

DANDARA BAIA BONIFÁCIO

**EFEITO DO CONSUMO DE KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*)
SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE RISCO
CARDIOMETABÓLICO EM INDIVÍDUOS COM EXCESSO DE PESO**

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

Orientadora: Josefina Bressan

Coorientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

Bonifácio, Dandara Baia, 2024-
B715e Efeito do consumo de kombucha de chá verde (*Camellia*
2024 *sinensis*) : sobre marcadores de estresse oxidativo e de risco
cardiometabólico em indivíduos com excesso de peso / Dandara
Baia Bonifácio. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (104 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Josefina Bressan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Nutrição e Saúde, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.181>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Obesidade. 2. Bebidas fermentadas. 3. Peróxido de
hidrogênio. 4. Hemoglobinas glicadas. I. Bressan, Josefina,
1959-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 616.3980654


DANDARA BAIA BONIFÁCIO

**EFEITO DO CONSUMO DE KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*)
SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE RISCO
CARDIOMETABÓLICO EM INDIVÍDUOS COM EXCESSO DE PESO**


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

APROVADA: 22 de março de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **DANDARA BAIA BONIFACIO**
Data: 16/07/2024 15:13:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dandara Baia Bonifácio
Autora

Documento assinado digitalmente
 **JOSEFINA BRESSAN**
Data: 16/07/2024 16:27:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Josefina Bressan
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora e Santa Rita de Cássia, que foram meu alicerce e direção.

Aos meus pais, Ozair e Claudia, por todo apoio e incentivo à educação, nunca medindo esforços para contribuir para o meu crescimento. Também agradeço ao meu namorado, Hugo, que durante todo o mestrado esteve me apoiando, e à minha irmã, Yara, por sempre me inspirar o melhor.

À minha orientadora, professora Josefina, que confiou no meu trabalho, me auxiliou durante toda a trajetória acadêmica e transmitiu valiosos ensinamentos para o meu crescimento como pesquisadora e futura docente.

À Gabriela, que vivenciou comigo os melhores e piores momentos, oferecendo um grande suporte durante todo processo.

À Alessandra, que sempre me motivou e por inúmeras vezes foi minha grande inspiração para seguir a vida acadêmica.

A toda a equipe do LAMECC e LAC, pelo apoio durante o mestrado, e em especial à Ana Claudia, pela colaboração nas análises de estresse oxidativo.

Também agradeço aos membros do projeto kombucha e, em especial, ao professor Frederico pela oportunidade de trabalhar com esta equipe.

A todos os amigos de Viçosa e Manhuaçu pelo apoio e companheirismo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (Código de Financiamento 001).

RESUMO

BONIFÁCIO, Dandara Baia, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2024. **Efeito do consumo de kombucha de chá verde (*Camellia sinensis*) sobre marcadores de estresse oxidativo e de risco cardiometabólico em indivíduos com excesso de peso.** Orientadora: Josefina Bressan. Coorientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros.

A kombucha é uma bebida fermentada por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras chamada *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY), que tem como substrato o chá de *Camellia sinensis* (chá verde, preto, branco ou vermelho) e açúcares. Estudos *in vitro* e experimentais com animais indicam que a kombucha promove efeitos benéficos sobre marcadores do estresse oxidativo, perfil lipídico e glicídico. Tais resultados podem sugerir potencial benefício do consumo de kombucha para a saúde humana. Por estes motivos, o presente estudo objetivou investigar o efeito do consumo diário de kombucha de chá verde sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco cardiometabólico em indivíduos com excesso de peso. Tratou-se de um ensaio clínico, randomizado controlado, com 59 indivíduos que foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais paralelos: 1) restrição calórica (-500 kcal/dia) sem consumo de kombucha ($n= 29$); 2) restrição calórica (-500 kcal/dia) + kombucha de chá verde (200mL/dia) ($n= 30$). O período de intervenção teve duração de dez semanas, ao longo das quais todos participantes seguiram um plano alimentar prescrito. Ao início e final da intervenção, todos compareceram ao laboratório para coleta de sangue, e aferição da pressão arterial e índice tornozelo-braquial (ITB). A partir das amostras biológicas foram analisados os marcadores da função endotelial (ICAM, VCAM, CD36), de estresse oxidativo (SOD, FRAP, GPx, GR, LDL-ox, ON, MDA e H₂O₂), de perfil lipídico (CT, LDL-c, HDL-c, VLDL-c, TG, Apo A e Apo B) e perfil glicídico (glicose, insulina e hemoglobina glicada). Além disso, o ácido úrico sérico foi dosado e os índices de Castelli I e II, TyG, HOMA-IR, HOMA- β e Apo A/Apo B foram calculados. As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS (versão 25.0, EUA), considerando-se um nível de significância de $\alpha= 0.05$. Ao início do estudo, a média de idade foi de $33,61 \pm 6,95$ anos e de IMC $32,74 \pm 3,70$ kg/m². Após o período de intervenção, o grupo kombucha reduziu H₂O₂ em relação ao grupo controle ($p=0.006$). Ainda, os homens do grupo kombucha reduziram a hemoglobina glicada, diferente daqueles do grupo controle, que aumentaram o marcador ($p=0.010$). Os demais marcadores avaliados não diferiram entre os grupos controle e kombucha. Ambos os grupos reduziram significativamente o ON, índice de Castelli I e HOMA- β comparado a linha de base. Por outro lado, o consumo de kombucha aumentou ITB e reduziu CT, LDL-c, VLDL-c, TG, índice de Castelli II e ácido úrico, enquanto

o grupo controle aumentou hemoglobina glicada e ICAM em relação a linha de base. Em conclusão, o consumo diário de 200 mL de kombucha de chá verde, por dez semanas, reduziu o radical pró-oxidante peróxido de hidrogênio em indivíduos com excesso de peso, e entre os homens, reduziu a hemoglobina glicada. Por fim, a bebida, quando associada à dieta com restrição calórica, apresentou benefícios à saúde cardiometabólica, como melhora do perfil lipídico, ácido úrico e ITB.

Palavras-chave: Obesidade; Bebida Fermentada; Peróxido de Hidrogênio; Hemoglobina Glicada

ABSTRACT

BONIFÁCIO, Dandara Baia, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2024. **Effect of consumption of green tea kombucha (*Camellia sinensis*) on markers of oxidative stress and cardiometabolic risk in individuals with excess weight.** Advisor: Josefina Bressan. Co-advisor: Frederico Augusto Ribeiro de Barros.

Kombucha is a beverage fermented by a symbiotic culture of bacteria and yeast called *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY), whose substrate is *Camellia sinensis* tea (green, black, white or red tea) and sugars. *In vitro* and experimental animal studies indicate that daily kombucha consumption promotes beneficial effects on markers of oxidative stress, lipid, and glucose profiles. Such results may suggest potential benefits of kombucha consumption for human health. For these reasons, the present study aimed to investigate the effect of daily consumption of green tea kombucha on oxidative stress and cardiometabolic risk markers in individuals with excess weight. This is a randomized controlled clinical trial, with 59 individuals who were randomly distributed into two parallel experimental groups: 1) caloric restriction (-500 kcal/day) without kombucha consumption (n= 29); 2) calorie restriction (-500 kcal/day) + green tea kombucha (200mL/day) (n= 30). The intervention period lasted ten weeks, during which all participants followed a prescribed eating plan. At the beginning and end of the intervention, participants attended the laboratory for blood collection, blood pressure, and ankle-brachial index (ABI) measurements. Through biological samples, markers of endothelial function (ICAM, VCAM, and CD36), oxidative stress (SOD, FRAP, GPx, GR, oxLDL, NO, MDA, and H₂O₂), lipid profile (TC, LDL -c, HDL-c, VLDL-c, TG, Apo A, and Apo B) and glucose profile (glucose, insulin, and glycated hemoglobin). Furthermore, serum uric acid was measured and Castelli I and II, TyG, HOMA-IR, HOMA-β, and Apo A/ Apo B indices were calculated. Statistical analyses were performed using SPSS software (version 25.0, USA), considering a significance level of $\alpha= 0.05$. At the beginning of the study, the average age was 33.61 ± 6.95 years, and BMI 32.74 ± 3.70 kg/m². After the intervention period, the kombucha group reduced H₂O₂ compared to the control group (p=0.006). Furthermore, men in the kombucha group reduced glycated hemoglobin, unlike those in the control group, who increased the marker (p=0.010). The other markers evaluated did not differ between the control and kombucha groups. Both groups significantly reduced NO, Castelli index I, and HOMA-β compared to baseline. On the other hand, kombucha consumption increased ABI and reduced TC, LDL-c, VLDL-c, TG, Castelli II index, and uric acid, while the control group increased glycated hemoglobin and ICAM in relation to baseline. In conclusion, daily consumption of

200 mL of green tea kombucha, for ten weeks, reduced the pro-oxidant radical hydrogen peroxide in individuals with excess weight, and among men, it promoted the reduction of glycated hemoglobin. Finally, the beverage, when associated with an energy-restricted diet, presented benefits to cardiometabolic health, such as improving the lipid profile, uric acid, and ABI.

Keywords: Obesity; Fermented Beverage; Hydrogen Peroxide; Glycated Hemoglobin

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
μUI/mL	Microunidade internacional por mililitro
μmol/dL	Micromol por decilitro
μmol/mL	Micromol por mililitro
ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
ABI	<i>Ankle Brachial Index</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	<i>Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
Apo A	Apolipoproteína A
Apo B	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferase
AU	Ácido Úrico
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CD36	Receptor necrófago B2
CFU/mL	<i>Colony Forming Units per milliliter</i>
cm	Centímetros
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTP-1	<i>Carnitine palmitoyltransferase I</i>
DBP	<i>Diastolic blood pressure</i>
EER	<i>Estimated Energy Requirement</i>
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FFQ	<i>Food Frequency Questionnaire</i>
FRAP	Poder antioxidante redutor de ferro
g/L	Gramas por litro
GAE	<i>Gallic acid equivalents</i>

GC	Grupo Controle
GGT	Gamma-glutamyl transferase
GK	Grupo kombucha
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL-c	Colesterol de alta densidade
HK-2	Linha celular tubular proximal
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina
HOMA- β	Modelo de Avaliação da Homeostase da Atividade do Pâncreas
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	Molécula-1 de adesão intracelular
IDL-c	Lipoproteínas de densidade intermediária
IMC	Índice de Massa Corporal
IPAQ	<i>International Physical Activity Questionnaires (short version)</i>
ITB	Índice Tornozelo-Braquial
KEAP-1	<i>Human Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kg	Quilograma
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
LAC-DNS	Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição e Saúde
LACDSA	Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde
LAMECC	Laboratório de Metabolismo Energético e de Composição Corporal
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteínas de baixa densidade oxidada
mcg	Micrograma
MDA	Malonaldeído
MET	<i>Metabolic Equivalent Task</i>
mg	Miligramas
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio

ng/L	Nanograma por litro
ng/mL	Nanograma por mililitro
NO	<i>Nitric Oxide</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
ON	Óxido nítrico
oxLDL	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i>
PA	<i>Physical Activity</i>
pg/mL	Picograma por mililitro
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
REBEC	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
SBP	<i>Systolic Blood Pressure</i>
SCOBY	<i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i>
SIRT-1	<i>Stimulating sirtuin-1</i>
SOD	Superóxido dismutase
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein 2</i>
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TC	<i>Total Cholesterol</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TFEQ-21	<i>Three Factor Eating Questionnaire - versão 21</i>
TG	Triglicerídeos
TyG	Índice triglicerídeos-glicose
U/L	Unidade por litro
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UPLC	<i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>
v/v	Volume por volume
VCAM	Molécula-1 de adesão celular vascular
VLDL-c	Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Excesso de peso, obesidade e doenças cardiovasculares.....	15
3.2 Marcadores de risco cardiometabólico	17
3.3 Kombucha: histórico e caracterização	19
4 OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo geral	22
4.2 Objetivos específicos	22
5 HIPÓTESE	23
6 METODOLOGIA.....	23
6.1 Aspectos Éticos	23
6.2 Delineamento do estudo	24
6.3 Critérios de inclusão	24
6.4 Critérios de não inclusão	24
6.5 Cálculo amostral	25
6.6 Recrutamento e triagem.....	25
6.7 <i>Run-in</i>	26
6.8 Randomização	26
6.9 Desenho do estudo.....	26
6.10 Intervenção	28
6.11 Planos alimentares	28
6.12 Coletas de amostras biológicas.....	28
6.13 Avaliações e mensurações	29
6.13.1 <i>Variáveis de caracterização dos participantes</i>	29
6.13.2 <i>Marcadores da saúde endotelial</i>	29
6.13.3 <i>Marcadores do estresse oxidativo</i>	29
6.13.4 <i>Marcadores tradicionais da saúde cardiometabólica</i>	30
6.14 Monitoramento da adesão ao protocolo do estudo	31
6.15 Critérios de descontinuidade do estudo	31
6.16 Análises estatísticas	31
REFERÊNCIAS	32
7 RESULTADOS	42

7.1 Artigo 1.....	42
7.2 Artigo 2.....	65
8 CONCLUSÃO GERAL	87
APÊNDICES	88

1 INTRODUÇÃO GERAL

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial, com estímulo à adiposidade, que resulta no desenvolvimento de morbidades associadas ao excesso de peso, como resistência à insulina e dislipidemias (Tchang *et al.*, 2021). Essas comorbidades contribuem para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, que são as principais causas de morte do mundo (Koenen *et al.*, 2021). O excesso de peso também pode ocasionar alterações estruturais e hemodinâmicas da função cardíaca e endotelial, com aumento do volume total de sangue, volume sistólico, débito cardíaco, pressão e volume de enchimento. Além disso, a dilatação e hipertrofia ventricular associada ao excesso de peso pode ocasionar disfunção sistólica e diastólica (Elagizi *et al.*, 2020). Neste sentido, além da perda de peso, o manejo do peso de indivíduos com excesso de peso e obesidade pode proporcionar importantes benefícios cardiometabólicos (Tchang *et al.*, 2021).

Ademais, a obesidade está associada, principalmente, à doença cardiovascular aterosclerótica (Zhang *et al.*, 2021). O início do processo de aterosclerose se dá pela instabilidade endotelial provocada por fatores de risco cardiovasculares e metabólicos, como o estresse oxidativo e acúmulo de lipídios. Essa instabilidade endotelial promove aumento da expressão de moléculas de adesão, que iniciam uma cascata de reações para formação da placa aterosclerótica (Liang *et al.*, 2020). Neste processo, o estresse oxidativo é induzido pelo desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes, por meio do excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS), que causam lesão vascular e expressão insuficiente de antioxidantes que atuam controlando as consequências indesejáveis das EROS (Kattoor *et al.*, 2017). Ainda, a formação da placa de ateroma também envolve o acúmulo de lipídeos na parede arterial. Neste sentido, o principal marcador das dislipidemias associadas ao excesso de peso é o aumento da lipoproteína de baixa densidade (VLDL-c) associado à redução do colesterol de alta densidade (HDL-c) (Zhang *et al.*, 2019). Demais anormalidades metabólicas também estão envolvidas na progressão da aterosclerose, como hiperglicemia, resistência à insulina e hipertensão arterial (Katakami, 2018).

Pesquisadores têm se dedicado a avaliar o efeito de alimentos específicos, como os funcionais, sobre a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como as cardiovasculares, principalmente, por meio da ação antioxidante, melhora do perfil lipídico, pressão arterial e função endotelial (Sikand *et al.*, 2015; Asgary *et al.*, 2018). Neste sentido, destaca-se a kombucha, uma bebida obtida pela fermentação de *Camellia sinensis* e açúcares por meio de

uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras chamada *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY) (Cardoso *et al.*, 2020). Evidências *in vitro* e em estudos experimentais com animais mostram o efeito do consumo de kombucha sobre o controle glicêmico (Bhattacharya *et al.*, 2013; Zubaidah *et al.*, 2019), melhora do estresse oxidativo (Sai Ram *et al.*, 2000; Chu e Chen, 2006; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Gaggia *et al.*, 2019; Cardoso *et al.*, 2021), e melhora do perfil lipídico (Lee *et al.*, 2018).

O processo de fermentação do chá promove o aumento do potencial bioativo da bebida. Entre os tipos de chá tradicionalmente utilizados para a fermentação da kombucha destaca-se o chá verde pelo alto potencial antioxidante (Jakubczyk *et al.*, 2020) e antibacteriano (Cardoso *et al.*, 2020). Além disso, a kombucha é rica em ácidos orgânicos como ácido acético, cítrico, glucônico, carbônico, tartárico e láctico. E contém vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 e B12) e C; minerais como ferro, cobre, manganês e zinco; e compostos fenólicos como epigallocatequinas, epicatequinas, epigallocatequina galato, epicatequina galato, e ácido gálico (Cardoso *et al.*, 2020; Junior *et al.*, 2022). Todos estes micronutrientes e compostos bioativos são responsáveis pelas promissoras perspectivas sobre o efeito do consumo de kombucha de chá verde sobre a saúde humana.

Porém, até o momento, apenas três ensaios clínicos avaliaram o efeito do consumo de kombucha sobre a saúde humana. Um deles mostrou que um produto à base de kombucha enriquecida com inulina foi capaz de reduzir a intensidade das queixas significativas de constipação (Pilipenko *et al.*, 2022). Outro ensaio clínico observou o efeito hipoglicemiante agudo da kombucha em pessoas saudáveis (Atkinson *et al.*, 2023). Por fim, um estudo piloto constatou que após 4 semanas do consumo de 240 mL de kombucha, indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 reduziram as concentrações plasmáticas de glicose (Mendelson *et al.*, 2023). Nenhum estudo avaliou marcadores do estresse oxidativo, saúde endotelial, perfil lipídico e ácido úrico em humanos.

2 JUSTIFICATIVA

Indivíduos com sobrepeso e obesidade apresentam um risco cardiometabólico elevado por conta da associação do excesso de adiposidade com o desenvolvimento de comorbidades, como dislipidemias, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 e aterosclerose. Ainda,

fisiologicamente, o excesso de peso pode causar alterações funcionais e hemodinâmicas na função cardíaca e endotelial. Desse modo, intervenções com alimentos específicos associados à uma dieta hipocalórica, que é a principal evidência para perda de peso, vêm sendo realizadas para manejo do sobrepeso e obesidade e redução do risco cardiometabólico.

A literatura, a partir de estudos *in vitro* e experimentais com animais, indica que o consumo de kombucha promove benefícios para saúde metabólica e cardiovascular, com melhora de marcadores do estresse oxidativo, pressão arterial, perfil lipídico e glicídico. Tais efeitos demonstram o potencial benefício do consumo de kombucha para a saúde humana. Contudo, nenhum estudo dedicou-se a avaliação do efeito do consumo regular de kombucha de chá verde sobre marcadores de estresse oxidativo e de risco cardiometabólico em indivíduos com excesso de peso, aparentemente saudáveis. É importante destacar que a *Food and Drug Administration* e o Ministério da Agricultura e Pecuária (Brasil) definiram que o consumo de kombucha, quando preparada de forma adequada, é seguro para a saúde humana.

A kombucha é uma bebida que contém bactérias e leveduras que produzem importantes ácidos, como acético, cítrico, glucônico, carbônico, tartárico e lático; além disso, contém minerais como ferro, cobre, zinco e manganês; vitaminas do complexo B e C; e compostos fenólicos como catequinas e seus derivados. Por conta desta rica composição nutricional e da necessidade de realização de um estudo com humanos, a realização do presente trabalho é fundamental para investigação do efeito da kombucha de chá verde sobre os marcadores de risco cardiometabólico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Excesso de peso, obesidade e doenças cardiovasculares

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de gordura anormal ou excessivo que pode causar prejuízos à saúde (Dononi *et al.*, 2022). Essa condição tem sido evidenciada como um problema de saúde pública global, com importantes impactos sociais e financeiros (Ruban *et al.*, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2016, 39% da população adulta mundial estava acima do peso e 13% tinham obesidade (WHO, 2021). Na região europeia, o sobrepeso e obesidade alcançam proporções endêmicas e evidenciam um dos principais determinantes de incapacidade e morte, atingindo 60% dos adultos (The Lancet

Public Heal, 2023). No Brasil, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde de 2020, a obesidade atinge 25,9% da população adulta (Donini, 2023). E conforme destaca a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO), a incidência aumenta de acordo com o aumento da idade e a maior prevalência de obesidade está entre as mulheres – uma em cada três brasileiras (Health, 2020).

Entre as cinco principais causas de morte do mundo, destaca-se a obesidade, sendo associada a diversas doenças crônicas como diabetes, cânceres, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Safaei *et al.*, 2021). O excesso de calorias provenientes da dieta pode provocar um acúmulo de gordura corporal que comumente é armazenado no tecido adiposo visceral (Xu *et al.*, 2021). Por sua vez, o excesso de adiposidade visceral e a obesidade abdominal são definidos como importantes marcadores de risco cardiovascular (Powell-Wiley *et al.*, 2021), devido ao fato de que o desenvolvimento do tecido adiposo visceral está associado a etiologia das doenças cardiovasculares (Keeley *et al.*, 2019). Além disso, em indivíduos com sobrepeso e obesidade, o comprometimento fisiopatológico do miocárdio pode ser reforçado pelo consumo alimentar inadequado, presença de estresse oxidativo e comprometimento endotelial (Ren *et al.*, 2021).

O excesso de peso pode causar efeitos diretos sobre a morbimortalidade nas doenças cardiovasculares, entre os quais se destacam alterações estruturais e funcionais relacionadas a adaptações para acomodação do excesso de peso corporal e efeitos das adipocinas na homeostase vascular (Koliaki *et al.*, 2019). Ainda, o acúmulo de gordura corporal pode mediar fatores de risco coexistentes e bem definidos às doenças cardiovasculares, como resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão e dislipidemia (Bovolini *et al.*, 2021).

A patogênese das principais doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico, é explicada pela presença da doença aterosclerótica, com a formação de placas de ateroma nas artérias que podem obstruir a passagem do fluxo sanguíneo (Libby *et al.*, 2021). Nos últimos 30 anos, a literatura tem se dedicado a descrever os mecanismos moleculares que envolvem o desenvolvimento da aterosclerose. Esta é uma doença multifatorial, em que no processo de desencadeamento se destacam os fatores genéticos e ambientais (Fan e Terou *et al.*, 2022). Acerca do processo aterosclerótico, inicialmente, ocorre agressão do endotélio, seguida pelo acúmulo de lipídios, aumento do estresse oxidativo, inflamação, formação de elementos fibrosos e calcificação. Todos estes eventos relacionados à progressão

da aterosclerose envolvem mudanças nos marcadores de risco cardiometabólico (Jebari-Benslaiman *et al.*, 2022).

3.2 Marcadores de risco cardiometabólico

A disfunção endotelial é um processo chave na fisiopatologia do desenvolvimento da doença aterosclerótica. O endotélio está localizado na camada íntima das artérias e é formado por uma camada única de células endoteliais, responsáveis pela promoção do tônus vascular, troca de fluido e angiogênese (Medina-Leyte *et al.*, 2021). Uma das principais atividades realizadas no endotélio é a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, inflamação e estresse oxidativo (Poredos *et al.*, 2021). Neste sentido, quando há instabilidade endotelial, pode ocorrer a infiltração de leucócitos e recrutamento de neutrófilos mediada pelas molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM) e pela molécula-1 de adesão intracelular (ICAM) (Yu *et al.*, 2022). Outro marcador do processo de formação da placa de ateroma e consequente lesão do endotélio é o receptor necrófago B2 (CD36), que atua na captação de ácidos graxos de cadeia longa, o principal substrato metabólico do miocárdio (Shu *et al.*, 2022).

