



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)
BIOTECNOLOGIA**

Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de Kombuchas em *Caenorhabditis elegans*

GABRIELA MILENA CHALLCO MERCADO

FOZ DO IGUAÇU

2022



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)
BIOTECNOLOGIA**

Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de Kombuchas em *Caenorhabditis elegans*

GABRIELA MILENA CHALLCO MERCADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial para a obtenção de título da Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Leticia Priscilla Arantes.

FOZ DO IGUAÇU

2022

GABRIELA MILENA CHALLCO MERCADO

AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS DAS KOMBUCHAS EM
Caenorhabditis elegans

Trabajo de Conclusión de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-Americano
Ciencias da Vida e da Natureza da
Universidad Federal da Integración Latino-
Americana, como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Priscilla Arantes

UNILA

Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

UNILA

Prof. Mts. Larissa Marafiga Cordeiro

UFSM

Foz do Iguaçu, 16 de Dezembro de 2022

RESUMO

Na atualidade, as pessoas buscam, ser mais conscientes sobre o cuidado com a própria saúde, procurando alternativas acessíveis para o bem-estar. Tendo em vista que a kombucha pode nos oferecer propriedades benéficas para a saúde e tem uma preparação simples e rápida, ela se torna uma alternativa desejada para cumprir esse propósito. Não obstante, ainda não se tem muitos estudos que comprovem as propriedades e os possíveis efeitos tóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos de kombuchas fermentadas em diferentes tempos (7, 14 e 30 dias) preparadas com chá verde e preto (5g/L) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Para a realização deste trabalho se utilizou *C. elegans* N2 (cepa selvagem) sincronizados no estágio larval L1, o tratamento foi realizado em placas de petri adicionando 1mL de Kombucha e chás. A exposição foi durante todo o desenvolvimento larval, se realizou ensaios de sobrevivência, desenvolvimento larval, parâmetros comportamentais (bombeamento faríngeo e locomoção) e o desenvolvimento reprodutivo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, com post-test Tukey, considerando como diferença significativa $p < 0.05$. Após os tratamentos, não foi observada nenhuma variação significativa para os ensaios de sobrevivência e parâmetros comportamentais. Porém, no ensaio de desenvolvimento larval houve um atraso no desenvolvimento após tratamento com chá verde, e no ensaio de desenvolvimento reprodutivo se observou uma quantidade maior de ovos no útero, após tratamento com kombuchas de 7 e 14 dias de fermentação. Além de uma diminuição de número de ovos no útero de ovos após tratamento com a kombucha de chá verde com 30 dias de fermentação.

Palavra-chave: Tempo de fermentação; Kombucha ; *C. elegans* ; Toxicidade da kombucha

RESUMEN

Hoy en día, las personas buscan ser más conscientes sobre el cuidado de su propia salud, buscando alternativas asequibles para su bienestar. Teniendo en cuenta que la kombucha puede ofrecernos propiedades beneficiosas para la salud y tiene una preparación sencilla y rápida, se convierte en una alternativa deseada para cumplir con este propósito. Sin embargo, todavía no hay muchos estudios que prueben las propiedades y posibles efectos tóxicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles efectos tóxicos de las kombuchas fermentadas en diferentes tiempos (7, 14 y 30 días) preparadas con té verde y negro (5g/L) sobre el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Para la realización de este trabajo se utilizó *C. elegans* N2 (cepa silvestre) sincronizada en el estado larvario L1, el tratamiento se realizó en placas petri adicionando 1mL de Kombucha y té. La exposición fue durante todo el desarrollo larvario y se realizaron pruebas de supervivencia, desarrollo larvario, parámetros de comportamiento (bombeo faríngeo y locomoción) y desarrollo reproductivo. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía, con post-test de Tukey, considerando $p < 0,05$ como diferencia significativa. Después de los tratamientos, no se observaron variaciones significativas en las pruebas de supervivencia y los parámetros de comportamiento. Sin embargo, en la prueba de desarrollo larvario hubo un retraso en el desarrollo después del tratamiento con té verde, y en la prueba de desarrollo reproductivo se observaron una mayor cantidad de huevos en el útero después del tratamiento con kombuchas de 7 y 14 días de fermentación. Además de una disminución del número de huevos en el útero después del tratamiento con kombucha de té verde con 30 días de fermentación.

Palabras- Clave: Tiempo de fermentación; Kombucha ; *C. elegans* ; Toxicidad de la kombucha.

Lista de Figuras

FIGURA 01 – Imagens ilustrativas do <i>Scoby</i> da Kombucha.....	14
FIGURA 02 – Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	20
FIGURA 03 – Passos para a preparação dos chás Verde e Preto.....	27
FIGURA 04 – Passos para a preparação das kombuchas (chá preto e verde)....	28
FIGURA 05 – Passos da exposição das kombuchas e chás (verde e preto).....	29
FIGURA 06 – Morfologia da vulva em <i>C. elegans</i>	30
FIGURA 07 – Descrição da análise do movimento corporal do <i>C. elegans</i>	31
FIGURA 09 – Imagem da taxa de desenvolvimento larval (%) após 48 horas de tratamento.....	34
FIGURA 10 – Análises de desenvolvimento larval após 72 horas.....	35
FIGURA 11 – Avaliação do bombeamento faríngeo.....	37
FIGURA 12 – Avaliação do movimento do corpo	38
FIGURA 13 – Avaliação de número de ovos no útero.....	39

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Lista de reagentes necessários para a produção do meio de cultivo NGM	25
Tabela 02 – Lista de reagentes para a preparação do meio LB para <i>E. coli</i> OP50.....	25
Tabela 03 – Lista de reagentes para a preparação da solução de branqueamento.....	26
Tabela 04 – Lista de reagentes para o preparo do tampão M9.....	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

CE50	Concentração Eficaz
CEUA	Comitês de Ética para o Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal
DSL	D-sacárico 1,4-lactona
ECG	Galato de epicatequina
ECGC	Galato de epigalocatequina
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
FDA	Federação de Administração de Alimentos e Comida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LB	Luria Bertani Médium
LC50	Dose Letal Média
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
NGM	Meio de Crescimento para Nematoides
SCOBY	Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 KOMBUCHA.....	13
2.2 PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA.....	13
2.2.1 INFUSÃO DE CHÁS.....	13
2.2.2 SCOBY.....	14
2.2.3 FERMENTAÇÃO.....	15
2.3 COMPOSIÇÃO DA KOMBUCHA.....	16
2.4 BENEFÍCIOS DA KOMBUCHA.....	17
2.5 EFEITOS TÓXICOS DA KOMBUCHA.....	18
2.6 MODELO EXPERIMENTAL <i>Caenorhabditis elegans</i>	20
2.6.1 CARACTERÍSTICAS.....	20
2.6.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> COMO UM ORGANISMO MODELO.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. OBJETIVO GERAL.....	24
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. METODOLOGIA.....	25
5.1 MANUTENÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO <i>C. elegans</i>	25
5.1.1 MANUTENÇÃO DO <i>C. elegans</i>	25
5.1.2 SINCRONIZAÇÃO DO <i>C. elegans</i>	26
5.2 PREPARAÇÃO DOS CHÁS E KOMBUCHAS.....	27
5.2.1 PREPARAÇÃO DOS CHÁS.....	27
5.2.2 PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA.....	27
5.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
5.3.1 EXPOSIÇÃO À KOMBUCHA.....	28
5.3.2 TESTES TOXICOLÓGICOS DA KOMBUCHA.....	30

5.3.2.1 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA.....	30
5.3.2.2 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO LARVAL.....	30
5.3.2.3 BOMBEAMENTOS FARÍNGEOS.....	31
5.3.2.4 MOVIMENTO CORPORAL (<i>Thrashing assay</i>).....	31
5.3.2.5 NÚMERO DE OVOS NO ÚTERO DO ANIMAL.....	32
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6. RESULTADOS E DISCUÇÃO	32
6.1 ANÁLISE DE TOXICIDADE.....	33
6.1.1 AVALIAÇÃO DA ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	33
6.1.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO LARVAL.....	33
6.1.3 AVALIAÇÃO DO BOMBEAMENTO FARÍNGEO.....	37
6.1.4 AVALIAÇÃO DO MOVIMENTO CORPORAL (<i>Thrashing assay</i>).....	38
6.1.5 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE OVOS NO ÚTERO DO ANIMAL.....	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
8. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

A kombucha é um chá adoçado e fermentado com origem na Ásia, muito consumida pelos seus benefícios terapêuticos. Já em 220 a.C. foi usada no nordeste da China pelas suas propriedades energizantes e desintoxicantes (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016; SILVA *et al.*, 2021). Atualmente, a legislação do Brasil, predispõe que os ingredientes obrigatórios da kombucha, que são: Infusão de um chá adoçado, 10% (v/v) do líquido de kombucha previamente fermentada e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras que é denominado SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) (Brasil, 2019). Existem diversos chás que podem ser usados para sua preparação, porém os mais comuns são o chá preto e verde, que são derivados da planta *Camellia sinensis* (COELHO *et al.*, 2020; JAYABALAN *et al.*, 2014).

É difícil definir a composição da kombucha e a concentração de cada metabólito, já que eles podem sofrer modificações (JAYABALAN *et al.*, 2014). Porém, os benefícios apresentados pela composição da kombucha são diversos, dos quais destacam atividades antioxidantes (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018), potencial anti-inflamatório, potencial inibitório do crescimento do câncer (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-LEAL; PONCE-GARCÍA; ESCALANTE-ABURTO, 2020), potencial para reduzir a pressão arterial, também pode melhorar o sistema imunológico, a função do fígado e melhorar o trato intestinal (MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018a), atividade antimicrobiana, (AHMED; DIRAR, 2005; EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2020) e efeitos hipoglicemiantes (ALOULOU *et al.*, 2012; CHAKRAVORTY *et al.*, 2019; ZUBAIDAH *et al.*, 2019). Em contrapartida, também se relataram efeitos tóxicos após o consumo desta bebida (JAYABALAN *et al.*, 2014; KOLE *et al.*, 2009; MOJTABA MOUSAVI *et al.*, 2020a; SABOURAUD *et al.*, 2009). Contudo, ainda não existem estudos clínicos que consigam provar os benefícios da kombucha para a saúde humana e ainda se requerem estudos toxicológicos desta bebida.

