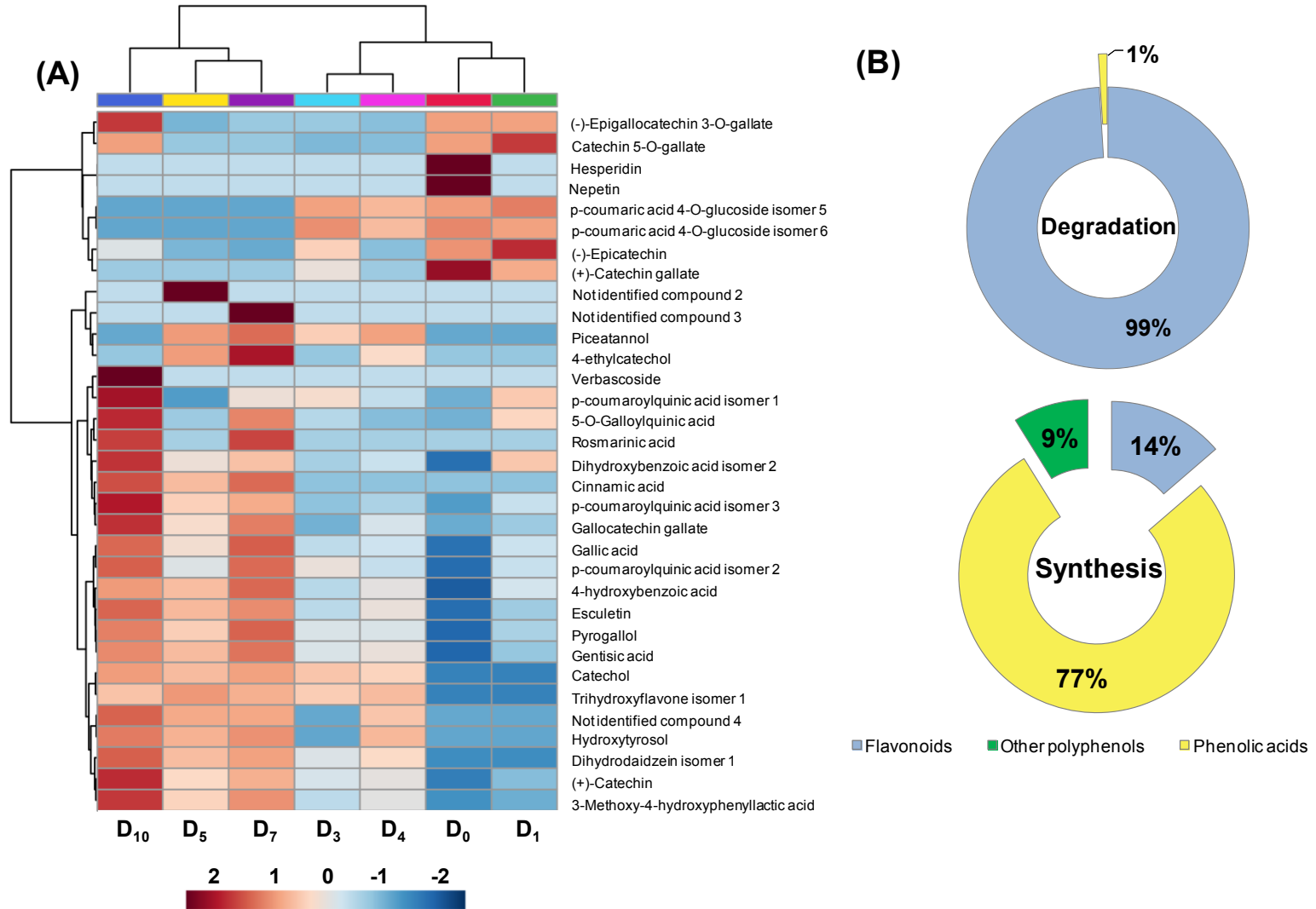
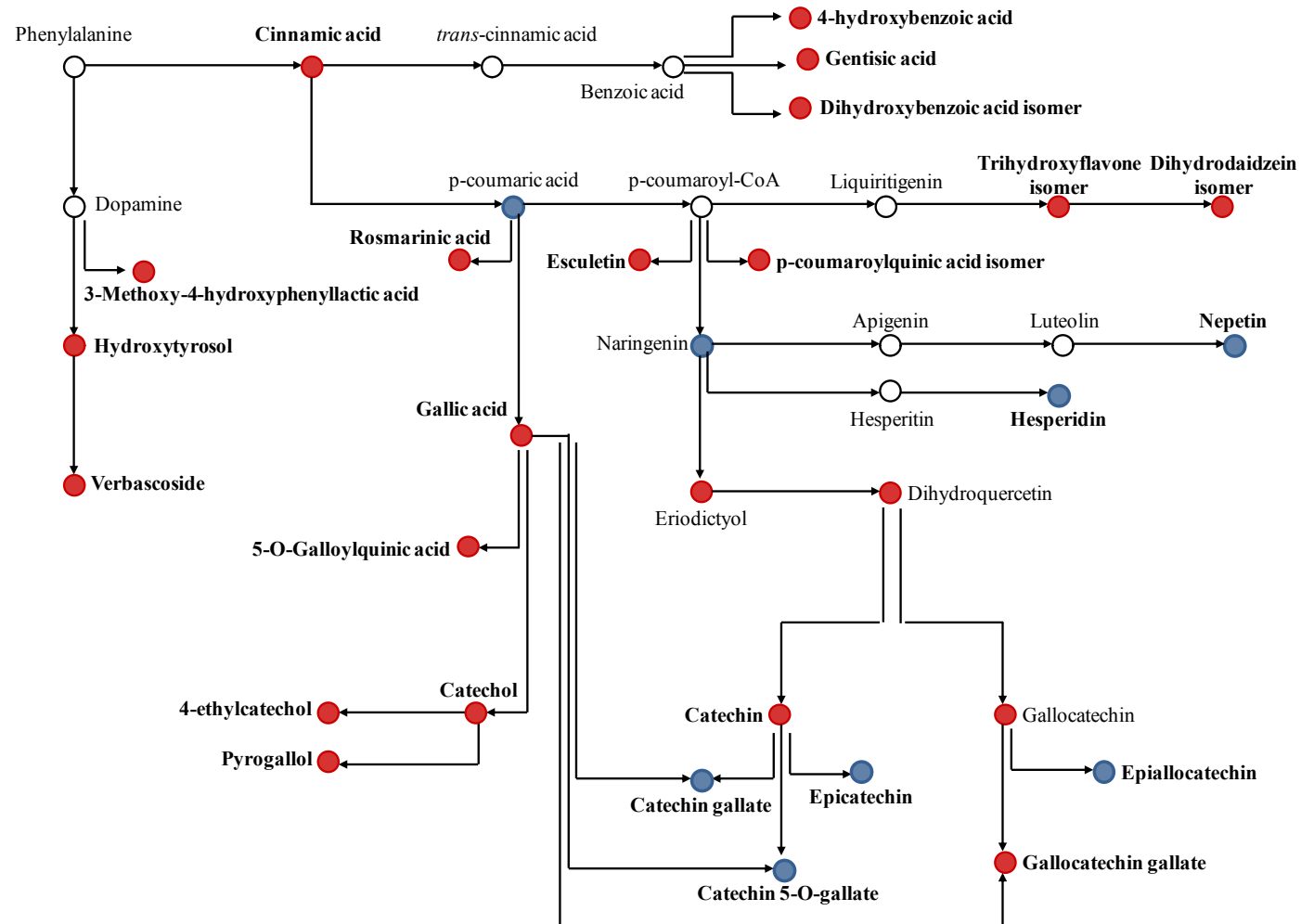


Figure 8 - Schematic diagram of phenylpropanoid and flavonoids pathway associated with the synthesis and degradation of phenolic compounds. The metabolites analyzed by LC/MS are colored, whose blue color represents the degraded compounds and the red color represents the synthesized compounds. The compounds in bold were selected by the heatmap (see Fig. 3) and empty circles are for no detected metabolites.



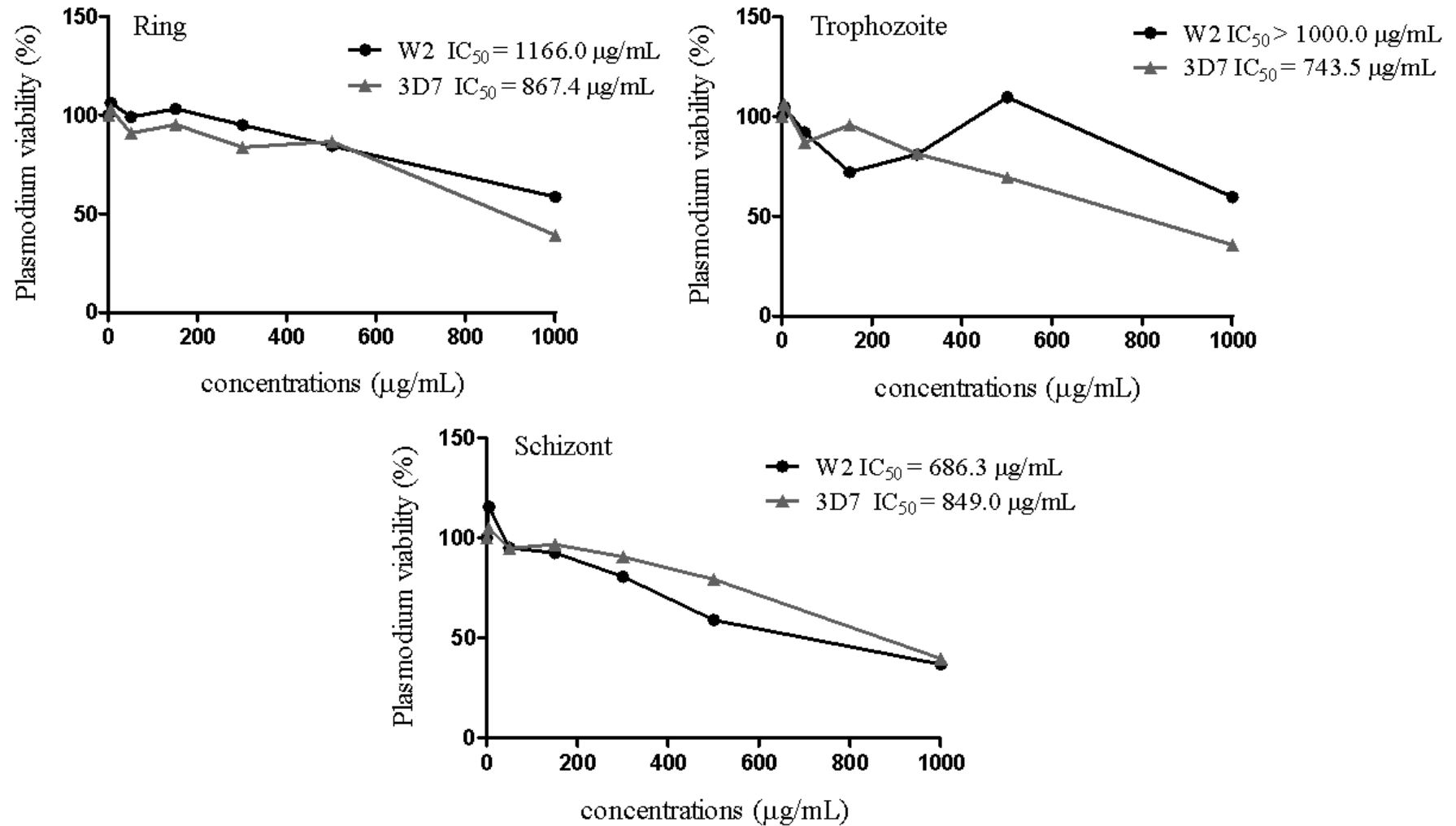
Verbascoside was another phenolic acid identified only at the end of the fermentation (D10) and may be related to the increase in the concentration of cinnamic acid (Figure 8; Table S1). Another consequence of the increase in cinnamic acid was the increase in the concentration of three other phenolic acids, 4-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, and dihydroxybenzoic acid isomer 2 (Figure 8).

3.4 Antimalarial activity of black tea kombucha

Properties of bioactive compounds from BTK have not previously been explored as antimalarial agents. The tested kombucha exerted toxicity against both W2 (chloroquine resistant) and 3D7 (chloroquine sensitive), decreasing the *P. falciparum* viability by up to 35%, dependent on the strain and parasitic stage (Figure 9). Structure-activity studies have highlighted that flavonoids from natural extracts have been closely related with antimalarial effects (Carmo *et al.*, 2020; Krettli, 2009). The reduction on *Plasmodium falciparum* viability observed herein may be attributed to the flavonoids content of BTK (i.e. Catechin, quercetin, epicatechin, among others). In this sense, Sannella *et al.* (2007) revealed that green tea crude extracts, rich in catechins as the BTK, exerted antimalarial activity in both sensitive ($IC_{50} = 30.76 \mu\text{M}$) and resistant ($IC_{50} = 28.61 \mu\text{M}$) strains. Moreover, Tasdemir *et al.* (2006) showed that flavonoids (i.e. quercetin) presented antimalarial effects by inhibiting enzymes involved on type-II fatty acid biosynthesis pathway of *P. falciparum*, namely β -ketoacyl-ACP-reductase, β -hydroxacylACP-dehydratase and enoyl-ACP-reductase. In the current study, regarding the 3D7 strain, BTK exhibited similar effects independent of the parasite stage, with IC_{50} values between 743.5 and 867.4 $\mu\text{g/mL}$. In respect of W2 strain, the ring and trophozoite forms seemed to be more resistant to the treatment ($IC_{50} > 1000.0 \mu\text{g/mL}$), while schizont stage was more sensible ($IC_{50} = 686.3 \mu\text{g/mL}$). Enechi *et al.*

(2021) pointed out that flavonoid-rich extract of *Buchholzia coriacea* seeds exhibited antimalarial property as shown by the significant reduction in parasitemia levels when infected-treated and infected-untreated mice were compared.

Figure 9 - Antiplasmodial activity of black tea kombucha against chloroquine sensitive strain (3D7) and chloroquine resistant strain (W2) at different synchronized plasmodial stages. Concentrations are expressed in $\mu\text{g/mL}$ of lyophilized kombucha



Overall, BTK revealed *in vitro* antimalarial effects against *P. falciparum*, even in resistant strain and this effect can be attributed to the phenolic content of BTK, such as gallic acid, catechins and epicatechins. This scenario open avenues to development of new food products as alternative strategies with amplified efficacy (three *P. falciparum* intra-erythrocytic stages as targets), besides to contribute to the diversification of nutrients and functional compounds that prevent diseases and promote health.

