

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**NAYARA BARBOSA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE AROMAS NATURAIS DE  
CAJU E CAJÁ NA SABORIZAÇÃO DE KOMBUCHA**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2023**

**NAYARA BARBOSA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE AROMAS NATURAIS DE CAJU E CAJÁ  
NA SABORIZAÇÃO DE KOMBUCHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa  
Coorientadora: Dra. Sharline Florentino de Melo Santos.

**JOÃO PESSOA PB**

**2023**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S237a Santos, Nayara Barbosa dos.

Avaliação da aplicabilidade de aromas naturais de  
caju e cajá na saborização de kombucha / Nayara Barbosa  
dos Santos. - João Pessoa, 2023.

80 f. : il.

Orientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa.

Coorientação: Sharline Florentino de Melo Santos.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Chá fermentado. 2. Segunda fermentação. 3.  
Flavorizantes naturais. 4. Frutas do nordeste  
brasileiro. 5. Aromas naturais. I. Sousa, Carlos  
Alberto Bispo de. II. Santos, Sharline Florentino de  
Melo. III. Título.

UFPB/BC

CDU 663.952.2(043)

**NAYARA BARBOSA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE AROMAS NATURAIS DE CAJU E CAJÁ  
NA SABORIZAÇÃO DE KOMBUCHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 28 de Março de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**



Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa - PPGEQ/CT/UFPB  
(Orientador)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sharline Florentino de Melo Santos - PPGEQ/CT/UFPB  
(Coorientadora)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Farias de Almeida - PPGEQ/CT/UFPB  
(Examinadora Interna)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Julice Dutra Lopes - PPGEQ/CT/UFPB  
(Examinadora Interna)



Prof.<sup>a</sup> Flávia de Oliveira Paulino - CBIOTEC/CT/UFPB  
(Examinadora Externa)

## DEDICATÓRIA

A Thiago e Lis,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Pensei em concluir esta etapa da vida – talvez a última formal de academia, agradecendo. Mas como seria suficiente, se devo a tanta gente este meu momento feliz?

Começo então, pelo divino que habita em cada um de todos nós, regendo, cuidando e retornando todas as coisas em seu devido momento e com uma maestria suprema!

Agradeço a minha querida mãe por me formar mulher forte e resiliente, me inspirando todos os dias com o seu profissionalismo e excelência em ser! Também, ao meu padraсто Fabinho e às minhas irmãs: Tayná e Yasmin, pessoas que tanto amo e quero bem!

Com saudade, agradeço a minha Vó Carmem e ao meu Vô Dada, pelo imenso privilégio em tê-los tido em minha vida! À minha Vó Gorete, meu muito obrigada por todo carinho e cuidado! Eu amo vocês!

Ao amor que fez morada em mim, Thiago Sombra e a nossa mugangueira predileta, Lilics da Globo, dedico este trabalho agradecendo por sempre me apoiarem!

À cidade maravilhosa de João Pessoa e a todos aqueles que me foram lar em solo paraibano nesses exatos 10 anos, meu muito obrigada! - Matheus Caldas, Regina Bernardo, Henrique Ramos, Lucas Gonçalves, Aline Sarmiento, Dayenne Soares, Thais Lima, Wanessa Lima e pessoal do Seu Pereira e Coletivo 401. Para minha sócia e irmã de alma, Andressa Aziz, não só agradeço a parceria, como também desejo tudo de mais lindo, minha amiga! #VIVABAUÁ

Ao Prof. Dr. Carlos Bispo e à Prof.a Dr.a Sharline Florentino, minha gratidão pela orientação neste trabalho. Também a todas as pessoas que colaboraram na execução do presente projeto: Rayronne Leal, Sofacles, Débora e José Evangelista.