A formação das placas ateroscleróticas envolve o estresse oxidativo, que é caracterizado pelo aumento de pró-oxidantes e redução de antioxidantes (Khosravi *et al.*, 2019). Com a presença aumentada de oxidantes, como o óxido nítrico (ON) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), há danificação de moléculas das membranas celulares, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Forman e Zhang, 2021) e desencadeamento da cascata de alterações na camada íntima endotelial (Li *et al.*, 2022). Para detecção do aumento de pró-oxidantes um marcador útil e confiável é o malonaldeído (MDA), que é o resultado da peroxidação lipídica (Sri Iswari *et al.*, 2021). Outro marcador importante para avaliar o estresse oxidativo relacionado à aterosclerose é a lipoproteínas de baixa densidade oxidada (LDLox), que é um marcador relacionado às cascatas de sinalização das vias inflamatórias (Marchio *et al.*, 2019). E para defesa contra os danos oxidativos que as ERO promovem, enzimas como a superóxido dismutase (SOD) desempenham o papel de primeira linha de defesa antioxidante (Zhao *et al.*, 2021). Outras enzimas como a glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) também pertencem ao grupo de enzimas antioxidantes que desempenham um importante papel contra o estresse oxidativo (Galasso *et al.*, 2021). Ainda, com a capacidade antioxidante total (CAT) é possível mensurar

a presença de antioxidantes, e essa pode ser avaliada por meio do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) (Sasikala *et al.*, 2021).

Associada ao desequilíbrio endotelial e estresse oxidativo, a pressão arterial é fortemente influenciada pelos fatores fisiológicos relacionados ao enrijecimento das artérias (Charry *et al.*, 2022). A pressão arterial é aumentada pela redução do diâmetro dos vasos sanguíneos, que é comumente causada pelas placas ateroscleróticas, ruptura da camada íntima endotelial ou compressão por outros tecidos (Mcclary e Massey, 2023). Tanto os níveis médios de pressão arterial, quanto a variação de pressão arterial em um curto espaço de tempo, promovem danos cardiovasculares como o aumento da espessura da íntima-média da artéria carótida e aumento da velocidade de pulsação da artéria carótida-femoral (Tatasciore *et al.*, 2020). Além disso, o processo de aterosclerose progressiva pode afetar os membros inferiores e causar a doença arterial periférica. Para avaliação vascular não invasiva, o índice tornozelo-braquial (ITB) é utilizado como uma medida precisa do fluxo sanguíneo dos membros inferiores (Casey *et al.*, 2019).

Entre os marcadores tradicionais de risco cardiovascular está o perfil lipídico. Evidências apontam o papel causal central da aterosclerose no acúmulo de remanescentes de lipoproteínas ricos em colesterol, com destaque para a LDL-c (Borén *et al.*, 2022). Inicialmente os lipídeos da dieta são absorvidos como quilomícrons no intestino, e pelo metabolismo transformam-se no fígado em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-c), e no tecido muscular e adiposo são metabolizados em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL-c). As IDL-c podem ser captadas novamente pelo fígado e posteriormente transformadas em LDL-c, partículas que, em excesso, acumulam-se nas artérias. Neste sentido, originada também no fígado, a HDL-c pode fazer o transporte reverso do colesterol, evitando o acúmulo nas artérias (Feingold, 2022). Assim, índices que relacionam a proporção das diferentes lipoproteínas aterogênicas com a HDL-c, como o Índice de Castelli I e II, são marcadores que evidenciam o risco cardiovascular (Drwila *et al.*, 2022). Além disso, as Apolipoproteína B (Apo B) são responsáveis pelo depósito de colesterol nas artérias (Sniderman *et al.*, 2019), enquanto as Apolipoproteína A (Apo A) exercem um papel anti-aterogênico, realizando o efluxo do colesterol das artérias, aceitando as partículas que efluem dos macrófagos na parede arterial e se caracterizando com funções cardioprotetoras bem definidas (Cochran *et al.*, 2021).

Além disso, o descontrole glicêmico está associado às alterações subclínicas presentes no desenvolvimento da doença aterosclerótica. Desse modo, marcadores como glicemia em

jejum, hemoglobina glicada e insulina são fundamentais para compreensão das disfunções metabólicas relacionadas a eventos cardiovasculares (Honigberg *et al.*, 2021). Além dos marcadores glicêmicos tradicionais, evidências apontam que o índice triglicéridos-glicose (TyG) é um biomarcador confiável para avaliação da resistência à insulina e prognóstico para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (Tao *et al.*, 2022). Ademais, a resistência à insulina também é diagnosticada pela medição do Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR), e a sensibilidade à insulina pelo Modelo de Avaliação da Homeostase da Atividade do Pâncreas (HOMA- β), que são caracterizados por serem modelos simples e amplamente utilizados (Cheng *et al.*, 2020; Tahapary *et al.*, 2022).

Tradicionalmente, o ácido úrico (AU) é um marcador do desenvolvimento da artrite gotosa (Keller e Mandell *et al.*, 2021). No entanto, a hiperuricemia também exerce um papel fundamental no mecanismo fisiopatológico do aumento do estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial (Nakanishi *et al.*, 2022). Assim, níveis elevados deste marcador comumente são observados em pacientes com síndrome metabólica e, por este motivo, este é amplamente aceito como fator de risco para as doenças cardiovasculares (Copur *et al.*, 2022).

É necessário destacar que a alimentação pode atuar como fator de risco ou proteção para o desenvolvimento das alterações metabólicas e cardiovasculares. E, dado a relevância das repercussões em saúde, diversos alimentos vêm sendo estudados para avaliar a redução do risco cardiometabólico (Baumgartner *et al.*, 2020; Companys *et al.*, 2021; Escalante-Araiza *et al.*, 2021).

3.3 Kombucha: histórico e caracterização

A kombucha é uma bebida originada na China, tradicionalmente preparada por meio da fermentação de folhas de *Camellia sinensis* (chá preto, verde, branco ou vermelho), com adição de açúcar. Esta bebida é caracterizada pela inoculação de um biofilme de bactérias e leveduras chamado SCOBY (Júnior *et al.*, 2022). O SCOBY consiste em uma película de celulose polimérica, formado principalmente pela atividade de cepas do gênero *Acetobacter* (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*). E a simbiose entre os microrganismos, bem como o ambiente ácido impedem o crescimento de potenciais contaminantes (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Ademais, a bebida também contém bactérias do gênero *Gluconobacter*

(*Gluconobacter oxydans*), bactérias lácticas (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) e leveduras (*Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis* sp., *Pichia* spp., *Brettanomyces* sp.) (Greenwalt *et al.*, 2000; Watawana *et al.*, 2015; Vina *et al.*, 2014).

A literatura aponta que a kombucha é uma bebida que começou a ser consumida há 220 a.C na região nordeste da China e se popularizou no país durante a dinastia “*Tsin*”, por conta das crenças nas atribuições desintoxicantes e energéticas da bebida. Em 414 d.C um médico coreano chamado Kombu introduziu a bebida no Japão para tratamento da doença intestinal do imperador do país, e devido a este fato, foi nomeada “kombucha” em homenagem ao médico (Chakravorty *et al.*, 2019a; Chakravorty *et al.*, 2019b). Por meio das rotas marítimas comerciais, a kombucha chegou até a Rússia e a comercialização expandiu-se para Alemanha e Itália, principalmente após a Segunda Guerra Mundial. Em 1950 ganhou popularidade também na França e norte da África (Jayabalan *et al.*, 2016). E atualmente, a kombucha é consumida mundialmente por conta das propriedades funcionais alegadas (Junior *et al.*, 2022).

O processo de fermentação da kombucha consiste na formação de compostos ácidos, microrganismos e uma pequena quantidade de álcool (Abaci *et al.*, 2022). A literatura aponta que o tipo de chá utilizado, a quantidade de açúcar, o tempo e a temperatura de fermentação influenciam na concentração de ácidos orgânicos, vitaminas, compostos fenólicos e teor alcoólico final da kombucha (Miranda *et al.*, 2022). Devido ao fato de as bactérias serem predominantemente acéticas, o principal produto final da fermentação é o ácido acético, por meio da fermentação do etanol produzido pelas leveduras (Junior *et al.*, 2022). No entanto, diferentes tipos de ácidos são encontrados na kombucha, como o cítrico, málico, glucônico, glucurônico, carbônico, tartárico e láctico (Vitas *et al.*, 2018; Chakravorty *et al.*, 2019a; Chakravorty *et al.*, 2019b; Zubaidah *et al.*, 2019). Entre os açúcares encontrados na kombucha, os principais são: glicose, frutose e sacarose. A kombucha também contém aminoácidos, ferro, zinco, manganês e vitaminas do complexo B e C (Jayabalan *et al.*, 2014; Jayabalan *et al.*, 2016; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Abuduaibifu e Tamer, 2019; Rahmani *et al.*, 2019). Além disso, a kombucha é rica em compostos fenólicos, como flavonóides e ácido fenólicos, com grande destaque para as catequinas e seus derivados, como a epicatequina e epigalocatequina (Leal *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2020)

Em 2001, foi demonstrado o potencial antimicrobiano da kombucha pela inibição do crescimento de bactérias patogênicas como *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* (Sreeramulu *et al.*, 2000). Em um estudo com radicais livres

in vitro, foram observadas altas atividades antioxidantes da kombucha (Chu e Chen, 2006). Em ratos diabéticos, o consumo de kombucha de chá preto (150 mg de extrato liofilizado/kg de peso corporal por 14 dias) promoveu efeito hipoglicemiante e antidiabético (Bhattacharya *et al.*, 2013). Em um trabalho experimental com ratos, o consumo de kombucha de chá verde (5 mL por kg de peso corporal em 16 semanas) atenuou a dislipidemia induzida pela dieta, com redução de colesterol total, triglicerídeos (TG), LDL-c, VLDL-c (Bellassoued *et al.*, 2015). De modo similar, em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e frutose, a kombucha de chá verde melhorou o metabolismo da glicose, a capacidade antioxidante total do plasma, a atividade da SOD e reduziu as concentrações de ON e TG (Cardoso *et al.*, 2021). Ademais, em modelo aterogênico experimental, a kombucha de chá verde aumentou a defesa antioxidante e reduziu a peroxidação lipídica (Costa *et al.*, 2021).

Um estudo que comparou kombuchas produzidas a partir de diferentes tipos de chás (chás branco, verde, preto e vermelho), observou que o chá verde apresentou potencial antioxidante mais significativo em relação aos demais (Jakubczyk *et al.*, 2020). O chá verde, que é fermentado pelo SCOBY, é naturalmente rico em epicatequina, epigallocatequina, epicatequina galato e epigallocatequina galato, e estes compostos são capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Musial *et al.*, 2020). Neste sentido, evidências têm destacado que em estudos *in vitro* e com animais, os compostos fenólicos do chá verde, em especial a epigallocatequina-3-galato (EGCG) possuem efeitos positivos contra diversas patologias, como diabetes e doenças cardiovasculares (Khan e Mukhtar *et al.*, 2018).

De acordo com testes microbiológicos e bioquímicos prévios, sabe-se que a ingestão de kombucha é segura para seres humanos (Food and Drug Administration, 1995). Ademais, um estudo experimental com ratos que avaliou o consumo de kombucha (2mL/kg) por 90 dias não observou nenhum tipo de toxicidade da bebida (Vijayaraghavan *et al.*, 2000). De forma similar, um outro estudo com ratos demonstrou que doses altas das bebidas não provocam efeitos adversos, quando preparadas em condições higiênico-sanitárias apropriadas (Pauline *et al.*, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura e Pecuária definiu os padrões de identidade e qualidade da kombucha pela Instrução Normativa 41. Por meio dessa, foram definidos pH, pressão, teor alcoólico e de acidez que devem ser respeitados e que são seguros para à saúde (MAPA, 2019).

Apesar dos estudos *in vitro* e experimentais demonstrarem o efeito da kombucha sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco cardiometabólico, estudos que avaliam o efeito da kombucha na saúde humana são escassos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do consumo diário de kombucha de chá verde, associado a uma dieta com restrição calórica (-500 kcal), sobre os marcadores de estresse oxidativo e de risco cardiometabólico em indivíduos com excesso de peso.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar os participantes quanto às variáveis antropométricas, de composição corporal e risco cardiometabólico;

Artigo 1:

- ✓ Avaliar o efeito do consumo de kombucha de chá verde sobre:
 - Marcadores endoteliais (ICAM, VCAM, CD-36, ITB, pressão arterial sistólica e diastólica);
 - Estresse oxidativo (SOD, FRAP, GPx, GR, LDL-ox, MDA, ON e H₂O₂);
- ✓ Verificar a associação entre os marcadores do estresse oxidativo e saúde endotelial.

Artigo 2:

- ✓ Avaliar o efeito do consumo de kombucha de chá verde sobre:
 - Perfil lipídico (CT, LDL-c, HDL-c, VLDL-c, TG, Apo A e Apo B);
 - Perfil glicídico (glicose, insulina e hemoglobina glicada);
 - Ácido úrico;
- ✓ Calcular e comparar os índices de Castelli I e II, TyG, HOMA-IR, HOMA- β e Índice ApoA/ApoB entre os grupos controle e kombucha.

5 HIPÓTESE

Baseado na necessidade de comprovar as evidências apresentadas *in vitro* e em animais acerca dos efeitos fisiológicos e metabólicos do consumo de kombucha de chá verde, o presente trabalho tem como hipóteses que um grupo de indivíduos com excesso de peso que consumiu kombucha de chá verde (200mL/dia), associado a uma dieta restrita em calorias (-500 kcal) durante 10 semanas, terá resultados benéficos adicionais relacionados aos marcadores de estresse oxidativo e risco cardiometabólico, quando comparado ao grupo de indivíduos que apenas seguiu uma dieta com restrição calórica.

6 METODOLOGIA

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Metabolismo Energético e de Composição Corporal (LAMECC) do Departamento de Nutrição e Saúde em conjunto com o Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), ambos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

6.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (CAAE: 25880819.3.0000.5153; número: 3.948.033) e pelo Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) (número: RBR-9832wsx). Além disso, os procedimentos descritos estão de acordo com a Resolução CNS/466 de 2012 e Declaração de Helsinki. Todos participantes que concordaram com os termos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2), em duas cópias, e foram informados quanto aos benefícios e riscos inerentes à pesquisa. A identificação dos participantes está mantida em sigilo pelos pesquisadores e os dados serão arquivados por cinco anos após o término da pesquisa.

Ao final do estudo, todos exames foram entregues aos participantes, e todos aqueles que demonstraram interesse receberam 200 mL de kombucha de chá verde, 30g de SCOBY e uma cartilha com a explicação de como produzir kombucha.

6.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo clínico, randomizado controlado, envolvendo dois grupos experimentais paralelos – grupo controle (GC) e grupo kombucha (GK):

- ✓ Restrição calórica (-500 kcal/dia) sem consumo de kombucha (GC);
- ✓ Restrição calórica (-500 kcal/dia) + kombucha de chá verde (200mL/dia) (GK).

6.3 Critérios de inclusão

Os participantes elegíveis para o estudo atenderam aos seguintes critérios:

- ✓ Homens e mulheres com idade entre 18 e 45 anos;
- ✓ Índice de massa corporal (IMC) igual ou acima de 27 kg/m²;
- ✓ Percentual de gordura corporal >25% para homens e >30% para mulheres;
- ✓ Perímetro da cintura \geq 94cm para homens e \geq 80cm para mulheres.

6.4 Critérios de não inclusão

Não foram incluídos participantes:

- ✓ Gestantes, lactantes ou na menopausa;
- ✓ Atletas;
- ✓ Fumantes;
- ✓ Com instabilidade ponderal (2% do peso usual) nos últimos 3 meses;
- ✓ Com pressão arterial elevada (>140 e/ou 90 mmHg);
- ✓ Com diagnóstico de diabetes *mellitus*;
- ✓ Com histórico de doença ou alterações digestivas, hepática, renal, cardiovascular, tireoide, câncer, doenças inflamatórias, e desordens alimentares;
- ✓ Com episódio infeccioso nos últimos 3 meses;
- ✓ Que fizeram o uso de medicamentos anti-inflamatórios, corticoides, antibióticos e outros que possam afetar o apetite e metabolismo energético nos últimos 3 meses;

- ✓ Com histórico de abuso de drogas e/ou álcool;
- ✓ Com consumo de álcool > 21 unidades por semana para homens e > 14 unidades por semana para mulheres;
- ✓ Com aversão a kombucha;
- ✓ Com hábito de consumir kombucha ou outros alimentos fermentados, chás verde, branco ou preto.

6.5 Cálculo amostral

O cálculo amostral do presente estudo foi realizado por meio do *software* G*Power versão 3.1.9.6, considerando um tamanho de efeito de 0,8 entre os valores de duas médias independentes de antioxidantes séricos totais, de um estudo clínico randomizado que avaliou o efeito da suplementação do chá verde, durante três meses, sobre o perfil antioxidante de indivíduos com obesidade (Suliburska *et al.*, 2012). Para o cálculo foi utilizado um poder de 95% e significância estatística de 5%. O número amostral mínimo foi de 30 indivíduos por grupo, e quando considerado 30% de perdas, 40 indivíduos por grupo.

6.6 Recrutamento e triagem

Os participantes do estudo foram recrutados na comunidade local (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) por meio da divulgação do estudo nas redes sociais e jornais locais, deixando à disposição um telefone para contato e um questionário de pré-triagem *online* no *Google* formulários. Os participantes que entraram em contato com a equipe do projeto por telefone, assim como os demais, foram direcionados para o preenchimento do questionário de pré-triagem *online*. Este questionário continha perguntas estabelecidas por meio dos critérios de inclusão e não inclusão para uma pré-triagem dos participantes. Aqueles que atenderam aos critérios de inclusão, foram chamados para uma triagem presencial, em que houve um maior detalhamento acerca das informações clínicas, dietéticas, sociodemográficas, antropométricas, de composição corporal e pressão arterial (APÊNDICE 1).

Durante a triagem presencial, os participantes elegíveis também foram informados sobre todos os procedimentos do estudo, e os que estavam de acordo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) em duas cópias (APÊNDICE 2). Ainda, na ocasião da primeira visita, os participantes selecionados foram orientados quanto aos requisitos necessários para a coleta de sangue.

6.7 Run-in

Foi realizado um período de *run-in*, ou pré-tratamento, de uma semana para identificar e excluir participantes com probabilidade de não aderir ao protocolo da pesquisa. Nesta fase, os participantes tinham que manter sua dieta habitual e fazer restrição de consumo de qualquer tipo de chás, alimentos e bebidas fermentadas. Ao final do período de *run-in*, os participantes foram pesados e aqueles que apresentaram variação no peso corporal superior a 2% em relação ao peso da triagem, ou que reportaram o consumo de algum dos alimentos e/ou bebidas restringidos, foram excluídos do estudo.

6.8 Randomização

Após o período de *run-in*, os participantes foram alocados na proporção de 1:1 em um dos dois grupos de intervenção – GC ou GK. Para a randomização dos participantes foi realizado o método de minimização, considerando fatores prognósticos definidos pelos pesquisadores: sexo, idade e IMC, conforme descrito por Abramson (2011). Para o processo de randomização foi utilizado o *software* MinimPy, versão 0.2 (Copyright, Mahmoud Saghaei, 2010-2011).

6.9 Desenho do estudo

Ao início do estudo, aqueles participantes que atenderam aos critérios de inclusão tiveram aferidas as medidas antropométricas, de composição corporal e preencheram o *Three Factor Eating Questionnaire* (TFEQ-21), para rastreamento de possíveis desordens alimentares. Após passarem pelo período de *run-in*, fizeram a coleta de sangue, aferição da pressão arterial e ITB e foram aleatoriamente randomizados. De acordo com o grupo de alocação, seguiram

planos alimentares com restrição calórica (-500 kcal/dia) e não consumiram chás ou alimentos fermentados (GC) ou seguiram planos alimentares com restrição calórica (-500 kcal/dia) e fizeram consumo diário de kombucha de chá verde (200mL) (GK) pelo período de 10 semanas. Adicionalmente, de 15 em 15 dias os participantes receberam mensagens para confirmação da adesão à dieta e na metade do estudo houve uma consulta de retorno. Além disso, semanalmente, os participantes do GK tiveram que comparecer ao laboratório para a entrega das embalagens da kombucha para controle de consumo. Ao final do estudo, a coleta de sangue, aferições de pressão arterial e ITB foram realizadas novamente. Durante o período de intervenção os participantes foram orientados a manter o nível de atividade física habitual, que foi avaliado ao início e ao final do estudo por meio do questionário internacional de atividade física (IPAQ) versão curta (**Figura 1**).

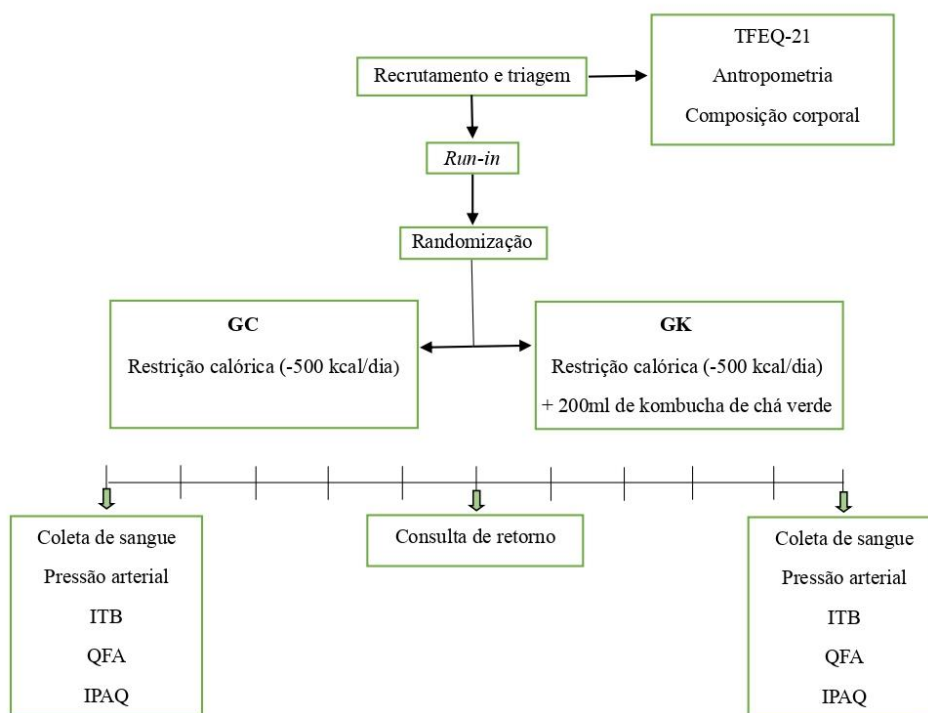


Figura 1. Desenho experimental do estudo

GC = grupo controle; GK = grupo kombucha; ITB = índice tornozelo-braquial; IPAQ = International Physical Activity Questionnaires (short version); QFA = Questionário de Frequência Alimentar; TFEQ-21 = Three Factor Eating Questionnaire - versão 21.