4. Conclusion

The microbiological composition of the black tea kombucha underwent changes during fermentation, which caused several transformations in the physicochemical composition and in the phenolic profile of the beverage. It was observed that the relative abundance of some flavonoids, such as nepetin and catechin 5-O-gallate, decreased over fermentation time, whereas the relative abundance of phenolic acids such as gallic acid and cinnamic acid increased. Phenolic acids were the most abundant compounds in all fermentation days. In addition, black tea kombucha presented antimalarial activity.

Therefore, the results of this study will help in the development of kombuchas with greater bioactive potential, enabling the optimization of the concentration of phenolic compounds and microorganisms of interest and contributing to a better understanding of the kombucha fermentation process.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Brazil, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, 26/202/709–2018)-Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 310343/2019-4) – Brazil for financial support.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

5. References

- Araujo, F.F., Farias, D.P., Neri-Numa, I.A. and Pastore, G.M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338: 127535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>
- Arıkan, M., Mitchell, A.L., Finn, R.D. and Gürel, F. (2020), microbial composition of kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of Food Science*, 85: 455-464. <https://doi.org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1750-3841.14992>
- Cardoso, R.R., Neto, R.O., D'Almeida, C.T.S., Nascimento, T.P., Pressete, C.G., Azevedo, L., Martino, H.S.D., Camerone, L.C., Ferreira, M.S.L., Barros, F.A.R. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* 128, 108782. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782
- Carmo, M.A.V., Fidelis, M., Sanchez, C.A., Castro, A.P., Camps, I., Colombo, F.A., Marques, M.J., Myoda, T., Granato, D., Azevedo, L. (2020). Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomicidal properties. *Food Research International*. V. 136, 109334, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109334>.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220:63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chen C, Liu BY. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* 89:834–9.
- Chen H., Sang, S., (2014), Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota, *Journal of Functional Foods*, Volume 7, Pages 26-42, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.013>.
- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>.
- Dufresne C, Farnworth E. 2001. Tea, kombucha, and health: a review. *Food Res Int* 33:409–21.

- Enechi, O. C., Okagu, I. U., Amah, C. C., Ononiwu, P. C., Igwe, J. F., & Onyekaozulu, C. R. (2021). Flavonoid-rich extract of *Buchholzia coriacea* Engl. seeds reverses *Plasmodium berghei*-modified haematological and biochemical status in mice. *Scientific African*, 12, e00748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00748>
- Ferreira, L.T., Venancio, V.P., Kawano, T., Abrão, L.C.C., Tavella, T.A., Almeida, L.D., Pires, G.S., Bilslund, E., Sunnerhagen, P., Azevedo, L., Talcott, S.T., Mertens-Talcott, S.U., Costa, F.T.M. (2019). Chemical Genomic Profiling Unveils the in Vitro and in Vivo Antiplasmodial Mechanism of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenols. 2470-1343, <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02127>
- Filippis, F.D., Troise, A.D., Vitaglione, P., Ercolini, D., (2018), Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during kombucha tea fermentation, *Food Microbiology*, Volume 73, Pages 11-16, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>.
- Instituto Adolfo Lutz. 2005. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4 ed. Brasília: ANVISA. 1018p
- Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M. et al. (2020). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *J Food Sci Technol* 57, 1840–1846. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13197-019-04217-3>
- Jakubczyk, K.; Kałduńska, J.; Kochman, J.; Janda, K. (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*, 9, 447. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109, 227–234. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.037.
- Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S. and 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*, 13: 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>.

- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127(4), 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>.
- Moneriz, C.; Marín-García, P.; Bautista, J. M.; Diez, A.; Puyet, A. (2009). Haemoglobin Interference and Increased Sensitivity of Fluorimetric Assays for Quantification of Low-Parasitaemia Plasmodium Infected Erythrocytes. *Malar. J.* 8, 279, DOI: 10.1186/1475-2875-8-279
- Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence, *Trends in Food Science & Technology*, V. 105, Pg. 323-333, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>.
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., & Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Acid content and the effect of fermentation condition of kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA – Journal of Food*, 15(4), 601–607. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>.
- Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., & Le, P. H. 2015. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1149–1155.
- Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: Risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76(4), 8–11 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020. URL <https://www.r-project.org>.
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., et al. 2004. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2), 212–225.
- Sannella, A. R., Messori, L., Casini, A., Francesco Vincieri, F., Bilia, A. R., Majori, G., & Severini, C. (2007). Antimalarial properties of green tea. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(1), 177–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.005>
- Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016 Dec;27(12):1897-1905. doi: 10.1007/s13361-016-1469-y. Epub 2016 Sep 13. PMID: 27624161; PMCID: PMC5110944.
- Schymanski, E.L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H.P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry:

Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 2097–2098, doi:10.1021/es5002105.

- Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M. 1995. Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Syst Appl Microbiol* 18:590–4.
- Singleton, V.L.; Rossi Junior, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture, Davis*, v. 16, n. 1, p. 144-158.
- Teoh AL, Heard G, Cox J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol* 95:119–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R., (2020). Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods* 9(7), 963; <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83(April), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>.
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P.D., Souchard, J.P., Taillandier, P., Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 333, 108778, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>.

Supplementary data

Figure S1 - Principal component analysis (PCA) biplot of kombucha comparing control vs (A) D1; (B) D3; (C) D4; (D) D5; (E) D7; and (F) D10. The samples (symbols) are distributed according to relative intensity of identified phenolic compounds (red circles).

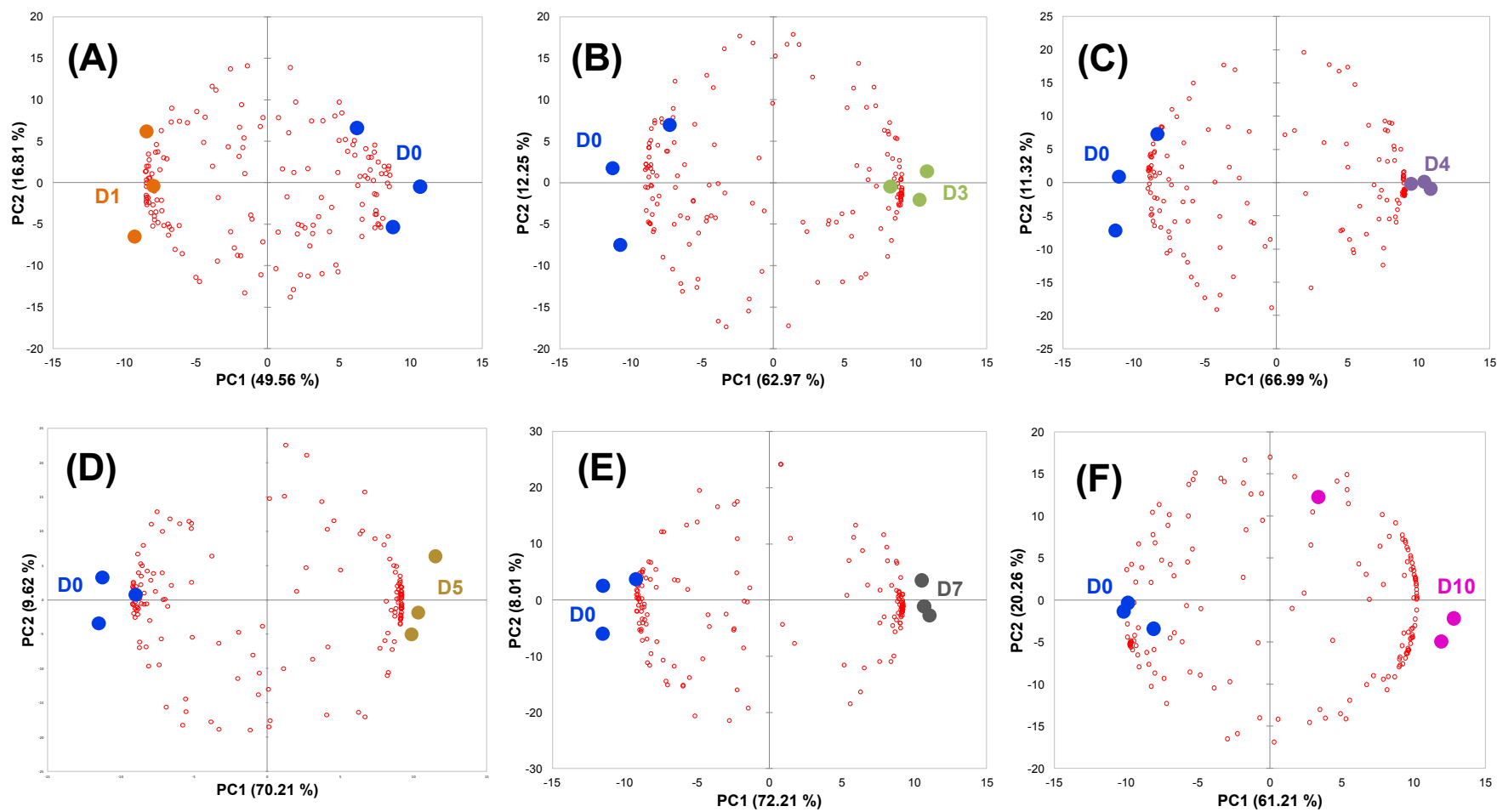


Table S1 - Phenolic compounds tentatively identified in the black tea kombucha by UPLC-MSE separated by classes and in retention time order.

Number A4:QA4: Q165	Common Name	Molecular Formula	m/z (exp.)	RT (min)	Score (%)	Fragmentation Score (%)	Frag database	Mass Error (ppm)	Isotope Similarity		Normalised abundance					
									D0	D1	D3	D4	D5	D7	D10	
FLAVONOIDS																
1	Hesperidin	C28H34O15	609,1867	0,55	41,7	34,1	135.0289 (100%); 431.1029 (5.33%)	6,82	82,14	5,69E+03						
2	Genistin	C21H20O10	431,1020	0,69	54,2	92,7	191.0553 (100%); 377.0843 (4.07%)	8,38	87,42	1,25E+06	1,09E+06	7,09E+05	6,24E+05	5,60E+05	5,17E+05	4,35E+05
3	6"-O-Acetylglucytin	C24H24O11	487,1294	0,71	41,8	28,2	59.0126 (3.24%); 71.0128 (19.19%); 73.0284 (0.38%); 131.0341 (4.49%); 143.0341 (7.40%); 161.0446 (8.90%); 377.0849 (0.90%); 387.1133 (6.80%); 431.1029 (0.61%)	9,81	91,59	8,87E+04	1,44E+05	5,50E+05	6,21E+05	6,88E+05	8,27E+05	1,05E+06
4	Didymin	C28H34O14	593,1905	0,73	42,5	30,8	69.0339 (1.37%); 85.0285 (100%); 87.0441 (6.50%); 141.0183 (4.16%); 431.1402 (3.19%)	4,99	87,59	1,77E+04	1,96E+04	2,55E+04	2,92E+04	3,14E+04	4,00E+04	5,25E+04
5	Procyanidin dimer B-type isomer 1	C30H26O12	577,1331	5,74	57,1	91,9	105.0365 (28.88%); 407.0757 (100%); 425.0849 (20.68%)	-3,58	97,75	9,73E+04	9,06E+04	9,68E+04	9,82E+04	9,72E+04	9,39E+04	9,82E+04
6	(-)-Epicatechin	C15H14O6	289,0711	5,96	46,4	36,5	83.0128 (3.21%); 95.0493 (3.49%); 97.0286 (6.56%); 105.0337 (1.08%); 109.0286 (19.97%); 125.0236 (100%); 135.0441 (13.19%); 139.0388 (5.53%); 147.0435 (1.53%); 151.0390 (15.18%); 153.0544 (1.87%); 167.0340 (13.67%); 175.0390 (2.39%); 179.0341 (21.42%); 181.0491 (2.01%); 189.0527 (1.42%); 205.0496 (7.36%); 217.0494 (1.50%); 247.0600 (1.30%); 263.0549 (1.01%)	-2,43	98,49	2,65E+06	2,74E+06	2,58E+06	2,45E+06	2,43E+06	2,42E+06	2,53E+06

7	Genistein 7-O-glucuronide	C21H18O11	445,0770	5,98	46,3	38,8	87.0078 (15.89%); 93.0336 (41.18%); 117.0176 (15.79%); 215.0339 (3.95%); 219.0286 (5.59%); 221.0444 (5.18%); 253.0486 (3.83%); 269.0446 (14.66%); 293.0445 (19.75%); 295.0576 (3.25%); 297.0388 (5.50%); 299.0544 (4.42%); 309.0390 (3.15%); 315.0503 (4.03%); 323.0545 (4.43%); 327.0501 (7.36%); 359.0397 (3.95%); 391.0694 (5.44%); 413.0861 (4.39%)	-1,39	94,31	8,71E+03	7,31E+03	7,89E+03	6,10E+03	6,75E+03	5,48E+03	
8	Quercetin 3-O-glucuronide	C21H18O13	477,0677	5,98	40,2	14,2	87.0078 (13.81%); 117.0176 (13.72%); 243.0288 (9.32%); 297.0388 (4.78%); 315.0503 (3.51%); 343.0698 (4.00%); 359.0397 (3.43%); 391.0694 (4.73%)	0,52	87,65	1,04E+04	1,06E+04	9,61E+03	8,55E+03	1,05E+04	5,97E+03	6,49E+03
9	Procyanidin trimer C-type isomer 1	C45H38O18	865,1956	5,98	41,7	18,5	149.0598 (11.12%); 233.0442 (3.35%); 257.0440 (6.42%); 269.0446 (14.66%); 311.0549 (27.35%); 323.0545 (4.43%); 341.0649 (11.02%); 395.0754 (2.18%); 413.0861 (4.39%)	-3,43	93,84	4,16E+04	3,45E+04	3,88E+04	3,12E+04	2,89E+04	2,72E+04	
10	6"-O-Malonyl glycitin	C25H24O13	531,1135	6,16	47,7	42,6	317.0648 (2.40%); 329.0898 (100%)	-1,68	98,02	6,38E+04	6,25E+04	7,15E+04	7,33E+04	7,45E+04	7,99E+04	7,74E+04
11	(+)-Gallicat echin	C15H14O7	305,0688	6,39	37,2	0,0	0	6,83	93,76	7,87E+04	8,63E+04	9,21E+04	9,41E+04	9,82E+04	9,77E+04	9,60E+04
12	Procyanidin dimer B-type isomer 2	C30H26O12	577,1339	6,42	47,8	46,2	343.0793 (3.37%); 425.0854 (100%); 451.1000 (13.20%)	-2,12	95,32	5,35E+05	5,28E+05	5,30E+05	5,42E+05	5,34E+05	5,32E+05	5,64E+05
13	Eriocitrin	C27H32O15	595,1649	6,44	43,4	22,6	235.0245 (3.70%); 343.0793 (6.78%); 385.0912 (86.70%); 415.1019 (13.46%)	-3,30	98,13	7,34E+04	7,51E+04	7,43E+04	7,45E+04	7,34E+04	7,35E+04	8,04E+04
14	Luteolin 7-O-glucuronide	C21H18O12	461,0707	6,71	44,9	39,1	151.0390 (69.47%); 177.0183 (100%); 195.0288 (25.80%); 215.0338 (3.18%); 231.0289 (3.55%); 245.0452 (21.77%); 257.0442 (9.95%); 261.0394 (12.94%); 303.0498 (70.65%); 417.0777 (1.26%)	-4,09	90,00	1,82E+04	1,83E+04	2,00E+04	2,00E+04	1,97E+04	1,87E+04	1,85E+04
15	Gardenin B	C19H18O7	357,0955	6,73	37,1	4,8	107.0492 (98.85%); 273.0752 (5.49%)	-6,80	88,18	8,94E+03	8,41E+03	1,04E+04	1,05E+04	9,54E+03	8,55E+03	1,00E+04

