

POTENCIAL PROBIÓTICO DE MICRO-ORGANISMO ISOLADO DE KOMBUCHA

KATERIN MILENA GALLEGOS SOSA¹; JOSEANE CASTANHEIRA MACHADO²;
PAOLA QUEVEDO DA COSTA³; TAICIANE GONÇALVES⁴; SIMONE PIENIZ⁵

¹Universidade Federal de Pelotas– katerinmgsnutri@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– joseanecastanheiram@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– quevedopaola97@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas– ta.ici@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas– nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida semelhante a um espumante, de sabor ácido e refrescante que apresenta efeito probiótico, tendo seu consumo aumentado nos últimos anos em decorrência do reconhecimento de seus benefícios à saúde, assim como pela modificação das escolhas alimentares da sociedade (RIBEIRO, 2021). Originalmente asiática, é preparada a partir da fermentação da infusão das folhas de *Camellia sinensis* (chá verde ou preto) com adição de sacarose (MEDEIROS; CECHINEL-ZANCHETTI, 2019), utilizando como inóculo uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras, que deriva da sigla “scooby” - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (MENDONÇA et al., 2020).

Probióticos são suplementos alimentares que contém bifidobactérias ou bactérias benéficas que, no caso da kombucha, serão responsáveis pelo consumo do açúcar, transformando-a em uma bebida naturalmente gaseificada e repleta de ácidos orgânicos, catequinas, flavonoides e compostos fenólicos (SANTOS et al., 2019; BRUSCHI, et al., 2018). Esses metabólitos resultantes das atividades microbiológicas têm sido relacionados à propriedades terapêuticas, e dentre as diversas alegações, destacam-se benefícios antimicrobianos, antioxidantes, anti-diabéticos e anticancerígenos (SOARES, 2021; CHAKRAVORTY et al., 2016; VITAS et al., 2013; YANG, et al., 2010).

Contudo, o mercado de kombucha além de inovador, está em crescimento, fazendo com que sejam necessárias pesquisas que avaliem a composição microbiológica desses produtos para que haja uma oferta segura, sensorialmente agradável e que traga os benefícios elucidados na literatura ao consumidor (SUHRE, 2020). Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial probiótico de micro-organismo isolado de kombucha.

2. METODOLOGIA

O isolado de kombucha utilizado no presente estudo foi obtido da Coleção Conservada em Estoque do Laboratório de Nutrifisiogenômica da Faculdade de Nutrição UFPel, Campus Anglo, localizado na cidade de Pelotas-RS, identificado como KaC.

A resistência do isolado sob diversas condições ácidas foi realizada de acordo com Erkkilä & Petaja (2000), com algumas modificações. O isolado KaC foi inoculado em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C por 24 h, e testado sob diferentes condições ácidas em caldo MRS ajustado com ácido clorídrico (HCL) concentrado (pH 2, 3 e 4), sendo que o pH 7 foi usado como controle. Um

mililitro (1 mL) da cultura foi adicionado em tubos contendo 10 mL de caldo MRS acidificado. Após a exposição às condições ácidas por 0 h, 2 h, e 4 h, diluições seriadas de cada tempo foram inoculadas em placas contendo ágar MRS e incubadas à 37 °C por 24 h. Os dados foram expressos como valores de log de Unidades Formadoras de Colônias por mL ($\log.UFC.mL^{-1}$). A viabilidade celular foi calculada com a seguinte equação: % de sobrevivência: contagem final ($UFC.mL^{-1}$) / controle ($UFC.mL^{-1}$) x 100.

Após a incubação em caldo MRS à 37 °C por 24 h, células do isolado foram coletadas por centrifugação (10000 x g por 15 min à 4 °C) e, a avaliação da resistência bacteriana aos sais biliares realizada utilizando 10 mL de caldo MRS esterilizado, suplementado com uma mistura de colato de sódio e desoxicolato de sódio (Sigma) na proporção de 1:1, obtendo uma concentração final de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1% (m/v). A contagem de células viáveis foi determinada, quando expostas aos sais biliares por 0 h, 2 h, e 4 h de incubação, em placas contendo ágar MRS. Em cada período foram realizadas diluições seriadas das amostras e incubadas à 37 °C por 24 h. Os dados foram expressos como valores de $\log.UFC.mL^{-1}$ (PERELMUTER et al., 2008).