6.10 Intervenção

A intervenção deste estudo consistiu em uma dieta com restrição calórica associada ao consumo diário de kombucha de chá verde (GK) ou apenas uma dieta com restrição calórica (GC), conforme o grupo de alocação, durante 10 semanas.

Além disso, a kombucha de chá verde foi produzida e caracterizada no Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV. Para produção da kombucha, foi utilizado o chá verde da marca *Amaya*, cultivado na cidade de Registro, São Paulo – Brasil, na concentração de 12g/L. A preparação do chá seguiu a recomendação do fabricante, com infusão à 75°C por um período de 1 minuto. A adição do chá de arranque foi realizada até que a bebida no dia 0 de fermentação tivesse um pH inicial de 4,4. Além disso, o tempo de fermentação foi de 5 dias à 25°C. A kombucha foi armazenada em recipientes de plástico (fermentadores) com capacidade para 20L e envasadas em garrafas plásticas com capacidade de 200mL.

6.11 Planos alimentares

De acordo com as recomendações atuais para o tratamento nutricional da obesidade, foram prescritos planos alimentares calculados conforme o *Estimated Energy Requirement* (EER) para pessoas adultas com excesso de peso e obesidade (IOM, 2002), com restrição calórica de 500 kcal/dia para todos os participantes.

Cada participante recebeu 5 planos alimentares isocalóricos contendo 5 refeições: café da manhã, colação, almoço, lanche da tarde e jantar. Adicionalmente, foi entregue uma lista de substituição dividida por grupos de alimentos, orientações nutricionais gerais sobre alimentação saudável e um caderno com receitas de preparações que foram incluídas nos planos alimentares.

Para avaliação da adesão aos planos alimentares prescritos, foram aplicados ao início e ao final do estudo questionários de frequência alimentar (QFA), que foram digitalizados no software ERICA-REC24h (Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes), e analisados por meio da comparação com a tabela de composição dos alimentos desenvolvida pela Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2008-2009).

6.12 Coletas de amostras biológicas

Ao início do estudo e após as 10 semanas de intervenção, foram coletadas amostras de sangue para as análises dos marcadores de estresse oxidativo, saúde endotelial e cardiometabólica. As coletas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas (LACDSA/UFV) por um técnico (a) em enfermagem habilitado. O sangue foi imediatamente adicionado a tubos de sorologia e EDTA. Metade do material coletado foi armazenado no LACDSA para análises dos marcadores: CT, LDL-c, HDL-c, VLDL-c, TG, ácido úrico, glicose, insulina, hemoglobina glicada e apolipoproteínas A e B; enquanto outra parte do sangue foi transportada em condições ideais até o Laboratório de Análises Clínicas (LAC-DNS/UFV) para análise de: ON, SOD, MDA, FRAP, H₂O₂, GPx, GR, LDL-ox, ICAM, VCAM e CD36. Ao chegar no LAC-DNS/UFV, o sangue foi imediatamente centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro e plasma. O material então foi aliquotado em eppendorfs de 1,5mL e armazenado em ultrafreezer a -80° C para posteriores análises.

6.13 Avaliações e mensurações

6.13.1 Variáveis de caracterização dos participantes

Os participantes foram caracterizados quanto às variáveis antropométricas e de composição corporal. O peso e a composição corporal foram avaliados por meio da técnica de bioimpedância elétrica tetrapolar (Bioimpedância tetrapolar, Inbody, modelo Y230), com a estimação do percentual de gordura corporal total, porcentagem de massa magra e porcentagem de água corporal total, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Já a altura foi determinada por meio de antropômetro vertical milimetrado, com extensão de 2,2 m e escala de 0,5 cm. Além disso, seguindo protocolos específicos, os perímetros da cintura, quadril e pescoço foram aferidas em triplicata, utilizando-se fita métrica inelástica. Por meio dos valores obtidos, foi calculada a relação cintura/quadril (Brasil, 2011).

6.13.2 Marcadores da saúde endotelial

As análises de ICAM, VCAM e CD36 foram realizadas por meio da técnica de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) utilizando os kits “Human ICAM/CD54” e “Human

VCAM/CD106” da marca Elabscience Biotechnology e “Human Cluster of differentiation 36” da marca MyBioSource, seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes.

6.13.3 Marcadores do estresse oxidativo

Os marcadores SOD, ON, FRAP, MDA e H_2O_2 foram determinados por meio de amostras do plasma em ensaios colorimétricos realizados em triplicata. A SOD foi determinada de acordo com o método de Marklund e Marklund (1974), que considera a redução da razão de auto-oxidação do pirogalol como base na catalisação da reação do superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , que também foi estimado por meio da ação enzimática de peroxidases (Aebi, 1984). A dosagem de ON plasmático foi realizada conforme dispõem Grisham, Johnson e Lancaster (1996), utilizando-se a curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio que variam de 0-125 μ M. Já a dosagem do MDA estimou a peroxidação lipídica por meio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como disposto por Buege e Aust (1978). Enquanto o FRAP foi realizado com base na redução de íons férricos em ferrosos por meio da adição de uma amostra com atividade redutora, como determina Benzie e Strain (1996). A avaliação das concentrações plasmáticas de LDL-ox foi realizada por meio da técnica de ELISA, utilizando o kit comercial denominado “Human OxLDL” da marca Elabscience Biotechnology, e de GPx e GR por meio dos kits “Human Glutathione Peroxidase 3” e “Human Glutathione Reductase” da marca MyBioSource, de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante.

6.13.4 Marcadores tradicionais da saúde cardiometabólica

As análises de ácido úrico, dos marcadores do perfil lipídico e glicídicos foram realizadas no LACDSA/UFV de acordo com os protocolos do laboratório, por meio do método cinético UV com o equipamento analisador bioquímico BS 200 ®.

Os índices de Castelli I e II foram calculados por meio da divisão CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c, respectivamente (Castelli, 1988). Já os valores de HOMA foram obtidos por meio das seguintes fórmulas: $HOMA-IR = [(insulinemia \text{ de jejum (mU/L)} \times glicemia \text{ de jejum (mmol/L)})/22,5]$ e o $HOMA-\beta = (20 \times insulina \text{ jejum (MICRO UI/mL)}) / (glicose \text{ jejum (mmol/L}^*) - 3,5)$ (Matthews *et al.*, 1985). Enquanto o índice TyG foi calculado de acordo com a fórmula: $TyG = Ln [(triglicerídeos \text{ de jejum (mg/dL)}) \times (glicemia \text{ de jejum (mg/dL)})/2]$ (Simental-Mendía *et al.*, 2008).

A pressão arterial dos participantes foi aferida por meio de um medidor de pressão automático Omron® modelo HEM-7113. Neste momento, o participante estava sentado, com as pernas descruzadas, pés apoiados no chão, de bexiga vazia, dorso encostado, livre de roupas nos braços, palma da mão voltada para cima e braço na altura do coração, como recomenda as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - 2020 (Barroso *et al.*, 2021). Ambos os braços foram aferidos e em caso de diferença entre os dois, o braço com maior valor foi aferido novamente, e a média dos valores foi adotada (WHO, 2007).

Para aferição do ITB foi utilizado Doppler vascular portátil (MEDMEGA®, DV 610B) associado a um esfigmomanômetro. O ITB foi calculado com base nos valores de aferição da PAS dos lados direito e esquerdo das artérias braquial, pediosa e tibial posterior. O cálculo consistiu na razão entre a maior PAS do membro inferior (artéria pediosa ou tibial posterior) e a PAS braquial do lado correspondente. Como recomenda Kim, Wattanakit e Gornik (2012), foi adotado o valor de ITB que apresentou menor valor entre os lados direito e esquerdo.

6.14 Monitoramento da adesão ao protocolo do estudo

Para verificar a adesão dos participantes ao protocolo do estudo, de 15 em 15 dias foi enviada uma mensagem via *WhatsApp* ou *Email* para perguntar aos participantes sobre o seguimento do plano alimentar. Na metade do estudo aconteceu uma visita de retorno para avaliação do peso, medidas antropométricas e de composição corporal, além da aplicação de um questionário de adesão ao protocolo do estudo (APÊNDICE 4). Ainda, os participantes do grupo kombucha receberam fichas de registro do consumo da kombucha (APÊNDICE 5).

6.15 Critérios de descontinuidade do estudo

Ao longo das 10 semanas, os participantes do grupo kombucha que não consumiram a bebida por três ou mais dias seguidos ou que apresentaram reações adversas ao consumo da kombucha foram excluídos do estudo. Além disso, aqueles participantes que não adeririam ao protocolo do estudo ou fizeram uso de medicamentos do tipo corticoides ou anti-inflamatórios também foram excluídos.

6.16 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS (versão 25.0, EUA). Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para avaliar a normalidade das variáveis e a homocedasticidade das variâncias, respectivamente. O efeito do tempo nos tratamentos foi avaliado pelo teste t pareado ou pelo teste de Wilcoxon. O teste t de amostras independentes ou o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para determinar as diferenças entre os grupos. Também foi realizada ANOVA multifatorial, seguida de post-hoc de Bonferroni, para avaliar o efeito do sexo nos desfechos observados. Para avaliar a correlação entre as variáveis foi utilizado o teste de correlação de Pearson ou Spearman, com base na normalidade das variáveis. Todos os dados estão apresentados como média e desvio padrão ou mediana e valores mínimos e máximos. A significância estatística considerada foi de $\alpha=0.05$.

REFERÊNCIAS

ABACI, N.; SENOL DENIZ, F. S.; ORHAN, I. E. Kombucha – An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. **Food Chemistry: X**, v. 14, p. 100302, 2022.

ABOYANS, V. *et al.* Measurement and Interpretation of the Ankle-Brachial Index: A Scientific Statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 126, n. 24, p. 2890–2909, 11 dez. 2012.

ABRAMSON, J. H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v. 8, n. 1, p. 1, 2011.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

ASGARY, S.; RASTQAR, A.; KESHVARI, M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 37, n. 5, p. 429–455, 1 jul. 2018.

ATKINSON, F. S. *et al.* Glycemic index and insulin index after a standard carbohydrate meal consumed with live kombucha: A randomised, placebo-controlled, crossover trial. **Frontiers in nutrition**, v. 10, 17 fev. 2023.

BARROSO, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 25 mar. 2021.

BAUMGARTNER, S. *et al.* The position of functional foods and supplements with a serum LDL-C lowering effect in the spectrum ranging from universal to care-related CVD risk management. **Atherosclerosis**, v. 311, p. 116–123, out. 2020.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema da Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011.

BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328-340, 2013.

BORÉN, J. *et al.* Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in health and dyslipidaemia. **Nature Reviews Cardiology**, v. 19, n. 9, p. 577–592, 2022.

BOVOLINI, A. *et al.* Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. **International Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 03, p. 199–214, 2020.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, p. 302–310, 1978.

CARDOSO, R.R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food research international**, v. 128, 2020.

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

CASEY, S. *et al.* The reliability of the ankle brachial index: a systematic review. **Journal of Foot and Ankle Research**, v. 12, n. 1, 2019.

CASTELLI, W. P. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 4 Suppl A, p. 5A10A, 1988.

CHAKRAVORTY, S. *et al.* Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea. **Non-Alcoholic Beverages**, p. 285–327, 2019.a

CHAKRAVORTY S. *et al.* Kombucha Drink: aspects of production, quality and safety. **Production and Management of Beverages**. v. 202, p. 259–288, 2019.b

CHARRY, D. *et al.* Arterial stiffness and contralateral differences in blood pressure: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)**, v. 24, n. 7, p. 878–884, 2022.

CHENG, F. *et al.* The Reference Intervals and Roles of GIR, HOMA and QUICKI Indexes to Judge Insulin Resistance/Insufficiency for Newly Diagnosed Diabetes Mellitus. **Clinical Laboratory**, v. 66, n. 11/2020, 2020.

CHU, S.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**. v. 98, p. 502-507, 2006.

COCHRAN, B. J. *et al.* APOA1: a Protein with Multiple Therapeutic Functions. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 23, n. 3, 2021.

COMPANYS, J. *et al.* Fermented dairy foods rich in probiotics and cardiometabolic risk factors: a narrative review from prospective cohort studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 12, p. 1966–1975, 2021.

COPUR, S.; DEMIRAY, A.; KANBAY, M. Uric acid in metabolic syndrome: Does uric acid have a definitive role? **European Journal of Internal Medicine**, 2022.

COSTA, M. A. DE C. *et al.* Effect of kombucha intake on the gut microbiota and obesity-related comorbidities: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–16, 2021.

DONINI, L. M. *et al.* Definition and Diagnostic Criteria for Sarcopenic Obesity: ESPEN and EASO Consensus Statement. **Obesity Facts**, p. 1–15, 2022.

DRWIŁA, D. *et al.* Prognostic value of non-traditional lipid parameters: Castelli Risk Index I, Castelli Risk Index II, and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio among

patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction during 1-year follow-up. **Kardiologia**, v. 62, n. 9, p. 60–66, 2022.

ELAGIZI, A. *et al.* A Review of Obesity, Physical Activity, and Cardiovascular Disease. **Current Obesity Reports**, v. 9, 2020.

ESCALANTE-ARAIZA, F.; GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G. Traditional Mexican foods as functional agents in the treatment of cardiometabolic risk factors. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 8, p. 1353–1364, 2020.

FEINGOLD, K. R. Lipid and Lipoprotein Metabolism. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 51, n. 3, p. 437–458, 2022.

FAN, J.; WATANABE, T. Atherosclerosis: Known and unknown. **Pathology International**, v. 72, n. 3, p. 151–160, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). FDA cautions consumers on “Kombucha Mushroom Tea”(News release). Washington, DC: US Department of Health and Human Services. **Public Health Service, Food and Drug Administration**, p. 29-54, 1995.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 2021.

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

GALASSO, M. *et al.* Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 264–272, 20 ago. 2021.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 976–981, 2000.

GRISHAM, M. B. *et al.* Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. In: **Methods in enzymology**. p. 237-246, 1996.

HONIGBERG, M. C. *et al.* Cardiovascular and Kidney Outcomes Across the Glycemic Spectrum. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 78, n. 5, p. 453–464, 2021.

HEALTH, T. L. P. Obesity prevention: changing perspectives. **The Lancet Public Health**, v. 8, n. 3, p. e161, 2023.

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. -. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=250002>.

IOM. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 11, p. 1621–1630, 2002.

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

JAYABALAN, R. *et al.* A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538–550, 21 jun. 2014.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. **Reference Module in Food Science**, 2016.

JEBARI-BENSLAIMAN, S. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3346, 2022.

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

KATAKAMI, N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, n. 1, p. 27–39, 1 jan. 2018.

KATTOOR, A. J. *et al.* Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, v. 19, n. 11, p. 42, 2017.

KELLER, S. F.; MANDELL, B. F. Management and Cure of Gouty Arthritis. **Medical Clinics of North America**, v. 105, n. 2, p. 297–310, 2021.

KEELEY, T. *et al.* Resistance to visceral obesity is associated with increased locomotion in mice expressing an endothelial cell-specific fibroblast growth factor 1 transgene. **Physiological Reports**, v. 7, n. 7, p. e14034, 2019.

KIM, E. S. H.; WATTANAKIT, K.; GORNIK, H. L. Using the ankle-brachial index to diagnose peripheral artery disease and assess cardiovascular risk. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 79, n. 9, p. 651–661, 2012.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 39, 2018.

KHOSRAVI, M. *et al.* The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. **Biological Chemistry**, v. 400, n. 6, p. 711–732, 2019.

KOENEN, M. *et al.* Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. **Circulation Research**, v. 128, n. 7, p. 951–968, 2021.

KOLIAKI, C.; LIATIS, S.; KOKKINOS, A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. **Metabolism**, v. 92, n. 92, 2018.

LI, M. *et al.* Novel Diagnostic Biomarkers Related to Oxidative Stress and Macrophage Ferroptosis in Atherosclerosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 8917947, 2022.

LEAL, M. J. *et al.* A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.

LEE, C. *et al.* Hepatoprotective Effect of Kombucha Tea in Rodent Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.9, p.2369, 2019.

LIANG, S. *et al.* The critical role of endothelial function in fine particulate matter-induced atherosclerosis. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 17, n. 1, dez. 2020.

LIBBY, P. The changing landscape of atherosclerosis. **Nature**, v. 592, n. 7855, p. 524–533, 2021.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 41, de 17 de setembro de 2019. **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 13-15, 2019.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTÍNEZ-LEAL, J. *et al.* A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

MARCHIO, P. *et al.* Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–32, 2019.

MATTHEWS. D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.

MCCLARY, K. N.; MASSEY, P. Ankle Brachial Index. **StatPearls**. 2023.

MEDINA-LEYTE, D. J. *et al.* Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 3850, 2021.

MENDELSON, C. *et al.* Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes – a randomized controlled pilot investigation. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1190248, 2023.

MIRANDA, J. F. *et al.* Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503–527, 14 jan. 2022.

MUSIAL, C.; KUBAN-JANKOWSKA, A.; GORSKA-PONIKOWSKA, M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1744, 2020.

NAKANISHI, K.; MORITA, H. Uric Acid. **International Heart Journal**, v. 63, n. 3, p. 423–425, 2022.

PAULINE, T. *et al.* Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of Kombucha tea. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 14, n. 3, p. 207-213, 2001.

PILIPENKO, V. I. *et al.* Efficacy of newly developed kombucha-based specialized food product for treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome. **Voprosy Pitaniia**, v. 91, n. 5, p. 95–104, 2022.

POREDOS, P.; POREDOS, A. V.; GREGORIC, I. Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. **Angiology**, v. 72, n. 7, p. 604–615, 2021.

POWELL-WILEY, T. M. *et al.* Obesity and Cardiovascular disease: a Scientific Statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 143, n. 21, 2021.

RAHMANI, R. *et al.* Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity. **Food Bioscience**, v. 30, p. 100414, 2019.

REN, J. *et al.* Obesity Cardiomyopathy: Evidence, Mechanisms and Therapeutic Implications. **Physiological Reviews**, 2021.

RIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972.

RUBAN, A. *et al.* Current treatments for obesity. **Clinical Medicine**, v. 19, n. 3, p. 205–212, 2019.

SAFAEI, M. *et al.* A Systematic Literature Review on obesity: Understanding the Causes & Consequences of Obesity and Reviewing Various Machine Learning Approaches Used to Predict Obesity. **Computers in Biology and Medicine**, v. 136, p. 104754, 2021.

SAI RAM, M. *et al.* Effect of Kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 235-240, 2000.

SASIKALA, T. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 is a surrogate biomarker for subclinical atherosclerosis in Type 2 diabetes mellitus. **Biomarkers in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 121–132, 2021.

SHU, H. *et al.* The role of CD36 in cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 118, n. 1, p. 115–129, 3 nov. 2020.

SIKAND, G.; KRIS-ETHERTON, P.; BOULOS, N. M. Impact of Functional Foods on Prevention of Cardiovascular Disease and Diabetes. **Current Cardiology Reports**, v. 17, n. 6, 2015.

SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The Product of Fasting Glucose and Triglycerides as Surrogate for Identifying Insulin Resistance

in Apparently Healthy Subjects. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 6, n. 4, p. 299-304, 2008.

SNIDERMAN, A. D. *et al.* Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease. **JAMA Cardiology**, 2019.

SRI ISWARI, R.; DAFIP, M.; PURWANTOYO, E. Malondialdehyde (MDA) Production in Atherosclerosis Supplemented with Steamed Tomato. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 3, p. 319–325, 15 fev. 2021.

SULIBURSKA, J. *et al.* Effects of Green Tea Supplementation on Elements, Total Antioxidants, Lipids, and Glucose Values in the Serum of Obese Patients. **Biological Trace Element Research**, v. 149, n. 3, p. 315–322, 2012.

TAHAPARY, D. L. *et al.* Challenges in the diagnosis of insulin resistance: Focusing on the role of HOMA-IR and Tryglyceride/glucose index. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 16, n. 8, p. 102581, 2022.

TAO, L.-C. *et al.* Triglyceride-glucose index as a marker in cardiovascular diseases: landscape and limitations. **Cardiovascular Diabetology**, v. 21, n. 1, 2022.

TATASCIORE, A. *et al.* From short-term blood pressure variability to atherosclerosis: Relative roles of vascular stiffness and endothelial dysfunction. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 22, n. 7, p. 1218–1227, 2020.

TCHANG, B. G.; SAUNDERS, K. H.; IGEL, L. I. Best Practices in the Management of Overweight and Obesity. **Medical Clinics of North America**, v. 105, n. 1, p. 149–174, 2021.

VILLARREAL-SOTO, S. A. *et al.* Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.

VIJAYARAGHAVAN, R. *et al.* Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 13, n. 4, p. 293–299, 2000.

VĪNA, I. *et al.* Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 2, p. 179–188, 2014.

VITAS, J. S. *et al.* Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 95–102, 2018.

WATAWANA, M. I. *et al.* Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

WHO. World Health Organization. Prevention of Cardiovascular Disease Prevention of Cardiovascular Disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. Geneva, 2007.

WHO. World Health Organization. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-over-weight#:~:text=Of%20these%20over%20650%20million%20adults%20were%20obese.,triple%20between%201975%20and%202016>. Acessado em 12 de maio de 2023.

XU, Z. *et al.* Measurement of visceral fat and abdominal obesity by single-frequency bioelectrical impedance and CT: a cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 11, n. 10, p. e048221, 2021.

YU, J. *et al.* Serum VCAM and ICAM measurement assists for MACE risk estimation in ST-segment elevation myocardial infarction patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 10, p. e24685, 2022.

ZHANG, T. *et al.* Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein: new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, 2019.

ZHAO, H. *et al.* Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 35, p. 6939–6957, 2021.

ZUBAIDAH, E. *et al.* Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit Kombucha, black tea Kombucha and metformin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 465–469, 2019.

7 RESULTADOS

7.1 Article 1

Effect of regular green tea kombucha (*Camellia sinensis*) consumption on oxidative stress and endothelial health in individuals with excess weight: a randomized, controlled clinical trial

* It will be submitted to the British Journal of Nutrition (Impact factor: 4.1)

Abstract

Kombucha is a fermented beverage rich in bioactive compounds. In the *in vitro* and experimental animal studies, this beverage has demonstrated high antioxidant capacity. In this sense, the objective of this study was to evaluate the effect of daily consumption of green tea kombucha on oxidative stress and endothelial health in individuals with excess weight. This is a randomized controlled clinical trial, lasting 10 weeks, during which the control group followed a healthy -500 kcal/day energy-restricted diet, while the kombucha group, in addition to the energy-restricted diet, consumed 200 mL of kombucha green tea daily. At the beginning and end of the study, markers of oxidative stress and endothelial health were evaluated. The significance level adopted in the statistical analyses was set at 5%. The kombucha consumption reduced hydrogen peroxide (H₂O₂) compared to the control group ($p=0.006$). Furthermore, the kombucha group increased the ankle-brachial index (ABI) compared to the baseline ($p=0.014$); without differences between the groups ($p=0.988$). The other markers evaluated unchanged after the kombucha consumption. In conclusion, daily consumption of 200 mL of green tea kombucha for 10 weeks reduced the pro-oxidant radical hydrogen peroxide, without altering other markers of oxidative stress and endothelial health in individuals with excess weight compared to the control group.