16	Procyani din trimer C-type isomer 2	C45H38O18	865,1982	6,74	38,8	0,0	0	-0,44	94,65	3,01E+04	2,60E+04	2,31E+04	2,89E+04	2,09E+04	1,84E+04	1,84E+04
17	Neorio citrin	C27H32O15	595,1663	6,82	48,8	49,4	153.0530 (0.61%); 313.0917 (32.47%); 433.1332 (1.92%); 475.1217 (1.57%)	-0,90	95,77	5,57E+04	5,02E+04	4,16E+04	3,81E+04	3,22E+04	2,28E+04	1,19E+04
18	(-) Epigallo catechin	C15H14O7	305,0657	6,85	45,2	30,2	87.0078 (9.13%); 167.0340 (100%); 179.0339 (37.72%)	-3,35	99,63	6,90E+05	7,40E+05	7,56E+05	7,74E+05	8,00E+05	8,09E+05	8,79E+05
19	(+)- Catechi n	C15H14O6	289,0710	6,92	46,6	37,6	83.0128 (1.02%); 95.0492 (1.02%); 97.0286 (2.72%); 109.0286 (7.78%); 123.0442 (6.11%); 137.0235 (28.29%); 151.0390 (5.03%); 163.0391 (48.98%)	-2,72	98,72	1,33E+06	1,39E+06	1,45E+06	1,47E+06	1,49E+06	1,53E+06	1,62E+06
20	Eriodict yol 7-O- glucosid e isomer 1	C21H22O11	449,1074	6,96	47,8	46,5	259.0600 (6.23%); 363.0742 (50.30%); 383.0761 (4.26%)	-3,42	96,46	4,15E+04	4,05E+04	3,93E+04	3,74E+04	3,49E+04	3,34E+04	3,90E+04
21	Baicalei n	C15H10O5	269,0442	7,03	48,2	57,1	125.0237 (20.80%); 165.0183 (1.35%); 169.0136 (100%)	-4,83	89,55	1,55E+04	1,50E+04	1,29E+04	1,40E+04	1,18E+04	1,14E+04	1,44E+04
22	(-) Epigallo catechin 3-O- gallate	C22H18O11	457,0771	7,03	53,2	69,5	125.0237 (20.80%); 165.0183 (1.35%); 169.0136 (100%); 179.0340 (1.05%); 269.0445 (1.06%); 287.0549 (2.67%); 305.0658 (6.77%); 331.0449 (1.83%)	-1,13	98,06	7,31E+06	7,30E+06	6,90E+06	6,87E+06	6,84E+06	6,91E+06	7,51E+06
23	Eriodict yol 7-O- glucosid e isomer 2	C21H22O11	449,1075	7,11	49,9	62,3	229.0493 (11.88%); 247.0602 (6.98%); 315.0499 (40.17%); 333.0603 (100%)	-3,14	91,03	3,25E+04	2,36E+04	2,08E+04	1,89E+04	1,59E+04	1,08E+04	7,12E+03
24	(+)- Catechin gallate	C22H18O10	441,0807	7,16	42,7	34,9	111.0077 (19.62%); 317.0637 (9.81%); 393.0579 (13.04%); 395.0749 (13.85%); 409.0550 (26.91%)	-4,50	84,01	1,82E+04	9,88E+03	5,61E+03				
25	6"-O- Acetylg enistin	C23H22O11	473,1069	7,23	38,1	4,4	91.0180 (37.17%); 105.0336 (22.31%)	-4,29	91,28	1,70E+04	1,54E+04	1,96E+04	2,05E+04	2,18E+04	2,15E+04	1,84E+04
26	Procyani din trimer C-type isomer 3	C45H38O18	865,1975	7,27	37,9	0,1	65.0021 (0.65%)	-1,21	90,81	3,04E+04	2,38E+04	2,44E+04	2,63E+04	2,54E+04	2,24E+04	2,48E+04

27	Eupatorin/Cirsilineol	C18H16O7	343,0813	7,32	50,2	61,1	165.0545 (100%)	-3,06	93,38	1,05E+04	1,50E+04	2,34E+04	2,82E+04	3,53E+04	3,93E+04	4,74E+04
28	Gallocathechin gallate	C22H18O11	457,0769	7,39	46	33,5	125.0236 (25.15%); 169.0135 (100%); 269.0444 (1.05%); 305.0655 (5.41%); 331.0454 (1.25%)	-1,62	98,62	1,57E+06	1,58E+06	1,57E+06	1,60E+06	1,62E+06	1,66E+06	1,69E+06
29	Apigenin 7-O-apiosylglucoside	C26H28O14	563,1392	7,50	53,1	71,1	323.0549 (5.50%); 325.0697 (11.57%); 353.0656 (54.87%); 355.0771 (4.85%); 365.0653 (6.37%); 383.0758 (45.23%); 395.0760 (5.55%); 443.0966 (16.12%); 453.0982 (9.78%); 473.1074 (14.09%); 503.1167 (3.36%)	-2,46	97,41	5,94E+05	5,69E+05	5,62E+05	5,77E+05	5,76E+05	5,83E+05	6,17E+05
30	Kaempferol 3-O-rutinoside isomer 1	C27H30O15	593,1468	7,53	44,9	43,4	339.0500 (16.88%); 359.0737 (16.07%); 423.0708 (77.02%); 429.0805 (8.32%)	-7,46	89,30	1,97E+04	1,66E+04	1,77E+04	2,09E+04	2,09E+04	1,92E+04	2,03E+04
31	Vicenin-2	C27H30O15	625,1389	7,55	44,9	43,5	209.0446 (5.59%); 396.0519 (7.85%)	-7,46	89,30	1,45E+05	1,28E+05	1,42E+05	1,44E+05	1,45E+05	1,41E+05	1,55E+05
32	Naringenin 7-O-glucoside	C21H22O10	433,1127	7,67	48,4	54,3	219.0285 (24.39%); 263.0186 (9.62%)	-2,93	91,34	2,49E+04	2,14E+04	2,45E+04	2,51E+04	2,20E+04	2,37E+04	2,57E+04
33	Myricetin 3-O-glucoside	C21H20O13	479,0823	7,67	49,2	49,4	178.9976 (6.66%); 219.0285 (5.89%); 259.0234 (4.72%); 271.0236 (24.75%); 287.0186 (16.68%); 316.0215 (100%); 437.0718 (2.05%); 447.0888 (2.98%)	-1,74	98,77	1,20E+06	1,19E+06	1,12E+06	1,14E+06	1,11E+06	1,12E+06	1,18E+06
34	Narirutin	C27H32O14	579,1692	7,75	41,4	25,6	129.0181 (11.50%); 147.0440 (100%); 355.0803 (47.39%)	-4,73	87,08	6,15E+03	5,09E+03	5,33E+03	5,33E+03	5,94E+03	5,95E+03	6,57E+03
35	Naringin 4'-O-glucoside	C21H22O10	433,1125	7,80	38,6	5,3	215.0336 (17.33%); 249.0789 (10.37%); 267.0679 (3.89%); 323.0549 (4.39%)	-3,49	91,95	2,50E+04	2,13E+04	2,21E+04	2,15E+04	2,16E+04	2,45E+04	2,25E+04
36	Kaempferol 3-O-rutinoside	C27H30O15	593,1500	7,80	52,4	65,4	215.0336 (17.33%); 381.0602 (17.50%); 409.0555 (29.80%); 413.0865 (100%); 425.0498 (32.96%)	-2,01	98,91	2,61E+05	2,58E+05	2,53E+05	2,59E+05	2,59E+05	2,72E+05	3,00E+05
37	Dihydroquercetin 3-O-rhamnoside	C21H22O11	449,1065	7,84	50,2	62,0	301.0340 (100%); 343.0448 (3.97%); 245.0607 (2.52%); 363.0710 (4.56%)	-5,47	95,44	5,59E+03	5,72E+03		5,00E+03	5,64E+03	5,48E+03	5,36E+03

38	Quercetin 3-O-glucosyl-rhamnosyl-galactoside	C33H40O21	771,1983	7,85	45,8	31,4	236.0914 (1.61%); 301.0340 (26.29%)	-0,78	98,41	1,05E+06	1,01E+06	9,67E+05	9,83E+05	9,59E+05	9,74E+05	1,03E+06
39	6"-O-Malonylgenistin	C24H22O13	517,0978	7,89	43,7	21,8	161.0239 (32.89%); 167.0339 (8.15%); 183.0290 (48.61%); 221.0445 (2.73%); 471.0919 (5.23%)	-1,90	99,20	6,07E+05	5,92E+05	5,64E+05	5,72E+05	5,84E+05	5,74E+05	5,98E+05
40	Luteolin 7-O-glucuronide isomer 1	C21H18O12	461,0711	8,01	45,6	38,2	257.0443 (22.04%); 261.0391 (4.93%); 263.0550 (23.22%); 289.0342 (35.77%); 341.0652 (26.31%); 415.0662 (40.54%); 427.0656 (16.45%)	-3,10	93,22	4,46E+04	3,78E+04	3,81E+04	3,79E+04	3,51E+04	3,74E+04	3,95E+04
41	Unknown compound 5	C27H30O14	577,1550	8,03	47,7	42,2	289.0342 (32.83%); 311.0549 (100%); 323.0547 (13.51%); 353.0652 (8.71%); 395.0749 (2.50%); 457.1114 (4.45%)	-2,24	98,97	3,75E+05	3,78E+05	3,75E+05	3,83E+05	3,98E+05	4,07E+05	4,46E+05
42	Quercetin 3-O-rutinoside	C27H30O16	609,1447	8,09	44,8	32,5	116.0496 (3.11%); 285.0393 (33.92%); 301.0335 (51.52%); 343.0450 (1.61%)	-2,34	94,29	7,18E+05	7,28E+05	6,54E+05	6,56E+05	6,42E+05	6,40E+05	6,99E+05
43	Quercetin 3-O-rhamnosyl-rhamnosyl-glucoside	C33H40O20	755,2019	8,09	54,6	80,6	116.0496 (3.11%); 285.0393 (33.92%); 301.0335 (51.52%); 343.0450 (1.61%); 609.1447 (100%)	-2,82	95,46	1,40E+05	1,28E+05	1,22E+05	1,24E+05	1,20E+05	1,18E+05	1,22E+05
44	Naringin	C27H32O14	579,1716	8,11	45,4	31,1	116.0496 (13.53%); 130.0652 (2.59%); 236.0916 (27.55%); 281.0444 (20.62%); 386.0982 (2.79%)	-0,56	96,67	4,99E+04	5,21E+04	5,31E+04	5,46E+04	5,26E+04	5,32E+04	4,95E+04
45	Apigenin 6-C-glucoside	C21H20O10	431,0971	8,14	42,8	25,5	116.0496 (13.53%); 281.0444 (20.62%); 283.0598 (66.75%); 386.0982 (2.79%)	-2,98	92,03	2,56E+05	2,59E+05	2,49E+05	2,49E+05	2,49E+05	2,54E+05	2,81E+05
46	Naringenin	C15H12O5	271,0600	8,21	47,5	47,4	109.0285 (2.56%); 123.0441 (1.16%); 125.0235 (39.92%); 137.0235 (4.64%); 151.0390 (2.65%); 167.0339 (2.88%); 205.0495 (2.46%); 245.0811 (4.65%); 254.0493 (1.26%); 259.0600 (1.27%)	-4,50	95,18	4,16E+04	3,92E+04	3,36E+04	3,41E+04	3,42E+04	2,97E+04	3,70E+04