A avaliação de tolerância a sobrevivência ao trato gastrointestinal (TGI) foi avaliada de forma simulada conforme Huang & Adams (2004). Após 24 h de incubação a 37 °C foram separadas por centrifugação (1200 x g por 5 min) as células do isolado, foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (0,85%) (PBS, Laborclin®), e ressuspendidas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 200 μ l da suspensão celular foi ministrada a 0,3 mL de solução salina e 1 mL de suco gástrico ou intestinal simulado e incubados a 37 °C. A contagem de células viáveis foi realizada no tempo 0 h, 2 h e 4 h para a tolerância gástrica e para a determinação da tolerância ao trânsito no intestino delgado. O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3 $mg.mL^{-1}$) e pH 2 com ou sem a adição de leite integral; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1 $mg.mL^{-1}$), pH 8 com ou sem adição de 0,5% de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH 2 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina (0,85%) por 0,3 mL de leite integral reconstituído a 10% (m/v). A contagem do número de células viáveis durante a simulação pelo trato gástrico e pelo trato intestinal foi realizada nos tempos 0 h, 2 h e 4 h em placas de Petri contendo ágar MRS. Os dados foram expressos como valores de $\log.UFC.mL^{-1}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Referente a sobrevivência do micro-organismo às condições ácidas, observou-se que, embora tenha ocorrido uma diminuição nos tempos 2 h e 4 h nos tratamentos mais ácidos (pH 2, 3 e 4) quando comparados ao controle (pH 7), não houveram alterações significativas entre os níveis de pH analisados, evidenciando viabilidade do isolado. Corroborando com estes dados, Suhre (2020) analisou em seu estudo características físico-químicas e composição microbiana de bebidas kombuchas brasileiras, onde descreve que para que se garanta a segurança microbiológica da bebida, o pH após a fermentação não deve ultrapassar a medida de 4,2 (SUHRE, 2020; VILLAREAL-SOTO et al., 2018).

Se tratando da resistência aos sais biliares, os resultados demonstram uma proporcionalidade na relação tempo/ concentração, de modo que os diferentes percentuais de sais biliares apresentaram a mesma viabilidade, principalmente

nos tempos de 0 h e 4 h. Matei e colaboradores (2018) também submeteram seus isolados a uma concentração de 1,5% e encontraram resultados semelhantes ao presente estudo. No entanto, quando submetidas a uma concentração de 3% (usual em humanos), os isolados coco-bacilos foram fortemente inibidos.

Quanto às análises de tolerância ao TGI, observou-se que os resultados para pancreatina pH 8 e pancreatina pH 8 + 1,5% de sais biliares, nos tempos de 2 h e 4 h, foram similares ao controle. Já os resultados para pepsina, apresentaram viabilidade estável entre si em todos os tempos analisados. Segundo Puspawati & Arihantana (2016), isolados de BAL apresentam capacidade de tolerar a acidez estomacal simulada (pH 2) por 4 h.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos, conclui-se que o isolado KaC apresentou efeito probiótico mantendo-se viável sob condições ácidas, na presença de sais biliares e na presença de enzimas intestinais simuladas (pancreatina e pepsina). Considerando que a procura por bebidas fermentadas tem aumentado nos últimos anos, trata-se de um resultado promissor para o uso e a comercialização da bebida kombucha.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MEDEIROS, S. C. G., CECCHINEL-ZANCHETT, C. C. Kombucha: efeito in vitro e in vivo. **Infarma Ciências Farmacêuticas**. v. 31, n. 2, p. 73-79, 2019.

RIBEIRO, L. S. **Kombucha: o que dizem as pesquisas brasileiras dos últimos cinco anos (2015-2020)**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará.

MEDONÇA, G. R., PEREIRA, A. L. F., FERREIRA, A. G. N., NETO, M. S., DUTRA, R. P., ABREU, V. K. G. Propriedades antioxidantes e efeitos antimicrobianos da Kombucha: revisão da evidência científica. **Revista Contexto & Saúde**, v. 20, n. 40, p. 244-251, 2020.

BRUSCHI, J. S., SOUSA, R. C. S., MODESTO, K. R. O ressurgimento do chá de kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 1 (Esp), p. 162-168, 2018.

SANTOS, J. S., NOBREGA, G. S. Kombucha: consumo, benefícios e comercialização. In: **SEMANA DE MOBILIZAÇÃO CIENTÍFICA - SEMOC**, 22., Salvador, 2019. Universidade Católica do Salvador, **Anais da 22ª SEMOC**.

SOARES, M. G. **Propriedades emergentes, aplicações e uso terapêutico do Kombucha e seu scoby: uma revisão**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

VITAS, J., MALBASA, R., GRAHOVAC, J., LONCAR, E. S. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quaterly**, v. 19, n.1, p. 129-130, 2013.

YANG, Z. X., ZHOU, F., JI, B., LI, B., LUO, Y., LI, T. **Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 89, n.1, p. 150-156. 2010.

CHAKRAVORTY, S., BHATTACHARYA, S., CHATZINOTAS, A., CHAKRABORTY, W., BHATTACHARYA, D., GACHHUI, R. **Kombucha tea fermentation: Microbial and Biochemical dynamics.** International Journal of Food Microbiology, v. 220, p. 63-72, 2016.

SUHRE, T. **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

VILLARREAL-SOTO, S. A; BEAUFORT, S.; BOUJILA, J.; SOUCHARD, J.; TAILANDIER, P. **Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review.** Journal of Food Science, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.

MATEI, B., SALZAT, J., DIGUTA, C. F., CORNEA, C. P., LUTA, G., UTOIU, E. R., MATEI, F. Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 3, p. 13592-13598, 2018.

PUSPAWATI, N. N., ARIHANTANA, N. M. I. H. Viability of Lactic Acid Bacteria isolated from kombucha tea against low pH and bile salt. **MITP - Media Imiah Technology Pangan**, v. 3, n. 1, p. 18-25, 2016.