O modelo animal escolhido foi *Caenorhabditis elegans*, esse animal foi escolhido pelo fácil manuseio e cultivo no laboratório, reprodução rápida, geração de uma grande descendência, tamanho pequeno, ciclo de vida curto (2 a 3 semanas), sequência completa do genoma e 60-80% dos genes homólogos com os humanos. Ademais, estudos mostram que o modelo de *C. elegans* pode ser usado para estudos sobre toxicidade por permitir uma avaliação simultaneamente de múltiplas concentrações e tempos de exposição, possui características alimentarias conservadas que o fazem um bom modelo de toxicidade, permite uma rápida avaliação da morfologia e expressão dos genes a nível tecidual, celular e subcelular isso porque os tecidos são transparentes e se tem planos corporais e neuronais mapeados (HUNT, 2017). Por isso, neste trabalho avaliamos os possíveis efeitos tóxicos da kombucha, usando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. KOMBUCHA

A kombucha é uma bebida refrescante que é obtida pela fermentação, originária da Ásia, mas sua popularidade foi devido aos efeitos terapêuticos no Ocidente.(ASHRAFI; JOKAR; MOHAMMADI NAFCHI, 2018; COELHO *et al.*, 2020) No entanto, no ano 1995, a popularidade da kombucha aumentou devido à estudos suíços que afirmaram que o consumo da kombucha era tão benéfico como o consumo do iogurte, devido a presença de ácidos que ajudavam no crescimento de bactérias benéficas no intestino e seguidamente a bebida foi introduzida no mercado mundial(HARTMANN *et al.*, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014).

Atualmente é produzida e consumida na maioria dos países e o Brasil é o único país do mundo com uma legislação específica para a kombucha. A normativa n° 41, de 17 de setembro de 2019, instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define os padrões de identidade, qualidade, classificação, rotulagem, parâmetros analíticos, composição (ingredientes obrigatórios e opcionais) e proibições desta bebida dentro do território nacional (BRASIL, 2019).

2.2. PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA

Segundo a legislação brasileira, os ingredientes obrigatórios são: Infusão de um chá adoçado, 10% (v/v) do líquido de kombucha previamente fermentada e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras que também é denominado SCOPY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Os ingredientes que podem ser opcionais são fruta, vegetais, mel, melado, fibras, vitaminas e sais minerais (Brasil, 2019). Além disso, as quantidades de chá e de açúcar, assim como o tempo e a temperatura de fermentação para a produção da kombucha, podem variar dependendo da região ou das preferências do consumidor(JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

2.2.1 INFUSÃO DE CHÁS

Os chás mais usados na preparação da kombucha são os chá preto e verde que são derivados da planta *Camellia sinensis* (COELHO *et al.*, 2020; JAYABALAN *et al.*, 2014). Entretanto, também se pode utilizar o chá mate (*Ilex*

paraguariensis)(KUMAR; JOSHI, 2016; LOPES; SANTOS; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2021), flores de malva de cera, café, folhas de carvalho, eucalipto, folhas de louro, sucos de frutas, leite e soro de leite (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2020; SILVA *et al.*, 2021). A preparação é relativamente fácil, começa adicionando 5% de chá em 1 litro de água fervendo, se adoça com até 10% de açúcar e se deixa esfriar à temperatura ambiente para evitar a inativação de microrganismo. Mas como é mencionando anteriormente, a quantidade e o chá que é usado pode variar. Alguns estudos usaram 0,5% de chá e 5% de açúcar, enquanto outros usaram 0,8% de chá e 8% de açúcar (GAGGIÀ *et al.*, 2018; KUMAR; JOSHI, 2016; MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018b).

2.2.2 SCOBY

O SCOBY é um filme celulósico que é obtido a partir da associação simbiótica entre leveduras e bactérias acéticas, e durante a fermentação este filme se forma na superfície do chá (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016) (Figura 01). A função do SCOBY é realizar a fermentação e a formação de um novo filme celulósico, que estão distribuídos em camadas, onde a mais nova está na superfície (SANTOS, 2016).

FIGURA 01 – Imagem ilustrativa do SCOBY da kombucha, onde se observa o SCOBY e o líquido da kombucha.



Fonte: Autoria própria.

A composição do SCOBY depende de vários fatores, como a origem, clima, localização geográfica e meio utilizado para o processo de fermentação(MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018). Entretanto, os procariotos mais abundantes pertencem aos gêneros

bacterianos *Acetobacter* e *Gluconobacter*. As principais bactérias do gênero *Acetobacter* são *Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *A. aceti*, e *A. pasteurianus*. Essas bactérias são encarregadas de sintetizar com seu metabólito secundário as fibras de celulose que formam o SCOBY, em especial a *A. xylinum*.

As leveduras pertencem aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Koleckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora* e *Zygnasaccharomyces* (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016). No SCOBY, estes microrganismos estão distribuídos da seguinte forma: As bactérias aeróbicas e aquelas encarregadas da formação do filme são alojadas na parte superior do SCOBY, e as leveduras ficam alojadas na parte inferior do biofilme. O SCOBY diminui a quantidade de oxigênio para que depois as leveduras iniciem a fermentação anaeróbia que gera etanol e compostos aromáticos característicos da kombucha (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2020).

2.2.3 FERMENTAÇÃO

Após a adição do chá adoçado, SCOBY e 10% da kombucha previamente fermentada em um recipiente de vidro, se inicia a fermentação. A fermentação da kombucha é uma combinação de três processos fermentativos (Fermentação alcoólica, láctica e acética) devido à presença de várias leveduras e bactérias coexistindo no meio. Por outro lado, a fermentação é feita em temperatura ambiente que pode variar de 20 a 30°C por 7 a 10 dias, no entanto, existem estudos que recomendam uma fermentação de 1 a 8 semanas ou de 7 a 60 dias até que o pH caia para 4,2 (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; KUMAR; JOSHI, 2016; MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018b).

Estudos de Chu e Chen (2006), mostraram que as atividades antioxidantes aumentaram quando o tempo de fermentação é maior. Outro estudo, mostrou que se encontraram mais quantidades de ácido glicurônico e de Vitamina C no líquido da kombucha quando a fermentação se realizava em temperaturas mais elevadas e em um intervalo de tempo maior (LONĀR *et al.*, 2006). Porém, a *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda uma fermentação de 10 dias, outros trabalhos

demonstram que uma fermentação longa pode causar acidificação excessiva da bebida, ocasionando a redução das propriedades promotoras da saúde ou afetando negativamente os consumidores devido ao acúmulo de ácidos orgânicos (CHU; CHEN, 2006; WATAWANA *et al.*, 2015).

Existem mudanças no processo de fermentação que podem afetar as propriedades do produto, modificando as propriedades organolépticas, qualidade nutricional e propriedades físico-químicas. Diante disso, as condições de fermentação devem ser controladas para obter um excelente produto. Estas mudanças podem ser: a modificação da temperatura, incremento ou diminuição do pH, quantidade de oxigênio presente no recipiente, CO₂ dissolvido, natureza do meio e tempo de fermentação (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; MOJTABA MOUSAVI *et al.*, 2020b; SILVA *et al.*, 2021b). Por exemplo, estudos como o de Chakravorty e colaboradores (2016) mostram que as propriedades da bebida mudaram com a progressão da fermentação e que a capacidade de eliminação de radicais aumentou significativamente no dia 7 de fermentação.

2.3. COMPOSIÇÃO DA KOMBUCHA

A composição da kombucha e a concentração de cada metabólito ainda não estão bem definidas, porque elas podem variar quantitativa e qualitativamente de acordo com sua origem, substrato e condições de produção, (JAYABALAN *et al.*, 2014). Ainda assim, os principais metabólitos encontrados na kombucha são: Ácido acético, lático, glucônico, glicurônico, etanol, glicerol, lático, málico, cítrico, tartárico, fólico, malônico, oxálico, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis e aminoácidos (como lisina e teanina) (BLANC, 1996; COELHO *et al.*, 2020; JAYABALAN *et al.*, 2014; KUMAR; JOSHI, 2016). Dentro do líquido da kombucha também pode-se encontrar diferentes elementos metálicos como Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni). Cobre (Cu) e Zinco (Zn)(BAUER-PETROVSKA; PETRUSHEVSKA-TOZI, 2000).

O composto químico que é responsável pelo aroma e o sabor ácido de vinagre da kombucha é o ácido acético (MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018c), O ácido glucônico, pode inibir infecções causadas por leveduras e fungos, como *Candida albicans* em humanos (JAYABALAN *et al.*, 2014). Outro composto que tem uma função

desintoxicante, uma vez que se liga aos compostos tóxicos presentes no fígado e permite que as substâncias sejam excretadas pelo rim, é o ácido glicurônico, que também é um precursor de vitamina C (NGUYEN et al., 2015). Outro trabalho, demonstrou que a redução do pH durante o período de fermentação é devido a produção de vários ácidos orgânicos (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

2.4 BENEFÍCIOS DA KOMBUCHA

Os compostos presentes na kombucha que são benéficos podem vir de duas fontes: A primeira seria o chá, e a segunda seriam os produtos da atividade metabólica de microrganismos presentes no SCOBY. Os bioativos provenientes do chá da planta *Camellia sinensis* são compostos fenólicos, como catequinas (estes compostos contribuem para o amargor, adstringência e sabor doce) e os polissacarídeos, vitaminas (B1, B2, B6, B12 y C), minerais, aminoácidos (o mais abundante é teanina), ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas, proteínas como bacteriocinas são bioativos provenientes da atividade metabólica do SCOBY (ANTOLAK; PIECHOTA; KUCHARSKA, 2021; JAYABALAN *et al.*, 2014; WISEMAN; BALENTINE; FREI, 1997).

A partir desses componentes, vários benefícios são atribuídos ao líquido da kombucha, como atividades antioxidantes (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018), potencial anti-inflamatório, potencial inibitório do crescimento do câncer (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-LEAL; PONCE-GARCÍA; ESCALANTE-ABURTO, 2020), potencial para reduzir a pressão arterial, também pode melhorar o sistema imunológico, a função do fígado e do trato intestinal (MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018a). Outros estudos também evidenciaram em ensaios *in-vivo* as propriedades cicatrizantes da kombucha contra úlceras estomacais em camundongos albinos Suíços (BANERJEE *et al.*, 2010).