47	Catechin 5-O-gallate	C22H18O10	441,0820	8,21	52	64,2	109.0285 (2.56%); 123.0441 (1.16%); 125.0235 (39.92%); 137.0235 (4.64%); 151.0390 (2.65%); 167.0339 (2.88%); 169.0135 (100%); 193.0132 (4.73%); 205.0495 (2.46%); 253.0493 (1.26%); 259.0600 (1.27%); 271.0599 (4.69%); 289.0709 (34.92%); 303.0493 (2.80%); 331.0448 (2.36%)	-1,68	98,05	5,64E+06	5,79E+06	5,28E+06	5,29E+06	5,32E+06	5,32E+06	5,63E+06
48	Quercetin 3-O-rhamnosyl-rhamnosyl-glucoside isomer 1	C33H40O20	755,2029	8,28	57	88,2	115.0387 (1.85%); 243.0287 (4.68%); 255.0288 (28.13%); 271.0236 (33.53%); 285.0394 (91.96%); 300.0264 (75.61%); 327.0498 (3.50%); 391.0694 (100%); 363.0866 (50.30%); 489.1024 (12.99%); 739.2057 (1.40%)	-1,48	98,39	5,44E+05	5,25E+05	4,94E+05	4,92E+05	4,87E+05	5,00E+05	5,30E+05
49	Quercetin 3-O-glucoside	C21H20O12	463,0868	8,30	49,9	54,0	178.9975 (5.92%); 243.0287 (4.68%); 255.0288 (28.13%); 271.0236 (33.53%); 300.0264 (75.61%); 391.0694 (100%); 363.0866 (50.30%)	-3,04	99,03	6,11E+05	6,14E+05	5,71E+05	5,66E+05	5,69E+05	5,58E+05	5,74E+05
50	Apigenin 7-O-apiosyl-glucoside isomer 1	C26H28O14	563,1373	8,33	48,2	60,4	161.0234 (86.68%); 439.0659 (26.92%)	-5,93	87,48	9,95E+03	6,64E+03	8,53E+03	9,16E+03	8,98E+03	8,53E+03	8,41E+03
51	Isorhamnetin 3-O-glucoside	C22H22O12	477,1050	8,43	38,6	3,8	317.0283 (5.62%)	2,41	92,20	1,31E+04	1,09E+04	1,13E+04	1,25E+04	1,11E+04	1,16E+04	9,82E+03
52	4'-O-Methylpivallocatechin	C16H16O7	319,0811	8,46	48,2	48,8	193.0500 (46.59%); 215.0335 (31.49%); 301.0709 (41.03%)	-3,73	96,53	1,21E+05	1,19E+05	1,17E+05	1,22E+05	1,22E+05	1,21E+05	1,23E+05
53	Trihydroxyflavone isomer 1	C15H10O5	269,0479	8,48	39,5	16,9	117.0336 (100%)	8,70	90,37			5,71E+03	6,12E+03	6,90E+03	6,41E+03	5,92E+03
54	Luteolin 7-O-rutinoside	C27H30O15	593,1499	8,55	48,9	50,4	257.0439 (7.05%); 285.0390 (100%); 289.0336 (5.02%); 341.0644 (5.60%); 383.0756 (4.62%); 427.0660 (12.90%); 497.1318 (13.80%); 505.0985 (1.00%)	-2,15	96,48	5,04E+05	4,70E+05	4,27E+05	4,30E+05	4,21E+05	4,24E+05	4,56E+05

55	Pelargonidin 3,5-O-diglucoside	C27H31ClO15	629,1252	8,55	37,6	0,0	0	-4,19	92,98	1,09E+05	9,84E+04	8,73E+04	7,98E+04	7,04E+04	7,12E+04	8,48E+04
56	Phloridzin	C21H24O10	435,1280	8,59	42,1	22,1	147.0439 (13.90%); 285.0770 (3.63%); 315.0861 (24.94%); 357.0943 (1.72%)	-3,76	92,65	1,30E+04	1,12E+04	1,19E+04	1,18E+04	1,15E+04	1,20E+04	1,14E+04
57	Quercetin 3-O-xyloside / Quercetin 3-O-arabinoside	C20H18O11	433,0764	8,60	52,3	73,5	227.0337 (46.49%); 255.0287 (39.09%); 300.0258 (24.22%); 327.0499 (10.50%)	-2,74	91,29	7,31E+04	6,74E+04	6,81E+04	7,11E+04	6,99E+04	6,49E+04	6,95E+04
58	Luteolin 7-O-glucoside	C21H20O11	447,0924	8,60	54,5	76,1	179.03398 (100%); 227.0337 (46.49%); 255.0287 (39.09%); 300.0258 (24.22%); 327.0499 (10.50%); 433.0764 (10.04%)	-1,89	98,47	2,49E+05	2,46E+05	2,35E+05	2,39E+05	2,41E+05	2,42E+05	2,48E+05
59	Isorhamnetin	C16H12O7	315,0500	8,64	38,7	5,2	115.0182 (3.48%); 202.9975 (9.55%)	-3,12	92,23	5,66E+03	5,32E+03	5,62E+03	6,22E+03	6,38E+03	7,54E+03	6,35E+03
60	Isorhoifolin	C27H30O14	577,1524	8,64	49,7	64,0	115.0182 (3.48%); 415.1015 (14.28%); 465.1022 (47.29%)	-6,65	92,11	1,05E+04	9,86E+03	1,02E+04	9,99E+03	9,54E+03	8,76E+03	1,07E+04
61	Isorhamnetin 3-O-galactoside	C22H22O12	477,1013	8,75	50,4	66,7	257.0426 (9.69%); 285.0385 (91.10%)	-5,36	91,60	9,31E+03	8,94E+03	8,86E+03	9,39E+03	9,36E+03	8,66E+03	9,53E+03
62	Rhoifolin	C27H30O14	577,1505	8,77	49,1	66,9	211.0387 (6.56%); 227.0339 (47.35%); 323.0565 (2.91%); 413.0871 (1.14%); 447.0922 (100%)	-9,96	89,59	8,05E+03	7,22E+03	7,28E+03	6,66E+03	7,81E+03	7,49E+03	7,06E+03
63	Kaempferol 3-O-glucoside	C21H20O11	447,0924	8,78	54,5	77,5	211.0387 (6.56%); 227.0339 (47.35%); 255.0288 (96.28%); 257.0426 (9.69%); 285.0385 (91.10%); 329.0649 (4.16%); 413.0871 (1.14%)	-2,04	97,59	6,11E+05	6,36E+05	5,86E+05	5,93E+05	5,89E+05	5,93E+05	6,10E+05
64	Butin	C15H12O5	271,0605	8,89	45,9	42,1	135.0078 (2.70%); 151.0390 (61.76%); 205.0492 (11.13%); 245.0808 (29.91%); 247.0599 (2.93%)	-2,55	90,22	9,56E+03	8,76E+03	8,44E+03	7,18E+03	7,55E+03	7,76E+03	
65	6"-O-Malonyl daidzin	C24H22O12	501,1030	8,89	44,5	27,6	205.0492 (4.09%); 455.0970 (8.71%)	-1,78	97,15	3,57E+05	3,71E+05	3,12E+05	3,15E+05	3,18E+05	3,09E+05	3,21E+05

66	Dihydroquercetin	C15H12O7	303,0499	8,91	47,4	42,9	123.0442 (21.43%); 135.0078 (4.37%); 139.0389 (31.66%); 151.0027 (100%); 165.0182 (32.70%); 247.0599 (4.75%)	-3,82	98,84	2,97E+04	3,82E+04	5,48E+04	6,73E+04	7,57E+04	9,33E+04	1,13E+05
67	Pinocebrin	C15H12O4	255,0651	8,94	48,3	54,2	105.0335 (3.86%); 107.0492 (10.02%); 166.0252 (31.59%); 185.0245 (2.31%); 195.0471 (5.00%); 211.0454 (75.63%); 214.0610 (7.63%); 215.0338 (12.36%); 215.0691 (6.08%); 229.0859 (76.93%); 231.0650 (26.06%); 241.0485 (28.76%); 243.0649 (18.41%)	-4,50	92,59	1,57E+04	1,31E+04	1,23E+04	1,39E+04	1,32E+04	1,19E+04	1,26E+04
68	Nepetin	C16H12O7	315,0494	8,94	41,3	17,1	97.0286 (11.86%); 166.0252 (3.75%); 181.0130 (2.45%); 215.0338 (1.47%); 241.0485 (3.41%); 297.0393 (4.66%); 301.0705 (2.34%)	-5,11	95,32	5,18E+03						
69	Luteolin 7-O-malonyl-glucoside	C24H22O14	533,0928	9,12	50,8	68,6	115.0390 (6.62%); 341.0649 (12.31%); 405.0846 (100%); 417.0813 (1.84%); 489.1013 (5.70%)	-1,57	87,35	5,23E+04	5,27E+04	4,54E+04	4,68E+04	4,93E+04	4,45E+04	4,54E+04
70	Myricetin	C15H10O8	317,0290	9,23	54,8	79,4	83.0128 (100%)	-4,05	99,31	2,57E+05	2,80E+05	2,83E+05	2,95E+05	3,14E+05	3,37E+05	3,79E+05
71	Diosmin	C28H32O15	607,1621	9,28	39,8	18,2	199.0389 (1.03%); 227.0338 (9.85%); 264.0865 (1.65%)	-7,76	89,38	7,11E+03	8,46E+03	8,28E+03	8,88E+03	8,62E+03	1,01E+04	8,19E+03
72	Morin	C15H10O7	301,0343	9,39	45,5	31,6	107.0128 (9.01%); 149.0235 (36.89%); 151.0026 (16.05%)	-3,41	99,67	5,79E+05	6,27E+05	5,81E+05	5,84E+05	6,07E+05	6,10E+05	6,33E+05
73	Apigenin 7-O-glucoside	C21H24O9	419,1328	9,46	42,2	25,6	121.0286 (19.04%); 145.0499 (3.73%); 153.0183 (100%); 269.0806 (3.52%)	-4,56	90,77	7,10E+03	5,97E+03	7,72E+03	7,63E+03	7,44E+03	7,95E+03	7,21E+03
74	Theaflavin	C29H24O12	563,1183	9,87	43,9	24,7	122.0359 (6.89%); 229.0492 (6.34%); 257.0444 (11.87%); 281.0445 (4.33%); 317.0659 (38.71%); 379.0816 (4.86%); 397.0933 (1.37%); 407.0756 (3.21%); 425.0853 (4.50%)	-2,05	97,39	1,32E+05	1,24E+05	1,19E+05	1,12E+05	1,14E+05	1,09E+05	1,13E+05
75	Eriodictyol	C15H12O6	287,0547	10,03	56,7	95,3	135.0441 (97.28%); 151.0026 (100%)	-4,81	93,82	2,43E+04	2,59E+04	3,07E+04	3,41E+04	3,81E+04	4,45E+04	4,89E+04
76	Theaflavin 3-O-gallate	C36H28O16	715,1285	10,09	49,1	52,0	281.0444 (58.03%); 563.1166 (100%); 577.0967 (16.35%)	-2,70	96,74	2,31E+05	2,29E+05	2,00E+05	1,96E+05	1,96E+05	1,85E+05	1,87E+05

77	Theaflavin 3,3'-O-digallate	C43H32O20	867,1402	10,16	51	58,7	285.0391 (100%); 593.1286 (39.15%); 697.1171 (6.30%)	-1,43	98,24	3,04E+05	3,07E+05	2,41E+05	2,42E+05	2,43E+05	2,17E+05	2,25E+05
78	Scutellarin	C15H10O6	285,0393	10,20	56,5	88,7	83.0128 (8.49%); 121.0285 (23.86%); 133.0286 (19.14%); 151.0027 (100%); 178.9976 (29.06%); 241.0493 (9.83%)	-4,04	98,36	1,16E+05	1,39E+05	1,50E+05	1,68E+05	1,79E+05	1,90E+05	2,19E+05
79	Quercetin	C15H10O7	301,0343	10,23	55,8	83,7	65.0020 (1.73%); 83.0128 (8.49%); 121.0285 (23.86%); 151.0027 (100%); 178.9976 (29.06%)	-3,65	99,68	4,09E+05	4,75E+05	5,02E+05	5,48E+05	5,90E+05	6,52E+05	7,45E+05
80	Dihydrodaidzein isomer 1	C15H12O5	271,0599	10,59	44	36,2	147.0442 (100%)	-4,62	89,22			5,16E+03	6,51E+03	7,48E+03	8,38E+03	1,01E+04
81	Dihydrodaidzein isomer 2	C15H12O5	271,0599	10,89	55,9	88,0	151.0026 (100%)	-4,69	96,85	7,65E+04	9,10E+04	9,46E+04	1,06E+05	1,21E+05	1,34E+05	1,53E+05
82	Jaceosidin	C17H14O7	329,0653	11,07	51,9	66,6	159.0437 (3.02%); 211.0388 (1.77%); 227.0337 (3.22%); 239.0339 (1.84%); 285.0394 (100%); 314.0415 (2.41%); 329.0651 (3.48%)	-4,08	97,54	4,55E+04	5,55E+04	5,20E+04	5,34E+04	5,82E+04	5,92E+04	6,33E+04
83	Kaempferol	C15H10O6	285,0395	11,08	50	54,9	108.0203 (1.75%); 211.0388 (1.77%); 227.0337 (3.22%); 239.0339 (1.84%); 271.0236 (4.10%)	-3,51	99,51	3,09E+05	3,66E+05	3,67E+05	4,04E+05	4,59E+05	5,07E+05	5,67E+05
84	Unknown compound 4	C16H12O6	299,0546	11,13	36,9	0,0	0	-4,96	90,40				5,35E+03	6,10E+03	6,12E+03	7,67E+03
85	Phloretin	C15H14O5	273,0757	11,16	55,6	83,5	78.0101 (9.44%); 173.0233 (100%)	-4,32	99,61	1,61E+05	1,78E+05	1,71E+05	1,80E+05	1,97E+05	2,00E+05	1,80E+05
86	O-Desmethylnangolensin	C15H14O4	257,0808	11,48	37,1	0,0	0	-4,44	90,58	1,00E+04	1,01E+04	1,28E+04	1,34E+04	1,46E+04	1,46E+04	1,22E+04
PHENOLIC ACIDS																
87	Verbascoside	C29H36O15	623,2005	0,65	53,7	89,8	475.1293 (13.44%); 515.1599 (9.52%); 533.1711 (15.41%)	3,79	83,09							8,14E+03
88	3,4-Dicaffeoylquinic acid	C25H24O12	515,1176	0,71	44,7	33,5	59.1126 (12.82%); 71.0128 (76.03%); 87.0078 (14.85%); 89.0236 (100%); 95.0129 (5.79%); 119.0341 (43.60%); 131.0341 (17.77%)	-3,74	94,21	2,07E+04	2,01E+04	1,76E+04	1,83E+04	1,90E+04	2,09E+04	3,09E+04
89	3-O-Methylgallic acid	C8H8O5	183,0288	1,80	50,8	65,1	115.0990 (100%); 122.0361 (60.15%)	-5,71	95,30	1,52E+04	1,73E+04	1,30E+04	1,22E+04	1,23E+04	1,37E+04	1,41E+04