## **EPÍGRAFE**

**O amor aprisiona, mas também liberta.**

(Autor desconhecido)

## RESUMO

O chá de kombucha é uma bebida refrescante de sabor característico, levemente doce e ácido, consumida no mundo todo. Enaltecida devido suas propriedades desintoxicantes e energizantes, é obtida em até 15 dias a partir da primeira fermentação (F1) do chá adoçado de folhas do gênero *Camellia sinensis* no qual se inocula uma solução acidificante (*starter*) juntamente com a Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras (SCOBY). A partir disso, disponibiliza-se a opção de incorporar diferentes sabores à bebida por meio de técnicas de infusão de frutas, polpas, especiarias ou ainda, extratos em uma segunda etapa de fermentação (F2). Importa para tanto, o controle de algumas variáveis influentes no processo como temperatura, luminosidade, oxigenação e assepsia, paralelamente ao acompanhamento de parâmetros como pH, acidez total, teor de álcool e de açúcares por meio de metodologias e aparelhos específicos. Nesse contexto, a presente pesquisa aplica-se à Bauá Kombucha® com o objetivo de avaliar a utilização de aromas naturais na flavorização do kombucha não alcoólico, como substitutos às polpas comerciais comumente utilizadas em escala industrial. Desta forma, buscou-se ressaltar aromas e sabores adicionados à bebida, conferindo também, padronização e estabilidade aos lotes. Os sabores regionais de cajá e de caju, já comercializados pela marca, foram selecionados devido a sua representatividade e disponibilidade no mercado. Assim, ensaios foram esquematizados em três partes fundamentais, para verificação da influência da concentração de carboidrato sob a F1 (Preliminares), determinação das melhores concentrações de aromas naturais e de polpas de ambos os sabores para F2 (Iniciais de bancada) e avaliação cinética da fase de maturação e gaseificação natural da bebida não pasteurizada. Em todos os casos, as receitas e concentrações utilizadas foram ocultadas por questões de sigilo industrial, sendo avaliados parâmetros como pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT), *Ratio*, cor, densidade, espumabilidade e produção de CO<sub>2</sub>. Por fim, prosseguiu-se com a caracterização nutricional dos melhores resultados obtidos, também quanto a fenólicos individuais e atividade antioxidante. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, demonstrando uma alta capacidade antioxidante e a presença de nove compostos fenólicos caracterizados por cromatografia. Apesar disso, não foram evidenciados fatores significativos que indiquem a substituição das polpas por aromas naturais na flavorização do kombucha de cajá e de caju.

Palavras-chave: chá fermentado; segunda fermentação; flavorizantes naturais; frutas do nordeste brasileiro; aromas naturais.

## ABSTRACT

Kombucha tea is a refreshing drink with a characteristic flavor, slightly sweet and acidic, consumed all over the world. Praised for its detoxifying and energizing properties, it is obtained in up to 15 days from the first fermentation (F1) of tea sweetened with leaves of the genus *Camellia sinensis* in which an acidifying solution (starter) is inoculated together with the Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). From this, the option of incorporating different flavors to the drink is available through infusion techniques of fruits, pulps, spices or extracts in a second fermentation stage (F2). Therefore, it is important to control some variables that influence the process, such as temperature, luminosity, oxygenation and asepsis, in parallel with the monitoring of parameters such as pH, total acidity, alcohol and sugar content through specific methodologies and devices. In this context, the present research applies to Bauá Kombucha® with the objective of evaluating the use of natural aromas in the flavoring of non-alcoholic kombucha, as substitutes for commercial pulps commonly used on an industrial scale. In this way, we sought to emphasize aromas and flavors added to the beverage, also providing standardization and stability to the batches. The Regional flavors of Cajá and Cashew, already commercialized by the brand, were selected due to their representativeness and availability in the market. Thus, tests were outlined in three fundamental parts, to verify the influence of the carbohydrate concentration on the F1 (Preliminaries), determination of the best concentrations of natural aromas and pulps of both flavors for F2 (Initials of bench) and kinetic evaluation of the maturation phase and natural gasification of the unpasteurized drink. In all cases, the recipes and concentrations used were hidden for reasons of secrecy, parameters such as pH, TSS, ATT, Ratio, color, density, foamability and CO<sub>2</sub> production being evaluated. Finally, we proceeded with the nutritional characterization of the best results obtained, also in terms of total phenolics, antioxidant activity and minerals. The results obtained were quite strong, demonstrating a high antioxidant capacity and the presence of new phenolic compounds characterized by chromatography. Despite this, there were no significant indications that indicate the replacement of pulps by natural aromas in the flavoring of cajá and cashew kombucha.