A propriedades antioxidantes apresentadas pela bebida é pela presença de polifenóis do chá, produção de ácido ascórbico, catequinas e o ácido D-sacárico 1,4-lactona (DSL) realizada pelo SCOBY (JAYABALAN *et al.*, 2014). A primeira evidência da kombucha como um agente antioxidante, foi quando se observou que a presença de polifenóis encontrados na kombucha poderiam eliminar de forma eficiente

os radicais livres de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MOJTABA MOUSAVI *et al.*, 2020a). Os polifenóis desempenham um papel na prevenção de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, uma vez que modulam a atividade de várias enzimas e receptores celulares que são usados contra o estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio, isto foi evidenciado usando ensaios de eliminação de radicais livres *in vitro* (CHU; CHEN, 2006; MOJTABA MOUSAVI *et al.*, 2020b; TSAO, 2010).

Além disso, vários trabalhos demonstraram uma atividade antimicrobiana contra microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *E.coli* e *Helicobacter pylori* e esta atividade pode estar ligada ao teor de ácido acético presente na bebida (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2020). Outro trabalho mostrou que a kombucha é capaz de prevenir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, *Shingella sonnei*, *Campylobacter jejuni* e *Staphylococcus aureus*, o que foi atribuído também à presença de ácido acético e a baixos níveis de pH (AHMED; DIRAR, 2005). Assim, outros pesquisadores observaram que depois de um tratamento com o chá fermentado, a concentração do ácido tiobarbitúrico foi reduzida significativamente nos rins e no fígado de ratos Wistar alimentados com dietas ricas em colesterol, indicando que a kombucha induziu a efeitos benéficos para hipercolesterolemia (BELLASSOUED *et al.*, 2015).

No entanto, ainda não existem estudos clínicos que consigam provar os benefícios da kombucha para a saúde humana e por esse motivo se reforça que as afirmações sobre os possíveis benefícios sejam testadas clinicamente (ERNST, 2003; KAPP; SUMNER, 2019).

2.5 EFEITOS TÓXICOS DA KOMBUCHA

Os problemas tóxicos relacionados ao consumo de kombucha têm sido associados principalmente à preparação em condições não higiênicas, evidenciando a presença de *Bacillus antraz*, *Penicillium* e *Aspergillus*, e ao excesso de consumo (JAYABALAN *et al.*, 2014). Além disso, existem alguns relatos onde as pessoas apresentaram tontura e náuseas após o consumo da Kombucha (MOJTABA MOUSAVI *et al.*, 2020a). Também, houve relatos de intoxicação por chumbo após o

consumo da kombucha que estava armazenada durante 6 meses em um recipiente de cerâmica (SABOURAUD *et al.*, 2009). Entretanto, se afirmou que o contaminante que ocasionou a intoxicação foi o corante presente no esmalte do recipiente e não a kombucha (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Outro caso relacionado com a toxicidade da kombucha foi associado a uma acidose láctica. Isto foi observada em um homem de 22 anos, diagnosticado com HIV, que após 12 horas de ingestão de 1 litro de kombucha, ficou com falta de ar e muita febre. Os resultados dos exames laboratoriais mostraram uma acidose e insuficiência renal aguda, porém também se realizou análises nas amostras da kombucha consumida, mas não constatou nenhuma presença de fungos e bactérias (KOLE *et al.*, 2009). Assim mesmo, também, dois casos foram relacionados ao consumo excessivo da bebida (mais de 355mL), onde se observou uma acidose metabólica (SRINIVASAN; SMOLINSKE; GREENBAUM, 1997).

Além disso, no ano 2000 pesquisadores avaliaram a toxicidade da kombucha em ratos por 90 dias por via oral e não foram encontrados sinais tóxicos (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2000). No entanto, em outro estudo se encontrou lesões internas nos órgãos de ratos após 12 semanas de consumo do líquido da kombucha (JOHNSON, 2007). A bebida também é contraindicada para mulheres grávidas e lactantes devido ao possível teor de heparina (componente glicosaminoglicano) presente no chá da kombucha. A heparina inibe as proteínas do sistema de coagulação do sangue e a presença desta é prejudicial durante o terceiro trimestre de gestação (MARTÍNEZ LEAL *et al.*, 2018d).

Não entanto, atualmente existem dados limitados sobre os efeitos colaterais e não há estudos conclusivos a longo prazo sobre a toxicidade desta bebida. Além disso, a evidência limitada sobre a toxicidade gera uma preocupação dos riscos à saúde do indivíduo que a consome.

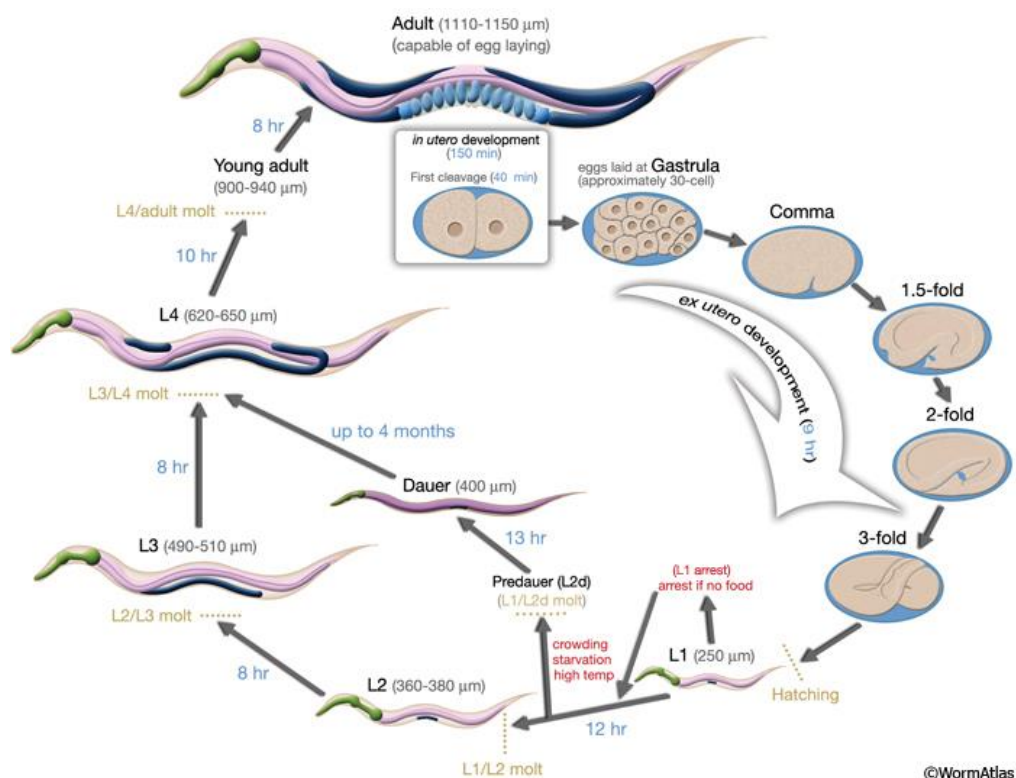
2.6 MODELO EXPERIMENTAL *Caenorhabditis elegans*

2.6.1 CARACTERÍSTICAS

Caenorhabditis elegans é um nematoide de 1mm de comprimento, encontrados praticamente em todos os habitats, porque estão adaptados a diferentes ambientes de solo onde o alimento e a disponibilidade da água, temperatura, populações podem mudar (STRANGE, 2006).

C. elegans adulto é predominantemente hermafrodita, mas também tem machos em menor proporção (aproximadamente 0,1%). Os hermafroditas produzem aproximadamente 300 descendentes, podendo chegar a mais de 1000 se fecundados por um macho. Eles têm um ciclo de vida rápido, e a vida útil média é de 2 a 3 semanas sob condições ideais de laboratório. O ciclo de vida tem quatro estágios larvais (L1-L4) como é mostrado na Figura 02 (STRANGE, 2006).

FIGURA 02 – Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*.



FONTE: ALTUM *et al*, 2012

2.6.2 *Caenorhabditis elegans* COMO UM ORGANISMO MODELO

Em 1963, Sydney Brenner estabeleceu o *Caenorhabditis elegans* como um organismo modelo e no ano 2002 ele e Jhon E. Sulston ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina após importantes descobertas sobre a regulação gênica do desenvolvimento dos órgãos e morte celular programada (BRENNER, 1973; ESPERÓN, 2003). Diferentes estudos demonstraram que existe uma grande similaridade entre *C. elegans* e os mamíferos, a nível celular e molecular, com aproximadamente 60 a 80% dos genes sendo homólogos aos dos humanos (KALETTA; HENGARTNER, 2006). *C. elegans* é usado atualmente para estudar muitos processos biológicos, como a apoptose, sinalização celular, ciclo celular, polaridade celular, regulação gênica, metabolismo, envelhecimento e determinação do sexo (RIDDEL, D. *et al*, 1997).

Existem 5 características que fazem *C. elegans* uma ferramenta poderosa para ser um organismo modelo: 1. É de fácil cultivo, uma vez que pode ser criado em laboratório com uma dieta a base de *Escherichia coli*; 2. Se reproduz rápida e prolificamente, visto que em 3 dias um ovo pode se desenvolver em um verme adulto e cada verme adulto pode gerar uma descendência do tamanho de 300-1000 indivíduos, permitindo sua produção em larga escala; 3. É de tamanho pequeno, o que facilita a maioria dos ensaios, que podem ser realizados em placas contendo ágar sólido ou líquido, usando mais de 100 animais em um único poço de uma placa de 96 poços de microtitulação; 4. É um verme transparente e facilita a observação dos processos como crescimento de axônios, embriogênese e metabolismo de gordura; 5. É um animal multicelular sofisticado, apresenta 959 células somáticas, formam muitos órgãos e tecidos diferentes, incluindo músculo, hipoderme, intestino, sistema reprodutivo, glândulas e um sistema nervoso contendo 302 neurônios (RIDDEL, D *et al*, 1997). Ademais, *C. elegans* é um modelo valioso para estudar toxicidade, uma vez que muitos dos processos fisiológicos e respostas ao estresse que são observados em organismos superiores são conservados na *C. elegans*. Além disso, *C. elegans* permite a detecção de alterações em nível de organismo como a alimentação, reprodução, tempo de vida e locomoção, também pode facilitar experimentos toxicológicos que

requeiram de maior tempo de análise (LEUNG *et al.*, 2008). Por exemplo, o estudo de (LI *et al.*, 2013) fez uma triagem de 21 produtos químicos em *C. elegans*, estudando a correlação da toxicidade química entre o nematoide e o roedores onde obtiveram valores de classificação de LC₅₀ iguais para cada produto. Outro estudo, usou o ensaio de motilidade para avaliar a neurotoxicidade (COLE; ANDERSON; WILLIAMS, 2004) também usou *C. elegans* para estudar a toxicidade de nanomateriais (WU *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013).