90	Gallic acid	C7H6O5	169,0136	1,85	52,9	70,5	69.0335 (2.17%); 79.0179 (3.10%); 97.0285 (3.70%)	-3,66	98,20	1,54E+07	1,80E+07	1,78E+07	1,81E+07	1,88E+07	2,10E+07	2,09E+07
91	5-O-Galloylquinic acid	C14H16O10	343,0664	2,17	55,8	82,7	85.0285 (4.91%); 127.0392 (2.11%); 191.0555 (100%)	-1,89	98,35	7,83E+06	8,50E+06	8,09E+06	7,90E+06	7,98E+06	8,89E+06	9,24E+06
92	4-O-Methylgallic acid	C8H8O5	183,0289	2,48	55,9	90,7	149.9948 (100%)	-5,43	95,15	4,28E+04	4,93E+04	4,37E+04	4,08E+04	4,35E+04	4,60E+04	5,05E+04
93	Dihydroxybenzoic acid isomer 1	C7H6O4	153,0185	3,49	40,3	8,5	78.0098 (37.38%)	-5,59	99,55	4,66E+05	5,79E+05	6,00E+05	6,01E+05	6,36E+05	6,89E+05	6,80E+05
94	2-Hydroxyphenylacetic acid	C8H8O3	151,0391	4,28	54,1	79,6	107.0130 (100%)	-6,49	98,36	5,56E+04	7,04E+04	7,65E+04	8,16E+04	8,21E+04	8,85E+04	8,49E+04
95	Hydroxyphenylacetic acid isomer 1	C8H8O3	151,0390	4,75	37,6	0,0	0	-6,83	95,61	5,32E+03		6,37E+03	7,72E+03	9,16E+03	1,13E+04	1,08E+04
96	3-Caffeoylquinic acid	C16H18O9	353,0864	5,50	57,2	92,0	155.0340 (2.66%); 163.0393 (100%); 337.0919 (12.62%)	-3,97	98,56	1,49E+05	1,39E+05	1,25E+05	1,20E+05	9,04E+04	1,46E+05	1,24E+05
97	p-Coumaroylquinic acid isomer 1	C16H18O8	337,0920	5,52	58,2	95,9	119.0493 (100%)	-2,53	98,00	3,50E+06	3,71E+06	3,76E+06	3,71E+06	3,74E+06	3,94E+06	3,95E+06
98	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 1	C15H18O8	325,0917	5,84	38	0,0	0	-3,61	94,24	1,75E+04	1,68E+04	1,78E+04	1,86E+04	1,87E+04	2,00E+04	1,79E+04
99	Chicoric acid	C22H18O12	473,0713	5,84	51,4	66,5	427.0656 (35.71%)	-2,70	93,71	4,72E+04	4,43E+04	5,54E+04	5,70E+04	5,88E+04	5,30E+04	5,39E+04

100	Homovanillic acid	C9H10O4	181,0494	5,94	48,2	49,8	81.0135 (3.42%); 83.0128 (3.21%); 93.0336 (9.27%); 97.0286 (6.56%); 109.0286 (27.35%); 111.0441 (4.52%); 119.0493 (10.37%); 123.0442 (19.97%); 125.0236 (100%); 135.0441 (13.19%); 139.0388 (5.53%); 151.0390 (15.18%); 167.0340 (13.67%)	-6,63	98,72	2,47E+04	3,38E+04	4,50E+04	4,45E+04	4,52E+04	4,43E+04	4,58E+04
101	Ethyl gallate	C9H10O5	197,0444	5,94	44,8	31,8	85.0285 (3.73%); 109.0286 (13.85%); 123.0442 (10.11%); 125.0236 (50.64%); 139.0388 (2.80%); 151.0390 (7.69%); 167.0340 (6.92%); 179.0341 (10.85%)	-5,76	98,90	6,57E+04	7,25E+04	6,23E+04	6,34E+04	6,02E+04	5,74E+04	6,19E+04
102	5-Caffeoylquinic acid	C16H18O9	353,0867	5,94	47,7	43,9	109.0286 (13.85%); 123.0442 (10.11%); 191.0553 (100%)	-3,00	98,21	1,48E+06	1,49E+06	1,29E+06	1,22E+06	1,22E+06	1,18E+06	1,16E+06
103	Vanillic acid	C8H8O4	167,0340	5,96	49	58,8	109.0286 (27.35%); 123.0442 (19.97%); 125.0236 (100%); 135.0441 (13.19%); 151.0390 (15.18%)	-5,98	92,90	8,72E+03	8,48E+03	8,30E+03	7,33E+03	7,67E+03	6,66E+03	6,43E+03
104	m-Coumaric acid	C9H8O3	163,0391	6,00	43,7	27,8	107.0492 (14.32%); 117.0336 (15.50%); 149.0598 (11.12%)	-5,66	97,04	6,10E+04	8,28E+04	1,36E+05	1,38E+05	1,38E+05	1,19E+05	8,13E+04
105	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 2	C15H18O8	325,0915	6,00	39,5	4,2	117.0336 (15.50%); 117.0545 (13.37%)	-4,14	98,28	6,49E+04	6,72E+04	5,52E+04	5,06E+04	4,79E+04	4,43E+04	4,65E+04
106	Gallic acid 3-O-gallate	C14H10O9	321,0243	6,02	40,9	9,7	273.0027 (6.11%)	-2,90	98,41	3,10E+05	3,32E+05	3,04E+05	2,83E+05	2,85E+05	2,85E+05	3,32E+05
107	Gentisic acid	C7H6O4	153,0186	6,08	48,5	48,6	91.0179 (100%)	-4,75	99,40	2,05E+06	2,38E+06	2,56E+06	2,61E+06	2,77E+06	2,95E+06	2,90E+06
108	4-Caffeoylquinic acid	C16H18O9	353,0868	6,14	57,3	92,9	135.0441 (45.08%); 173.0446 (100%); 179.0341 (37.09%); 329.0898 (6.66%)	-2,73	96,87	7,42E+05	7,65E+05	8,06E+05	8,02E+05	8,39E+05	8,45E+05	8,31E+05
109	p-Coumaric acid 4-O-glucoside	C15H18O8	325,0915	6,24	40,7	17,1	233.0437 (27.31%)	-4,14	91,13	1,31E+04	1,10E+04	1,59E+04	1,37E+04	1,32E+04	1,19E+04	1,15E+04

	e isomer 3															
110	Caffeic acid	C9H8O4	179,0341	6,32	38,6	0,0	0	-5,03	98,76	2,60E+05	2,95E+05	2,67E+05	2,44E+05	2,40E+05	2,23E+05	2,17E+05
111	p-Coumaroylquinic acid isomer 2	C16H18O8	337,0921	6,51	47,7	43,5	93.0337 (12.44%); 119.0492 (18.05%); 163.0391 (18.46%); 173.0448 (100%)	-2,45	98,13	2,33E+06	2,41E+06	2,40E+06	2,37E+06	2,32E+06	2,39E+06	2,50E+06
112	Syringic acid	C9H10O5	197,0446	6,58	39,4	7,6	153.0541 (9.88%)	-4,71	94,93	9,81E+03	9,62E+03	1,25E+04	1,25E+04	1,32E+04	1,26E+04	1,29E+04
113	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 4	C15H18O8	325,0922	6,62	44,7	33,0	193.0515 (11.59%); 207.0652 (10.03%); 217.0494 (13.99%); 235.0601 (8.87%); 245.0452 (22.05%); 259.0597 (18.15%)	-2,10	92,94	1,95E+04	1,86E+04	1,95E+04	1,88E+04	2,16E+04	1,84E+04	1,75E+04
114	Dihydrocaffeic acid	C9H10O4	181,0498	6,64	45,6	37,6	157.0496 (16.00%)	-4,46	95,56	1,28E+04	1,36E+04	1,54E+04	1,57E+04	1,75E+04	1,45E+04	1,32E+04
115	4-Hydroxymandelic acid	C8H8O4	167,0340	6,87	42,4	26,0	87.0078 (100%)	-6,07	92,97	1,07E+04	1,08E+04	1,18E+04	1,26E+04	1,37E+04	1,22E+04	1,30E+04
116	o-Coumaric acid	C9H8O3	163,0391	6,92	51	63,2	93.0337 (65.81%); 109.0286 (27.52%); 119.0493 (42.25%); 123.0445 (21.59%); 137.0235 (100%); 151.0390 (17.78%)	-6,06	98,85	4,49E+04	5,02E+04	5,01E+04	5,31E+04	5,78E+04	5,62E+04	5,52E+04
117	p-Coumaroylquinic acid isomer 3	C16H18O8	337,0922	6,92	52	73,2	93.0337 (18.62%); 119.0493 (11.95%); 163.0391 (48.98%); 173.0449 (100%)	-1,99	89,02	5,09E+06	5,26E+06	5,16E+06	5,21E+06	5,40E+06	5,46E+06	5,68E+06
118	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 5	C15H18O8	325,0922	7,00	38,2	0,0	0	-2,13	93,42	5,65E+03	6,21E+03	5,53E+03	5,05E+03			
119	Dihydroxybenzoic acid isomer 2	C7H6O4	153,0185	7,11	56,4	88,8	119.0128 (100%)	-5,14	99,37	1,09E+06	1,24E+06	1,16E+06	1,19E+06	1,21E+06	1,24E+06	1,32E+06

120	3-Feruloylquinic acid	C17H20O9	367,1023	7,28	58,3	96,0	115.0391 (1.97%); 155.0340 (14.33%); 193.0497 (100%);	-3,07	98,85	2,11E+05	2,07E+05	2,07E+05	2,04E+05	2,10E+05	1,99E+05	2,01E+05
121	Phenacetylglycine	C10H11NO3	192,0654	7,32	38,1	0,0	0	-6,45	97,97	3,54E+04	3,71E+04	3,98E+04	4,06E+04	4,18E+04	4,26E+04	3,82E+04
122	Cinnamic acid	C9H8O2	147,0441	7,34	43,7	36,0	101.0388 (2.59%); 103.0545 (2.23%)	-6,85	90,29					5,12E+03	7,17E+03	7,80E+03
123	3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid	C10H12O5	211,0601	7,34	50,8	66,8	72.9918 (5.74%); 147.0441 (100%); 165.0545 (60.60%)	-5,06	93,07		6,03E+03	1,66E+04	2,29E+04	2,97E+04	4,04E+04	5,23E+04
124	Feruloyl tartaric acid	C14H14O9	325,0543	7,34	38,5	8,3	72.9918 (5.74%); 147.0441 (100%)	-6,80	92,00	9,91E+03	1,08E+04	9,20E+03	8,89E+03	8,63E+03	8,52E+03	9,83E+03
125	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 6	C15H18O8	325,0912	7,34	41,8	22,0	147.0441 (100%); 217.0494 (18.68%)	-5,21	93,20	6,21E+03	5,68E+03	6,04E+03	5,09E+03			
126	Danshen su	C9H10O5	197,0445	7,40	56	88,1	78.0100 (4.52%); 79.0176 (8.96%); 107.0129 (68.93%); 143.0341 (100%)	-5,10	97,92	5,50E+04	8,00E+04	1,01E+05	1,16E+05	1,44E+05	1,92E+05	2,91E+05
127	p-Coumaroylquinic acid isomer 4	C16H18O8	337,0919	7,44	49,8	53,2	191.0552 (100%); 337.0916 (15.38%)	-2,89	99,15	1,09E+06	1,13E+06	1,10E+06	1,11E+06	1,09E+06	1,13E+06	1,18E+06
128	Dicaffeoylquinic acid isomer 2	C25H24O12	515,1167	7,44	39,6	19,3	85.0285 (4.67%); 87.0078 (1.86%); 333.0601 (2.06%); 337.0916 (15.38%)	-5,36	84,90	1,13E+04	1,04E+04	1,00E+04	1,12E+04	9,33E+03	8,84E+03	1,11E+04
129	p-coumaric acid	C9H8O3	163,0393	7,53	38,7	0,0	0	-4,51	98,62	3,56E+05	3,28E+05	7,07E+04	3,55E+04	2,33E+04	1,85E+04	1,52E+04
130	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 7	C15H18O8	325,0910	7,78	37,7	4,7	181.0495 (45.32%)	-5,84	90,53	2,11E+04	2,09E+04	2,27E+04	2,41E+04	2,28E+04	2,28E+04	2,08E+04

131	Ferulic acid	C10H10O4	193,0498	8,05	38,8	0,0	0	-4,41	99,12	3,33E+04	3,65E+04	2,25E+04	2,70E+04	2,58E+04	2,04E+04	1,78E+04
132	p-Coumaric acid 4-O-glucoside isomer 8	C15H18O8	325,0915	8,16	38,2	0,0	0	-4,28	95,75	2,63E+04	2,45E+04	2,55E+04	2,63E+04	2,32E+04	2,62E+04	2,53E+04
133	Ellagic acid	C14H6O8	300,9980	8,21	50,2	55,3	226.9975 (11.74%); 245.0080 (100%); 254.9924 (10.92%); 257.0080 (29.62%); 289.9949 (79.64%)	-3,24	99,56	1,09E+06	1,19E+06	1,14E+06	1,16E+06	1,19E+06	1,22E+06	1,25E+06
134	Rosmarinic acid	C18H16O8	359,0789	8,51	40,6	15,8	219.0285 (21.36%); 231.0285 (27.76%)	4,60	92,38						5,23E+03	5,33E+03
135	4-hydroxy benzoic acid	C7H6O3	137,0237	8,69	56,8	91,2	93.0337 (80.93%)	-5,12	98,89	1,84E+06	2,17E+06	2,13E+06	2,21E+06		2,46E+06	2,38E+06
136	Dihydro-p-coumaric acid	C9H10O3	165,0546	8,80	48,8	56,3	147.0440 (68.04%)	-6,82	95,44	1,97E+04	2,32E+04	2,79E+04	3,06E+04		3,32E+04	2,54E+04
137	p-Coumaric acid 4-O-glucoside	C15H18O8	325,0919	8,87	49,1	57,4	133.0497 (10.01%); 205.0492 (4.09%); 279.0864 (3.66%); 289.0707 (100%);	-3,12	92,05	7,00E+03	5,71E+03	7,22E+03	6,83E+03		7,54E+03	6,29E+03
138	Cinnamoyl glucose	C15H18O7	309,0965	9,12	40,6	15,1	115.0390 (11.09%); 147.0439 (17.52%)	-4,74	93,48	4,68E+04	4,74E+04	5,53E+04	5,97E+04		6,80E+04	6,30E+04
139	Hydroxyphenylacetic acid isomer 2	C8H8O3	151,0392	9,70	37,5	0,0	0	-5,71	93,80	1,39E+04	1,68E+04	1,81E+04	1,77E+04		1,98E+04	2,08E+04
OTHER POLYPHENOLS																
140	Pyrogallol	C6H6O3	125,0236	1,85	51,1	62,8	69.0335 (2.17%); 79.0179 (3.10%); 97.0285 (3.70%)	-6,35	99,90	1,14E+06	1,35E+06	1,42E+06	1,42E+06	1,52E+06	1,67E+06	1,63E+06
141	Rosmadiol	C20H24O5	343,1563	2,17	35,5	0,1	191.0555 (100%)	3,50	81,45	1,18E+04	7,53E+03	1,09E+04	9,13E+03	7,47E+03	8,40E+03	
142	Hydroxytyrosol	C8H10O3	153,0549	3,59	38,6	0,0	0	-5,21	98,89				5,26E+03	5,38E+03	6,11E+03	6,56E+03
143	Catechol	C6H6O2	109,0285	4,12	37,2	0,0	0	-9,28	96,20			1,13E+04	1,06E+04	1,18E+04	1,30E+04	1,31E+04