**Keywords:** fermented tea; second fermentation; natural flavorings; fruits from the Brazilian northeast; natural flavors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.1  | Distribuição da população microbiana na cultura SCOBY e kombucha .....                                                                                                                                                                                           | 19 |
| Figura 3.2  | Representação esquemática da atividade metabólica principal do chá de kombucha .....                                                                                                                                                                             | 20 |
| Figura 3.3  | Percentual de etanol em amostras de chá de kombucha em relação à variação do meio e tempo de fermentação .....                                                                                                                                                   | 25 |
| Figura 3.4  | Fluxograma do processo fermentativo do chá de kombucha .....                                                                                                                                                                                                     | 30 |
| Figura 4.1  | Relação entre comprimento de onda e as características de cor .....                                                                                                                                                                                              | 44 |
| Figura 5.1  | Análise média de sólidos solúveis totais em ensaios preliminares de concentração $C_1$ e $C_2$ .....                                                                                                                                                             | 48 |
| Figura 5.2  | Análise média de Acidez Total Titulável em ensaios preliminares de concentração $C_1$ e $C_2$ .....                                                                                                                                                              | 48 |
| Figura 5.3  | Análise média de <i>Ratio</i> em ensaios preliminares de concentração $C_1$ e $C_2$ .....                                                                                                                                                                        | 50 |
| Figura 5.4  | <b>A.</b> Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Cajá .....                                       | 53 |
| Figura 5.5  | <b>A.</b> Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Caju; <b>B.</b> Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Caju .....                                       | 53 |
| Figura 5.6  | <b>A.</b> Análise de pH com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de pH em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Cajá .....                                                    | 54 |
| Figura 5.7  | <b>A.</b> Análise de pH em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Caju; <b>B.</b> Análise de pH em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Caju .....                                         | 54 |
| Figura 5.8  | <b>A.</b> Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Cajá ..... | 55 |
| Figura 5.9  | <b>A.</b> Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Caju; <b>B.</b> Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Caju ..... | 55 |
| Figura 5.10 | <b>A.</b> Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Cajá .....                                       | 56 |
| Figura 5.11 | <b>A.</b> Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Caju; <b>B.</b> Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Caju .....                                       | 56 |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5.12 | <b>A.</b> Análise de <i>Ratio</i> em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de <i>Ratio</i> em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Cajá .....                                                                                                             | 57 |
| Figura 5.13 | <b>A.</b> Análise de <i>Ratio</i> em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$ e $P_2$ ) sabor Caju; <b>B.</b> Análise de <i>Ratio</i> em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$ e $A_2$ ) sabor Caju .....                                                                                                             | 57 |
| Figura 5.14 | <b>A.</b> Análise de SST em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de SST em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Caju .....                                       | 58 |
| Figura 5.15 | <b>A.</b> Análise de pH em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de pH em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Caju .....                                         | 59 |
| Figura 5.16 | <b>A.</b> Análise de acidez total titulável em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de acidez total titulável em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Caju ..... | 59 |
| Figura 5.17 | <b>A.</b> Análise de cor em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de cor em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Caju .....                                       | 60 |
| Figura 5.18 | <b>A.</b> Análise de <i>Ratio</i> em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Cajá; <b>B.</b> Análise de <i>Ratio</i> em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Caju .....                     | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                                          |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3.1 | Composição química geral do chá de Kombucha .....                                                                                                        | 21 |
| Tabela 3.2 | Componentes predominantes no chá de kombucha tradicional em diferentes tempos de fermentação e teores de chá preto adoçado com sacarose .....            | 23 |
| Tabela 3.3 | Efeitos fisiológicos e de saúde dos constituintes do chá de Kombucha obtidos de diferentes fontes prontamente disponíveis .....                          | 27 |
| Tabela 3.4 | Parâmetros analíticos para registro e comercialização de kombucha no Brasil .....                                                                        | 32 |
| Tabela 4.1 | Receita padrão generalizada do mosto de primeira fermentação da Bauá .....                                                                               | 36 |
| Tabela 4.2 | Viabilidade da composição majoritária do SCOBY.....                                                                                                      | 37 |
| Tabela 4.3 | Esquema de testes iniciais de bancada para determinação das melhores concentrações de polpa e aroma natural de cajá para a saborização do kombucha ..... | 39 |
| Tabela 4.4 | Esquema de testes iniciais de bancada para determinação das melhores concentrações de polpa e aroma natural de caju para a saborização do kombucha ..... | 39 |
| Tabela 4.5 | Esquema de testes para avaliação cinética da segunda etapa de fermentação do kombucha sabor cajá .....                                                   | 40 |
| Tabela 4.6 | Esquema de testes para avaliação cinética da segunda etapa de fermentação do kombucha sabor caju .....                                                   | 40 |
| Tabela 4.7 | Esquema de envase do volume teste para avaliação da maturação e gaseificação natural do kombucha sabor cajá .....                                        | 41 |
| Tabela 4.8 | Esquema de envase do volume teste para avaliação da maturação e gaseificação natural do kombucha sabor caju .....                                        | 41 |
| Tabela 5.1 | Equações das retas $C_1$ e $C_2$ referentes a análise média de <i>Ratio</i> em ensaios preliminares .....                                                | 51 |
| Tabela 5.2 | Caracterização físico-química de flavorizantes sabor Cajá e Caju .....                                                                                   | 51 |
| Tabela 5.3 | Densidade relativa média para o kombucha sabor Cajá .....                                                                                                | 61 |
| Tabela 5.4 | Densidade relativa média para o kombucha sabor Caju .....                                                                                                | 61 |
| Tabela 5.5 | Caracterização nutricional do kombucha sabor Cajá e Caju nas melhores condições de processo .....                                                        | 64 |
| Tabela 5.6 | Determinação de atividade antioxidante do kombucha sabor Cajá e Caju nas melhores condições de processo .....                                            | 67 |
| Tabela 5.7 | Determinação de compostos fenólicos individuais do kombucha sabor Cajá e Caju nas melhores condições de processo .....                                   | 69 |