Por fim, *C. elegans* é um ótimo organismo modelo para estudos que envolvam a investigação da toxicologia de uma nova substância e outros efeitos que sejam necessários. Além disso, o uso deste organismo modelo na pesquisa não requer aprovação do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA) nem da sumição no Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), uma vez que se trata de um organismo invertebrado.

3. JUSTIFICATIVA

A kombucha ou bebida funcional vem se tornando uma bebida muito apreciada em todo o mundo pelos possíveis benefícios à saúde (SILVA *et al.*, 2021a). A composição e a concentração de cada metabólito produzido dependerão do inóculo, concentração inicial, temperatura, pH, natureza do meio e tempo de fermentação (KUMAR; JOSHI, 2016; SILVA *et al.*, 2021a). A mudança de algum aspecto mencionado anteriormente pode modificar completamente a bebida, tornando-a uma bebida com propriedades organolépticas, qualidade nutricional e propriedades físico-químicas ideais, mas também pode ser uma bebida com efeitos não benéficos para o consumidor (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; MOJTABA MOUSAVI *et al.*, 2020b; SILVA *et al.*, 2021b). Os estudos sobre a toxicidade desta bebida foram realizados em outros organismos modelo (camundongo e ratos), mas ditos estudos não conseguiram administrar a kombucha em todo o ciclo de vida do organismo (JOHNSON, 2007; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2000). Por este motivo, nosso estudo busca observar os possíveis efeitos tóxicos quando esta é administrada durante todo o ciclo da vida do organismo modelo (*C. elegans*).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de Kombuchas em *Caenorhabditis elegans*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os efeitos das Kombuchas produzidas usando duas matérias primas diferentes (chá verde e chá preto) e em diferentes tempos de fermentação;
- Avaliar os efeitos das Kombuchas sobre a sobrevivência e desenvolvimento larval do *C. elegans*;
- Avaliar os efeitos das Kombuchas sobre parâmetros comportamentais (bombeamento faríngeo e locomoção) de *C. elegans*;
- Avaliar os efeitos das Kombuchas sobre o desenvolvimento reprodutivo de *C. elegans*.

5. METODOLOGIA

5.1 MANUTENÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE *C. elegans*

5.1.1 MANUTENÇÃO DE *C. elegans*

A cepa de *C. elegans* selecionada para este estudo foi N2 (Tipo selvagem). Os animais foram mantidos em placas de petri com meio de crescimento para nematódeos (NGM), segundo (BRENNER,1973) (Tabela 1). Para a alimentação, foi cultivada a bactéria *E. coli* OP50, que é deficiente na síntese de uracila e tem crescimento limitado, em meio LB (*Luria Bertani Medium*) (Tabela 2) durante a noite em estufa a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ (STIERNAGLE, 2006).

Tabela 1 – Lista de reagentes necessários para a produção do meio de cultivo NGM

Reagentes	Quantidades
NaCl	3 gramas
Agar	17 gramas
Peptona	2,5 gramas
H ₂ O destilada	1000mL
Colesterol (5mg/mL)	1mL
CaCl ₂ (1M)	1mL
MgSO ₄ (1M)	1mL
Tampão KPO ₄ (1M, pH 6,0)	25mL
Nistatina	12500 UI
Sulfato de estreptomicina (100mg/mL)	1mL

Fonte:(BRENNER, 1973)

Tabela 02 – Lista de reagentes para a preparação do meio LB para *E. coli* OP50

Reagentes	Quantidades
Triptona	0,5 gramas
Extrato de levedura	0,25 gramas
NaCl	0,25 gramas
H ₂ O destilada	50 mL

Fonte:(STIERNAGLE, 2006)

5.1.2 SINCRONIZAÇÃO DE *C. elegans*

A sincronização das culturas de *C. elegans*, se realizou na primeira fase larval (L1), foi feita usando a técnica do branqueamento (“*Bleaching*”), seguindo o protocolo de (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012). Em resumo, os nematoides adultos grávidos foram coletados das placas com água destilada, transferidos para tubos cônicos (falcon) de 15 mL e submetidos à decantação. O sobrenadante foi descartado, se adicionou a solução de branqueamento (Tabela 03) e agitou em vórtex por alguns minutos até ser possível observar no microscópio os ovos liberados.

Tabela 03: Lista de reagentes para a preparação da solução de branqueamento.

Reagentes	Quantidades
Hipoclorito de Sódio	1,5 mL
NaOH 10M	0,250 mL
H ₂ O	3,250 mL

Fonte: (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012)

Depois, a reação foi interrompida adicionando tampão M9 (Tabela 04). Os tubos foram centrifugados por 3 min a 3000 rpm e se descartou o sobrenadante, e seguidamente se realizou três lavagens com tampão M9. Finalmente, os ovos foram colocados em placas de petri contendo M9 e incubados a 20°C por 24h.

Tabela 04: Lista de reagentes para o preparo do tampão M9

Reagentes	Quantidades
KH ₂ PO ₄	3,0 gramas
Na ₂ HPO ₄	6,0 gramas
NaCl	5,0 gramas
H ₂ O destilada	1000 mL

Autoclavar e depois de frio, adicionar 1mL de MgSO₄ 1M

Fonte: (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012)

5.2 PREPARAÇÃO DOS CHÁS E KOMBUCHA

5.2.1 PREPARAÇÃO DOS CHÁS

O processo começou na limpeza e higienização dos recipientes e utensílios usando detergente e vinagre de álcool, com a finalidade de prevenir qualquer tipo de contaminação (WATAWANA et al., 2015). Para o preparo dos chás foram usados 1000mL de água fervida da torneira e 5 saquinhos (o equivalente a 5g) das folhas do chá preto ou verde (marca Prenda) seguida de infusão por cerca de 10 min. Este chá foi adoçado com 50 g/L de sacarose (5%), após foram retirados os saquinhos dos chás (GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000; KUMAR; JOSHI, 2016). As infusões foram deixadas a temperatura ambiente para resfriarem até cerca de 20°C (ANTOLAK; PIECHOTA; KUCHARSKA, 2021), figura 03.

FIGURA 03 – Passos para a preparação dos chás Verde e Preto



Fonte: Autoria própria

5.2.2 PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA

Para a fabricação da kombucha usaram-se 6 frascos de vidro grandes, previamente higienizados e esterilizados a 121°C por 20 min (VIJAYARAGHAVAN et al., 2000). Os frascos foram identificados com número, data do início da fermentação, data de término da fermentação e tipo de chá usado. Cada frasco continha um SCOBY e 10% do líquido de uma kombucha já fermentada doada pela autora, completando-o com os chás preparados na etapa 5.2.1. Os recipientes nº1 e 2 continham chá verde e preto, respectivamente, e após atingir o tempo de fermentação (7, 14 e 30 dias) retirou-se uma amostra. Para o processo de fermentação, os frascos foram colocados em um ambiente escuro e ficaram cobertos com gaze ou papel toalha fixados com elásticos para evitar

contaminações externas (GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000; KALLEL *et al.*, 2012) (Figura 04).

FIGURA 04 – Passos para a preparação das kombuchas (chá preto e verde).



Fonte: Autoria própria

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

5.3.1 EXPOSIÇÃO À KOMBUCHA

Aproximadamente 100 *C. elegans* no estágio L1 foram expostos às diferentes amostras de kombucha e chás até atingir o estágio de adulto com ovos. Para isso, foram utilizadas placas de petri com meio NGM semeadas com *E.coli* OP50. Seguidamente as placas foram deixadas por 15 min em UV, para inativar o microrganismo e na superfície das placas foi adicionado 1mL do líquido dos tratamentos (Chá verde, chá preto, kombucha preta e Kombucha verde), onde após secar, foram adicionados os vermes, seguido de incubação a 20°C para o desenvolvimento (Figura 05).

FIGURA 05 – Passos da exposição das kombuchas e chás (verde e preto).



Fonte: Autoria própria

Foram realizados os seguintes tratamentos:

C: Nematoides + meio NGM (Controle)

CV: Nematoides + Chá verde 5g/L

CP: Nematoides + Chá preto 5g/L

KV7: Nematoides + Kombucha de chá verde fermentada por 7 dias

KV14: Nematoides + Kombucha de chá verde fermentada por 14 dias

KV30: Nematoides + Kombucha de chá verde fermentada por 30 dias

KP7: Nematoides + Kombucha de chá preto fermentada por 7 dias

KP14: Nematoides + Kombucha de chá preto fermentada por 14 dias

KP30: Nematoides + Kombucha de chá preto fermentada por 30 dias

5.3.2 TESTES TOXICOLÓGICOS DA KOMBUCHA

Nos testes toxicológicos, foi observado se a exposição à kombucha produz alguma alteração na sobrevivência, desenvolvimento larval, locomoção, bombeamento faríngeo e produção de ovos.

As análises foram feitas da seguinte forma:

. Dia 1. L1 exposição às respectivas amostras da Kombucha

Dia 2. L2/L3 foi feita a análise de sobrevivência e do desenvolvimento larval

Dia 3. L4/adulto jovem, foi feita a análise de sobrevivência, do desenvolvimento larval, os testes de comportamento (Movimento corporal e bombeamento faríngeo).

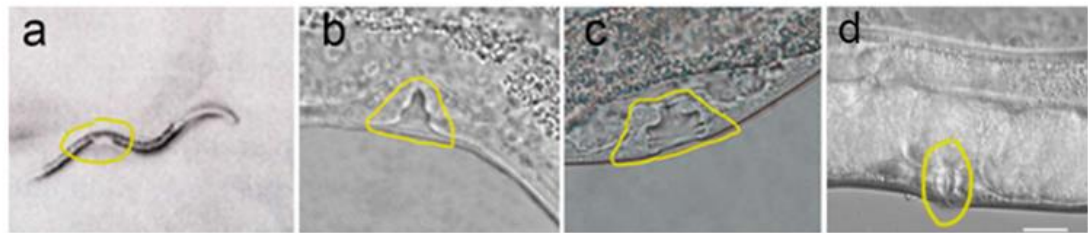
Dia 4. Adulto com ovos, foi feita análises do desenvolvimento larval e a contagem de ovos formados no útero do animal.

5.3.2.1 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA

Após 24h e 48h da exposição à kombucha e no tratamento controle, os animais foram examinados como vivos ou mortos com o auxílio do microscópio. Foram considerados vivos quando reagem a um estímulo mecânico, e como mortos quando não reagem a um estímulo mecânico (ARANTES et al., 2014).