144	Syringaldehyde	C9H10O4	181,0496	4,51	42,5	20,6	127.0390 (75.84%)	-5,66	98,21	2,72E+04	4,35E+04	9,25E+04	1,08E+05	1,27E+05	1,68E+05	1,85E+05
145	p-Anisaldehyde	C8H8O2	135,0441	4,55	46	43,9	107.0492 (100%)	-7,65	94,66	2,36E+04	2,53E+04	2,43E+04	2,56E+04	2,62E+04	2,32E+04	2,59E+04
146	Esculin	C15H16O9	339,0703	5,15	47,3	49,7	177.0183 (100%)	-5,40	92,94	3,78E+04	3,70E+04	3,34E+04		2,82E+04	2,41E+04	2,09E+04
147	Oleoside dimethyl ester	C18H26O11	417,1383	5,92	53,2	76,6	157.0498 (9.05%); 191.0554 (100%); 353.0865 (6.82%)	-4,67	94,80	1,15E+04	1,13E+04	1,17E+04	1,07E+04	1,21E+04	1,16E+04	1,05E+04
148	Umbelliferone	C9H6O3	161,0231	5,96	41,8	19,9	93.0336 (9.27%); 109.0286 (27.35%); 119.0493 (10.37%); 135.0441 (13.19%)	-7,92	98,12	6,25E+03	7,32E+03	5,82E+03	5,77E+03	6,01E+03	5,55E+03	5,27E+03
149	Mellein	C10H10O3	177,0540	6,00	42,2	25,4	117.0336 (15.50%); 133.0649 (5.67%); 149.0598 (11.12%)	-9,39	95,95	6,08E+03	6,27E+03	6,39E+03	6,00E+03	5,56E+03	6,28E+03	6,37E+03
150	Isopimpinellin	C13H10O5	245,0476	6,73	49,5	67,0	193.0515 (100%)	8,35	89,54	1,53E+04	1,54E+04	1,99E+04	2,10E+04	2,18E+04	2,12E+04	2,29E+04
151	Lithospermic acid	C27H22O12	537,1019	7,16	41	23,5	207.0282 (3.44%); 231.0286 (27.48%); 247.0236 (100%); 317.0237 (9.81%); 409.0550 (26.91%)	-3,58	85,90	8,98E+03	6,67E+03	1,05E+04	1,25E+04	1,53E+04	1,25E+04	1,69E+04
152	Esculetin	C9H6O4	177,0186	7,24	41,5	14,1	91.0182 (3.33%)	-4,08	98,13	2,04E+06	2,28E+06	2,33E+06	2,44E+06	2,57E+06	2,65E+06	2,72E+06
153	Oleuropein	C25H32O13	539,1742	7,94	38	7,0	180.0602 (6.53%); 273.0742 (4.11%)	-5,22	89,17	2,37E+04	2,21E+04	2,14E+04	2,10E+04	1,83E+04	2,19E+04	2,26E+04
154	Coumarin	C9H6O2	145,0285	8,21	38,3	5,7	0	-6,88	93,82	5,06E+03				5,41E+03		5,19E+03
155	Scopoletin	C10H8O4	191,0334	9,04	42,4	27,7	145.0285 (28.49%)	-8,39	93,63	5,70E+03	6,34E+03	7,17E+03	7,09E+03	8,54E+03	8,64E+03	8,07E+03
156	4-Ethylcatechol	C8H10O2	137,0596	9,25	53,9	85,6	83.0128 (100%)	-8,51	93,16				5,41E+03	8,12E+03	1,29E+04	
157	Ligstroside	C25H32O12	523,1797	9,39	39,5	7,2	105.0335 (3.77%); 165.0545 (12.34%); 173.0606 (1.46%); 180.0624 (4.34%)	-4,57	95,86	2,02E+04	1,56E+04	1,61E+04	1,69E+04	1,69E+04	1,65E+04	1,53E+04
LIGNANS																
158	Gomisin M2	C22H26O6	385,1620	5,98	35,8	0,0	0	-9,39	89,39	8,67E+04	8,82E+04	6,41E+04	5,41E+04	4,85E+04	4,41E+04	5,83E+04
159	Dimethylmatairesinol	C22H26O6	385,1621	6,23	35,1	0,2	0	-9,14	85,27	3,31E+04	3,04E+04	2,85E+04	2,55E+04	2,81E+04	2,39E+04	2,77E+04
STILBENES																
160	Piceatanol	C14H12O4	243,0653	11,77	54,8	89,3	78.0101 (100%)	-4,19	89,66			6,29E+03	7,78E+03	7,93E+03	9,20E+03	
UNKNOWN COMPOUNDS																

161	Myrtenic acid	C ₉ H ₆ O ₃	161,0231	5,26	37,4	0	0	-8,24	96,08		5,65E+03					
162	Unknown compound 1	C ₁₀ H ₁₁ NO ₅	224,0553	5,82	36,5	0	0	-5,08	88,29	3,42E+04	3,78E+04	3,79E+04	3,60E+04	4,12E+04	3,98E+04	3,57E+04
163	Unknown compound 2	C ₁₁ H ₁₀ O ₆	237,0395	6,57	56,7	93,2	209.0446 (85.74%); 211.0238 (100%)	-4,07	94,82					5,08E+03		
164	Unknown compound 3	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	271,0995	11,07	40,2	16,2	108.0203 (42.62%); 135.0078 (15.80%); 157.0286 (17.56%); 159.0437 (73.70%); 184.0496 (6.99%); 185.0596 (85.00%)	7,07	92,95						5,84E+03	

CAPÍTULO 3

Artigo 2

Alterações na composição físico-química, bioativa e microbiológica durante a vida de prateleira de kombucha de chá preto

Resumo

A kombucha é uma bebida obtida de chá de folhas de *Camellia sinensis*, adoçada e inoculada por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). Avaliou-se as alterações físico-químicas, microbiológicas e teores de fenólicos totais (FT), teaflavinas (TF) e tearubiginas (TR) durante a vida de prateleira da kombucha de chá preto armazenada a 4°C por 180 dias. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Durante a vida de prateleira houve um aumento na acidez total (0,37-0,67%) e acidez volátil (70,19-75,18 meq/L), com consequente redução do pH (3,27-3,10). Além disto, verificou-se redução nas contagens de todos os micro-organismos avaliados (bactérias acéticas, lácticas e leveduras) e que os teores de FT e TF não variaram durante todo o período de armazenamento. O teor de TR reduziu de 2,54 a 2,02% nos primeiros 30 dias, o que sugere que esses compostos fenólicos poliméricos podem ter sido degradados em outros compostos fenólicos menores. As alterações mais relevantes na bebida ocorreram nos primeiros 2 meses de vida de prateleira, devido ao metabolismo dos micro-organismos utilizando os substratos residuais da fase de fermentação. Apesar dessas alterações, a kombucha sempre se manteve dentro dos limites exigidos pela legislação vigente (IN nº41 - MAPA), estando apta para consumo. Com isso, conclui-se que apesar da alteração dos fatores físico-químicos é possível armazenar a kombucha de chá preto por até 180 dias, sob refrigeração. Porém, mais estudos são necessários para a avaliação sensorial da bebida no decorrer da vida de prateleira.

Keywords: Kombucha, Vida de Prateleira, Compostos Fenólicos e MAPA.

1. Introdução

A kombucha é uma bebida produzida a partir de substrato obtido pela infusão ou extrato de folhas de *Camellia sinensis* com sacarose, e da atividade simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY) (Brasil, 2019). O consumo da kombucha vem sendo associado a diversos benefícios à saúde, como redução de inflamação e dos níveis de triglicerídeos, além de potencial antioxidante, antimicrobiano e anticancerígeno (Morales, 2020; Villarreal-Soto *et al.*, 2020; Cardoso *et al.*, 2020).

O consumo e a comercialização da kombucha vêm se intensificando nas últimas décadas, tanto devido ao aumento dos trabalhos sobre suas propriedades bioativas, bem como a adaptação das formulações da bebida fermentada. A melhoria das técnicas de produção, além da combinação com outros sucos e extratos, possibilita a adaptação do perfil sensorial da bebida ao padrão de consumo (Tran *et al.*, 2020). O mercado de kombucha deverá apresentar uma forte taxa de crescimento nos próximos anos, acompanhando a tendência do mercado norte americano que prevê o aumento de 17,5% entre os anos de 2019 e 2024 (Mordor Intelligence, 2019).

A composição química da kombucha é caracterizada pela presença de ácidos orgânicos (principalmente: ácidos acético, glicônico, glicurônico) (Jayabalan *et al.*, 2007; Jakubczyk *et al.*, 2020), compostos fenólicos (principalmente: ácidos fenólicos, teaflavinas (TF), tearubiginas (TR) e catequinas) (Cardoso *et al.*, 2020; Villarreal-Soto, 2019), açúcares (principalmente: sacarose, glicose e frutose), etanol e dióxido de carbono (Coelho *et al.*, 2020). Cardoso *et al.* (2020) identificaram 127 compostos fenólicos presentes em kombuchas de chá preto e chá verde. Deste total, 103 compostos foram relatados pela primeira vez na literatura, sendo a maioria

pertencente a classe dos flavonóides (70,2%) e ácidos fenólicos (18,3%). Os principais compostos fenólicos identificados em kombucha de chá preto foram catequinas, ácido 5-O-galoilquínico, teaflavinas e tearubiginas.

A composição microbiológica da kombucha é variável e depende da composição do SCOBY, tipo de substrato, disponibilidade de oxigênio, tempo de fermentação ou vida de prateleira. Entre os principais micro-organismos encontrados no SCOBY temos as bactérias acéticas (ex.: Acetobacter, Bacterium, Gluconacetobacter, Gluconobacter, Komagataeibacter e Tanticharoenia), bactérias lácticas (ex: Lactobacillus e Lactococcus) e leveduras (ex: Candida, Debaryomyces, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Zygowilliopsis e Zygotorulaspóra) (Morales, 2020).

A composição físico-química e sensorial de bebidas fermentadas por microbiotas complexas pode ser afetada durante a vida de prateleira. De acordo com Altay *et. al.*, (2013) a fermentação de kefir pode continuar durante o armazenamento em baixa temperatura devido a presença de lactose residual, levando a produção de compostos indesejáveis. Bueno *et. al.*, (2020) observaram que apesar de temperatura baixa e armazenamento em frasco âmbar, ocorreram alterações na composição físico-química do kefir, observando aumento no teor de etanol e de ácido acético, levando ao comprometimento das características sensoriais da bebida.

As alterações na composição da kombucha durante a fermentação podem ser afetadas por diversos fatores, como tempo, temperatura, substrato, inóculo, tipo de fermentador e nível de oxigenação (Tran *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2020). Entretanto, não foram encontrados trabalhos avaliando as alterações durante a vida de prateleira da kombucha de chá preto, armazenada sob refrigeração. Com o aumento do

consumo e produção da kombucha, há a necessidade de se estudar variações na composição físico-química, microbiológica e bioativa da bebida durante a vida de prateleira, objetivando a melhoria na padronização e controle de qualidade na indústria. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações físico-químicas, microbiológica, nos teores de fenólicos totais, teaflavinas e tearubiginas durante a vida de prateleira da kombucha de chá preto por 180 dias, armazenada a 4°C, e verificar a compatibilidade da bebida com a legislação brasileira.

2. Materiais e Métodos

2.1 Produção de kombucha

A kombucha foi produzida a partir de folhas de chá preto (*Camellia sinensis*), de acordo com a metodologia utilizada por Cardoso *et al.* (2020). O chá preto (Darjeeling Gielle FTGFOP1 Second Flush) foi adquirido na loja “Tea Shop”, localizada em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. A kombucha foi armazenada em recipientes (fermentadores) de 24cm de altura e 14cm de diâmetro.

2.1.1 Fermentação, vida de prateleira e amostragem

A fermentação da kombucha foi realizada em três bateladas, a 25°C, por 10 dias em uma estufa (BOD). Após a fermentação, as amostras foram acondicionadas em garrafas do tipo PET de 200 mL e armazenadas em temperatura de 4°C em BOD. Durante a vida de prateleira, foram coletadas amostras utilizando uma garrafa para cada ponto experimental, nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias para as análises microbiológicas, determinação de pH e acidez titulável. Outras amostras foram transferidas para microtubos tipo *Eppendorf*, centrifugadas a 10.000rpm por

10min e armazenadas a -18 °C até a realização das demais análises (fenólicos totais, teor de teaflavinas e tearubiginas, acidez volátil e etanol).

2.2 Caracterização da kombucha

2.2.1 Acidez titulável, acidez volátil e pH

A acidez titulável das amostras foi determinada por titulação, utilizando NaOH 0,1 N e fenolftaleína como indicador. O resultado foi expresso como % (m/v) de ácido acético (IAL, 2005). O pH das amostras foi medido com pHmetro, previamente calibrado.

A acidez volátil das amostras foi determinada por titulação, utilizando NaOH 0,1 N e fenolftaleína como indicador, a amostra foi extraída por meio de arraste de vapor utilizando um determinador de acidez volátil TE-0871 da fabricante Tecnal, conforme o método 05 do manual de métodos de análises de bebidas e vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 1986). O resultado foi expresso como miliequivalente de ácido acético por litro de kombucha (meq/L).

2.2.2 Caracterização microbiológica

A contagem de bactérias acéticas, bactérias lácticas e leveduras foi realizada por meio de plaqueamento das amostras após diluições seriadas, conforme metodologia descrita por Cardoso *et. al.* (2020). Para contagem de bactérias acéticas e leveduras, as placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias sob condições aeróbicas. A contagem de bactérias lácticas foi realizada após incubação a 30 °C por 2 dias em microaerofilia. Os resultados foram expressos como UFC/mL.

2.2.3 Quantificação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como padrão de referência (Singleton & Rossi, 1965). A absorbância foi medida a 760nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em *mg* de ácido gálico equivalente por mL de kombucha (mg AGEq/mL).

2.2.4 Teaflavinas e Tearubiginas

A concentração de teaflavinas e tearubiginas das amostras de kombucha foi estimada de acordo com o método espectrofotométrico segundo Jayabalan *et al.* (2007) e os resultados foram expressos como % (m/v).