## LISTA DE QUADROS

|            |                                                                                                                                                              |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 5.1 | Análise de espumabilidade em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Cajá ..... | 62 |
| Quadro 5.2 | Análise de espumabilidade em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com <i>priming</i> sabor Caju ..... | 63 |

## SUMÁRIO

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                     | 14 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                                      | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                      | 16 |
| 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS                                | 16 |
| <b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>                          | 17 |
| 3.1 CHÁ DE KOMBUCHA: UMA BEBIDA FERMENTADA COMPLEXA     | 17 |
| 3.1.1 O consórcio microbiológico                        | 18 |
| 3.1.2 Dinâmica microbiana e bioquímica                  | 19 |
| 3.1.3 Composição química e seus influentes              | 21 |
| 3.1.4 Potencial nutricional e bioativo                  | 26 |
| 3.2 PRODUÇÃO: TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO DO CHÁ DE KOMBUCHA | 29 |
| <b>4 METODOLOGIA</b>                                    | 36 |
| 4.1 MATERIAIS                                           | 36 |
| 4.2 PRODUÇÃO DO KOMBUCHA                                | 36 |
| 4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS                                  | 42 |
| 4.3.1 pH                                                | 42 |
| 4.3.2 Temperatura                                       | 42 |
| 4.3.3 Sólidos Solúveis Totais                           | 42 |
| 4.3.4 Açúcares Redutores Totais                         | 43 |
| 4.3.5 Acidez Total Titulável                            | 43 |
| 4.3.6 Ratio                                             | 43 |
| 4.3.7 Cor                                               | 43 |
| 4.3.8 Espumabilidade                                    | 44 |
| 4.3.9 Densidade Relativa                                | 44 |
| 4.3.10 Resíduo seco                                     | 45 |
| 4.3.11 Cinzas                                           | 45 |
| 4.3.12 Proteínas Solúveis                               | 45 |
| 4.3.13 Carboidratos totais                              | 45 |
| 4.3.14 Atividade antioxidante                           | 45 |
| 4.3.15 Fenólicos                                        | 46 |
| 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS                       | 47 |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                         | 48 |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>                                     | 70 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                      | 72 |

## 1 INTRODUÇÃO

Originário de Manchúria - nordeste da China, o chá de kombucha é uma bebida refrescante, de sabor característico (levemente doce e ácido), consumida em todo o mundo. Enaltecida devido suas propriedades desintoxicantes e energizantes durante a dinastia Tsin no ano de 220 a.C, a bebida era chamada “elixir da imortalidade”, sendo hoje conhecida por diversos nomes como chá-kvass na Rússia, *funkochineses* na Itália e KōchaKinoko no Japão. Globalmente difundida por marinheiros e comerciantes, o kombucha emergiu na Europa nos anos posteriores à segunda guerra mundial, atingindo maior reconhecimento em 1950 na Itália e popularizando-se gradativamente desde então (JAYABALAN et al., 2014).