5.3.2.2 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO LARVAL

Após 24h, 48h e 72h da exposição à kombucha e no tratamento controle, os animais foram avaliados conforme o estágio larval a partir da análise do desenvolvimento da vulva (ARANTES et al., 2016) (Figura 06).

FIGURA 06 – Morfologia da vulva em *C. elegans*

(A): verme no estágio larval L3, neste estágio não é visível a vulva e o círculo amarelo mostra uma fenda que seria o útero. (B) e (C): morfologia da vulva no estágio L4 na etapa inicial e final das morfogêneses, respectivamente. O círculo amarelo mostra a vulva. (D): morfologia de um verme no estágio de adulto e o círculo amarelo mostra a vulva.

Fonte: Adaptado (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012)

5.3.2.3 BOMBEAMENTOS FARÍNGEOS

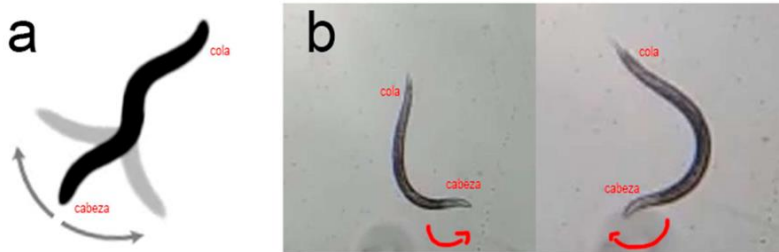
Para avaliar o bombeamento faríngeo, se analisou 5 nematoides no estágio L4 por grupo que foram expostos à amostras de kombucha e chás a partir do estágio L1. Os nematoides foram mantidos nas placas com bactéria e os bombeamentos faríngeos foram contados por 10 segundos, 3 vezes no mesmo verme, no microscópio, com uma ampliação de 100x (RAIZEN *et al.*, 2012). O teste foi feito em triplicata e se fez a média das triplicatas.

5.3.2.4 MOVIMENTO CORPORAL (*Thrashing assay*)

Para a quantificação do número de thrashes do animal, 5 vermes no estágio L4 que foram expostos ao líquido da kombucha e chás desde o estágio L1, foram lavados 3 vezes com tampão M9 com o propósito de retirar o tratamento da Kombucha e os restos de bactérias. Os vermes limpos foram transferidos para uma placa só com tampão M9. Após a adaptação por 1 minuto, foram contados o número de thrashes no estereomicroscópio com uma ampliação mínima de 100x por 20 segundos, em três intervalos. Neste teste se contabilizou o movimento corporal

completo a um lado e depois o retorno a posição original, como mostra a figura 07. O ensaio se fez por triplicata (NAWA; MATSUOKA, 2012).

FIGURA 07 – Descrição da análise do movimento corporal do *C. elegans*.



(a): Movimento corporal do *C. elegans*; **(b):** mostra-se a sequência de fotografias correspondente ao movimento corporal do mesmo verme, as setas vermelhas mostram a direção do movimento corporal.

Fonte: (a): adaptado (ZHANG; GAO; CHEN, 2022); (b):(ALCARAZ GARCETE, 2022).

5.3.2.5 NÚMERO DE OVOS NO ÚTERO DO ANIMAL

Este ensaio envolveu a contagem de ovos formados no útero de *C. elegans*. Para isto, foram analisados 5 animais no estágio de adulto grávido, expostos ao líquido da kombucha desde L1. Após o tratamento, se adicionou 10 μ L da solução de branqueamento (bleaching) sobre cada animal e se esperou aproximadamente 10 min ou até degradar a cutícula dos vermes, expelindo os ovos. Finalmente, os ovos foram contabilizados com o auxílio do microscópio (GARDNER; ROSELL; MYERS, 2013).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA de uma via usando o post-teste Tukey. Os resultados foram considerados significativos em relação ao tratamento controle quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização da kombucha tentou ser igual a uma produção na vida real, onde a temperatura mínima registrada na cidade de Foz de Iguaçu no mês de Outubro foi de 7°C e a máxima foi 34°C. O fator de temperatura é importante, uma vez que nesta cidade se tem muitas oscilações de temperatura e dita variação pode afetar nas propriedades da composição microbiana, como foi relatado em outros estudos, onde se

observou que temperaturas altas aceleram o processo fermentativo e temperaturas baixas o diminui (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; AUNG; EUN, 2022; DE FILIPPIS *et al.*, 2018; NEFFE-SKOCIŃSKA *et al.*, 2017).

Para todos os experimentos além de usar o controle se optou usar dois controles mais, os chás (CV e CP), isso porque queria descartar a possibilidade de interferência com os resultados obtidos com os tratamentos de kombuchas.

6.1. Análise de toxicidade

6.1.1. Avaliação da análise da sobrevivência

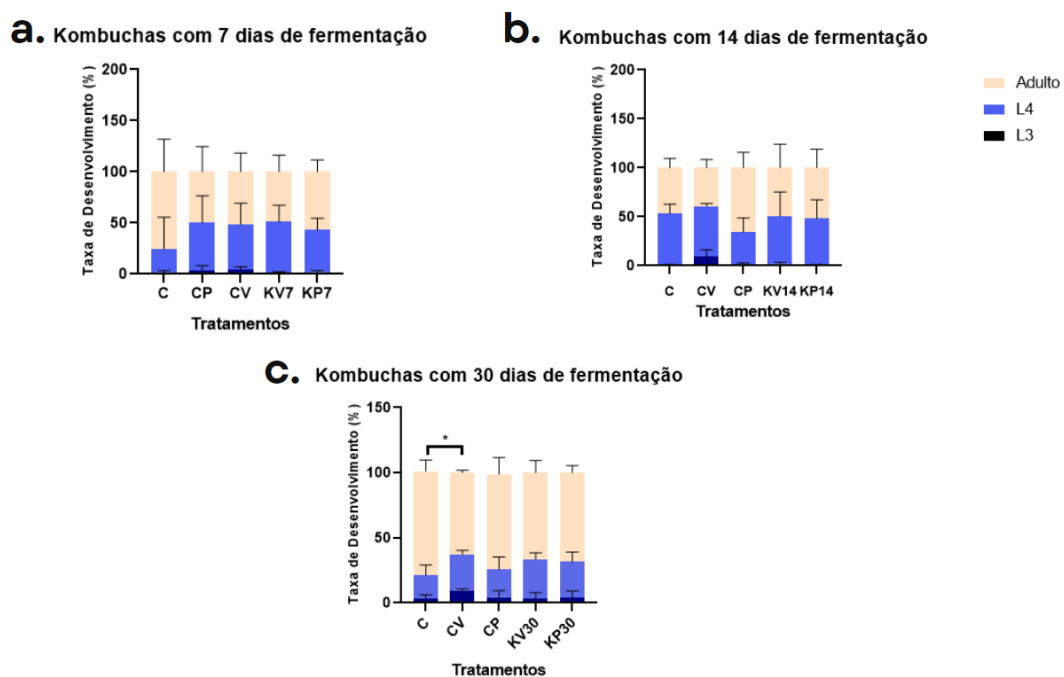
A primeira análise realizada consistiu na observação da taxa de vermes vivos por placa de tratamento. Neste estudo, as kombuchas de chá verde e preto fermentadas por 7, 14 e 30 mostraram 100% de vermes vivos após 24 e 48 horas de tratamentos, assim como os controles. Isso pode indicar que todas as kombuchas e os chás proporcionaram condições ideais para a sobrevivência dos vermes.

6.1.2. Avaliação do desenvolvimento larval

Os resultados do desenvolvimento larval após 24 horas de tratamento não mostraram nenhuma diferença para kombuchas de chá verde e preto fermentadas por 7, 14 e 30 dias, ao olhar as placas no microscópio todos os vermes encontravam-se no estágio larval L3.

Já na análise de desenvolvimentos larval após 48 horas de tratamento, observou resultados diferentes. Na figura 9A observamos a taxa desenvolvimento (%) larval após 48 horas de kombuchas com 7 dias de fermentação. Ele mostra 3 diferentes estágios larvais (L3, L4 e Adulto), mas sem nenhuma variação significativa segundo análise de ANOVA de uma via. Na figura 9B, observa-se que os vermes tratados com kombuchas fermentados por 14 dias, onde também se observa que os vermes analisados encontrava-se em diferentes estágios larvais (L3, L4 e Adulto). Após a exposição, só observa-se vermes no estágio L3 no tratamento CV. Apesar de ter uma porcentagem de vermes L3, o resultado não foi significativo para a para a análise ANOVA de uma via com post- test Tukey.

FIGURA 09 –Taxa de desenvolvimento larval (%) após 48 horas de tratamento.



Fonte: da autora.

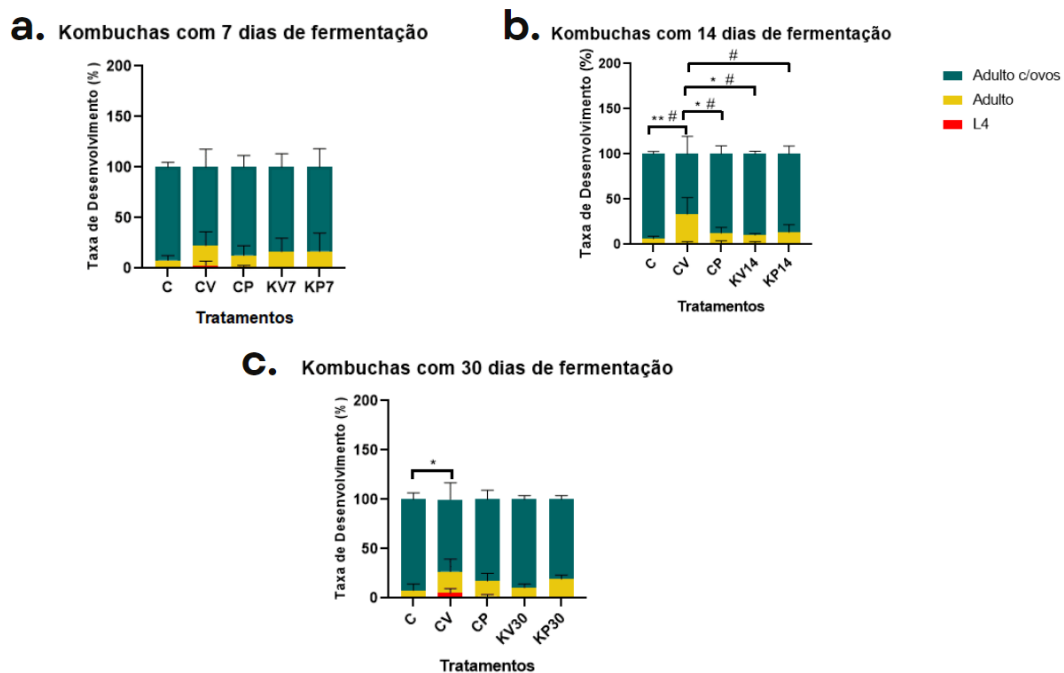
Fig. 09 : Taxa de desenvolvimento larval (%) após 48 horas de tratamento; **(a)**. kombuchas fermentadas por 7 dias **(b)**.kombuchas fermentadas por 14 dias e **(c)** kombuchas fermentadas por 30 dias. * indica uma variação significativa entre C (controle) e CV (chá verde) na etapa larval adulto ($p < 0,05$). Foram analisados aproximadamente 100 vermes por grupo e ditos resultados são produto da média de três experimentos independentes \pm -SEM, analisados por ANOVA de uma via com post-test Tukey. C= Controle, CV= Chá Verde, CP= Chá Preto, KV7,KV14 e KV30= Kombucha Verde fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente e KP7, KP14 e KP30 = Kombucha Preta fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente.