Keywords: Fermented Beverages; Hydrogen Peroxide; Ankle Brachial Index; Atherosclerosis

Introduction

Excess visceral adiposity and abdominal obesity are related to increased cardiovascular risk ⁽¹⁾. The World Health Organization estimates that 17.9 million deaths each year are caused by cardiovascular diseases globally ⁽²⁾. In this sense, the literature has been dedicated to studying the mechanisms involved in developing cardiovascular diseases, mainly those caused by modifiable risk factors ⁽³⁾. The pathogenesis of atherosclerosis, one of the main causes of acute myocardial infarction, is mainly explained by the process of aggression to the vascular endothelium, which begins with the accumulation of oxidized lipids in the wall of the endothelial intimal layer, forming an atheroma plaque that obstructs the passage of blood flow ^(4,5).

Endothelial dysfunction promotes impairments related to vascular tone, fluid exchange, and angiogenesis, and is characterized as one of the key processes in the pathophysiology of atherosclerosis ⁽⁶⁾. The vascular endothelium is formed by a single layer of endothelial cells that are in the endothelial intimal layer and performs activities such as vasodilation, inhibition of platelet aggregation, inflammation, and oxidative stress ⁽⁷⁾. In cases of endothelial instability, caused by aggression to the endothelium, the beginning of the cascade of events of atheroma plaque formation may occur, which involves the infiltration of leukocytes and recruitment of neutrophils mediated by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and by intracellular adhesion molecule-1 (ICAM) ⁽⁸⁾ and uptake of long-chain fatty acids, mediated by the scavenger receptor B2 (CD36) ⁽⁹⁾.

Oxidative stress, a result of increases in free radicals in relation to the content of antioxidants ⁽¹⁰⁾, promotes aggression to the vascular endothelium ⁽¹¹⁾. With increased oxidative stress, damage to molecules in cell membranes, such as proteins, nucleic acids, and lipids, can occur ⁽¹²⁾. Furthermore, the hardening of arteries caused by endothelial dysfunction, or the reduction in the diameter of blood vessels caused by atheroma plaques, can result in increased blood pressure ⁽¹³⁾. Both upper and lower limb blood pressure, such as that assessed by the ankle-brachial index (ABI) ⁽¹⁴⁾, are related to cardiovascular events, resulting in increased intima-media thickness of the artery carotid artery and carotid-femoral artery pulsation velocity ⁽¹⁵⁾.

To improve risk factors related to endothelial dysfunction, several studies have been dedicated to evaluating the effect of foods rich in antioxidant compounds on cardiovascular health, mainly in people with increased cardiometabolic risk, such as in individuals with excess

weight⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. In this sense, kombucha stands out, a fermented, lightly carbonated beverage, rich in phenolic compounds such as epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, and epigallocatechin gallate, which are capable of neutralizing reactive oxygen and nitrogen species⁽²⁰⁾. This beverage is produced with teas from *Camellia sinensis* leaves (black, green, white, or red tea), among which green tea stands out due to its high antioxidant potential⁽²¹⁾. However, to date, no clinical study has been dedicated to evaluating the effect of daily consumption of green tea kombucha on oxidative stress and endothelial health. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of this beverage on health in individuals with excess weight. The energy-restricted diet was adopted in both groups as it is a standard intervention to reduce cardiovascular risk in overweight individuals without apparent comorbidities.

Methods

Ethical aspects

The National Research Ethics Commission (CONEP) approved the conduct of this study (CAAE: 25880819.3.0000.5153; number: 3.948.033). Furthermore, this study was registered in the Brazilian Clinical Trials Registry (REBEC) (number: RBR-9832wsx). All procedures carried out are in accordance with Resolution CNS/466 of 2012 and the Declaration of Helsinki.

Study design

This is a randomized, controlled clinical trial, conducted with two parallel experimental groups. The control group followed an energy-restricted diet of 500 kcal/day, and the kombucha group, in addition to the diet, consumed 200 mL of green tea kombucha daily for 10 weeks.

At the beginning of the study, all participants filled out the Three-Factor Eating Questionnaire (TQFE) and measured anthropometry and body composition markers. After this moment, all participants participated in a one-week run-in period, to assess possible adherence to the study protocol. During this period, participants had to maintain stability in their usual weight, with less than <2% variations, and could not consume teas and fermented foods. Those who met the initial requirements participated in the initial blood collection, and brachial, and peripheral blood pressure measurements to measure the ankle-brachial index (ABI). After 5

weeks of study, participants responded to a return questionnaire to assess adherence to the protocol. At the end of the study, a new blood collection and blood pressure measurement were performed (**Figure 1**).

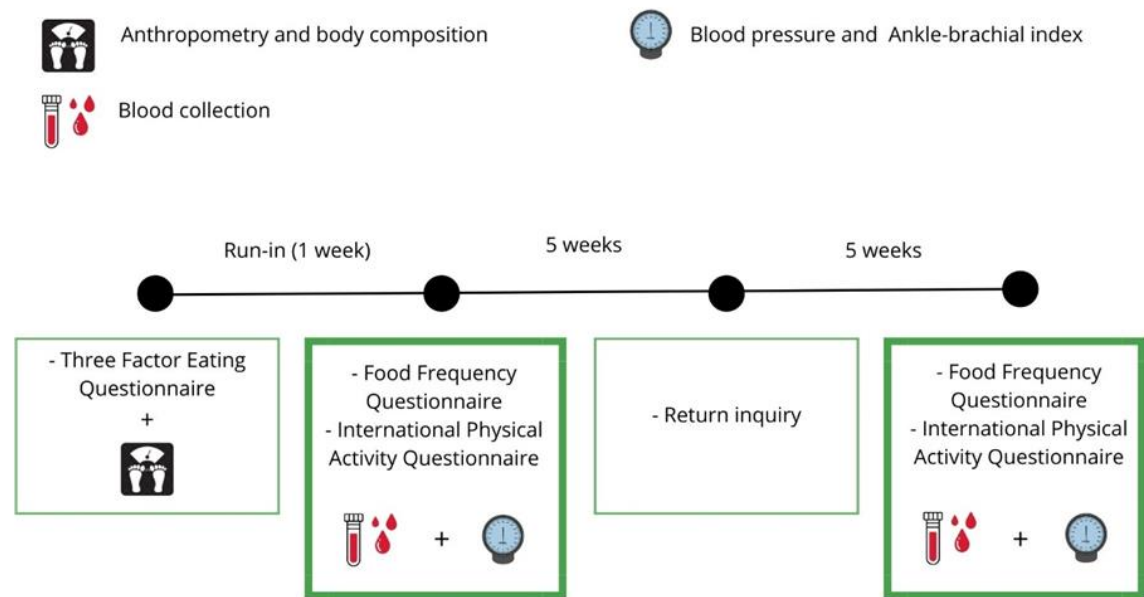


Figure 1. Experimental design of the study

Participants

The study included men and women aged 18 and 45 years, with excess weight, assessed by body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m², body fat percentage $>25\%$ for men and $>30\%$ for women, and waist circumference ≥ 94 cm for men and ≥ 80 cm for women. Participants were recruited from the local community of Viçosa (Minas Gerais, Brazil) and underwent online and in-person screening to assess inclusion criteria. Individuals with chronic diseases such as diabetes, high blood pressure, and cardiovascular diseases did not participate in the study. Those who had acute infectious or inflammatory conditions in the last three months were also not included. As well as those, who had eating disorders, pregnancy, menopause, were smokers, athletes, vegans, or who were in the lactation period. Individuals who already regularly consumed teas, supplements, or fermented foods were also not included.

Sample calculation and randomization

The sample calculation was performed using the values of two independent means of total serum antioxidants⁽²²⁾ in the G*Power software version 3.1.9.6, considering an effect size

of 0.8, a power of 95 %, and a statistical significance of 5%. Therefore, the minimum sample number was 30 individuals per group.

The randomization of participants who were included in the study was carried out using the minimization method, in a 1:1 ratio, in MinimPy software, version 0.2 (Copyright, Mahmoud Saghaei, 2010-2011), considering sex, age, and BMI as prognostic factors ⁽²³⁾.

Interventions

Both groups followed healthy diets individually planned by a nutritionist, considering the distribution of macronutrients and micronutrients necessary for health, and applying a caloric prescription of (-500 kcal/day) in the values calculated by the Estimated Energy Requirement (EER) for individuals with excess weight ⁽²⁴⁾. In addition, all participants received nutritional guidance, five menus with a list of substitutions, and a recipe book with the preparations presented on the menus. Furthermore, everyone was advised to maintain their usual level of physical activity.

In addition, participants in the kombucha group received seven 200 mL bottles of kombucha weekly and were instructed to keep them refrigerated and ingest them with a main meal (lunch or dinner) due to the acidity of the beverage. Kombucha was also produced weekly, with green tea from the Amaya brand, grown in the city of Registro (São Paulo, Brazil). The tea was prepared by infusion, as recommended by the manufacturer's instructions. The 30 g/L of a biofilm of bacteria and yeast and a previously produced kombucha were added until the pH reached 4.4. Incubation for kombucha fermentation occurred for 5 days at 25 °C.

At the end of preparation, through Ultra-high performance liquid chromatography-MSE (UPLC - MSE) analysis, it was possible to determine that kombucha presented 92 phenolic compounds, mostly from the flavonoid class (70.7%), phenolic acids (25%), lignans (2.2%) and other polyphenols (1.1%). Among the most abundant phenolic compounds in the drink are gallic acid, catechin 5-O-gallate, epicatechin, epigallocatechin, 5-O-galloylquinic acid, catechin, 5-p-coumaroylquinic acid, quercetin 3-O-rutinoside and nircetin 3-O - glycoside. Furthermore, it exhibited a total phenolic content of 0.32 ± 0.003 mg GAE/mL (in gallic acid equivalents), antioxidant capacity of 3.24 ± 0.43 μ mol TE/mL, pH of 3.41 ± 0.09 and total acidity 0.20 ± 0.02 (w/v acetic acid).

Assessments and measurements

At the beginning of the study, weight, and body composition were assessed using the tetrapolar electrical bioimpedance technique (Tetrapolar Bioimpedance, Inbody, model Y230).

The participants' food consumption was assessed using a food frequency questionnaire (FFQ), which was digitized in ERICA-REC24h, which uses the food composition table developed by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) ⁽²⁵⁾. All food consumption data were adjusted for thousand kilocalories. Physical activity was assessed using the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) short version, validated for the Brazilian population ⁽²⁶⁾, and was presented in the metabolic equivalent task (MET).

On the initial and final experimental days, participants came to the laboratory, fasting for 10 hours, to collect blood and measure brachial and peripheral blood pressure. The day before the experimental day, all participants were instructed to eat a standard dinner, as determined by the study. The blood was collected by a trained professional and centrifuged to separate the plasma fractions for analysis of the markers in the focus of this study. To this end, the samples were stored in an ultrafreezer at -80°C until analysis. To characterize the participants in relation to the variables that can interfere with oxidative stress and endothelial health, at the beginning of the study, an analysis of the inflammatory profile and liver enzymes was carried out using the UV kinetic method with BS 200 @ biochemical analyzing equipment.

The markers ICAM, VCAM, oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), CD-36, glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR) were analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique using the kits “Human ICAM/CD54”, “Human VCAM/CD106”, “Human OxLDL” from the Elabscience Biotechnology brand and “Human Cluster of differentiation 36”, “Human Glutathione Peroxidase 3” and “Human Glutathione Reductase” from the MyBioSource brand, following the protocols recommended by the manufacturers.

The activity of superoxide dismutase (SOD), hydrogen peroxide (H₂O₂), iron-reducing antioxidant power (FRAP), malondialdehyde (MDA), and nitric oxide (NO) was determined using plasma samples in colorimetric assays. SOD was determined considering the capacity to catalyze the reaction of superoxide (O₂⁻) into H₂O₂, which was also evaluated through the oxidation of substrate by a peroxidase ⁽²⁷⁻²⁸⁾. While FRAP analysis considered the reduction of ferric ions to ferrous ions through the addition of a sample with reducing activity ⁽²⁹⁾. MDA dosage measured lipid peroxidation through thiobarbituric acid reactive species (TBARS) ⁽³⁰⁾. The ON considered a standard curve with known sodium nitrite concentrations, which ranged from 0-125µM ⁽³¹⁾.

Brachial blood pressure was measured in participants in both arms and in case of differences, the arm with the highest value was measured again, and the average between the values were considered ⁽³²⁾. To do this, the participants were seated, with their legs uncrossed,

feet flat on the floor, with an empty bladder, free of clothing on their arms, palms facing upwards, and arms at heart level ⁽³³⁾.

To assess the ABI, a portable vascular Doppler (MEDMEGA®, DV 610B) was used associated with a sphygmomanometer, measuring systolic blood pressure (SBP) on the right and left sides of the brachial, dorsal foot, and posterior tibial arteries. The ratio between the highest SBP of the lower limb (dorsal foot or posterior tibial artery) and the brachial SBP of the corresponding side was calculated, and the ABI value that presented the lowest value between the right and left sides was adopted ⁽³⁴⁾.

Statistical analyses

Statistical analyses and graph construction were performed using SPSS (version 25.0) and GraphPad Prism (version 10.0) software, respectively. The Shapiro-Wilk and Levene tests were used to assess the normality of variables and the homoscedasticity of variances, respectively. The effect of time on treatments was assessed using the paired t-test or the Wilcoxon test. The independent samples t-test or Mann-Whitney U test was used to determine differences between groups. The correlation between variables was estimated based on the Pearson or Spearman correlation tests. The results were presented as mean and standard deviation or median and minimum and maximum values, with a statistical significance of 5%.

Results

A total of 500 individuals were recruited and 75 met the inclusion criteria and began the study. Throughout the study, 21.33% of participants were lost to follow-up, who were discontinued for personal reasons or non-adherence to the study protocol (**Supplementary material**). After 10 weeks, 59 people completed the study, 29 from the control group (17 women and 12 men) and 30 from the kombucha group (18 women and 12 men). When comparing baseline markers, there was no significant difference between those who were initially randomized (n=75) and those who completed the study (n=59).

Furthermore, during the study, there was a similarity between the control and kombucha groups regarding consumption of calories (p=0.736), grams of carbohydrates (p=0.458), proteins (p=0.891), lipids (p=0.585), and fibers (p=0.275), as well as in relation to the level of physical activity practiced (p=0.649). Similarly, the consumption of micronutrients with antioxidant potential also did not differ between groups, as shown in **Table 1**.

Table 1. Micronutrient consumption according to the self-reported final food frequency questionnaire adjusted per thousand kilocalories

Micronutrients	Control group	Kombucha group	<i>p</i>
Vitamin A (mcg)	218.2 (68.1)	179.7 (81.4)	0.057
Vitamin C (mg)	134.8 (11-263)	112.6 (16-298)	0.586
Vitamin E (mcg)	467.3 (151)	448.2 (183)	0.415
Selenium (mcg)	74.4 (21.3)	62.7 (23.5)	0.052
Zinc (mg)	8.03 (2.24)	6.97 (2.46)	0.092
Copper (mg)	0.77 (0.2)	0.73 (0.21)	0.435
Manganese (mg)	1.84 (0.62)	1.69 (0.45)	0.290

Values are presented as mean (standard deviation) or median (minimum - maximum value). The *p* values represent the results obtained by the independent samples t-test or Mann-Whitney U test. mcg: microgram; mg: milligram.

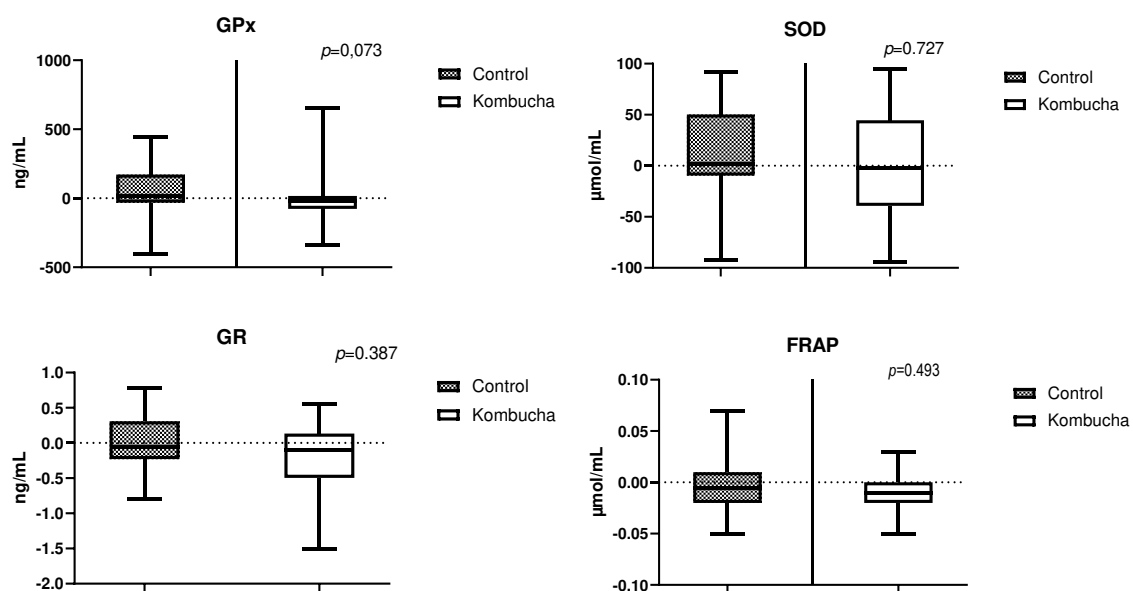
At baseline, age, BMI, inflammatory profile and liver enzymes did not differ between groups (**Table 2**). After 10 weeks of intervention, the H₂O₂ marker showed a significantly greater reduction in the kombucha group, compared to the control group (*p*=0.006). The other markers of oxidative stress and endothelial health did not differ between the groups (**Figure 2**). In the temporal analysis (initial vs final), only the control group had a significant increase in ICAM, while only the kombucha group showed a significant increase in ABI. Furthermore, both groups significantly reduced NO and H₂O₂ (**Table 3**).

Table 2. Characteristics of participants at baseline, according to allocation group

Variables	Control group	Kombucha group	<i>p</i>
Age (years)	32.51 (6.9)	34.66 (6.9)	0.239
BMI (kg/m ²)	32.05 (27.3 - 46.5)	32.90 (27.3 - 40.8)	0.259
PCR (mg/L)	0.26 (0.04 - 11.07)	0.40 (0.07-5.04)	0.214
Complement C3 (mg/dL)	140.18 (22.13)	148.76 (18.99)	0.216
AST (U/L)	25.64 (8.29)	24 (9.22)	0.477
ALT (U/L)	17 (23.09)	23.14 (5.68)	0.693
GGT (U/L)	37.1 (23.09)	37.1 (29.32)	0.856

Values are presented as mean (standard deviation) or median (minimum - maximum value). The *p* values represent the results obtained by the independent samples t-test or Mann-Whitney U test. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: body mass index; GGT: gamma-glutamyl transferase; kg: kilograms; kg/m²: kilograms per square meter; mg/L: milligrams per liter; mg/dL: milligrams per deciliter; U/L: units per liter.

A.



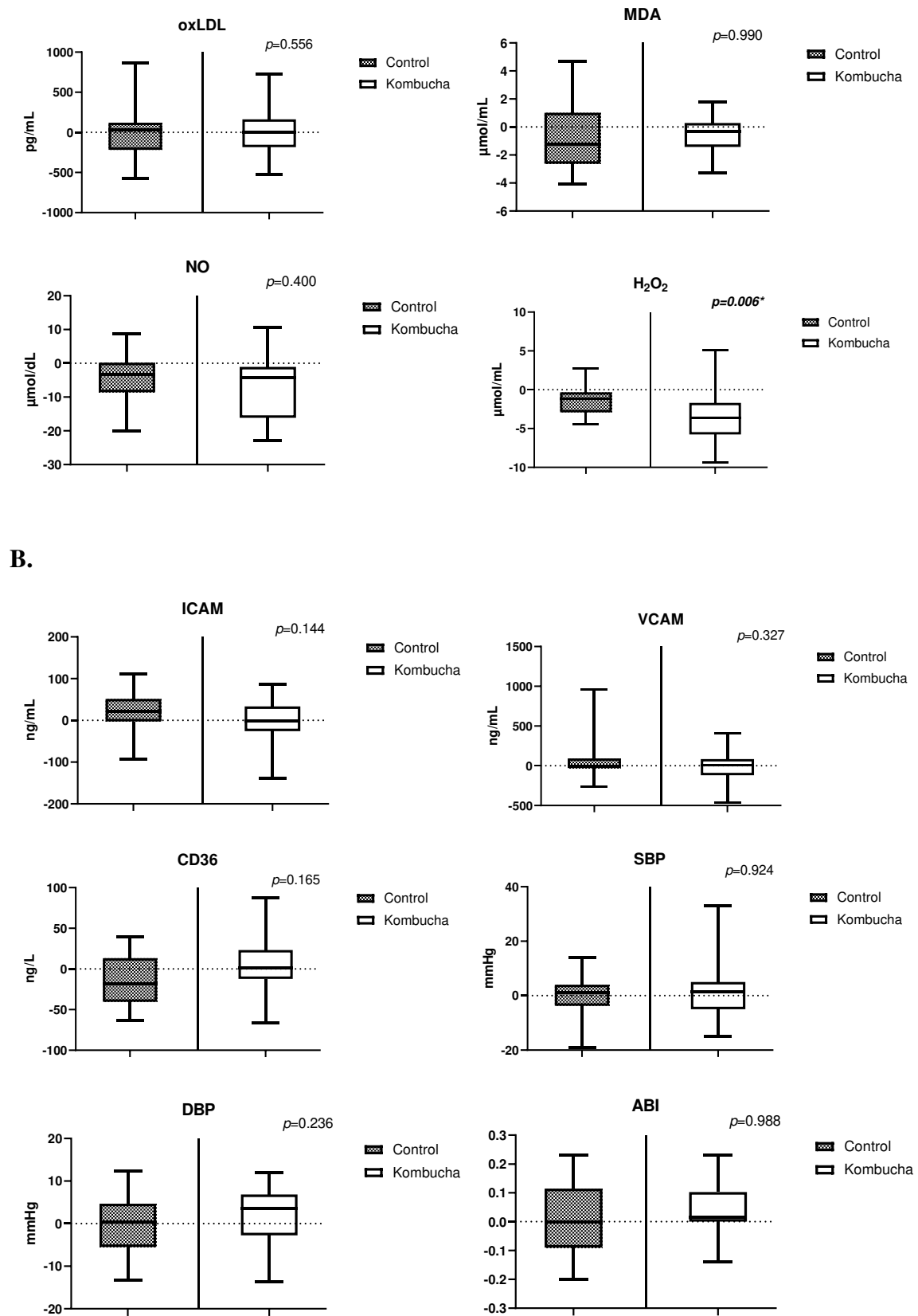


Figure 2. Markers of oxidative stress and endothelial health in the comparison between the control and kombucha group

(A.) refers to markers of oxidative stress and (B.) refers to markers of endothelial function. The *p* values represent those obtained by the independent samples t-test or Mann-Whitney U test in the comparison between the deltas (final - initial) of the groups. ABI = ankle-brachial index; BPS = systolic blood pressure; BPD = diastolic blood pressure; CD36 = scavenger receptor B2; FRAP = iron-reducing antioxidant power; GPx = glutathione peroxidase; GR = glutathione reductase; H₂O₂ = hydrogen peroxide; ICAM= intracellular adhesion molecule; MDA = malondialdehyde; NO = nitric oxide; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein; SOD = superoxide dismutase; VCAM = vascular cell adhesion molecule.