2.2.5 Etanol

A análise foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU, bomba (LC-20AT); forno (CTO 20 A); autoinjeter (SIL-20A HT), detector de índice de refração (RID-10 A). Degaseificador (DGU-20A 5R); coluna Aminex® HPX87H (BIO-RAD), 300 cm x 7,8 mm, e pré-coluna de mesma fase, temperatura do forno: 32 °C; vazão de fluxo: 0,6 mL. min.⁻¹. A fase móvel utilizada foi água ultrapura: Ácido sulfúrico (5mM) e o volume de amostra injetado foi 10 ul. Aquisição de dados: software Lab Solutions, Shimadzu Corporation (2013).

2.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos nas análises de acidez titulável, pH, análises microbiológicas, teaflavinas, tearubiginas e fenólicos totais foram tabulados por meio das médias de três repetições, por tempo de vida de prateleira, e foi realizada uma análise de

regressão, ajustando a modelos lineares e não lineares e identificando os pontos críticos. O R software (R CORE TEAM, 2020), versão 4.0.2, foi utilizado para a análise dos dados estatísticos.

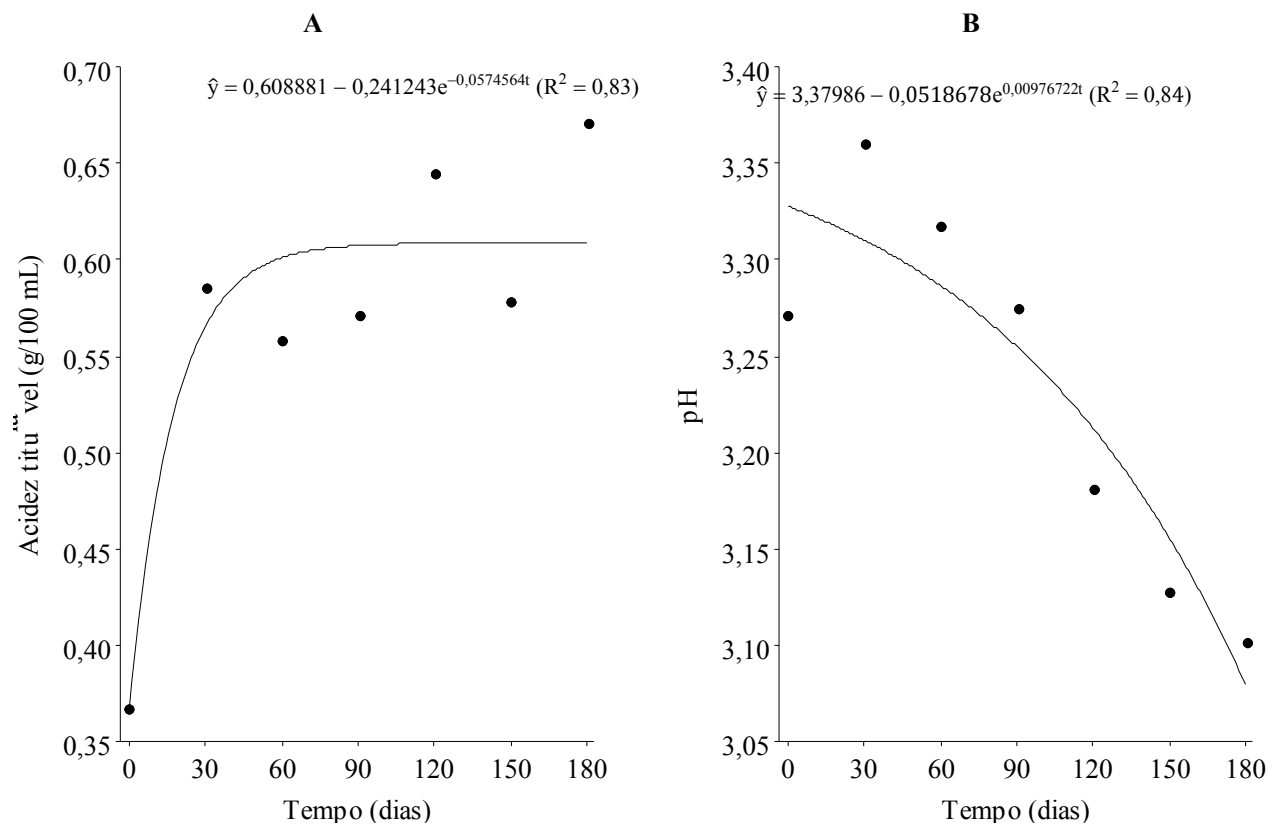
3. Resultados e Discussão

3.1 Transformações físico-químicas na kombucha durante a vida de prateleira

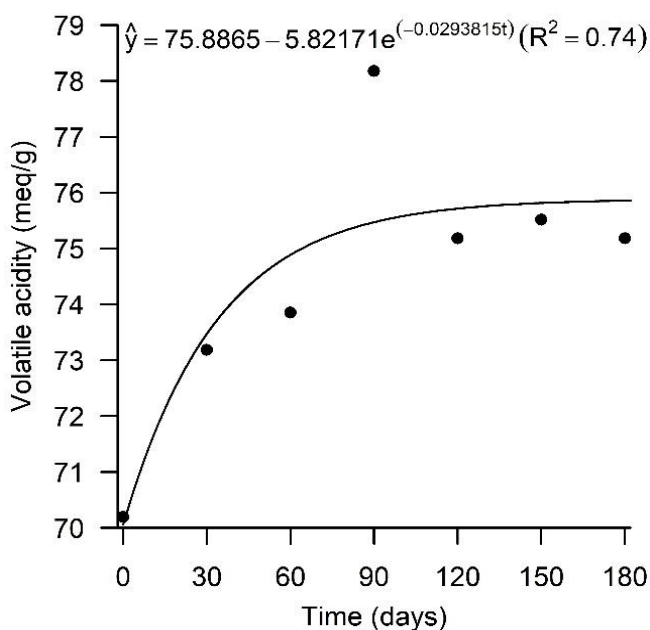
A kombucha apresentou aumento na acidez total durante a vida de prateleira, variando de 0,37% (dia 0) a 0,67% (dia 180) e este aumento foi mais pronunciado durante os primeiros 30 dias de armazenamento, onde a acidez aumentou de 0,37% (dia 0) a 0,58% (dia 30) (Figura 1A). Um comportamento similar foi observado para a acidez volátil, que apresentou aumento durante a vida de prateleira, variando de 70,19 meq/L (dia 0) a 75,18 meq/L (dia 180) (Figura 1C). Todos os valores obtidos na análise de acidez volátil estão dentro da legislação brasileira, que prevê valores maiores que 30 meq/L e menores que 120 meq/L (Brasil, 2019).

O pH médio das bebidas no primeiro dia de armazenamento foi de 3,27, e, durante o armazenamento, o pH diminuiu gradativamente, chegando a um pH final de 3,10 no dia 180 (Figura 1B). Os valores de pH das bebidas se mantiveram dentro da faixa considerada segura para consumo humano, que varia de 2,5 a 4,2 (Nummer, 2013), garantido assim, a segurança microbiológica e química da bebida.

Figura 1 - Variação da acidez total (A), pH (B) e acidez volátil (C) durante a vida de prateleira de kombucha.



C



A kombucha apresentou baixo teor de etanol durante todo o período de armazenamento, apresentando as seguintes concentrações: 1,35 g/L (dia 0), 1,94 g/L (dia 30), 1,36 g/L (dia 60), 1,67 g/L (dia 90), 2,12 g/L (dia 120), 1,76 g/L (dia 150) e 2,72 g/L (dia 180). Todas mantendo-se abaixo dos 0,5% (v/v) exigidos pela legislação brasileira (Brasil, 2019), para classificação como kombucha não alcoólica. (Figura 2B).

A hidrólise da sacarose residual proveniente da fermentação provoca o aumento na acidez total e volátil durante a vida de prateleira, por meio da produção de ácidos orgânicos pelas bactérias acéticas e lácticas, que utilizam açúcares residuais e etanol como substrato (Malbasa *et al.*, 2008).

De acordo com Villarreal-Soto *et al.*, (2020) as leveduras, além de hidrolisarem a sacarose em glicose e frutose, realizam o processo de fermentação da glicose para produção de etanol, que por sua vez, pode ser convertido em ácido acético pela atividade das bactérias acéticas. Além disso, as bactérias acéticas podem utilizar glicose para produção de ácido glicônico e celulose (Arikan *et al.*, 2020).

A mudança de temperatura de fermentação (25°C) para a temperatura de vida de prateleira (4°C) e a limitação de oxigênio, provoca a diminuição da velocidade da atividade metabólica dos micro-organismos presentes na bebida, com isso, as transformações químicas tendem a se estabilizar durante o armazenamento em baixa temperatura. Além disso, o esgotamento dos substratos e os efeitos tamponantes causados pelos ácidos orgânicos e gás carbônico formados durante a fermentação e início da vida de prateleira, podem inibir a atividade metabólica dos micro-organismos (Morales, 2020; Jaybalan *et al.*, 2007; Kallel *et al.*, 2012; Malbaša *et al.*, 2011).

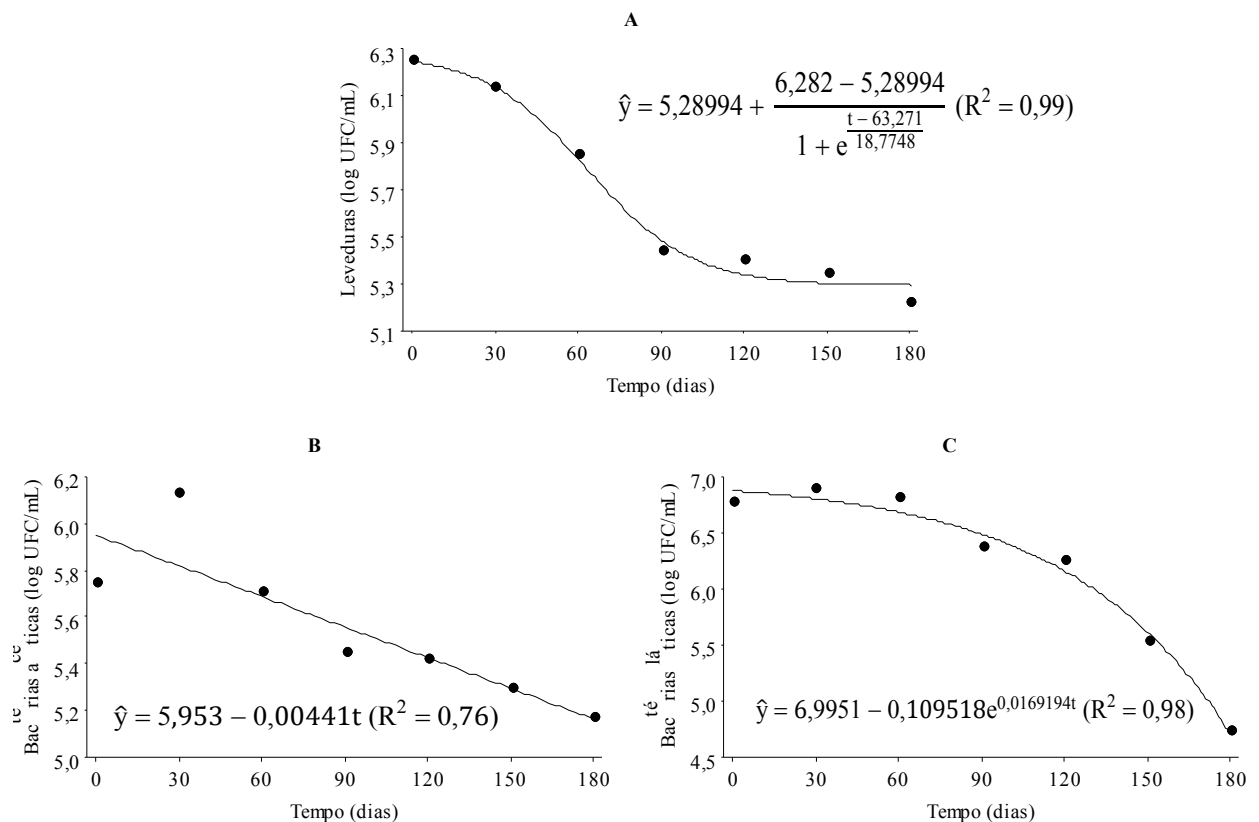
3.2 Transformações microbiológicas da kombucha durante a vida de prateleira

As contagens de leveduras, bactérias acéticas (BAA) e bactérias lácticas (BAL) reduziram com diferentes taxas durante o armazenamento por 180 dias (Figura 2). A contagem de leveduras reduziu aproximadamente um ciclo log em 90 dias, permanecendo na ordem de 6,25 a 5,22 logs UFC/mL durante o armazenamento a 4°C, apresentando redução a taxas crescentes até o dia 60 (Figura 2A). A partir desse dia o comportamento se modificou e a contagem apresentou redução a taxas decrescentes, tendendo a estabilização após o dia 120 (Figura 2A).

O fato de as garrafas serem fechadas altera a atividade metabólica conjunta dos micro-organismos presentes na kombucha, pois o meio se torna um ambiente de microaerofilia (Bueno *et al.*, 2021). A atividade fermentativa das leveduras tende a se elevar e esse comportamento afeta diretamente a composição físico-química da bebida, pois elas promovem a liberação de enzimas que permite a hidrólise da sacarose e açúcares residuais em glicose e frutose (Figura 2A), que podem ser facilmente metabolizadas pelas bactérias. Além de serem responsáveis pela produção de etanol como produto da sua atividade (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). As leveduras

têm papel importante durante as variações na acidez total, volátil e pH que ocorreram principalmente durante os primeiros 2 meses de armazenamento, onde ainda existe a presença de açúcares residuais fermentescíveis (Bueno *et al.*, 2021).

Figura 2 - Caracterização microbiológica da bebida durante a vida de prateleira: contagem de leveduras (A); bactérias acéticas (B) e bactérias lácticas (C).



A contagem de BAA apresentou redução a taxas constantes (Figura 2B), variando de 5,74 a 5,17 log UFC/mL durante o armazenamento, apesar de apresentar oscilação na contagem, logo que, a maior contagem foi obtida no dia 30 (6,13 log UFC/mL). As bactérias acéticas dependem do oxigênio para o seu metabolismo, e utilizam a glicose para produzir ácido glicônico e celulose (Sievers *et al.*, 1995; Jayabalan *et al.*, 2007; Jayabalan *et al.*, 2014) e o etanol para produzir ácido acético (Dufresne & Farnworth, 2000; Jayabalan *et al.*, 2007; Arikan *et al.*, 2020). A redução na contagem das BAA está associada à diminuição dos substratos e do oxigênio disponível no meio, que se torna mais relevante a partir do dia 30, onde inicia a redução na contagem de BAA (Figura 2B) e ocorre a diminuição na taxa do aumento da acidez total (Figura 1A).