Na análise de desenvolvimento após 48 horas do tratamento com kombuchas fermentadas por 30 dias, observou-se três diferentes etapas larvais (L3, L4 e Adulto) das quais só se teve uma variação significativa na etapa larval Adulto. A variação foi evidenciada entre o C com CV com um valor $p = 0,0289$, esta diferença se dá porque

no CV observou-se menos animais adultos em comparação ao controle e teve mais vermes no estágio larval L4. Isto indicaria um atraso no desenvolvimento larval nos vermes tratados com CV em comparação ao controle demonstrados na Figura 9C o que não foi observado em CP, KV7 e KP7.

Na análise de desenvolvimento larval após 72h foram observadas três estágios larvais (L4, Adulto e Adulto com ovos). NA figura 10A, demostramos os resultados do tratamento com kombuchas fermentadas por 7 dias, onde observou-se vermes no estágio larval L4 só no tratamento CV. Porém, não teve nenhum valor significativo segundo a análise de ANOVA de uma via o que indicaria que o tratamento com as kombuchas fermentadas por 7 dias não mostram nenhuma alteração no desenvolvimento larval.

FIGURA 10 – Análises de desenvolvimento larval após 72 horas.



Fonte: Próprio da autora.

Figura 10: Taxa de desenvolvimento larval após 72h. Foram analisados aproximadamente 100 vermes por grupo e ditos resultados são produto da média de três experimentos independentes +- SEM, analisados por ANOVA de uma via com post-test Tukey. (a) tratamento com kombuchas fermentadas por 7 dias, (b) tratamento com kombuchas fermentadas por 14 dias. (c) tratamento com kombuchas fermentadas por 30 dias. * indica diferença estatística entre os grupos em relação à etapa de adulto. # indica diferença estatística entre os grupos em relação à etapa de adulto com ovos ($p < 0,05$) C= Controle, CV= Chá Verde, CP= Chá Preto, KV7, KV14 e KV30= Kombucha Verde fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente, e KP7, KP14 e KP30= Kombucha Preta fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente.

Na figura 10B são mostrados os resultados dos vermes tratados com kombuchas fermentadas por 14 dias e controles. Não houve nenhuma variação significativa na porcentagem de vermes na etapa larval L4, mas teve três variações significativas na etapa larval adulto. Uma diferença encontrada foi entre C e CV, onde no CV se observou um aumento de vermes adultos em relação ao controle. As outras diferenças foram observadas entre CV com CP e KV14, isso porque o CV tem uma maior quantidade de adulto.

Já na etapa larval adulto com ovos, se observou duas variações. A primeira foi entre os tratamentos C/ CV, dita variação é evidenciada porque o tratamento CV teve menos quantidade de vermes na etapa adulto com ovos em relação com controle. A segunda variação significativa foi porque o número de adultos com ovos dos tratamentos CP, KV14 e KP14 é menor do que a quantidade do tratamento CV. Ditos resultados nos indicariam que o tratamento CV atrasa o desenvolvimento do *C. elegans*.

Finalmente, os resultados para o ensaio de desenvolvimento após 72 horas de tratamento com kombuchas fermentadas por 30 dias mostraram uma diferença significativa na última etapa larval, adulto com ovos, entre o grupo de tratamento CV e controle. Esta diferença se dá porque a quantidade de vermes no estágio larval adulto com ovos no grupo de tratamento CV é menor do que o controle, (Figura 10C). Isto reforça a ideia de que o tratamento com CV atrasa o desenvolvimento larval.

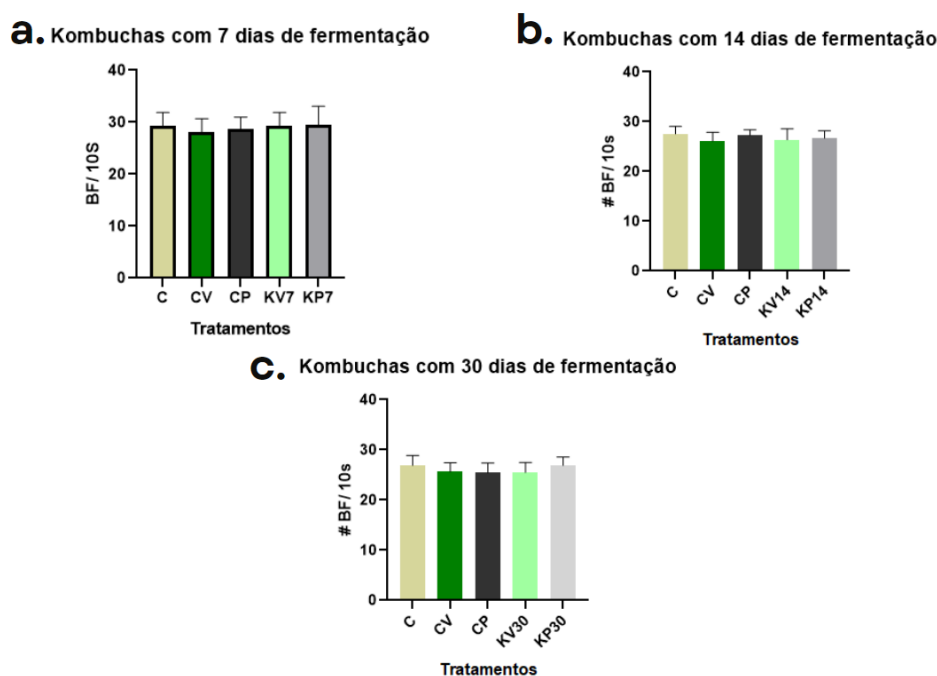
Analisando os resultados, foi possível observar que os vermes tratados com chá verde (5g/L) atrasaram o desenvolvimento larval. Esse achado coincide com os resultados de (TIAN *et al.*, 2021), onde demonstrou que houve um atraso do desenvolvimento larval do *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* após tratamentos com duas Catequinas (2,5 μ M de galato de epigallocatequina (EGCG) e galato de epicatequina (ECG) presentes em abundância no chá verde. Outro estudo também mostrou atraso no desenvolvimento larval do *C. elegans* após uma administração diária de 220 μ M de EGCG (ABBAS; WINK, 2009). Ditas Catequinas são degradadas no processo de fermentação do chá para a produção da kombucha. Um

estudo de JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007, mostrou uma degradação de 30% e 18% das EGCG e de 23% e 48% de ECG em kombuchas de chá preto e de chá verde, respectivamente. Além disso, outro trabalho também mostrou a diminuição de EGCG de 48 mg/L a 10mg/L na kombucha (KALLEL *et al.*, 2012). Já no chá preto, há pouco EGCG porque ele oxida os compostos fenólicos como as catequinas, com o propósito de transformá-los em substâncias mais aromáticas e de cor marrom (FRANKS *et al.*, 2019; OLBA DO COUTO; DE LIMA, 2022). Isto poderia explicar porque os vermes tratados com chá preto e kombuchas não tiveram um atraso no desenvolvimento, mas ainda falta estudos que possam mostrar o mecanismo exato que possa explicar tal evento.

6.1.3. Avaliação do bombeamento faríngeo

Os resultados mostraram que os vermes de tipo selvagem N2, no estágio larval L4 não tiveram nenhuma variação significativa nos 5 tratamentos para os três grupos de estudo, segundo a análise ANOVA de uma via.

FIGURA 11 – Avaliação do bombeamento faríngeo.



Fonte: Da autora.

Figura 11 : Número de bombeamentos faríngeos em 10 segundos **a.** kombuchas de 7 dias fermentação, **b.** kombuchas de 14 dias de fermentação e **c.** kombuchas de 30 dias de fermentação. Foram analisados 5 vermes por grupo em triplicata e ditos resultados são produto da média de três experimentos independentes +- SEM, analisados por ANOVA de uma via com post-test Tukey. C=

Controle, CV= Chá Verde, CP= Chá Preto, KV7, KV14 e KV30= Kombucha Verde fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente e KP7, KP14 e KP30= Kombucha Preta fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente.