Table 3. Effect of control and kombucha interventions on oxidative stress and endothelial health

Variable	Control group initial	Control group final	<i>p</i>	Kombucha group initial	Kombucha group final	<i>P</i>
<i>Oxidative stress</i>						
GPx (ng/mL)	130.23 (22.4-460)	184.7 (20-633)	0.113	138.43 (19-521)	149.54 (16.88-571)	0.179
SOD (μmol/mL)	347.71 (37.52)	354.34 (40.45)	0.509	343.75 (41.15)	345.47 (38.33)	0.864
GR (ng/mL)	3.71 (2.96-10.52)	3.71 (2.6-11)	0.799	3.51 (2.96-8.4)	3.47 (2.75-16)	0.168
FRAP (μmol/mL)	44.93 (0.01)	44.93 (0.02)	0.437	44.93 (44.9-44.97)	44.92 (44.9-44.97)	0.083
LDLox (pg/mL)	467.1 (47.8-908.1)	324.9 (81.7-830)	0.750	480.2 (25.7-807)	460.4 (65.6-846)	0.629
MDA (μmol/mL)	3.32 (0.3-7.0)	2.34 (0.22-7.76)	0.277	1.89 (0.03-3.75)	0.84 (0.18-2.90)	0.056
ON (μmol/dL)	12.31 (0.56-23.52)	4.84 (0.8-17.51)	0.016*	14.58 (2.32-24.70)	7.0 (1.37-20.13)	0.012*
H ₂ O ₂ (μmol/mL)	16.5 (1.49)	15.09 (1.53)	0.001*	18.4 (11.1-23.04)	13.58 (12.33-19.65)	<0.001*
<i>Endothelial health</i>						
ICAM (ng/mL)	157.22 (41.48)	181.15 (28.79)	0.019*	171.41 (37.23)	176.35 (29.04)	0.681
VCAM (ng/mL)	302.72 (108-556)	347.55 (120-1227)	0.328	378.82 (196.9)	371.72 (136.14)	0.857
CD36 (ng/L)	163.5 (34.4-524.9)	154.2 (15.8-507)	0.112	62.27 (35.15-427.31)	56.54 (30—514.9)	0.570
DBP (mmHg)	75.62 (7.21)	74.95 (8.67)	0.565	73.02 (6.95)	74.91 (7.02)	0.145
SBP (mmHg)	114.92 (9.49)	114.22 (9.33)	0.565	115.19 (9.17)	116.53 (9.33)	0.308
ABI	1.04 (0.87 – 1.40)	1.10 (0.90 – 1.28)	0.322	1.00 (0.11)	1.05 (0.10)	0.014*

Values are presented as mean (standard deviation) or median (minimum - maximum value). The *p* values represent the results obtained by the Paired t-test or Wilcoxon, through initial vs final analysis. μmol/mL = micromole per milliliter; μmol/dL =

micromole per deciliter; ABI = ankle-brachial index; CD36 = scavenger receptor B2; DBP = diastolic blood pressure; FRAP = iron-reducing antioxidant power; GPx = glutathione peroxidase; GR = glutathione reductase; H₂O₂ = hydrogen peroxide; ICAM= intracellular adhesion molecule; MDA = malondialdehyde; mmHg = millimeters of mercury; ng/mL = nanograms per milliliter; ng/L = nanogram per liter; NO = nitric oxide; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein; pg/mL = picogram per milliliter; SBP = systolic blood pressure; SOD = superoxide dismutase; VCAM = vascular cell adhesion molecule.

Through correlation analyses, it was possible to observe direct, moderate, and significant correlations between ICAM and CD36, SOD and ABI, and GPx and FRAP, while inverse, moderate, and significant correlations were presented between FRAP and DBP, and H₂O₂ and ABI. A direct, strong, and significant correlation was also observed between SBP and DBP (Figure 3).

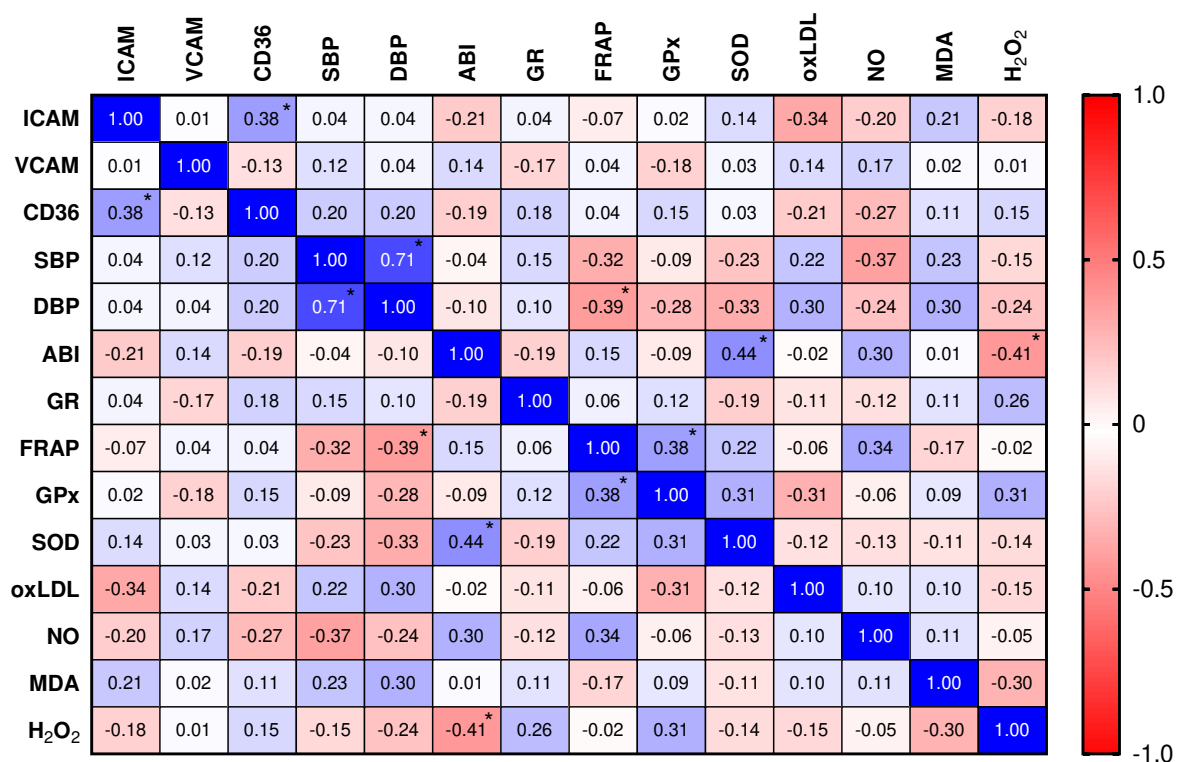


Figure 3. Correlation matrix between markers of oxidative stress and endothelial health

The values presented are the Pearson or Spearman correlation coefficients. * Indicate statistical significance. ABI = ankle-brachial index; CD36 = scavenger receptor B2; DBP = diastolic blood pressure; FRAP = iron-reducing antioxidant power; GPx = glutathione peroxidase; GR = glutathione reductase; H₂O₂ = hydrogen peroxide; ICAM= intracellular adhesion molecule; MDA = malondialdehyde; NO = nitric oxide; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein; SBP = systolic blood pressure; SOD = superoxide dismutase; VCAM = vascular cell adhesion molecule.

Discussion

This is the first clinical study dedicated to evaluating the effect of green tea kombucha consumption on markers of oxidative stress and endothelial health. After 10 weeks of intervention, participants in the kombucha group reduced H_2O_2 significantly compared to the control group. Other markers of oxidative stress, such as antioxidant enzymes and other pro-oxidant radicals, were not altered by kombucha consumption. Furthermore, the consumption of kombucha associated with an energy-restricted diet showed a potential protective effect on endothelial health, through protection against the increase in ICAM, which was observed in the control group, and also through the increase in ABI presented by the kombucha group. However, in relation to endothelial health, significant differences between the groups were not observed.

The green tea used to produce kombucha has complex polyphenols that are degraded by bacterial and yeast enzymes during the fermentation process, increasing the content of phenolic compounds and increasing the bioavailability and antioxidant capacity of the beverage⁽³⁵⁻³⁶⁾. The kombucha used in this study had a total phenolic content of 0.32 mg GAE/mL (in gallic acid equivalents) and an antioxidant capacity of 3.24 $\mu\text{mol TE/mL}$. Evidence also points out that kombucha is a beverage that contains vitamin C and antioxidant minerals such as copper, manganese, and zinc, which are capable of neutralizing free radicals⁽³⁷⁻³⁸⁾. This rich composition of the beverage possibly contributed to the reduction of the pro-oxidant radical H_2O_2 .

Previous *in vitro* and experimental animal studies have shown the potential of kombucha for reducing oxidative stress^(36, 39-42) a fact that is justified by the presence of phenolic compounds, such as verbascoside⁽⁴²⁾. In the present study, both groups were able to reduce H_2O_2 , however the kombucha group showed a significantly greater reduction in this marker. H_2O_2 occurs in normal metabolism and is responsible for the detection, signaling, and regulation of detox in humans. Increased concentrations of this marker cause tissue and cellular damage, promoting changes in cell shape, proliferation, and recruitment of immune cells⁽⁴³⁾. For these reasons, H_2O_2 has stood out as a marker with a dual causal role in atherosclerosis induced by oxidative stress, causing damage to the vascular wall and activating the signaling of the cascade of thrombogenic events⁽⁴⁴⁾.

Although no antioxidant enzyme studied was altered by kombucha consumption, the literature indicates that the beverage's action against oxidative stress may occur through the inhibition of reactive oxygen and nitrogen species and also through the activation of antioxidant enzymes⁽⁴⁵⁾. The kombucha used in this study presented the main phenolic compounds gallic acid, catechin 5-O-gallate, epicatechin, epigallocatechin, and catechin. These

compounds are capable of activating cysteine thiol oxidation of human Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP-1), which causes nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) to be released, causing the transcription of antioxidant enzymes to be activated⁽³⁸⁾.

The reduction of oxidative stress through H₂O₂ may be related to potential beneficial effects on endothelial health. In the present study, it was demonstrated that H₂O₂ presents an inverse, moderate, and significant correlation with ABI, a marker that, after 10 weeks of intervention, increased only in the kombucha group. Low ABI values may indicate the presence of peripheral arterial disease⁽⁴⁶⁾, and the marker has stood out for being a non-invasive method that provides useful and reliable information for diagnoses and prognoses of arterial diseases⁽⁴⁷⁾. Furthermore, anomalous ABI stands out as a risk factor for the incidence of all-cause mortality, myocardial infarction, and hemorrhagic events⁽⁴⁸⁾. However, it is important to highlight that although the consumption of kombucha associated with the diet promotes potential beneficial effects on ABI, in the comparison between the control and kombucha groups there was no significant difference.

Moreover, it was possible to notice a positive effect of the energy-restricted diet on the reduction of oxidative stress markers such as NO and H₂O₂ in both groups. The literature is clear about the effectiveness of a healthy, properly planned, energy-restricted diet in reducing concentrations of free radicals in the human body and increasing longevity⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾. For these reasons, it was expected that the diet would also promote benefits to the vascular endothelium. However, unexpectedly, ICAM increased in the control group. This molecule plays a fundamental role in mediating inflammation in the vascular endothelium and is increased in pathological cases of inflammation, such as obesity⁽⁵¹⁾. Possibly, the participants in this study already showed a tendency to increase this marker due to the low-grade inflammation caused by the accumulation of abdominal fat and visceral adiposity, and therefore the energy-restricted diet for 10 weeks was insufficient to minimize this impact related to excess of weight.

The correlations presented between the baseline markers of the participants in this study are in line with information previously established in the literature. The ICAM and CD36 molecules showed a direct, moderate, and significant correlation, and evidence indicates that both favor the formation of atheroma plaque^(9, 51). Furthermore, the direct, moderate, and significant association between SOD and ABI, as well as the inverse, moderate and significant association between FRAP and BPD, happens due to the already-established role of antioxidants on blood pressure⁽⁵²⁻⁵³⁾. Similarly, the direct and significant associations of GPx and FRAP (moderate), BPS and BPD (strong) depict congruence between markers with similar functions⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾.

The strengths of this study include the similarity between the control and kombucha groups in relation to baseline characteristics, such as age, BMI, inflammatory profile, and also characteristics during the study, such as consumption of macronutrients and fiber, antioxidant micronutrients and practice of physical activity. Furthermore, the control for this study was a energy-restricted diet, which is considered the gold standard intervention related to improving cardiovascular risk factors in apparently healthy individuals with excess weight. However, this study had as a limitation the intervention time, which was apparently insufficient for greater health benefits.

In conclusion, daily consumption of 200 mL green tea kombucha for 10 weeks proved to be effective in reducing the pro-oxidant H₂O₂ radical. The other markers of oxidative stress and endothelial health were similar between the control and kombucha groups. As this beverage is still little studied, new clinical studies are needed to elucidate other possible beneficial effects on health.

Acknowledgments

We thank the Federal University of Viçosa, Università degli Studi di Padova, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Financial support

This study was funded by FAPEMIG (grant number: APQ-00035-20).

Declaration of Interests

The authors of this article declare that there is no conflict of interest.

References

1. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, et al. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(21):e984-e1010. doi:10.1161/CIR.0000000000000973
2. World Health Organization. Cardiovascular Diseases [Internet]. World Health Organization. 2023. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
3. Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int*. 2022;72(3):151-160. doi:10.1111/pin.13202
4. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-533. doi:10.1038/s41586-021-03392-8
5. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3346. Published 2022 Mar 20. doi:10.3390/ijms23063346
6. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):3850. Published 2021 Apr 8. doi:10.3390/ijms22083850
7. Poredos P, Poredos AV, Gregoric I. Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. *Angiology*. 2021;72(7):604-615. doi:10.1177/0003319720987752
8. Yu J, Liu Y, Peng W, Xu Z. Serum VCAM and ICAM measurement assists for MACE risk estimation in ST-segment elevation myocardial infarction patients. *J Clin Lab Anal*. 2022;36(10):e24685. doi:10.1002/jcla.24685
9. Shu H, Peng Y, Hang W, Nie J, Zhou N, Wang DW. The role of CD36 in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2022;118(1):115-129. doi:10.1093/cvr/cvaa319

10. Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, Farhad S, Najafi M. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biol Chem.* 2019;400(6):711-732. doi:10.1515/hsz-2018-0397
11. Li M, Xin S, Gu R, et al. Novel Diagnostic Biomarkers Related to Oxidative Stress and Macrophage Ferroptosis in Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8917947. Published 2022 Aug 5. doi:10.1155/2022/8917947
12. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy [published correction appears in *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Aug;20(8):652]. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(9):689-709. doi:10.1038/s41573-021-00233-1
13. McClary KN, Massey P. Ankle Brachial Index. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 16, 2023.
14. Casey S, Lanting S, Oldmeadow C, Chuter V. The reliability of the ankle brachial index: a systematic review. *J Foot Ankle Res.* 2019;12:39. Published 2019 Aug 2. doi:10.1186/s13047-019-0350-1
15. Tatasciore A, Di Nicola M, Tommasi R, et al. From short-term blood pressure variability to atherosclerosis: Relative roles of vascular stiffness and endothelial dysfunction. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2020;22(7):1218-1227. doi:10.1111/jch.13871
16. Reverri EJ, LaSalle CD, Franke AA, Steinberg FM. Soy provides modest benefits on endothelial function without affecting inflammatory biomarkers in adults at cardiometabolic risk. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(2):323-333. doi:10.1002/mnfr.201400270
17. Katz DL, Davidhi A, Ma Y, Kavak Y, Bifulco L, Njike VY. Effects of walnuts on endothelial function in overweight adults with visceral obesity: a randomized, controlled, crossover trial. *J Am Coll Nutr.* 2012;31(6):415-423. doi:10.1080/07315724.2012.10720468

18. Liu X, Hill AM, West SG, et al. Acute Peanut Consumption Alters Postprandial Lipids and Vascular Responses in Healthy Overweight or Obese Men. *J Nutr.* 2017;147(5):835-840. doi:10.3945/jn.116.246785

19. Bardagjy AS, Hu Q, Giebler KA, Ford A, Steinberg FM. Effects of grape consumption on biomarkers of inflammation, endothelial function, and PBMC gene expression in obese subjects. *Arch Biochem Biophys.* 2018;646:145-152. doi:10.1016/j.abb.2018.04.003

20. Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1744. Published 2020 Mar 4. doi:10.3390/ijms21051744

21. Jakubczyk K, Kałduńska J, Kochman J, Janda K. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(5):447. Published 2020 May 22. doi:10.3390/antiox9050447

22. Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(3):315-322. doi:10.1007/s12011-012-9448-z

23. Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov.* 2011;8(1):1. Published 2011 Feb 2. doi:10.1186/1742-5573-8-1

24. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M; Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids [published correction appears in *J Am Diet Assoc.* 2003 May;103(5):563]. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(11):1621-1630. doi:10.1016/s0002-8223(02)90346-9

25. IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. -

[Internet]. biblioteca.ibge.gov.br. Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=250002>

26. Matsudo S, Araújo T, Matsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira LC, et al. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): Estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. 2001;6(2):5–18. doi: 10.12820/rbafs.v.6n2p5-18

27. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47(3):469-474. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x

28. Nahum A, Wood LD, Sznajder JI. Measurement of hydrogen peroxide in plasma and blood. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(5):479-484. doi:10.1016/0891-5849(89)90040-3

29. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292

30. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-310. doi:10.1016/s0076-6879(78)52032-6

31. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*. 1996;268:237-246. doi:10.1016/s0076-6879(96)68026-4

32. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk [Internet]. www.who.int. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547178>

33. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa AD de M, et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2021 Mar 25;116(3):516–658. Available from: <https://abccardiol.org/article/diretrizes-brasileiras-de-hipertensao-arterial-2020/>

34. Kim ES, Wattanakit K, Gornik HL. Using the ankle-brachial index to diagnose peripheral artery disease and assess cardiovascular risk. *Cleve Clin J Med*. 2012;79(9):651-661. doi:10.3949/ccjm.79a.11154
35. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:328-340. doi:10.1016/j.fct.2013.07.051
36. Gaggia F, Baffoni L, Galiano M, et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients*. 2018;11(1):1. Published 2018 Dec 20. doi:10.3390/nu11010001
37. Júnior JCDS, Meireles Mafaldo Í, de Lima Brito I, Tribuzy de Magalhães Cordeiro AM. Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Curr Res Food Sci*. 2022;5:360-365. Published 2022 Feb 4. doi:10.1016/j.crfs.2022.01.023
38. Costa MAC, Vilela DLS, Fraiz GM, et al. Effect of kombucha intake on the gut microbiota and obesity-related comorbidities: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;63(19):3851-3866. doi:10.1080/10408398.2021.1995321
39. Sai Ram M, Anju B, Pauline T, et al. Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol*. 2000;71(1-2):235-240. doi:10.1016/s0378-8741(00)00161-6
40. Chu SC, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. 2006 Jan;98(3):502-7
41. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci*. 2018;83(3):580-588. doi:10.1111/1750-3841.14068
42. Cardoso RR, Moreira LPD, de Campos Costa MA, et al. Kombuchas from green and black teas reduce oxidative stress, liver steatosis and inflammation, and improve glucose metabolism

in Wistar rats fed a high-fat high-fructose diet. *Food Funct.* 2021;12(21):10813-10827. Published 2021 Nov 1. doi:10.1039/d1fo02106k

43. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017;11:613-619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035

44. Mercier N, Bäck M. The double-action of hydrogen peroxide on the oxidative atherosclerosis battlefield. *Atherosclerosis.* 2021;331:28-30. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2021.07.001

45. Yang ZW, Ji BP, Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2008 Oct 14;89(1):150–6

46. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, et al. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association [published correction appears in *Circulation.* 2013 Jan 1;127(1):e264]. *Circulation.* 2012;126(24):2890-2909. doi:10.1161/CIR.0b013e318276fbc

47. Casey S, Lanting S, Oldmeadow C, Chuter V. The reliability of the ankle brachial index: a systematic review. *J Foot Ankle Res.* 2019;12:39. Published 2019 Aug 2. doi:10.1186/s13047-019-0350-1

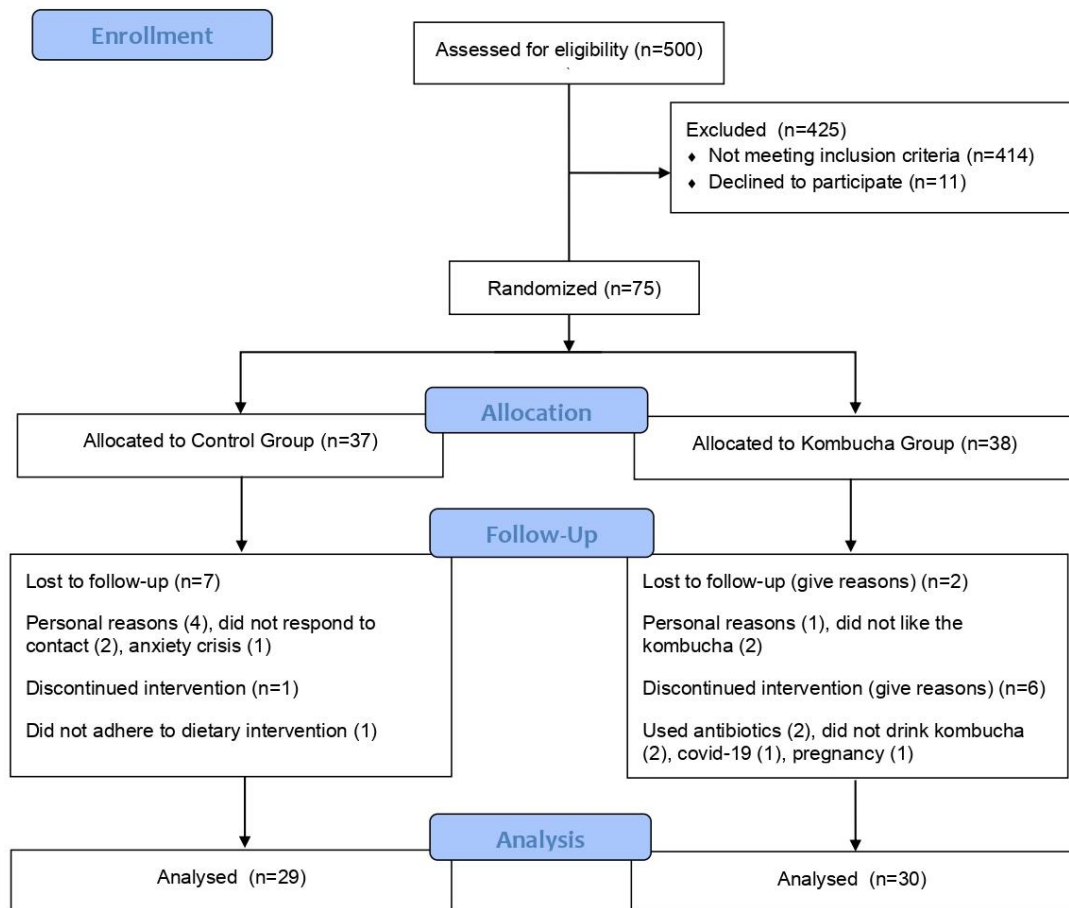
48. Woo JS. Ankle brachial index: a simple path to the future. *Korean J Intern Med.* 2023;38(3):277-279. doi:10.3904/kjim.2023.141

49. Mladenovic Djordjevic A, Loncarevic-Vasiljkovic N, Gonos ES. Dietary Restriction and Oxidative Stress: Friends or Enemies?. *Antioxid Redox Signal.* 2021;34(5):421-438. doi:10.1089/ars.2019.7959

50. Green CL, Lamming DW, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):56-73. doi:10.1038/s41580-021-00411-4

51. Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM and VCAM: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clin Chim Acta*. 2023;548:117487. doi:10.1016/j.cca.2023.117487
52. Ortiz MC, Manriquez MC, Romero JC, Juncos LA. Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):655-659. doi:10.1161/01.hyp.38.3.655
53. Salonen JT, Salonen R, Ihanainen M, et al. Blood pressure, dietary fats, and antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 1988;48(5):1226-1232. doi:10.1093/ajcn/48.5.1226
54. Gawlik K, Naskalski JW, Fedak D, et al. Markers of Antioxidant Defense in Patients with Type 2 Diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2352361. doi:10.1155/2016/2352361
55. Thompson B, McEvoy JW. Establishing target systolic and diastolic blood pressure in diabetic patients with hypertension: what do we need to consider?. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2021;19(11):993-1003. doi:10.1080/14779072.2021.2013814

Supplementary material



Supplementary figure. Study participant selection flowchart

7.2 Article 2

Green tea kombucha (*Camellia sinensis*), in the context of a healthy energy-restricted diet, improves cardiometabolic risk markers in individuals with excess weight: a randomized, controlled clinical trial

* It will be submitted to the European Journal of Nutrition (Impact factor: 5.0)

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the effect of green tea kombucha consumption on traditional cardiometabolic risk markers in individuals with excess weight.