A contagem de BAL apresentou a maior contagem inicial e também a maior redução, variando de 6,77 a 4,72 log UFC/mL (Figura 2C), sempre com taxas crescentes de redução, durante todo o período avaliado para vida de prateleira. Cardoso *et al.* (2020) obtiveram valores similares de contagem de BAL após a fermentação por 10 dias, e observou-se que apesar da alta contagem o teor de ácido láctico na kombucha era baixo, devido a predominância de bactérias heterofermentativas no SCOBY, que não possuíam a produção de ácido láctico como principal via metabólica.

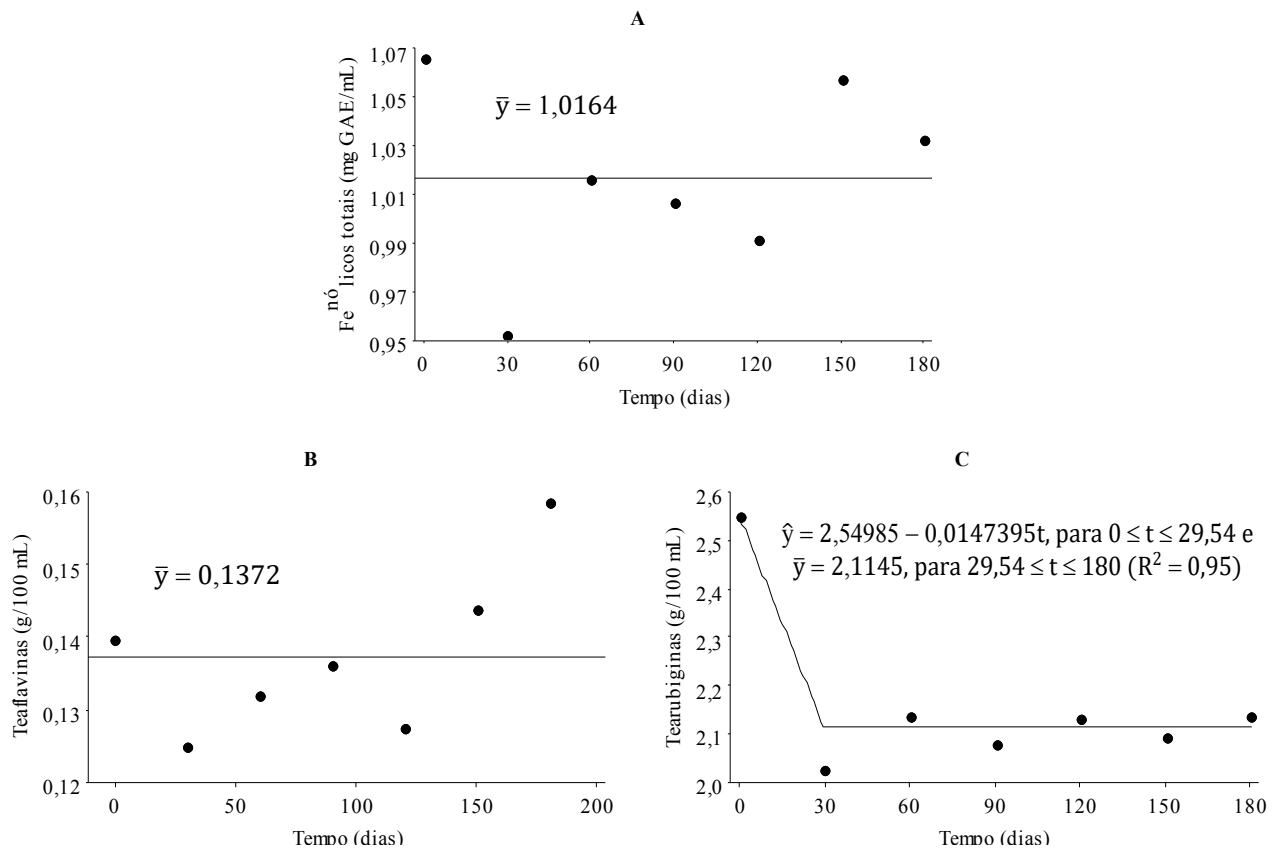
3.3 Quantificação de compostos fenólicos da kombucha durante vida de prateleira

Os resultados da quantificação de fenólicos totais, teaflavinas (TFs) e tearubiginas (TRs) durante a vida de prateleira estão apresentados na Figura 3.

A concentração de fenólicos totais na kombucha variou de 1,065 mg de GAE/mL (dia 0), a 1,031 mg de GAE/mL (dia 180), entretanto, essa variação na concentração com o tempo não foi possível ser explicada matematicamente (Figura 3A). Essa oscilação pode ser justificada pelas transformações na composição fenólica da kombucha, causadas pelos micro-organismos presentes na bebida. Por exemplo, as catequinas podem se polimerizar em moléculas com alto peso molecular, reduzindo assim a concentração de fenólicos totais (Chu & Chen, 2006). Por outro lado, isômeros de epicatequina podem sofrer hidrólise com consequente aumento da concentração de ácido gálico, epicatequina e epigallocatequina, o que pode aumentar a concentração de fenólicos totais (Jaybalan *et al.*, 2007; Jaybalan *et al.* 2008).

O conteúdo de tearubiginas (TR) reduziu nos primeiros 30 dias de vida de prateleira de 2,54 a 2,02% (Figura 3C). Diferentemente, o conteúdo de teaflavinas (TF) não variou (0,1372%) (Figura 3B). Como o chá preto é obtido por meio de processo de oxidação enzimática das folhas de *Camellia sinensis*, a kombucha de chá preto apresenta maiores concentrações de teaflavinas e tearubiginas, que são flavonóides diméricos e poliméricos, respectivamente (Jaybalan *et al.* 2007).

Figura 3: Variação da concentração de fenólicos durante a vida de prateleira- concentrações de fenólicos totais (A); teaflavinas (B) e tearubiginas (C).



Como demonstrado no capítulo 2, não houve variação na concentração de tearubiginas durante 10 dias de fermentação da kombucha de chá preto. Possivelmente, tempos mais longos de fermentação são necessários para acontecer a degradação de tearubiginas e conseqüente formação de outros compostos fenólicos como catequinas e ácidos fenólicos (Kallel et al., 2012 e Jayabalan et al., 2007). Kallel et al. (2012) observaram aumento de teaflavinas e redução de tearubiginas após 15 dias de fermentação, enquanto Jayabalan et al., (2007) observaram a degradação de 11% das tearubiginas durante a fermentação por 18 dias da kombucha de chá preto. No nosso estudo sobre a vida de prateleira, a kombucha de chá preto foi produzida por uma fermentação de 10 dias, e então armazenada sob refrigeração. Portanto, como ainda há presença de açúcares no início da vida de prateleira, o processo

fermentativo continuou, o que pode ter influenciado na redução da concentração de tearubiginas (Figura 3C).

4. Conclusão

A composição físico-química, microbiológica e de compostos fenólicos da kombucha sofreu alterações durante o armazenamento por 180 dias a 4°C. Essas mudanças foram provocadas devido ao metabolismo/fermentação dos microorganismos presentes na bebida, utilizando os substratos residuais. Identificou-se a hidrólise da sacarose com consequente aumento nas concentrações de glicose e frutose, que levou a elevação na acidez total (0,37-0,67%), acidez volátil (70,19-75,18 meq/L) e consequentemente redução do pH (3,27-3,10), apesar da não variação da concentração de ácido acético. Durante a vida de prateleira, todos os microorganismos avaliados sofreram redução nas contagens devido à redução dos substratos: leveduras (6,25-5,22 logs UFC/mL), bactérias acéticas (5,74-5,17 log UFC/mL) e bactérias lácticas (6,77-4,72 logs UFC/mL). Não foram identificadas variações significativas nas concentrações de fenólicos totais e teaflavinas, porém, a concentração de tearubiginas reduziu nos primeiros 30 dias de vida de prateleira (2,54-2,02%). Observamos o aumento do teor alcoólico, mesmo assim, mantendo sempre em baixas concentrações, abaixo de 0,5% (v/v).

Podemos concluir que durante a vida de prateleira as alterações ainda acontecem, mas a velocidade dessas reações reduz drasticamente, e que a kombucha após 180 dias de armazenamento sob refrigeração se manteve segura e dentro dos padrões de identidade e qualidade prevista na Instrução Normativa Nº41 do MAPA, estando apta para consumo. Porém, mais estudos são necessários para avaliação sensorial e padronização da kombucha de chá preto. Sugere-se, então, o

desenvolvimento de futuros trabalhos relacionados à qualidade sensorial da bebida, para avaliar o nível de comprometimento de sua aceitabilidade com a evolução das modificações que acontecem, mesmo durante o armazenamento sob refrigeração.

Agradecimentos

Nós agradecemos à CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

5. Referências

- Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heperkan, D., (2013) A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 167, Issue 1, Pages 44-56, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016>.
- Arikan, M., Mitchell, A.L., Finn, R.D. and Gürel, F. (2020), microbial composition of kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of Food Science*, 85: 455-464. <https://doi.org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1750-3841.14992>
- Brasil. Instrução Normativa n. 41 de 17 de setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Brasília, 18 set. 2019. Seção 1, p.13.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.
- Bueno R. S., Jéssica B. Ressutte, Natália N.Y. Hata, Fernanda C. Henrique-Bana, Karla B. Guergoletto, Admilton G. de Oliveira, Wilma A. Spinosa, Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya, *LWT*, Volume 140, 2021, 110770, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110770>.
- Cardoso, R.R., Neto, R.O., D'Almeida, C.T.S., Nascimento, T.P., Pressete, C.G., Azevedo, L., Martino, H.S.D., Camerone, L.C., Ferreira, M.S.L., Barros, F.A.R. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* 128, 108782. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782
- Chen H., Sang, S., (2014), Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota, *Journal of Functional Foods*, Volume 7, Pages 26-42, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.013>.
- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidante activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>.
- Coelho, R.M.D Aryelle Leite de Almeida, Rafael Queiroz Gurgel do Amaral, Robson. Nascimento da Mota, Paulo Henrique M. de Sousa, (2020), Kombucha: Review, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, Volume 22, 100272, ISSN 1878-450X, <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>.

- Dufresne C, Farnworth E. 2000. Tea, kombucha, and health: a review. *Food Res Int* 33:409–21.
- Instituto Adolfo Lutz. 2005. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4 ed. Brasília: ANVISA. 1018p
- Jakubczyk, K.; Kałduńska, J.; Kochman, J.; Janda, K. (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*, 9, 447. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109, 227–234. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.037.
- Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S. and 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*, 13: 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., M. Djuric, I. Dosenovic. (2008). Efeito da concentração de sacarose nos produtos da fermentação do Kombuchá no melão. *Food Chemistry*, 108, pp. 926 - 932 , 10.1016 / j.foodchem.2007.11.069
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127(4), 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>.
- Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence, *Trends in Food Science & Technology*, V. 105, Pg. 323-333, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>.
- Mordor Intelligence. (2019). Global kombucha market—growth, trends and forecast (2019—2024). Mordor Intelligence website: Retrieved from <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/kombucha-market>

- Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: Risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76(4), 8–11 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Pasquini, C., Maria C.Hespanhol, Kaique A. M. L.Cruz, Alexandre F.Pereira, (2021), Monitoring the quality of ethanol-based hand sanitizers by low-cost near-infrared spectroscopy, *Microchemical Journal*.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020. URL <https://www.r-project.org>.
- Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M. 1995. Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Syst Appl Microbiol* 18:590–4.
- Singleton, V.L.; Rossi Junior, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, Davis, v. 16, n. 1, p. 144-158.
- Tu. C, S. Tang, F. Azi, W. Hu, M. Dong. 2019. Uso do consórcio kombucha para transformar soro de soja em uma nova bebida funcional *Journal of Functional Foods*, 52, pp. 81 - 89, 10.1016 / j.jff.2018.10.024
- Tran, T.,Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R., (2020). Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods* 9(7), 963; <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P. and Taillandier, P. (2018), Understanding kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83: 580-588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83(April), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>.
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P.D., Souchard, J.P., Taillandier, P., Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 333, 108778, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>.

CONCLUSÕES GERAIS

A composição físico-química e microbiológica da kombucha de chá preto sofreu alteração durante todo o período de fermentação e vida de prateleira. Essas alterações foram mais pronunciadas no início da fermentação e da vida de prateleira. Também foi observada alteração no perfil de compostos fenólicos durante a fermentação por meio de análise utilizando UPLC-MS^E. Os ácidos fenólicos eram os compostos mais abundantes nas amostras em todos os dias de fermentação, apesar dos flavonoides apresentarem o maior número compostos identificados.

Durante toda a fermentação foram identificados um total de 164 compostos fenólicos. Entre os compostos pode-se destacar aqueles que sofreram degradação com o tempo de fermentação como os flavonoides (+)-catequina galato, nepetina e hesperidina. Já entre os compostos que tiveram suas concentrações aumentadas com o tempo destacam-se os ácidos fenólicos, ácido gálico, verbascosídio, ácido rosmarínico e ácido cinâmico.

A kombucha de chá preto apresentou atividade antiplasmódica contra cepa 3D7 (sensível cloroquina) independente do estágio do parasita, e contra à cepa W2 (resistente cloroquina) na forma esquizonte. Essa atividade antimalárica pode estar relacionada ao perfil de compostos fenólicos da kombucha.

No estudo de vida de prateleira, foi observado um aumento na acidez total, acidez volátil, e conseqüente redução do pH. Não foi observado alterações nas concentrações de fenólicos totais e teaflavinas. Houve uma redução da concentração de tearubiginas nos primeiros 30 dias de vida de prateleira, indicando possíveis alterações na composição fenólica da bebida. Apesar das alterações observadas, a bebida se manteve dentro dos padrões de identidade e qualidade prevista na

Instrução Normativa Nº41 do MAPA, estando apta para consumo. Concluímos assim, que a kombucha de chá preto pode ser armazenada sob refrigeração por 180 dias, porém, mais estudos são necessários para avaliação das alterações sensoriais da kombucha de chá preto durante a vida de prateleira.