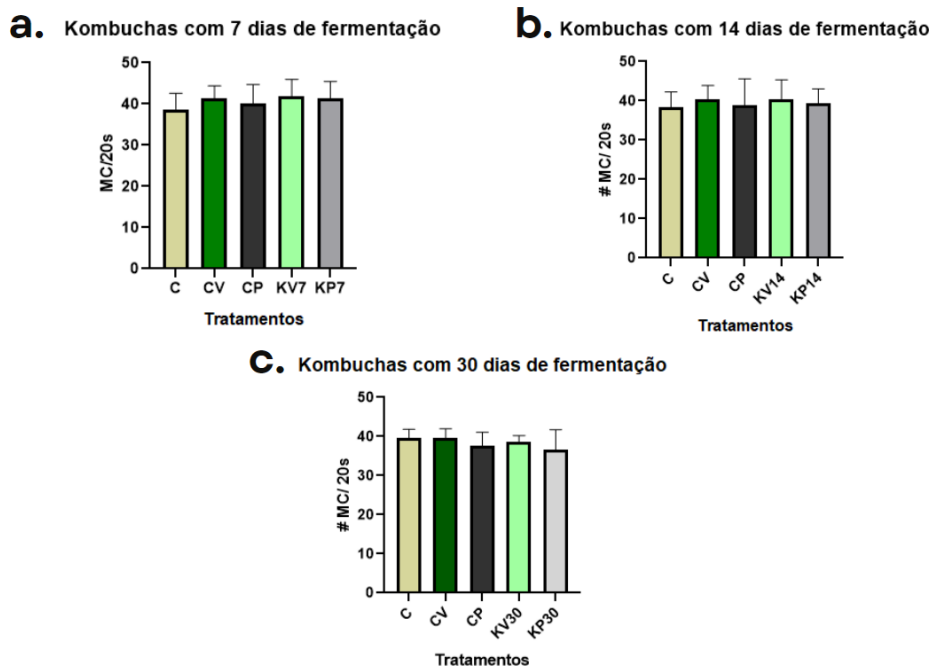
O bombeamento faríngeo, é um ciclo de contração e relaxamento que suga o líquido do ambiente usando músculos. Ele é controlado por neurônios motores (MC e M3): O MC tem o controle quando uma concentração começa e o M3 a termina (AVERY; YOU, 2012). Assim, a taxa de alimentação adequada e tempo dos movimentos faríngeos são necessários para uma alimentação eficiente e nos indicaria que os neurotransmissores (acetilcolina e serotonina) e grupos musculares estão em bom funcionamento (RAIZEN *et al.*, 2012).

6.1.4. Avaliação do movimento do corpo

C. elegans é capaz de se locomover em diferentes formas. Ele pode nadar na água ou/e se arrastar na terra, isso porque é de vida livre e porque dito comportamento é dirigido por distintos circuitos neuronais, então para manter um movimento normal dois neurotransmissores têm que estar presentes: a dopamina e a serotonina. Para estimar a frequência dos movimentos laterais ou a mobilidade do animal em líquido se usa o ensaio de *thrashing assay*, onde é possível investigar efeitos de fármacos, substâncias químicas ou mutações que podem afetar o comportamento de *C. elegans* e o sistema dopaminérgico e serotoninérgico (BUCKINGHAM; SATTELLE, 2009; VIDAL-GADEA *et al.*, 2012).

Neste estudo, não houve nenhuma variação significativa após o tratamento com kombuchas fermentadas por 7, 14 e 30 dias (Figura 12).

Figura 12- Ensaio de movimento corporal (*Thrashes*)



FONTE: Próprio da autora

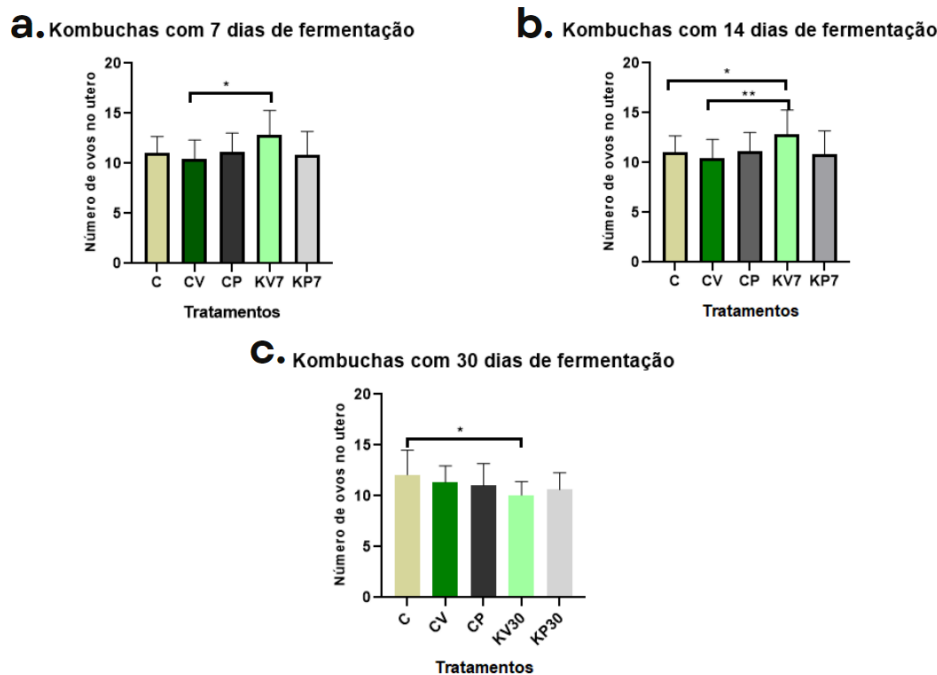
Figura 12: Número de movimento do corpo (thrashes) em 20 segundos. **(a)** tratamentos com kombuchas de 7 dias de fermentação, **(b)** tratamento com kombuchas de 14 de fermentação e **(c)** tratamento com kombuchas de 30 dias de fermentação. Foram analisados 5 vermes por grupo em triplicata e ditos resultados são produto da média de três experimentos independentes +- SEM, analisados por ANOVA de uma via com post-test Tukey. C= Controle, CV= Chá Verde, CP= Chá Preto, KV7, KV14 e kv30= Kombucha Verde fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente, e KP7, KP14 e KP30= Kombucha Preta fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente.

Este resultado pode nos indicar que após o tratamento com as kombuchas e os chás, os vermes não tiveram disfunções nas vias serotoninérgicas. Além que, ainda não se tem estudos que avaliem os thrashes após tratamento com chá preto, verde e nem com kombuchas.

6.1.5. Avaliação do número de ovos no útero do animal

Os resultados mostram um aumento significativo do número de ovos no útero de vermes tratados com kombuchas fermentadas por 7 dias em relação ao chá verde (Figura 13A). vermes tratados com kombuchas fermentadas por 14 dias, também tiveram uma maior quantidade de ovos em comparação com o grupo C e CV (Figura 13B).

FIGURA 13- Análises de número de ovos no útero.



FONTE: Próprio da autora

Figura 13: Média do número de ovos encontrados no útero em cinco vermes diferentes. (a) mostra os vermes tratados com kombuchas fermentadas por 7 dias, onde * mostra a diferença significativa entre dois grupos, CV e KV7. (b) mostra o tratamento com kombuchas fermentadas por 14 dias, onde a variação significativa é observada na figura pelos símbolos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,1$. E (c) mostra o tratamento com kombuchas fermentadas por 30 dias e a variação significativa é observada na figura pelo símbolo: * $p < 0,05$, mostrado entre C e KV30, todos eles analisados por ANOVA de uma via com post-test Tukey. Os grupos de tratamento são: C= Controle, CV= Chá Verde, CP= Chá Preto, KV7, KV14 e KV30= Kombucha Verde fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente, e KP7, KP14 e KP30= Kombucha Preta fermentada por 7, 14 e 30 dias, respectivamente.

Por fim, os resultados para a análise do número de ovos no útero para o tratamento com kombuchas com 30 dias de fermentação, mostrou uma diferença significativa no tratamento C e KV30, figura 13C.

Considerando os resultados, o tratamento com o líquido da kombucha verde de 7 e 14 dias aumentou a produção de ovos e o tratamento com o líquido da kombucha verde 30 dias diminuiu a quantidade de ovos. Não se tem estudos que mostre um potencial de aumentar ou diminuir a fertilidade com o consumo de kombucha, mas BARTLETT; ERLICH, 2015 recomenda o consumo de kombucha para promover da fertilidade, porque é uma bebida rica em probióticos que podem influenciar positivamente no estado da flora intestinal. Já que ela argumenta que é necessário ter um equilíbrio dita flora para o incremento da fertilidade, porque uma desregulação

pode levar ao aumento de infecções fúngicas, sensibilidade alimentar, sistema imunológico prejudicado e uma má absorção de nutrientes, prejudicando a fertilidade da mulher. Por outro lado, alterações na produção de ovos foi relacionada ao aumento ou a diminuição no acúmulo de lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020). *C. elegans*, não apresenta um tecido direcionado para o acúmulo de lipídeos, mas os armazenam como trigliceróis nas células intestinais, hipoderme e gônadas para depois produzir proteínas para a constituição do vitelo (KURZCHALIA; WARD, 2003; ZHANG *et al.*, 2013). Também observou-se que existe um sistema endógeno que controla o acúmulo lipídico, quando se tem condições ambientais propícias ao crescimento e reprodução, ativa uma cascata de sinalização que ajuda com a ativação de genes envolvidos na lipogênese (ELLE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011). Isto pode ser observado nos estudos KONG *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2011 onde observou-se redução do número de ovos após tratamentos com agentes tóxicos (Níquel e Mercurio).

Além disso, prejuízos ou a diminuição dos processos reprodutivos no *C. elegans* é consequência de um transporte ineficaz de lipídeos para a formação de vitelo, já que ele é uma importante fonte nutricionais para o desenvolvimento dos embriões. Os fatores que estariam associados à dita regulação são condições de estresse, exposição a metais pesados e hormônios (NOVILLO *et al.*, 2005; ROMPAY *et al.*, 2015). Com base nesses estudos podemos dizer que o líquido da kombucha de 7 e 14 dias de fermentação poderia criar um ambiente propício para o incremento do metabolismo de lipídeos e também para a formação de vitelo ao contrário do líquido da kombucha de 30.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Observou-se que o líquido das kombuchas não interferiu na sobrevivência e no desenvolvimento larval dos *C. elegans*, mas o tratamento com chá verde (5g/L) atrasou o desenvolvimento larval, provavelmente relacionada à presença de EGCG que é reduzida na fermentação.
- O tratamento com as kombuchas e os chás não alterou o comportamento de movimento corporal (thrashes) e o bombeamento faríngeo após os tratamentos

com as kombuchas com três tempos de fermentação (7, 14 e 30 dias), o que sugere que o sistema nervoso e muscular não foi alterado.

- O número de ovos dentro do útero aumentou após o tratamento com as kombuchas de 7 e 14 dias de fermentação, por outro lado diminuiu após o tratamento com as kombuchas de 30 dias. Isto pode indicar que as kombuchas de 30 dias de fermentação outorgam um ambiente estressante ou afetam algum processo de transporte de lipídeos para a formação de vitelo. As kombuchas de 7 e 14 mostram um ambiente propício para o incrementar o metabolismo de lipídeos.
- Não se encontrou resultados que demonstrem toxicidade das kombuchas de 7 e 14 dias de fermentação quando presentes durante o ciclo larval de *C. elegans*. Já com a kombucha fermentada por 30 dias se observou uma redução do número de ovos. Mais estudos precisam ser feitos para poder explicar se efetivamente as kombuchas de chá verde após uma fermentação por 30 dias são tóxicas e qual o mecanismo que elas afetam para ter uma redução no processo de formação do ovo.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; WINK, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 216–221, fev. 2009.