Methods: This is a randomized controlled clinical trial with 10 weeks of duration, in which 59 individuals with excess weight ($BMI > 27 \text{ kg/m}^2$) were distributed into two parallel experimental groups: control group, which followed an energy-restricted diet (-500 kcal/day), and kombucha group, which followed the same energy-restricted diet + daily consumption of green tea kombucha (200 mL/day), for 10 weeks. At the beginning and end of the intervention, cardiometabolic health markers were evaluated, such as total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL-c), very low-density lipoprotein (VLDL-c), high-density lipoprotein (HDL-c), triglycerides (TG), Castelli index I and II, apolipoprotein A, apolipoprotein B, Apo A/Apo B ratio, blood glucose, insulin, glycated hemoglobin, HOMA-IR, HOMA- β , TyG index, and uric acid. Statistical analyses were performed considering a significance level of $\alpha = 0.05$.

Results: At the end of the study, participants in the kombucha group showed a significant reduction in TC, LDL-c, VLDL-c, TG, Castelli index II, and uric acid compared to baseline. Both groups significantly reduced Castelli index I and HOMA- β after intervention and only the control group showed a significant increase in glycated hemoglobin (within values considered normal) compared to pre-intervention. Furthermore, men in the kombucha group showed a significant reduction in glycated hemoglobin compared to men in the control group. The other markers were similar between the groups.

Conclusion: The consumption of green tea kombucha, associated with an energy-restricted diet, reduced cardiometabolic risk markers in individuals with excess weight.

Brazilian Clinical Trials Registry (REBEC) number: RBR-9832wsx.

Keywords: Lipids; Glycated Hemoglobin; Uric Acid; Cardiovascular Diseases.

Introduction

Excess weight is defined as a chronic and multifactorial condition, which is associated to the development of morbidities associated with the accumulation of body fat [1]. It reaches endemic proportions in many parts of the world. In the European region, 60% of adults have excess weight, which has been one of the main determinants of disability and death [2]. The accumulation of body fat is characterized as a risk factor for the development of cardiovascular diseases through the possibility of the coexistence of insulin resistance, hyperglycemia, hypertension, and dyslipidemia [3]. Furthermore, excess weight can cause structural and functional changes to accommodate body weight that impair vascular homeostasis [4]. For these reasons, people with excess weight have a higher risk of death from cardiovascular diseases, independent of other metabolic factors [5].

In this sense, the treatment of excess weight is necessary to reduce the risk of developing cardiovascular diseases, among which atherosclerosis stands out [6]. The accumulation of cholesterol-rich lipoprotein remnants, especially low-density lipoprotein (LDL-c), plays a central causal role in developing atheroma plaque [7]. Metabolic abnormalities, such as hyperglycemia and insulin resistance, are also involved in the progression of atherosclerosis [8]. Lack of glycemic control is associated with subclinical changes responsible for cardiometabolic dysfunctions [9]. Furthermore, hyperuricemia has recently been shown to play a fundamental role in the pathophysiological mechanism of atherosclerosis [10-11].

To minimize the impacts caused by excess weight, studies have been dedicated to evaluating the effect of specific foods on cardiometabolic risk markers, mainly through the improvement of the lipid and glucose profile [6, 12]. In this sense, kombucha stands out, a beverage obtained by fermentation of *Camellia sinensis* tea (mainly green and black tea) and sugars through a symbiotic culture of bacteria and yeast called Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) [13]. In its composition, organic acids such as acetic, citric, gluconic, carbonic, tartaric, and lactic acids may play a key role in the beverage's therapeutic action stand out. In addition, vitamins from complex B (B1, B2, B6, and B12) and C are present; minerals such as iron, copper, manganese, and zinc; and phenolic acids such as epigallocatechin, epicatechins, epigallocatechin gallate, and epicatechin gallate [14]. Thus, the rich composition of kombucha may be responsible for the promising perspectives on its effect on human health.

Two recent clinical studies highlighted the hypoglycemic potential of kombucha [15-16]. However, there are still few studies that evaluated the effect of kombucha consumption on cardiometabolic human health. Thus, the objective of the present study was to evaluate the

potential additional effect of daily consumption of 200 mL of green tea kombucha in the context of an isocaloric energy-restricted diet, for 10 weeks, on cardiometabolic markers in individuals with excess weight. The strategy of adopting an energy-restricted diet in both groups is due to the fact that it is a consolidated strategy for reducing cardiometabolic risk markers in overweight individuals, without apparent comorbidities.

Materials and methods

This is a randomized controlled clinical trial, with two parallel experimental groups, carried out with adults with excess weight for 10 weeks. This work was carried out at the Federal University of Viçosa, (Minas Gerais, Brazil), through partnerships between the Department of Nutrition and Health and the Department of Food Technology. This study was approved by the National Research Ethics Commission (CONEP) (CAAE: 25880819.3.0000.5153; number: 3.948.033), by the Brazilian Clinical Trials Registry (REBEC) (number: RBR-9832wsx) and is in accordance with the Resolution CNS/466 of 2012 and Declaration of Helsinki. All participants who agreed to participate in the study were informed about the risks and benefits and signed an informed consent form.

Participants

This study was conducted with adult individuals, aged between 18 and 45 years, who had a body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m², body fat percentage $>25\%$ for men and $>30\%$ for women, waist circumference ≥ 94 cm for men and ≥ 80 cm for women and no chronic or acute illness in the last three months. Pregnant, lactating, or menopausal women, smokers, those using medications such as antibiotics, anti-inflammatories and corticosteroids, nutritional supplements teas, kombucha, drugs, and alcohol abuse were not included. Furthermore, people with eating disorders, vegans, and athletes were not included.

Randomization

Participants were randomized in a 1:1 ratio, using the minimization method in the MinimPy software, version 0.2 (Copyright, Mahmoud Saghaei, 2010-2011), considering sex, age, and BMI as prognostic factors [17]. Then, according to randomization, participants were allocated into two parallel groups - the control group, which followed an energy-restricted diet (-500kcal/day), or the kombucha group, which in addition to calorie restriction (-500kcal/day), received 200 mL of green tea kombucha daily, for 10 weeks.

Sample calculation

This is an article with secondary outcomes and the sample size calculation was carried out based on the primary outcomes related to oxidative stress. The sample size calculation was carried out using the G*Power software version 3.1.9.6, considering an effect size of 0.8 between the values of two independent means of total serum antioxidants [18], power of 95%, and statistical significance of 5%. The minimum sample number resulted in 30 individuals per group.

Study design

Participant recruitment took place in the local community and those who showed interest completed an online pre-screening questionnaire. Those who met the initial inclusion criteria attended the laboratory to confirm the information provided through body composition and anthropometric measurements and also filled out the Three-Factor Eating Questionnaire (TQFE). Only those who obtained TQFE scores that did not reveal possible eating disorders participated in the study. Eligible candidates who agreed to participate in the study went through the run-in period to investigate and exclude those who presented the possibility of non-adherence to the study protocol. During this period, participants had to maintain their usual diet and body weight without significant changes (<2%) for one week.

Before the intervention started, participants answered the food frequency questionnaire (FFQ) and the international physical activity questionnaire short version (IPAQ) in addition to blood collection. Over the course of 10 weeks, participants followed the interventions determined by the study and were recommended to maintain their usual level of physical activity. Moreover, every 15 days participants received messages to confirm adherence to the diet, and in the 5th week, there was a return consultation to check compliance with the study protocol. After 10 weeks, all the data and blood collection were similarly applied to baseline. Throughout the study, participants who were unable to adhere to the protocol, had any illness, or had any adverse reaction to kombucha consumption were discontinued from the study.

Kombucha production

The kombucha was prepared with Amaya brand green tea, grown in the city of Registro (São Paulo, Brazil). To prepare the tea infusion, initially, the water was boiled to 75 °C, then 12g of green tea and 50g of sugar were added per liter of water. The tea was filtered and immediately cooled to 25 °C in an ice bath. Then, 30g/L of SCOBY was added as well as a previously produced kombucha until it reached a pH 4.4. Finally, the kombucha was fermented

for 5 days at 25 °C, portioned into 200 ml sterile plastic packaging, and distributed weekly to participants in the kombucha group, who were instructed to keep the beverage refrigerated (**Fig. 1**). Furthermore, participants were advised to consume the beverage during the main meal.

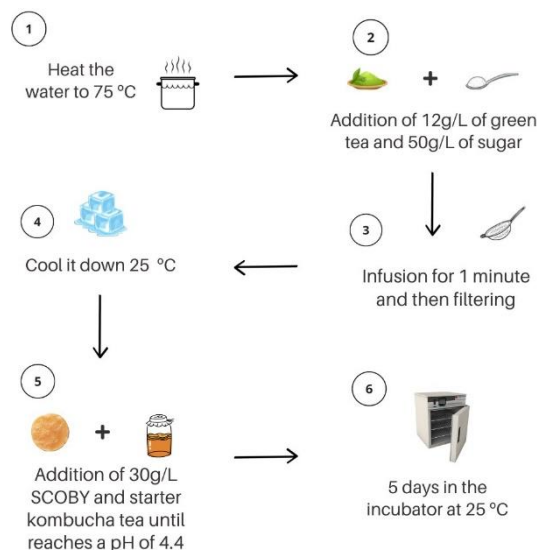


Fig. 1 Procedures for producing green tea kombucha

°C: degrees Celsius; %: percentage; g/L: grams per liter; v/v: volume per volume

At the end of preparation, the green tea kombucha had a pH of 3.41 ± 0.09 and a total acidity of 0.20 ± 0.02 (w/v acetic acid). Furthermore, the beverage had an antioxidant capacity of 3.24 ± 0.43 $\mu\text{mol TE/mL}$ and a total phenolic content of 0.32 ± 0.003 mg/mL in gallic acid equivalents (GAE). Through microbiological characterization, populations of lactic acid bacteria (1.98×10^7 CFU/mL), acetic bacteria (1.07×10^7 CFU/mL), and yeast (1.57×10^7 CFU/mL) were evaluated. Furthermore, 92 phenolic compounds were identified in the beverage, through Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UPLC - MS/MS) analyzes, and among the main ones were galocatechin, catechin 5-O-gallate, epicatechin, epigallocatechin, 5-O-galloylquinic acid, catechin, 5-p-coumaroylquinic acid, quercetin 3-O-rutinoside and nirutin 3-O-glycoside. In total, 70.7% of these belonged to the flavonoid class, followed by phenolic acids (25%), lignans (2.2%), and other polyphenols (1.1%). The sugars, and ethanol concentrations are shown in **Frame 1**.

Frame 1 – Concentration of sugars, and ethanol in green tea kombucha

Components	Concentration (g/L)
Sucrose	22.24 (1,9)
Fructose	12.57 (2,16)
Glucose	11.49 (0,86)
Ethanol	4.70 (0,11)

g/L: Gram per liter. Values are presented as average (standard deviation).

Diet plan

The eating plans were prepared for each participant individually, considering the caloric needs determined by the Estimated Energy Requirement (EER) for adults with excess weight, and the distribution guidelines for macronutrients and micronutrients necessary for maintaining health [19]. For each participant, a calorie restriction of 500 kcal/day was applied. During the study, participants were instructed not to consume potentially functional foods. In addition, participants received five menu options, with a daily calculated replacement list, and a recipe book with the preparations of food described in the meal plan. All material offered, as well as menu calculations, were carried out by nutritionists.

Variables and measurement instruments

To evaluate the participants' characterization variables, during the baseline and run-in period, weight and body composition were measured using the tetrapolar electrical bioimpedance technique (Tetrapolar Bioimpedance, Inbody, model Y230). Furthermore, with an inelastic measuring tape, the circumference of the waist, hips, and neck were measured with three repetitions. From the values obtained, the waist/hip ratio was calculated [20].

The last meal of the day before collection was a standardized dinner for all participants. Blood was collected by a qualified professional after a 10-hour overnight fast. After collection, the samples were analyzed at the Clinical Analysis Laboratory (LACDSA/UFV), following the laboratory's internal recommendations, and the results of tests for total cholesterol (TC), LDL-c, high-density lipoprotein (HDL-c), very low-density lipoprotein (VLDL-c), triglycerides (TG), Apolipoprotein A (Apo A), Apolipoprotein B (Apo B), fasting blood glucose, estimated blood glucose, insulin, glycated hemoglobin and uric acid (UA) were sent to researchers. All

markers mentioned were analyzed using the UV kinetic method with the BS 200 ® biochemical analyzing equipment. With the results of the aforementioned exams, it was possible to calculate the Castelli I and II indices, using the divisions of TC/HDL-c and LDL-c/HDL-c respectively [21]. It was also calculated the HOMA [22] indices using the following formulas: $HOMA-IR = [(fasting\ insulin\ (mU/L) \times fasting\ blood\ glucose\ (mmol/L))/22.5]$ and $HOMA-\beta = (20 \times fasting\ insulin\ (MICRO\ IU/mL)) / (fasting\ glucose\ (mmol/L^*) - 3.5)$. Additionally, the TyG index [23] was also calculated according to the formula: $TyG = Ln [(fasting\ triglycerides\ (mg/dL)) \times (fasting\ blood\ glucose\ (mg/dL))/2]$.

Statistical analyses

The statistical analyses of this study were carried out using SPSS software (version 25.0, USA), considering a statistical significance of 5%. Initially, data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity using Levene's test. Paired t-test and Wilcoxon test were used to evaluate the effect of time on treatments, while independent samples t-test and Mann-Whitney U test were performed for comparisons between groups. Multifactorial ANOVA was performed to evaluate the interaction between treatment and participants' sex, and in cases of significant interaction, differences were evaluated by Bonferroni post-hoc. The data from this study are presented as mean and standard deviation or median and minimum and maximum values.

Results

In total, 500 individuals completed the pre-selection questionnaire, and only 75 met the inclusion criteria. Were randomized 37 to the control group and 38 to the kombucha group. In the end, 59 completed participants in this study, 29 in the control group and 30 in the kombucha group. Among the main causes of loss to follow-up are personal reasons (31.25%), not responding to researchers' contact (12.5%), use of antibiotics (12.5%), not liking the kombucha's taste (12.5%) and stop drinking kombucha for more than three days (12.5%) (**Fig. 2**). Baseline values of all markers studied did not differ between those who started the study and those who completed the study (data not shown).

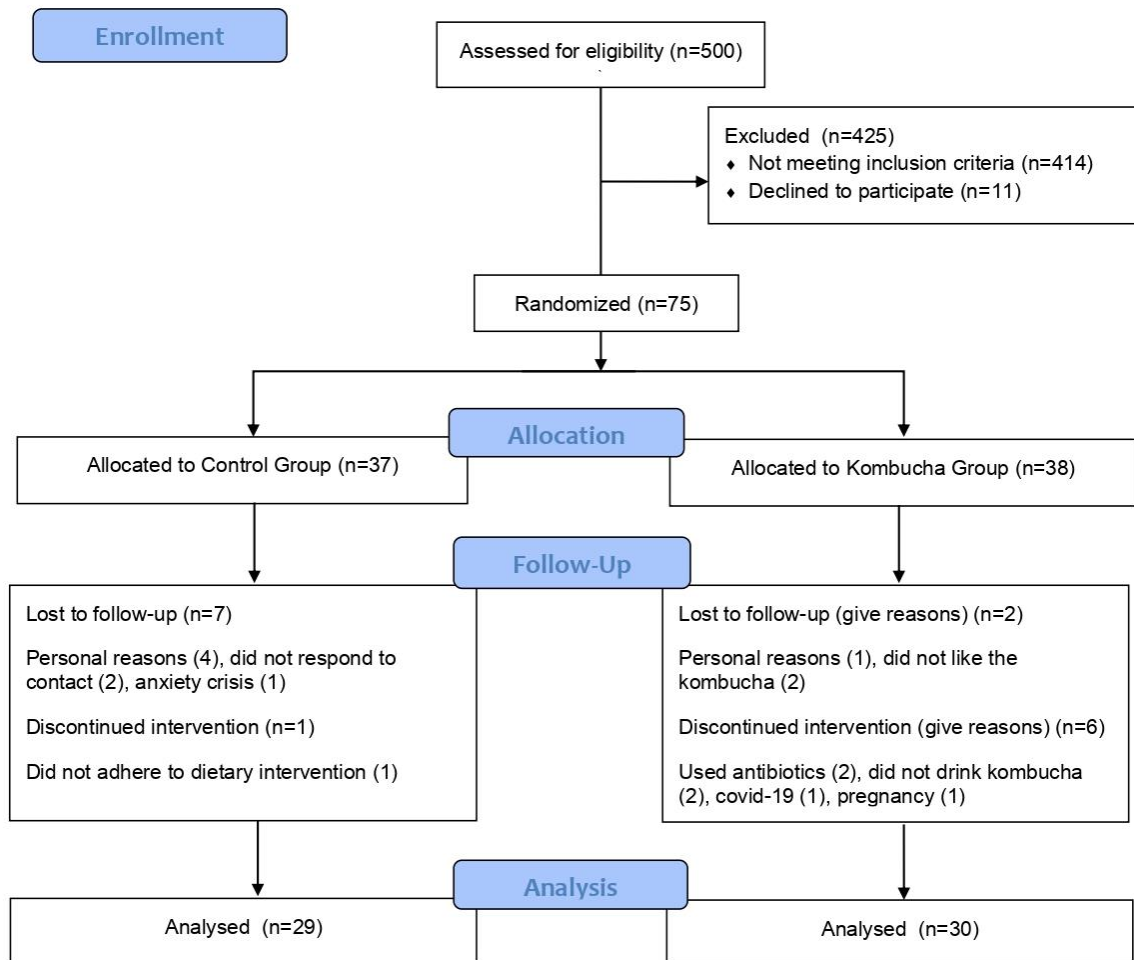


Fig.2 Study participant selection flowchart

At the end of the study, the control group was composed of 17 women and 12 men, while the kombucha group presented 18 women and 12 men. At baseline, 79.31% of the control group had obesity, while 80% of the kombucha group had the same condition. Age, anthropometric, and body composition variables did not differ between participants at the beginning of the study (**Table 1**).

Table 1. Anthropometric and body composition characteristics of the control and kombucha groups at baseline

Variables	Control group	Kombucha group	<i>p</i>
Age (years)	32.51 (6.9)	34.66 (6.9)	0.239
BMI (kg/m ²)	32.05 (27.3 - 46.5)	32.90 (27.3 - 40.8)	0.259
Muscle mass (kg)	30.95 (21.2 – 44.4)	29.60 (22.3 – 52.7)	0.666
Body fat (%)	38.14 (8.2)	39.93 (6.7)	0.267
Neck circumference (cm)	36 (26.5 – 43.4)	36.5 (32.5 - 44)	0.804
Waist circumference (cm)	92.52 (8.5)	97.05 (10.7)	0.078
Hip circumference (cm)	114.75 (8.3)	115.47 (7.96)	0.816
Waist/hip ratio	0.89 (0.06)	0.92 (0.07)	0.451

Values are presented as mean (standard deviation) or median (minimum - maximum value). The *p* values represent the results obtained by the independent samples t-test or Mann-Whitney U test. % - percentage; cm: centimeters; BMI: body mass index; kg: kilograms; kg/m²: kilograms per square meter

Using the IPAQ, it was possible to verify that there was no difference between the initial and final level of physical activity, both in the control ($p=0.352$) and in the kombucha group ($p=0.107$). Furthermore, throughout the study, the groups did not differ in terms of food consumption and level of physical activity, measured by the FFQ and IPAQ, respectively (**Table 2**).

Table 2. Food consumption and physical activity level of participants (self-reported) during the study according to allocation group

Variável	Control group	Kombucha group	<i>p</i>
Calories (kcal)	1359.52 (399.4)	1432.63 (453.7)	0.736
Carbohydrate (g)	117.9 (47.5-319)	120.3 (56.4-310)	0.458
Protein (g)	44 (12.9-95.5)	38.4 (26.2-120)	0.891
Lipids (g)	36.57 (13.6-75.3)	32 (15.8-94.4)	0.585
Fibers (g)	12,29 (4.6-34.5)	13.09 (5.2-35.1)	0.275
PA - Walk (MET)	387 (655)	336 (545)	0.525
PA - Moderate (MET)	1360 (2620)	798 (901)	0.981
PA - Vigorous (MET)	4481 (8681)	4635 (8981)	0.524
PA - Total (MET)	6230 (9337)	5770 (9287)	0.649

Values are presented as mean (standard deviation) or median (minimum - maximum value). The *p* values represent the results obtained by the independent samples t-test or Mann-Whitney U test. Food consumption results according to the food frequency questionnaire (FFQ), adjusted per thousand kilocalories. Physical activity results according to metabolic equivalent task (MET) scores obtained from the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). g: grams; Kcal: kilocalories; PA: physical activity.

After 10 weeks of intervention, it was possible to observe that the kombucha group reduced several markers of the lipid profile, such as TC, LDL-c, VLDL-c, TG, and Castelli index I and II compared to baseline, while the control group reduced only the Castelli index I. Additionally, only the kombucha group reduced uric acid after intervention. Regarding the glucose profile, both groups reduced HOMA- β , and only the control group increased glycated hemoglobin (within normal values) post-intervention. The other markers unchanged after the intervention. When comparing the differences in the two moments (Δ = final - initial), there were no differences between the control and kombucha groups for all evaluated variables (**Table 3**).