O Kombucha é obtido a partir da fermentação do chá adoçado de folhas do gênero *Camellia sinensis*, normalmente chá verde e/ou preto, no qual se inocula uma solução acidificante proveniente de fermentações anteriores (*Starter*) juntamente com o SCOBY (sigla traduzida como Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras). Assim, em até 15 dias a fermentação ocorre em aerobiose e é caracterizada pelo consumo do açúcar por esses microrganismos, concomitante à produção de diversas substâncias benéficas à saúde humana como ácidos orgânicos, vitaminas C e do complexo B, aminoácidos, enzimas, etanol, antibióticos ativos, antioxidantes, minerais e gás carbônico (JAYABALAN et al., 2014; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Por isso, atualmente o chá de kombucha tem sido reconhecido como parte importante de uma dieta saudável. No entanto, alegações oficiais dos órgãos mundiais de saúde pública ainda não podem ser apresentadas, pois as evidências científicas publicadas até o presente momento constam apenas de investigações em animais (JAYABALAN et al., 2014). Tais alegações ressaltam a atividade antioxidante da bebida a qual se relaciona a diversos benefícios como a prevenção de alguns tipos de cânceres, o aumento da imunidade e a melhora de quadros inflamatórios, como visto na artrite reumatoide e outras afecções (JAYABALAN et al., 2014).

A elaboração do kombucha é dada em duas etapas de fermentação. Após a primeira etapa, o SCOBY é reservado e a bebida, já pronta para consumo, pode ser saborizada através de métodos infusivos de frutas e especiarias em uma segunda fase fermentativa. Só então os resíduos sólidos são retirados enquanto o kombucha é encaminhada para o envase, seguido de um período destinado à gaseificação natural e refrigeração para conservação do produto não pasteurizado.

Na busca por melhores hábitos alimentares, a ideia de associar uma dieta balanceada com alimentos insípidos e insossos tem sido desmistificada, tornando este setor alimentício fluido e com previsão de crescimento expansivo. De acordo com agências de pesquisa, o

mercado de alimentos saudáveis cresceu 98% no Brasil, com grande salto entre 2009 e 2014, ranqueando o país à quarta posição mundial com movimentação de US\$ 35 bilhões/ano. Tais resultados foram alcançados devido à dinâmica de conscientização do consumidor, de forma que atualmente 28% da população acredita que consumir alimentos nutricionalmente ricos é importante e 22% dela opta por comprar alimentos naturais e sem conservantes, sempre que possível. É importante ressaltar que esta tendência vem na contramão da industrialização que preconiza a conservação de alimentos, muitas vezes, por meio de técnicas prejudiciais à saúde e dita as regras de consumo em detrimento a uma extensa variedade de alimentos mais saudáveis (BARBOSA et al., 2019).

Assim, em meio a este mercado crescente e promissor, a produção industrial da bebida é feita com autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e fiscalizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em consonância com a Instrução Normativa nº 41 que estabelece os padrões de identidade e qualidade para a produção comercial da categoria. De acordo com a Associação Brasileira de Kombucha (ABKom), existem cerca 40 empresas de pequeno porte regulamentadas no Brasil, produzindo uma média de 2 mil a 5 mil garrafas por mês distribuídas regionalmente.

Neste contexto, como uma iniciativa engajada à alimentação saudável e natural, a presente pesquisa aplica-se à indústria e objetiva avaliar a utilização de aromas naturais na saborização do chá de kombucha, substituindo polpas comumente utilizadas na segunda etapa de fermentação. Isto porque busca-se, em escala industrial, ressaltar sabores e aromas adicionados à bebida, atribuindo padronização e estabilidade, refletida também em tempo de prateleira, aos produtos comercializados.