AHMED, S. E.; DIRAR, H. A. **Studies on the Microbiology of Kombucha (Tea Fungus)**. **J. Agric. Sci**, 2005.

ALCARAZ GARCETE, L. A. Evaluación del Efecto Protector de la Rutina Frente a los Efectos Tóxicos Inducidos por Atrazina en *Caenorhabditis elegans*. 2022.

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

ALOULOU, A. et al. **Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/63>>.

ANTOLAK, H.; PIECHOTA, D.; KUCHARSKA, A. Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). 2021.

- ARANTES, L. P. et al. Luehea divaricata Mart. anticholinesterase and antioxidant activity in a Caenorhabditis elegans model system. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 265–271, 1 dez. 2014.
- ARANTES, L. P. et al. Guarana (Paullinia cupana Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in Caenorhabditis elegans. **Cite this: Toxicol. Res**, v. 5, p. 1629, 2016.
- ASHRAFI, A.; JOKAR, M.; MOHAMMADI NAFCHI, A. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 444–454, 1 mar. 2018.
- AUNG, T.; EUN, J. B. Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (Porphyra dentata) during fermentation. **LWT**, v. 154, p. 112643, 15 jan. 2022.
- AVERY, L.; YOU, Y. J. **C. elegans feeding. WormBook : the online review of C. elegans biology**, 2012.
- BANERJEE, D. et al. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. **Food & Function**, v. 1, n. 3, p. 284–293, 2010.
- BARTLETT, E.; ERLICH, L. **Feed Your Fertility: Your Guide to Cultivating a Healthy Pregnancy with Chinese Medicine, Real Food, and Holistic Living - PDFDrive.com**, 2015.
- BAUER-PETROVSKA, B.; PETRUSHEVSKA-TOZI, L. **Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink**, 2000.
- 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, 2015.
- BLANC, P. J. **CHARACTERIZATION OF THE TEA FUNGUS METABOLITES**, 1996.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 41. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 17 de setembro de 2019. Disponível: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-41-de-17-de-setembro-de-2019.pdf/view>
- BRENNER, S. **THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS**, 1993. Disponível em: <<https://academic.oup.com/genetics/article/77/1/71/5991065>>.
- BUCKINGHAM, S. D.; SATTELLE, D. B. Fast, automated measurement of nematode swimming (thrashing) without morphometry. **BMC Neuroscience**, v. 10, 20 jul. 2009.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, 2016.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea. **Non-alcoholic Beverages: Volume 6. The Science of Beverages**, p. 285–327, 1 jan. 2019.
- CHU, S. C.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502–507, 1 jan. 2006.

COELHO, R. M. D. et al. **Kombucha: Review. International Journal of Gastronomy and Food Science**AZTI-Tecnalia, , 1 dez. 2020.

COLE, R. D.; ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, P. L. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 194, n. 3, p. 248–256, 1 fev. 2004.

DE FILIPPIS, F. et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11–16, 1 ago. 2018.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. **Tea, Kombucha, and health: a review**, 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/foodres>.

ELLE, I. C. et al. **C. elegans: A Model for Understanding Lipid Accumulation****Lipid Insights**, 2008.

EMILJANOWICZ, K. E.; MALINOWSKA-PAŃCZYK, E. **Kombucha from alternative raw materials–The review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition**Bellwether Publishing, Ltd., , 27 out. 2020.

ERNST, E. Kombucha A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Complementary Medicine Research**, v. Vol 10, p. 85–87, 2003.

ESPERÓN, P. Premio Nobel en medicina 2002: Todo lo que un nemátodo nos puede decir. **Journal Of Science Education**, v. Vol. 4, n. Ed.1, p. 46, 2003.

FRANKS, M. et al. The influence of water composition on flavor and nutrient extraction in green and black tea. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2019.

GAGGIÀ, F. et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. 2018.

GARDNER, M.; ROSELL, M.; MYERS, E. M. Measuring the effects of bacteria on *C. elegans* behavior using an egg retention assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 80, 22 out. 2013.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. **Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects****Journal of Food Protection**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/63/7/976/1671742/0362-028x-63_7_976.pdf>.

HARTMANN, A. M. et al. Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in c57-bl/6 mice: a pilot study. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 755–761, 1 set. 2000b.

HUNT, P. R. **The C. elegans model in toxicity testing. Journal of Applied Toxicology**John Wiley and Sons Ltd, , 1 jan. 2017.

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**Blackwell Publishing Inc., , 2014.

- JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. Em: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2016.
- JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 392–398, 1 jan. 2007.
- JOHNSON, W. Final Report on the Safety Assessment of Capsicum Annuum Extract, Capsicum Annuum Fruit Extract, Capsicum Annuum Resin, Capsicum Annuum Fruit Powder, Capsicum Frutescens Fruit, Capsicum Frutescens Fruit Extract, Capsicum Frutescens Resin, and Capsaicin 1. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 3–106, 2007.
- KALETTA, T.; HENGARTNER, M. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 387–399, 2006.
- KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226–232, 1 nov. 2012.
- KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70, 1 fev. 2019.
- KOLE, A. S. et al. A case of Kombucha tea toxicity. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 3, p. 205–207, maio 2009.
- KONG, L. et al. Reproductive toxicity induced by nickel nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 1530–1538, 1 maio 2017.
- KUMAR, V.; JOSHI, V. K. Kombucha : Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 6, n. 1, p. 13, 2016.
- KURZCHALIA, T. V; WARD, S. **Why do worms need cholesterol? NATURE CELL BIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>>.
- LEUNG, M. C. K. et al. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **TOXICOLOGICAL SCIENCES**, v. 106, n. 1, p. 5–28, 2008.
- LI, Y. et al. Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent. **Toxicology Research**, v. 2, n. 6, p. 403–412, 2013.
- LONĂR, E. et al. Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 3, p. 186–192, 1 set. 2006.
- LOPES, D. R.; SANTOS, L. O.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant and antibacterial activity of a beverage obtained by fermentation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) with symbiotic kombucha culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, 1 fev. 2021.
- 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, 2018a.

- MOJTABA MOUSAVI, S. et al. Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. 2020a.
- NAWA, M.; MATSUOKA, M. **The Method of the Body Bending Assay Using *Caenorhabditis elegans***. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e253>>.
- NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. Contenido de ácido y efectos de las condiciones de fermentación en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de bebidas de té de Kombucha. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2 out. 2017.
- NGUYEN, N. K. et al. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149–1155, 1 dez. 2015.
- NOVILLO, A. et al. **Changes in Nuclear Receptor and Vitellogenin Gene Expression in Response to Steroids and Heavy Metal in *Caenorhabditis elegans* 1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.receptors.org/NR/>>.
- OLBA DO COUTO, G.; DE LIMA, C. P. Determinação de compostos fenólicos totais do chá verde e chá preto não fermentados e suas respectivas kombuchas. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 20, n. 2, p. 21–30, 14 abr. 2022.
- PEREIRA, C.; DE FREITAS RODRIGUES, C.; SILVA AVILA, D.; CASAGRANDE DENARDIN, C. Extratos Oleosos da Semente Sálvia Hispanica L. (chia) Reduzem o Acúmulo de Lipídios em *Caenorhabditis Elegans*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v.5, n.2, 14 Feb.2020.
- PORTA-DE-LA-RIVA, M. et al. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **J. Vis. Exp**, n. 64, 2012.
- RAIZEN, D. et al. Methods for measuring pharyngeal behaviors. 2012.
- ROMPAY, L. VAN et al. New genetic regulators question relevance of abundant yolk protein production in *C. Elegans*. **Scientific Reports**, v. 5, 10 nov. 2015.
- SABOURAUD, S. et al. Intoxication environnementale par le plomb liée à la consommation de boisson conservée dans une cruche artisanale en céramique vernissée. **La Revue de Médecine Interne**, v. 30, n. 12, p. 1038–1043, 1 dez. 2009.
- SILVA, D. P. DA et al. KOMBUCHÁ: DO “CHÁ DA IMORTALIDADE” A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA. Em: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 4**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2021a. p. 74–87.
- SILVA, K. A. et al. Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, 1 jul. 2021b.
- SRINIVASAN, R.; SMOLINSKE, S.; GREENBAUM, D. **Received from Texas Tech Health Sciences Center**, 1997.
- STIERNAGLE, T. **Maintenance of *C. elegans***. **WormBook : the online review of *C. elegans* biology**, 2006.

STRANGE, K. **An Overview of C. elegans Biology**, 2006.

TIAN, J. et al. Green tea catechins EGCG and ECG enhance the fitness and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by complex I inhibition. **Priority Research Paper**, v. Vol 13, n. 19, 2021.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231–1246, 2010.

VIDAL-GADEA, A. G. et al. Coordination of behavioral hierarchies during environmental transitions in *Caenorhabditis elegans*. **Worm**, v. 1, n. 1, p. 5–11, jan. 2012.

VIJAYARAGHAVAN, R. et al. Subacute (90 Days) Oral Toxicity Studies of Kombucha Tea. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, 2000.

WANG, M. C. et al. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. **Nature Methods**, v. 8, n. 2, p. 135–138, fev. 2011.

WATAWANA, M. I. et al. and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Review Article Health**, 2015.

WISEMAN, S. A.; BALENTINE, D. A.; FREI, B. Antioxidants in tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 8, p. 705–718, 1997.

WU, Q. et al. Association of oxidative stress with the formation of reproductive toxicity from mercury exposure on hermaphrodite nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 175–184, set. 2011.

ZHANG, H.; GAO, S.; CHEN, W. Automated recognition and analysis of head thrashes behavior in *C. elegans*. **BMC Bioinformatics**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2022.

ZHANG, Y. et al. Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 12 mar. 2013.

ZHAO, Y. et al. **Translocation, transfer, and in vivo safety evaluation of engineered nanomaterials in the non-mammalian alternative toxicity assay model of nematode *Caenorhabditis elegans***. **RSC Advances**, 7 maio 2013.

ZUBAIDAH, E. et al. Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars. **Nutrition and Food Science**, v. 49, n. 2, p. 333–343, 6 mar. 2019.