Table 3. Effect of 10 weeks of intervention on cardiometabolic risk markers, according to allocation group

Variable	Control group initial	Control group final	<i>p</i>	Kombucha group initial	Kombucha group final	<i>p</i>	Δ Control	Δ Kombucha	Δ <i>p</i>
TC (mg/dL)	180.60 (28.46)	177.57 (24.89)	0.352	182.92 (32.70)	173.53 (27.18)	0.024*	-3.03 (16.94)	-9.39 (20.74)	0.215
LDL-c (mg/dL)	113.39 (28.42)	110.32 (25.49)	0.290	114.48 (22.71)	108.36 (17.91)	0.035*	-3.07 (15.05)	-6.12 (13.67)	0.446
HDL-c (mg/dL)	39.56 (7.81)	41.24 (7.41)	0.093	40.79 (8.32)	42.31 (9.32)	0.250	1.68 (4.80)	1.51 (6.95)	0.922
VLDL-c (mg/dL)	18.50 (10 – 43)	17.00 (10 – 54)	0.866	24.07 (10.39)	20.81 (7.69)	0.011*	-0.12 (5.28)	-3.25 (6.16)	0.059
TG (mg/dL)	91.50 (52 – 216)	84.00 (49 – 269)	0.954	120.29 (52.02)	104.37 (38.40)	0.012*	-0.91 (26.04)	-15.92 (30.82)	0.068
Castelli index I	4.62 (1.04)	4.38 (0.88)	0.015*	4.66 (1.11)	4.29 (1.04)	0.007*	-0.23 (0.44)	-0.36 (0.64)	0.423
Castelli index II	2.84 (0.72)	2.75 (0.73)	0.097	3.02 (0.75)	2.73 (0.73)	0.002*	-0.09 (0.26)	-0.29 (0.38)	0.066
Apo A (mg/dL)	121 (108 – 208)	122 (101 – 239)	0.966	130.13 (20.22)	129.37 (18.97)	0.554	0.97 (12.27)	-0.77 (14.66)	0.728
Apo B (mg/dL)	97.96 (19.54)	100.48 (17.71)	0.332	100.48 (20.85)	99.92 (14.79)	0.838	0.00 (-20 – 33)	3.00 (-33 – 16)	0.869
Apo A/Apo B index	1.26 (0.82 – 1.81)	1.18 (0.88 – 1.86)	0.159	1.27 (0.30)	1.26 (0.21)	0.653	-0.06 (0.22)	-0.01 (0.16)	0.433
Fasting blood glucose (mg/dL)	80.8 (5.63)	86.6 (10.93)	0.052	86 (5.96)	91.81 (6.69)	0.057	5.8 (2.59)	5.8 (2.66)	1.000
Insulin (μUI/mL)	9.40 (3.39)	8.50 (3.03)	0.187	12.40 (6.10 – 19.20)	10.70 (4.50 – 24.80)	0.424	-0.90 (3.37)	-0.47 (4.07)	0.851
Glycated hemoglobin (%)	5.07 (0.29)	5.16 (0.29)	0.004*	5.05 (0.32)	5.08 (0.33)	0.478	0.10 (-0.30 – 0.40)	0.05 (-0.30 – 0.30)	0.126
HOMA- IR	1.89 (0.70)	1.89 (0.73)	0.987	2.69 (1.14 – 4.50)	2.27 (1.33 – 5.93)	0.572	0.00 (0.71)	0.11 (1.02)	0.650
HOMA-β	138.25 (56.04 – 293.05)	99.09 (45.77 – 267.20)	0.019*	192.90 (95.84 – 357.75)	117.15 (59.59 – 263.34)	<0.001*	-39.96 (66.59)	-66.43 (50.39)	0.134
Tyg	4.45 (4.21 – 4.91)	4.48 (4.17 – 4.99)	0.189	4.57 (0.23)	4.57 (0.20)	0.896	0.02 (0.09)	-0.00 (0.13)	0.063
Uric Acid (mg/dL)	4.30 (2.50 – 6.20)	3.85 (2.70 – 6.80)	0.673	4.18 (1.01)	3.95 (0.87)	0.027*	-0.06 (0.75)	-0.23 (0.52)	0.321

Values are presented as mean (standard deviation) or median (minimum - maximum value). The *p* values represent the results obtained by the Paired t-test or Wilcoxon, and Δ*p* (final - initial) represents those obtained by the independent samples t-test or Mann-Whitney U test. μUI/mL: international micro unit per milliliter; Apo A: apolipoprotein A; Apo B: Apolipoprotein B; TC: Total cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; HOMA-β: Homeostasis Model Assessment - Beta Cells; LDL-c: low-density lipoprotein; mg/dL: milligram per deciliter; TG: triglycerides; TyG; Triglycerides/glucose index; VLDL-c: very low-density lipoprotein.

Furthermore, the results of the factorial ANOVA showed that sex influenced only the variable glycated hemoglobin ($p=0.049$). Post-hoc comparison tests between groups showed that men in the kombucha group reduced glycated hemoglobin, while men in the control group increased this marker (**Fig. 3**).

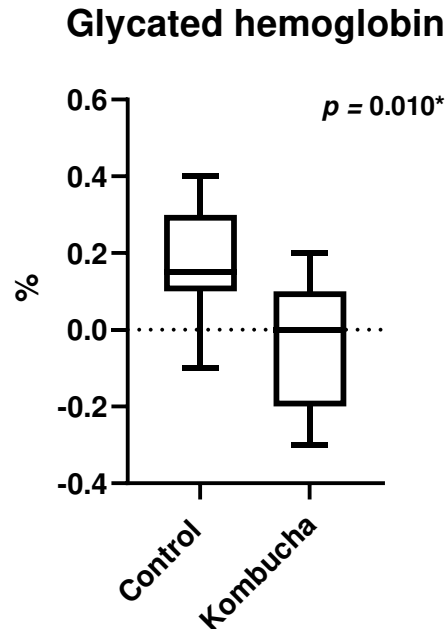


Fig 3. Effect of interventions on glycated hemoglobin in male participants of both groups

The p value represents the differences between the Δ (final - initial) of the kombucha and control group in the independent samples t-test.

Discussion

In the context of a healthy diet with calorie restriction, lasting 10 weeks, the daily consumption of 200 mL of green tea kombucha contributed to the significant reduction of lipid profile markers, such as TC, LDL-c, VLDL-c, TG, Castelli index II, and uric acid in individuals with excess weight, compared to baseline. A significant improvement in these parameters was not observed in the control group, and the same did not present any additional beneficial effect in relation to the kombucha group. Both groups were also able to reduce the Catelli I index and HOMA- β , in a similar way ($p<0.05$), a fact that can be attributed to the calorie-restricted diet. At the end of the study, only the control group increased glycated hemoglobin; however, within the range considered normal. Furthermore, in male participants, the kombucha intervention proved more effective in reducing glycated hemoglobin than the control intervention, with a

significant difference between the groups. However, in the other markers, no significant differences were observed when comparing the groups.

The beneficial effect of green tea kombucha on the lipid profile can be attributed to the rich composition of the beverage, which presented 92 types of phenolic compounds, mostly from the flavonoid class (70.7%). Infused green tea, naturally, is a beverage rich in complex polyphenols [24], and during the kombucha fermentation process, these compounds are degraded by enzymes released by bacteria and yeast, forming simpler molecules and increasing the content of total phenolic compounds of the beverage [25], among which, gallic acid, catechin 5-O-gallate, epicatechin, epigallocatechin, 5-O-galloylquinic acid, catechin, 5-p-coumaroylquinic acid, quercetin 3-O-rutinoside and nircetin 3-O-glycoside stood out. Furthermore, the acetic bacteria present in kombucha (1.07×10^7 CFU/mL) are capable of transforming glucose into gluconic acid [26], which in turn conjugates with phenolic compounds, promoting an increase in their bioavailability [27].

A literature review on kombucha showed that phenolic compounds are capable of stimulating sirtuin-1 (SIRT-1), activating adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and promoting inhibition of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP) transcription. In general, this mechanism contributes to metabolic homeostasis and causes a reduction in lipogenesis and cholesterol synthesis in the liver. Kombucha, through phenolic compounds and probiotic microorganisms, also can provide benefits to the intestinal microbiota that involve systemic effects, such as improving the lipid profile [28]. Furthermore, catechins, present abundantly in green tea kombucha, can interrupt the absorption and emulsification of lipids [29].

In accordance with the present study, consumption of green tea kombucha for 16 weeks promoted the reduction of TC, TG, LDL-c, and VLDL-c in rats with hypercholesterolemia [30]. Similarly, a study with rats fed a high-fat, high-fructose diet to induce metabolic changes, found that consumption of green tea kombucha for 10 weeks reduced TG concentrations and reversed diet-induced hepatic steatosis from grade 2 to grade 1. In this same study, it was elucidated that kombucha stimulated the activation pathways of Carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1), which promotes the reduction of triacylglycerols [29]. Another study with mice induced to non-alcoholic fatty liver disease also observed that consumption of kombucha for 4 weeks caused the animals to protect the hepatocytes from toxicity lipids [31].

Furthermore, it is known that increased consumption of fructose and salt is associated with obesity and metabolic syndrome, and can activate purine nucleotide degradation pathways, which also increase uric acid levels [32]. For this reason, the effect of green tea kombucha,

associated with a healthy diet with calorie restriction, on serum uric acid concentrations stands out as an important cardiometabolic benefit. An *in vitro* study, with model cells from the proximal tubular cell line (HK-2), which evaluated the effect of black tea kombucha and cascara coffee on oxidative stress, also identified that the beverage was able to reduce uric acid levels [33].

Evidence indicates that the polyphenols present in green tea are capable of reducing uric acid by inhibiting the activity of xanthine oxidase, which is an enzyme that catalyzes purine reactions, transforming them into uric acid, and also by reducing the expression of renal urate transporters, increasing the excretion of uric acid [34]. Moreover, the literature shows that the main bioactive compound in green tea with the potential to reduce uric acid is gallic acid, and the degree of tea fermentation may be inversely proportional to the ability to provide effects on xanthine oxidase [35]. The kombucha offered to participants had a total phenolic content of 0.32 mg/mL in gallic acid equivalents, which represents 64 mg/day, considering the volume offered to participants (200 mL). For reasons associated with palatability, the fermentation time of kombucha (5 days) was relatively shorter compared to beverages previously studied in animal models, which generally vary between 10 and 14 days [13, 36-37], which may have contributed to the effects of kombucha tea to reduce uric acid levels.

It is known that abdominal obesity predisposes individuals to a greater risk of cardiovascular diseases and insulin resistance [38] and that glycated hemoglobin is considered the gold standard for measuring glucose levels, due to the high reliability and stability of the marker, representing average glucose values over two to three months [39]. Therefore, it is important to highlight the observed effect of green tea kombucha consumption on the reduction of glycated hemoglobin in men with excess weight. The men in this study were more responsive to kombucha treatment, and this may be explained by biological differences in glucose metabolism between men and women. Women have been proven to have lower glucose tolerance [40], insulin extraction in the liver [41], and hepatic fasting glucose uptake [42], which possibly hindered the significant action of kombucha.

Kombucha, through phenolic compounds, is capable of inhibiting glucose transporter 1 (GLUT1) and other enzymes of glucose metabolism, such as glycosity, in addition to inhibiting glucose absorption in the small intestine [28]. Previous clinical studies have also identified the great hypoglycemic potential of kombucha. A randomized, double-blind, crossover pilot clinical trial in a hospital system aimed to evaluate the effect of consuming 240 mL of kombucha on hyperglycemia in patients with type 2 diabetes *mellitus* for 4 weeks and identified

that the beverage was able to reduce levels of blood glucose [16]. Another clinical study also observed the postprandial hypoglycemic potential of kombucha in healthy people [15].

A healthy diet with calorie restriction is considered the main intervention to be adopted to reduce cardiometabolic risk markers in individuals with excess weight who do not have comorbidities [43], such as the participants in the present study. These effects were demonstrated by the reduction of the Catelli I index and HOMA- β in both groups. However, participants in the control group, at the end of the study, showed an increase in glycated hemoglobin. This increase was less than 0.1% and did not result in exceeding normal limits, which are values below $< 5.7\%$ [44]. This small increase is probably because to adapt to the caloric deficit, at the beginning of the diet period there is an increase in glycogenolysis [45] and, consequently, the levels of free glucose for hemoglobin glycation. Possibly, the hypoglycemic power of kombucha mitigated this effect caused by the diet of the group that consumed the beverage.

We highlight the limitation of this study regarding the dosage of kombucha offered to participants, as to date, there is a scarcity of studies and clinical guidelines that cite ideal doses for therapeutic effects. In this sense, the researchers chose to maintain a safe dose for supplementation for patients, with an approximate amount already reported in a previous study [16]. Among the strengths of this study, the similarity between the groups in terms of the characteristics of the participants at baseline, as well as the control of eating during the study, stands out. Finally, it is important to highlight that this was the first time that a study was dedicated to evaluating the consumption of green tea kombucha on cardiometabolic risk markers in individuals with excess weight.

Conclusions

Daily consumption of 200 mL of green tea kombucha for 10 weeks, associated with a healthy diet with a restriction of 500 kcal/day, reduced TC, LDL-c, VLDL-c, TG, Castelli index II, and uric acid in individuals with excess weight (without apparent comorbidities), compared to baseline. Among men, green tea kombucha also reduced glycated hemoglobin compared to the control group. For these reasons, green tea kombucha should be included, in addition to the caloric deficit, in nutritional strategies to reduce cardiometabolic risk in individuals with excess weight. Due to the rich composition of phenolic compounds, organic acids, and potentially beneficial microorganisms, new therapeutic targets of green tea kombucha need to be studied.

Acknowledgments

We thank the Federal University of Viçosa and the Università degli Studi di Padova for all the support for this study. We also thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Funding

This study was funded by FAPEMIG (grant number: APQ-00035-20).

Statements and Declarations

The authors of this article declare that there is no conflict of interest.

References

- [1] Tchang BG, Saunders KH, & Igel LI (2021). Best Practices in the Management of Overweight and Obesity. *The Medical Clinics of North America*, 105(1), 149–174. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.08.018>

- [2] The Lancet Public Health (2023). Obesity prevention: changing perspectives. *The Lancet. Public health*, 8(3), e161. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(23\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(23)00033-6)

- [3] Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, & Duarte JA (2021). Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *International journal of sports medicine*, 42(3), 199–214. <https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>

- [4] Koliaki C, Liatis S, & Kokkinos A (2019). Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism: clinical and experimental*, 92, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.011>

- [5] Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, Lear SA, Ndumele CE, Neeland IJ, Sanders P, St-Onge MP, & American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council (2021). Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 143(21), e984–e1010. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973>
- [6] Asgary S, Rastqar A, & Keshvari M (2018). Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(5), 429–455. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1410867>
- [7] Borén J, Taskinen MR, Björnson E, & Packard CJ (2022). Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in health and dyslipidaemia. *Nature reviews. Cardiology*, 19(9), 577–592. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00676-y>
- [8] Katakami N (2018). Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 25(1), 27–39. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17014>
- [9] Honigberg M C, Zekavat SM, Pirruccello JP, Natarajan P, & Vaduganathan M (2021). Cardiovascular and Kidney Outcomes Across the Glycemic Spectrum: Insights From the UK Biobank. *Journal of the American College of Cardiology*, 78(5), 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.05.004>
- [10] Nakanishi K, & Morita H (2022). Uric Acid. *International heart journal*, 63(3), 423–425. <https://doi.org/10.1536/ihj.22-127>
- [11] Copur S, Demiray A, & Kanbay M (2022). Uric acid in metabolic syndrome: Does uric acid have a definitive role? *European journal of internal medicine*, 103, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2022.04.022>

[12] Sikand G, Kris-Etherton P, & Boulos NM (2015). Impact of functional foods on prevention of cardiovascular disease and diabetes. *Current cardiology reports*, 17(6), 39. <https://doi.org/10.1007/s11886-015-0593-9>

[13] Cardoso RR, Neto RO, Dos Santos D'Almeida CT, do Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L, Martino HSD, Cameron LC, Ferreira MSL, & Barros FAR (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 128, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>

[14] Júnior JCDS., Meireles MÍ, de Lima Brito I, & Tribuzy de Magalhães Cordeiro AM (2022). Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Current research in food science*, 5, 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>

[15] Atkinson FS, Cohen M, Lau K, & Brand-Miller JC (2023). Glycemic index and insulin index after a standard carbohydrate meal consumed with live kombucha: A randomised, placebo-controlled, crossover trial. *Frontiers in nutrition*, 10, 1036717. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1036717>

[16] Mendelson C, Sparkes S, Merenstein DJ, Christensen C, Sharma V, Desale S, Auchtung JM, Kok CR, Hallen-Adams HE, & Hutkins R (2023). Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes - a randomized controlled pilot investigation. *Frontiers in nutrition*, 10, 1190248. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1190248>

[17] Abramson JH (2011). WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiologic perspectives & innovations: EP+I*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1742-5573-8-1>

[18] Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, & Jablecka A (2012). Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biological trace element research*, 149(3), 315–322. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9448-z>

- [19] Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M, & Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(11), 1621–1630. [https://doi.org/10.1016/s0002-8223\(02\)90346-9](https://doi.org/10.1016/s0002-8223(02)90346-9)
- [20] Portal da Secretaria de Atenção Primária a Saúde (2011). Orientações para coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: norma técnica do sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN. Ministério da Saúde. <https://aps.saude.gov.br/biblioteca/visualizar/MTI4MQ==>
- [21] Castelli WP (1988). Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. *The Canadian journal of cardiology*, 4 Suppl A, 5A–10A
- [22] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, & Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- [23] Simental-Mendía LE, Rodríguez-Morán M, & Guerrero-Romero F (2008). The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic syndrome and related disorders*, 6(4), 299–304. <https://doi.org/10.1089/met.2008.0034>
- [24] Zhao CN, Tang GY, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Liu Q, Mao QQ, Shang A, & Li HB (2019). Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(7), 215. <https://doi.org/10.3390/antiox8070215>
- [25] 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 and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 60, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.051>

- [26] Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP., & Taillandier P (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of food science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- [27] Martínez Leal J, Valenzuela Suárez L, Jayabalan R, Huerta Oros J, & Escalante-Aburto A (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- [28] Costa MAC, Vilela DLS, Fraiz GM, Lopes IL, Coelho AIM, Castro LCV, & Martin JGP (2023). Effect of kombucha intake on the gut microbiota and obesity-related comorbidities: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(19), 3851–3866. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1995321>
- [29] Cardoso RR, Moreira LPD, de Campos Costa MA, Toledo RCL, Grancieri M, Nascimento TPD, Ferreira MSL, da Matta SLP, Eller MR, Duarte Martino HS, & de Barros FAR (2021). Kombuchas from green and black teas reduce oxidative stress, liver steatosis and inflammation, and improve glucose metabolism in Wistar rats fed a high-fat high-fructose diet. *Food & function*, 12(21), 10813–10827. <https://doi.org/10.1039/d1fo02106k>
- [30] Bellassoued K, Ghrab F, Makni-Ayadi F, Van Pelt J, Elfeki A, & Ammar E (2015). Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharmaceutical biology*, 53(11), 1699–1709. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1001408>
- [31] Lee C, Kim J, Wang S, Sung S, Kim N, Lee HH, Seo YS, & Jung Y (2019). Hepatoprotective Effect of Kombucha Tea in Rodent Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2369. <https://doi.org/10.3390/ijms20092369>
- [32] Andres-Hernando A, Cicerchi C, Kuwabara M, Orlicky DJ, Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T, Johnson RJ, & Lanaspa MA (2021). Umami-induced obesity and metabolic syndrome is mediated by nucleotide degradation and uric acid generation. *Nature metabolism*, 3(9), 1189–1201. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00454-z>

- [33] Sales AL, Iriondo-DeHond A, DePaula J, Ribeiro M, Ferreira IMPLVO, Miguel MAL, Del Castillo MD, & Farah A (2023). Intracellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Bioactive Profiles of Coffee Cascara and Black Tea Kombucha Beverages. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(9), 1905. <https://doi.org/10.3390/foods12091905>
- [34] Chen G, Tan ML, Li KK, Leung PC, & Ko CH (2015). Green tea polyphenols decreases uric acid level through xanthine oxidase and renal urate transporters in hyperuricemic mice. *Journal of ethnopharmacology*, 175, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.043>
- [35] Wu D, Chen R, Zhang W, Lai X, Sun L, Li Q, Zhang Z, Cao J, Wen S, Lai Z, Li Z, Cao F, & Sun S (2022). Tea and its components reduce the production of uric acid by inhibiting xanthine oxidase. *Food & nutrition research*, 66, 10.29219/fnr.v66.8239. <https://doi.org/10.29219/fnr.v66.8239>
- [36] Phung LT, Kitwetcharoen H, Chamnipa N, Boonchot N, Thanonkeo S, Tippayawat P, Klanrit P, Yamada M, & Thanonkeo P (2023). Changes in the chemical compositions and biological properties of kombucha beverages made from black teas and pineapple peels and cores. *Scientific reports*, 13(1), 7859. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34954-7>
- [37] 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* (Basel, Switzerland), 9(5), 447. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- [38] Piché ME, Tchernof A, & Després JP (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation research*, 126(11), 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
- [39] Zhan Z, Li Y, Zhao Y, Zhang H, Wang Z, Fu B, & Li WJ (2022). A Review of Electrochemical Sensors for the Detection of Glycated Hemoglobin. *Biosensors*, 12(4), 221. <https://doi.org/10.3390/bios12040221>
- [40] Blaak E (2008). Sex differences in the control of glucose homeostasis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 11(4), 500–504. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32830467d3>

- [41] Basu R, Dalla Man C, Campioni M, Basu A, Klee G, Toffolo G, Cobelli C, & Rizza RA (2006). Effects of age and sex on postprandial glucose metabolism: differences in glucose turnover, insulin secretion, insulin action, and hepatic insulin extraction. *Diabetes*, 55(7), 2001–2014. <https://doi.org/10.2337/db05-1692>
- [42] Keramida G, & Peters A M (2017). Fasting hepatic glucose uptake is higher in men than women. *Physiological reports*, 5(11), e13174. <https://doi.org/10.14814/phy2.13174>
- [43] Pepe RB, Lottenberg AM, Fujiwara CTH, Beyruti M, Cintra DE, Machado RM, Rodrigues A, Jensen NSO, Caldas APS, Fernandes AE, Rossoni C, Mattos F, Motarelli JHF, Bressan J, Saldanha J, Beda LMM, Lavrador MSF, Del Bosco M, Cruz P, Correia PE, Piovacari SMF (2023). Position statement on nutrition therapy for overweight and obesity: nutrition department of the Brazilian association for the study of obesity and metabolic syndrome (ABESO-2022). *Diabetology & metabolic syndrome*, 15(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13098-023-01037-6>
- [44] Little RR, Rohlfing C, Sacks DB. The national glycohemoglobin standardization program: over 20 years of improving hemoglobin a1c measurement. *Clin Chem*. 2019;65(7):839–48
- [45] Most J, & Redman LM (2020). Impact of calorie restriction on energy metabolism in humans. *Experimental gerontology*, 133, 110875. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110875>

8 CONCLUSÃO GERAL

Em indivíduos com excesso de peso, o consumo de 200 mL kombucha de chá verde por dez semanas reduziu o peróxido de hidrogênio, um importante radical pró-oxidante, que promove danos teciduais e celulares à parede vascular. Além disso, a kombucha de chá verde foi capaz de reduzir a hemoglobina glicada em participantes do sexo masculino, demonstrando o grande potencial hipoglicemiante da bebida. Os demais marcadores avaliados não diferiram entre os grupos controle e kombucha.