Para tanto, este estudo foi realizado em parceria com a Bauá Kombucha® (João Pessoa/PB), empresa pioneira no estado na produção da bebida em escala industrial, que atua desde 2021 com o apoio de editais nacionais de subvenção à *startups*: Programa Centelha (Fapesq/FINEP), Tecnova II (Fapesq/FINEP) e Startup NE (Sebrae). A marca aposta em sabores tradicionais da região nordeste do Brasil (cajá e caju) considerando a representatividade e disponibilidade desses insumos no mercado. Vale destacar que as análises de fermentação foram realizadas no Laboratório de Produtos Fermento-destilados da Universidade Federal da Paraíba (LPFD/CT/UFPB), em parceria com o Laboratório de Bioengenharia (LaBio/CT/UFPB) e com o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria desta instituição de ensino superior (CCHSA/UFPB - Campus III).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade de aromas naturais de cajá e de caju na saborização do kombucha, como substitutos da polpa natural na segunda fermentação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar duas concentrações iniciais de sacarose para a primeira fermentação do chá de kombucha;
- Caracterizar as polpas e os aromas naturais de cajá e de caju quanto à composição e características físico-químicas (pH, ART, SST, ATT, cor, cinzas, resíduo seco);
- Estabelecer, com base em receitas preexistentes da Bauá Kombucha® e recomendações do fornecedor, duas concentrações de polpas e duas concentrações de aromas de cajá e de caju para testes iniciais de bancada;
- Realizar ensaios para determinar as melhores concentrações de polpas e aromas naturais de cajá e caju na segunda fermentação do kombucha, por meio de medidas de pH, SST, ATT, *Ratio* e cor;
- Prosseguir com estudo de saborização e gaseificação natural da bebida nas melhores concentrações de polpas e aromas de cajá e caju previamente estabelecidas. Para tanto, realizar o acompanhamento cinético de cada processo, por meio de medidas de pH, SST, ATT, *Ratio*, cor, densidade, espumabilidade e produção de CO<sub>2</sub> por 360 horas;
- Avaliar a influência da substituição das polpas por aromas naturais na segunda fermentação do kombucha, partindo da caracterização nutricional (proteínas solúveis, carboidratos totais, resíduo seco e cinzas), da análise de fenólicos individuais por cromatografia, assim como da atividade antioxidante nas melhores condições de processo.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 CHÁ DE KOMBUCHA: UMA BEBIDA FERMENTADA COMPLEXA

O Kombucha é uma bebida produzida a partir da fermentação tradicional de uma infusão de folhas do gênero *Camellia sinensis* previamente açucarada e acidificada, na qual se inocula uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) (VITAS et al., 2013). Segundo Jayabalan et al. (2014), o substrato ideal para esse bioprocesso é o chá preto adoçado com 5% a 8% de sacarose, sendo o extrato de chá verde considerado uma alternativa popular.

Dentre os vários tipos de fermentação cujos produtos dependem da via metabólica, o chá de kombucha decorre da combinação da fermentação alcoólica, láctica e acética devido à diversidade de microrganismos coexistentes (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). No entanto, importa salientar que apesar da variação de microrganismos, estes, em simbiose, apresentam alta capacidade de inibir o crescimento de contaminantes. Isso também ocorre a um baixo valor de pH, decorrente da formação de ácidos durante a fermentação prolongada (MAYSER et al., 1995).

Assim, sob condições aeróbicas e em um período de até 15 dias, os microrganismos do chá de kombucha metabolizam o açúcar presente no meio em cerca de 14 aminoácidos, vitaminas, enzimas, alguns hidrolíticos e inúmeros ácidos orgânicos (MALBASA et al., 2011). Adicionalmente, forma-se um biofilme flutuante na superfície do líquido (novo SCOBY) decorrente da atividade de cepas específicas de bactérias acéticas (WATAWANA et al., 2016).

Como os diversos ácidos produzidos associam-se a baixos valores de pH (característico da bebida), Dutta e Paul (2019) e Vohra et al. (2019) ressaltaram a necessidade de se estabelecer valores limites mínimo de pH e máximo de teor de etanol, uma vez que estes podem ser potencialmente prejudiciais ao corpo.