Ao final do estudo, o grupo que consumiu a kombucha obteve benefícios adicionais ao grupo controle na comparação com os valores da linha de base. Somente os participantes do grupo kombucha aumentaram o ITB e reduziram o CT, LDL-c, VLDL-c, TG, índice de Castelli II e ácido úrico. Estes resultados elucidam que a bebida potencializa os efeitos que comumente já são observados com a dieta saudável de restrição calórica.

Portanto, o consumo de kombucha de chá verde pode ser incentivado, no contexto de uma dieta saudável e com restrição calórica, para melhora do estresse oxidativo e marcadores de risco cardiometabólico em indivíduos com excesso de peso.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO DE SELEÇÃO

Você foi diagnosticado (a) com COVID-19? () Sim () Não

Quando: _____

Atualmente, você faz uso de algum medicamento?

Medicamentos	Posologia (dose e frequência)	Tempo de uso	Motivo

Já passou por alguma cirurgia? () Sim () Não

Qual: _____

Pretende realizar alguma cirurgia nos próximos 3 meses? () Sim () Não

Qual: _____

Tabagismo:

() não fumante

() fumante

() ex-fumante

Cigarros/dia: _____ Fuma desde: _____ (ano)

Cigarros/dia (antes): _____ Parou: _____ (ano)

Em caso de mulheres:

Gestante ou lactante? () Sim () Não

Pretende engravidar nos próximos 3 meses? () Sim () Não

Já entrou na menopausa? () Sim () Não

Seu ciclo menstrual é regular? () Sim () Não

Observações _____

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO DE SELEÇÃO

Existe algum alimento (s) que você não gosta ou não ingere por motivo religiosos/filosóficos? () Sim () Não Se sim, qual (is)?

Quais alimentos você ingere diariamente ou que não podem faltar na sua rotina?

Indique as horas do dia em que você consome refeições e lanches. Coloque a letra R para refeições e L para lanches sob cada hora do dia.

Manhã e início da tarde

1h 2h 3h 4h 5h 6h 7h 8h 9h 10h 11h 12h

— — — — — — — — — — — —

Tarde e noite

13h 14h 15h 16h 17h 18h 19h 20h 21h 22h 23h 24h

— — — — — — — — — — — —

Você perdeu ou ganhou peso nos últimos 3 meses? () Sim () Não

() Perdeu ___ Kg () Ganhou ___ Kg

Observações: _____

Atualmente você está seguindo alguma dieta ou está em acompanhamento nutricional?

() Sim () Não Especifique: _____

Nos últimos 3 meses, houve alguma mudança no seu hábito alimentar?

() Sim () Não Especifique: _____

Você pratica atividade física?

() Sim () Não Especifique: _____

Nos últimos 3 meses, houve alguma mudança no seu padrão de atividade física?

() Sim () Não Especifique: _____

Nos últimos 3 meses, você apresentou algum episódio alérgico ou infeccioso?

() Sim () Não Especifique: _____

Você fez uso de algum antibiótico nos últimos 3 meses? (ex.: Amoxicilina, Azitromicina, Cefalexina, Ciprofloxacino, Ampicilina, Tetraciclina etc.)

() Sim () Não Especifique: _____

Como é seu hábito intestinal? Qual frequência? Possui algum desconforto ao evacuar?

Qual a consistência (escala de Bristol) _____

Quantas horas por dia você dorme? Seu sono é restaurador? () Sim () Não

Horas: _____

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO DE SELEÇÃO

Composição corporal

Antropometria	
Estatura (m):	
Peso habitual (kg):	Variação de 5% do peso (3m)
Peso atual (kg):	()SIM - exclui participante ()NÃO
IMC (kg/m ²):	>27kg/m ² ()SIM ()NÃO - exclui participante
Perímetro da Cintura (cm):	≥ 80cm (mulher); ≥ 94cm (homem)
Menor circunf: Umbilical:	()SIM () NÃO - exclui participante
Perímetro do Quadril(cm):	
BIA - InBody	
Gordura (%):	>30% (mulher); >25%(homem) ()SIM () NÃO - exclui participante
Gordura (kg):	
MM (kg):	
TMB (kcal/dia):	
Água (% peso):	
Pressão Arterial	
PAS (mmHg):	>130 e/ou 85 mmHg ()SIM – repetir no mesmo braço; se ainda der elevada pedir para o participante relaxar, respirar fundo e aferir 2x no outro braço. Se ainda der elevada, excluir participante () NÃO
PAD (mmHg)	

Qual sua disponibilidade de vir ao laboratório na parte da manhã? Quais dias conseguiria vir? (Obs: Perguntar também sobre a possibilidade de vir 1x/sem pegar kombuchas caso fique neste grupo)

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: _____ Data: ____/____/____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário do estudo “Efeito do consumo de kombuchas de chás verde e preto na microbiota intestinal e nas alterações metabólicas de indivíduos eutróficos e com excesso de peso”. Todas as informações necessárias sobre a pesquisa encontram-se descritas abaixo e em caso de dúvida, favor esclarecê-las antes da assinatura do presente termo.

A kombucha é uma bebida fermentada a base de chá verde ou chá preto, consumida há milhares de anos. Estudos recentes têm relatado diversos efeitos benéficos associados à ingestão de kombucha para a saúde. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa é investigar se a ingestão de kombucha de chá verde por 10 semanas consecutivas está associada a mudanças favoráveis no organismo de indivíduos adultos que se encontram dentro ou acima do peso.

O estudo será conduzido no Laboratório de Metabolismo Energético e de Composição Corporal (LAMECC) do Departamento de Nutrição e Saúde em conjunto com o Departamento de Tecnologia de Alimentos, ambos na UFV. Caso aceite participar do estudo, você deverá comparecer ao LAMECC em duas ocasiões diferentes (no início e ao final do estudo) para avaliação do peso, altura e medidas corporais. Na primeira visita, será solicitado a você o preenchimento de questionários com perguntas relacionadas à sua saúde, alimentação e estilo de vida. A avaliação nutricional e a entrevista têm duração média de 1 hora. Será realizada ainda coleta de sangue, urina, saliva e fezes de todos os participantes. O sangue será utilizado em análises bioquímicas, como glicemia, colesterol e triglicérides, e em análises de marcadores do estresse oxidativo (situação em que há excesso de radicais livres no organismo). A urina também será utilizada em análises de marcadores do estresse oxidativo e para análise da permeabilidade intestinal (integridade da parede intestinal). As fezes serão utilizadas para análise de ácidos graxos de cadeia curta (gorduras presentes nas fezes) e a saliva e fezes para avaliação da microbiota oral e intestinal (bactérias que habitam a boca e o intestino). As análises citadas têm por objetivo avaliar sua saúde antes e após o consumo da kombucha.

Os procedimentos invasivos serão realizados por pessoas treinadas, minimizando ao máximo eventuais desconfortos. A coleta de sangue será realizada ao início e ao final do estudo na Divisão de Saúde da UFV (DSA-UFV) por um técnico em enfermagem, utilizando apenas

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

materiais descartáveis, sendo possível uma sensação incômoda ou dolorida na hora de inserir a agulha e formação de hematomas no local da entrada da agulha que desaparecerão espontaneamente. Será solicitado ao técnico ser o mais preciso possível para minimizar qualquer incômodo. No caso de eventuais complicações no momento da punção venosa, serão prestados os primeiros socorros pelo técnico em enfermagem. Em caso de quaisquer outras complicações decorrentes do procedimento, você receberá assistência médica imediata e integral cujos custos serão de responsabilidade dos pesquisadores.

Os demais procedimentos do estudo não envolvem riscos à saúde.

A coleta da urina será realizada em duas ocasiões distintas, no começo e ao fim do estudo. Nos dias agendados, você deverá comparecer ao LAMECC após jejum noturno de 8 horas e deverá permanecer no laboratório durante 4 horas e 30 minutos. Durante esse período, toda a urina será coletada em recipientes fornecidos pela nossa equipe.

A avaliação do peso, altura e medidas corporais serão realizadas por profissional treinada, em uma sala fechada e silenciosa, com o intuito de preservar sua privacidade e minimizar qualquer constrangimento no momento das aferições. A composição corporal também será avaliada na Divisão de Saúde da UFV (DSA-UFV) por Densitometria Óssea (DEXA), o procedimento é feito com o indivíduo em decúbito dorsal, não é invasivo, não apresenta riscos e não necessita de preparo para sua execução. Durante a resposta dos questionários, você poderá deixar de responder a uma ou a um conjunto de perguntas caso sintase constrangido (a) sem que isso traga qualquer alteração de tratamento por parte dos pesquisadores.

As kombuchas fornecidas durante o estudo terão boa procedência e qualidade e serão devidamente acondicionadas visando a manutenção da qualidade nutricional e microbiológica. Ressalta-se que será uma bebida não-alcóolica.

Todos os indivíduos incluídos ou não no estudo receberão gratuitamente avaliação nutricional, antropométrica e de composição corporal. Os participantes incluídos no estudo receberão ainda uma cópia dos exames realizados e acompanhamento nutricional durante todo o estudo. Acreditamos ainda, com base em estudos preliminares, que a ingestão de kombucha aliada ao acompanhamento nutricional por dez semanas consecutivas proporcionará benefícios à saúde dos participantes.

O material biológico coletado (sangue, urina, saliva e fezes) será armazenado em ultra freezers do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV até o momento das análises. Dessa forma, ao assinar o presente termo, você autoriza a coleta, depósito, armazenamento e utilização do material biológico coletado (sangue, urina, saliva e fezes) em posteriores análises.

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Ressaltamos que, a qualquer momento, você pode retirar seu consentimento para a guarda, utilização e/ou armazenamento do material biológico e essa atitude não lhe trará qualquer prejuízo. A solicitação deve ser feita por escrito e assinada, com validade a partir da data da comunicação de sua decisão ao pesquisador.

Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o encerramento do estudo e depois desse tempo, serão destruídos. Nós trataremos sua identidade com sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e utilizaremos as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Seus dados ficarão guardados em local seguro, onde apenas os pesquisadores terão acesso. Além disso, você será identificado pelas iniciais de seu nome e/ou número de registro a fim de garantir a confidencialidade dos dados.

Em caso de danos decorrentes da pesquisa, você receberá assistência integral e imediata pelo tempo que for necessário, cujos custos serão de responsabilidade dos pesquisadores. Destacamos que você terá direito à indenização caso ocorram eventuais danos, previstos ou não, decorrentes da pesquisa.

A equipe de trabalho não se responsabiliza por informações não prestadas por você, que possam interferir na sua saúde.

A decisão de participar desse estudo é completamente voluntária. Esse estudo não trará nenhum custo ou prejuízo financeiro e todos os materiais serão fornecidos pela equipe da pesquisa. Todos os gastos decorrentes à sua participação na pesquisa, incluindo gastos com transporte e alimentação para você e seu (s) acompanhante (s), quando for o caso, serão ressarcidos.

Você pode se recusar a participar ou poderá sair do estudo a qualquer momento, mesmo depois de dar o seu consentimento, e essa atitude não lhe trará prejuízos futuros. Em caso de interrupção do estudo, você receberá assistência de forma adequada, pelo tempo que for necessário, cujos custos serão de responsabilidade dos pesquisadores.

A qualquer momento você poderá fazer perguntas sobre o estudo ou esclarecer dúvidas. Para isso, poderá entrar em contato pelo telefone (41) 99619-7612.

Esse termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Todas as páginas deverão ser rubricadas por você e pelo pesquisador responsável ou pela doutoranda da pesquisa.

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, contato _____, fui informado (a) dos objetivos da pesquisa *“Efeito do consumo de kombuchas de chás verde e preto na microbiota intestinal e nas alterações metabólicas de indivíduos eutróficos e com excesso de peso”* de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Pesquisador Responsável: Professor Frederico Augusto Ribeiro de Barros

Endereço: Universidade Federal de Viçosa. Edifício Beck Andersen, 2º andar. Avenida PH Rolfs, s/n – Campus Universitário. CEP: 36570-000 Viçosa - MG

Telefone: (31) 3612-6803

E-mail: fredbarros@ufv.br

Em caso de discordância ou irregularidades sobre o aspecto ético dessa pesquisa, você poderá consultar:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP/UFV

Universidade Federal de Viçosa - Edifício Arthur Bernardes, piso inferior. Avenida PH Rolfs, s/n – Campus Universitário. CEP: 36570-000 Viçosa - MG

Telefone: (31) 3612-2316

E-mail: cep@ufv.br

Website: www.cep.ufv.br

Viçosa, _____ de _____ de _____.

Gabriela Macedo Fraiz
Doutoranda PPGCN/UFV

Voluntário (a)

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE



CARTILHA DO PARTICIPANTE

Equipe:

Professora Dra. Josefina Bressan (Coordenadora)

Professor Dr. Frederico Barros (Coordenador)

Gabriela Macedo Fraiz (Doutoranda)

Dandara Bonifácio (Mestranda)

Udielle Lacerda (Mestranda)

Maria Fernanda Pereira (Estudante de graduação)

Carolina Vargas (Estudante de graduação)

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE

AGORA VOCÊ É UM PARTICIPANTE DO PROJETO KOMBUCHA



Durante o período do estudo, é preciso que você siga algumas orientações:

- Siga as recomendações nutricionais prescritas pela nutricionista;
- Mantenha o mesmo padrão de atividade física durante o estudo;
- Não faça uso de suplementos (vitaminas, minerais, ômega 3, probióticos, prebióticos ou simbióticos);
- Caso consuma bebida alcoólica, não ultrapasse o limite de álcool permitido (MULHERES: 1 lata pequena de cerveja – 350 ml OU 1 taça pequena de vinho – 150 ml OU 1 dose de destilados como gin, cachaça e vodca – 25 ml; HOMENS: 2 latas pequenas de cerveja – 700 ml OU 2 taças pequenas de vinho – 300 ml OU 1 dose de destilados como gin, cachaça e vodca – 50 ml). Atenção: o limite se refere a dose máxima/dia e não é cumulativa para a semana;

Ainda, **NÃO** consuma os seguintes alimentos:

- Bebidas e alimentos fermentados (chucrute, tofu, kefir e kombucha caso esteja no grupo apenas da dieta e outras kombuchas além da fornecida caso esteja no grupo da kombucha com dieta)
- Chá verde, branco, preto, oolong, de hibisco ou mistura de chás que contem algum destes chás.

Por favor, comunique à nossa equipe se ficar doente, incluindo COVID-19, ou se precisar tomar algum medicamento durante o estudo, especialmente se fizer uso de antibiótico. Também nos comunique em caso de alteração na sua alimentação, atividade física

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE



DIAS 4 E 5: Ao final do estudo, serão repetidos os dias 1 e 2, para realização de um novo teste de permeabilidade intestinal, nova coleta de sangue e novo exame DEXA.

Lembre-se de levar roupas leves em todas as ocasiões para realizar a aferição do seu peso.

ORIENTAÇÕES PARA O DIA DA COLETA DE SANGUE E DEXA

Você primeiramente irá coletar o sangue no Laboratório de Análises Clínicas, localizado na Divisão de Saúde (DSA/UFV) a partir das 7:00h. Após a coleta, você será encaminhado no mesmo local para exame de Densitometria Óssea (DEXA) para avaliar sua composição corporal. Este exame inicia às 8:00h (ordem de chegada).

- Você deverá comparecer ao laboratório com jejum de 10 horas. Nesse período será permitido consumir apenas água e/ou remédios.
- Sugerimos duas opções de refeições para serem consumidas na véspera do exame. Desse modo, sua última refeição pode ser um sanduíche natural com suco, ou um jantar completo de arroz, feijão, vegetais com carne ou ovo;
- Sua última refeição deverá ser consumida até 20:00 horas;
- NÃO ULTRAPASSE MAIS DE 14 HORAS DE JEJUM;
- Evitar a ingestão de álcool 72h antes do exame;
- Evitar atividade física excessiva 24h antes da coleta.

QUE VESTIMENTA DEVO USAR?

- No dia da coleta de sangue utilize roupas leves e confortáveis.
- Evite usar acessórios de metal, sutiã ou calça com aro ou botão de metal, pois precisarão ser retirados para realização do DEXA (exame que é feito no mesmo dia da coleta).

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE



DIAS 4 E 5: Ao final do estudo, serão repetidos os dias 1 e 2, para realização de um novo teste de permeabilidade intestinal, nova coleta de sangue e novo exame DEXA.

Lembre-se de levar roupas leves em todas as ocasiões para realizar a aferição do seu peso.

ORIENTAÇÕES PARA O DIA DA COLETA DE SANGUE E DEXA

Você primeiramente irá coletar o sangue no Laboratório de Análises Clínicas, localizado na Divisão de Saúde (DSA/UFV) a partir das 7:00h. Após a coleta, você será encaminhado no mesmo local para exame de Densitometria Óssea (DEXA) para avaliar sua composição corporal. Este exame inicia às 8:00h (ordem de chegada).

- Você deverá comparecer ao laboratório com jejum de 10 horas. Nesse período será permitido consumir apenas água e/ou remédios.
- Sugerimos duas opções de refeições para serem consumidas na véspera do exame. Desse modo, sua última refeição pode ser um sanduíche natural com suco, ou um jantar completo de arroz, feijão, vegetais com carne ou ovo;
- Sua última refeição deverá ser consumida até 20:00 horas;
- NÃO ULTRAPASSE MAIS DE 14 HORAS DE JEJUM;
- Evitar a ingestão de álcool 72h antes do exame;
- Evitar atividade física excessiva 24h antes da coleta.

QUE VESTIMENTA DEVO USAR?

- No dia da coleta de sangue utilize roupas leves e confortáveis.
- Evite usar acessórios de metal, sutiã ou calça com aro ou botão de metal, pois precisarão ser retirados para realização do DEXA (exame que é feito no mesmo dia da coleta).

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE

ORIENTAÇÕES PARA O DIA DA PERMEABILIDADE INTESTINAL



COLETA DE URINA

Para a coleta de urina siga os seguintes passos:

1. Esvazie a bexiga, mesmo que não esteja com vontade, imediatamente após o consumo da última refeição do dia anterior ao teste de permeabilidade intestinal. Essa urina deverá ser desprezada (não será coletada).
2. A partir daí, toda vez que for ao banheiro, coletar a urina em copo descartável e armazenar na garrafa fornecida pela equipe. Colete até mesmo a urina que for eliminada durante o período da noite.
3. No dia seguinte, continuar a coleta de urina, incluindo a primeira urina do dia e as subsequentes até a chegada ao laboratório.
4. Armazene a urina na geladeira e leve ao laboratório no dia do teste de permeabilidade.

COLETA DE FEZES

- Para evitar contaminação do material, urine no vaso sanitário antes de fazer a coleta das fezes, se for necessário.
- Não retire as fezes da água do vaso sanitário para evitar contaminação.
- Faça a coleta da amostra no recipiente fornecido pela equipe do Projeto Kombucha.
- Até o momento de entrega da amostra no laboratório, as fezes devem ser congeladas e transportadas em uma caixa de isopor com gelo (fornecida pela equipe).
- A entrega da amostra deve ser realizada em até 24 horas. Caso não seja possível coletar as fezes na véspera do exame, entre em contato com alguém da equipe Kombucha para que seja possível agendar outro horário para entrega do material.

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE



COLETA DE SALIVA

O dia que você irá coletar a saliva no laboratório será o mesmo dia do teste de permeabilidade intestinal. Siga os seguintes passos:

1. Escove os dentes após a sua última refeição no dia anterior que está agendado seu teste de permeabilidade intestinal.
2. Não ingerir nenhum alimento após escovar os dentes.
3. No dia do exame, comparecer ao laboratório sem escovar os dentes e sem ingerir qualquer alimento, também não é permitido mascar chicletes ou chupar balas (mesmo sem açúcar). É permitido o consumo de água (sem gás).
4. Você poderá escovar os dentes após nossa equipe coletar sua saliva no laboratório, então se preferir pode levar sua escova e pasta de dente para higienização bucal.

CHECKLIST DE PREPARO PARA O DIA DA PERMEABILIDADE INTESTINAL



- Jejum de 8 horas. Realizar refeição equilibrada no jantar.
- Levar galão com urina coletada conforme orientações
- Levar fezes coletadas e congeladas dentro do isopor
- Levar ou ir vestido(a) com roupas leves e confortáveis
- Ir para o laboratório sem escovar os dentes
- Levar os 3 registros alimentares preenchidos

APÊNDICE 3 – CARTILHA DO PARTICIPANTE



APÊNDICE 4 – QUESTIONÁRIO DE ADESÃO AO PROTOCOLO DO ESTUDO

ANTROPOMETRIA	
1 - Peso:	_____
2 - Altura:	_____
3 - IMC:	_____
4 - Perímetro da cintura (umbilical/ menor circunferência):	_____
5 - Perímetro do quadril:	_____
6 - Perímetro do pescoço:	_____
7- Gordura corporal (InBody):	_____
Observações: _____	
CONTROLE DO CONSUMO ALIMENTAR	
Durante o período consumiu:	Quantidade:
() Chá verde	_____
() Chá preto	_____
() Chá branco	_____
() Chá de hibisco	_____
() Bebidas/ alimentos fermentadas	_____
() Bebidas alcóolicas	_____
ADESÃO À DIETA	
Você beliscou entre as refeições? _____	
Nos finais de semana a sua alimentação mudou? _____	
Adicionou sal ou açúcar aos alimentos após o preparo? Em quais? _____	

Utilizou qual tipo de gordura no preparo dos alimentos? _____	
Ingestão de água (quantidade/frequência): _____	
Gostaria de algum ajuste? _____	
Observações: _____	
SINTOMAS GASTROINTESTINAIS (na última semana)	
() Náuseas/Vômitos	() Constipação
() Flatulência	() Pirose (azia)
() Diarreia	() Estase gástrica pós-prandial
() Disfagia	() Dor ou sangramento retal
Quantidade de evacuações por dia/semana: _____	
Escala de Bristol: _____	
Observações: _____	

APÊNDICE 5 – FICHAS DE REGISTRO DO CONSUMO DA KOMBUCHA



REGISTRO DO CONSUMO DE KOMBUCHA

Nome: _____ Início do estudo: ____/____/____

Semana 1		
Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N	

Semana 2		
Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N	

Semana 3		
Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N	

Semana 4		
Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N	

APÊNDICE 5 – FICHAS DE REGISTRO DO CONSUMO DA KOMBUCHA

Semana 5			Semana 6		
Dia	Consumo	Horário	Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N		Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N		Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N		Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N		Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N		Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N		Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N		Segunda-feira	() S () N	
Semana 7			Semana 8		
Dia	Consumo	Horário	Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N		Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N		Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N		Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N		Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N		Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N		Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N		Segunda-feira	() S () N	
Semana 9			Semana 10		
Dia	Consumo	Horário	Dia	Consumo	Horário
Terça-feira	() S () N		Terça-feira	() S () N	
Quarta-feira	() S () N		Quarta-feira	() S () N	
Quinta-feira	() S () N		Quinta-feira	() S () N	
Sexta-feira	() S () N		Sexta-feira	() S () N	
Sábado	() S () N		Sábado	() S () N	
Domingo	() S () N		Domingo	() S () N	
Segunda-feira	() S () N		Segunda-feira	() S () N	