Nesse contexto, Hur et al. (2014) destacaram ainda que, em decorrência das diversas mudanças bioquímicas do processo fermentativo, é possível que haja alterações na bebida as quais relacionam-se intimamente ao inóculo e às condições de produção do chá de kombucha. Desta forma, algumas das propriedades nutricionais do alimento produzido (como bioatividade e digestibilidade, por exemplo) podem ser consequentemente modificadas. Por essa razão, recomenda-se a caracterização microbiológica percentual da cultura inicial de SCOBY, aliada ao controle produtivo da bebida a fim de mapear os metabólitos produzidos (DUTTA e PAUL, 2019).

### 3.1.1 O consórcio microbiológico

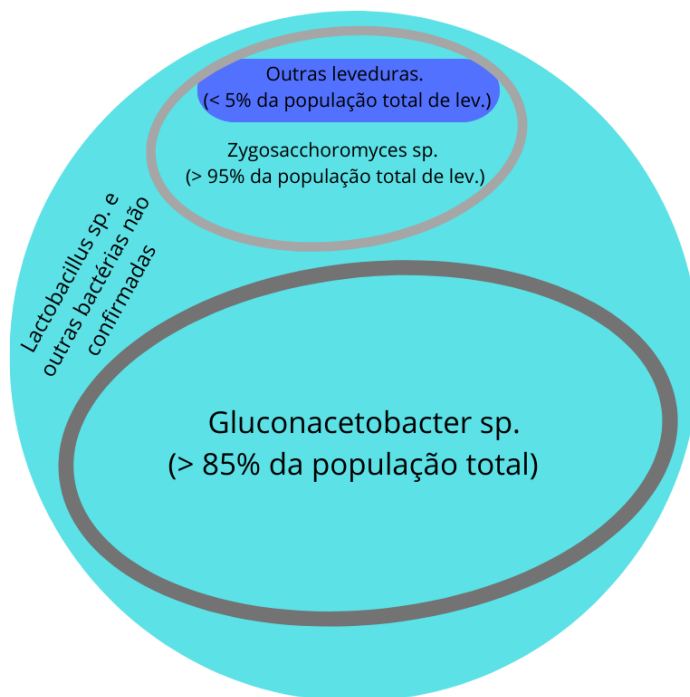
O Kombucha é uma bebida fermentada complexa obtida a partir de um consórcio microbiológico de nome botânico *Medusomyces gisevii*, mais comumente denominado SCOBY, “fungo do chá” ou ainda “mãe do Kombucha” (HESSELTINE, 1965). Segundo Jayabalan et al. (2014), este consórcio microbiológico é composto por uma poderosa simbiose entre leveduras osmofílicas e bactérias acéticas (AAB: *Acetic Acid Bacteria*) e do ácido láctico (LAB: *Lactic Acid Bacteria*) em uma esteira zoogleia (camada celulósica).

Estudos relatam uma extensa variedade de microrganismos na composição da citada microflora, com predominância de uma cultura mista de *A. xylinum* e *Zygosaccharomyces sp.* Além disso, autores afirmam que a caracterização exata das espécies em simbiose não pode ser dada, haja vista haver variação conforme a fonte de inóculo utilizada para a fermentação do chá (JAYABALAN et al., 2014; MALBASA et al., 2011).

Assim, para a produção de kombucha com o claro entendimento dos prováveis metabólitos, faz-se necessário uma identificação microbiológica percentual do SCOBY por meio da caracterização do inóculo (DUTTA e PAUL, 2019). Isto porque diversos estudos apontam a presença de bactérias do ácido acético (*Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter*), do ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) e leveduras (*Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*) no fungo do chá (MARSH et al., 2014; COTON et al., 2017; ROOS e VUYST, 2018).

Adicionalmente, dentre os procariontes, os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* são predominantes. Inclusive, estudos definem a *Gluconacetobacter sp. A4* (*G. sp. A4*) como a principal espécie bacteriana funcional isolada de um kombucha preservado cuja distribuição populacional microbiana é ilustrada na Figura 3.1. A espécie em questão é particularizada pela forte capacidade de produção de ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL) o qual atua como inibidor da atividade da glucuronidase (enzima indiretamente relacionada a vários tipos de cânceres) (JAYABALAN et al., 2014).

Figura 3.1 - Distribuição da população microbiana na cultura SCOBY e kombucha



Fonte: Adaptada de Marsh et al. (2014).

Autores acreditam que as interações microbianas entre leveduras do gênero *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* possibilitam inúmeras vantagens ao processo de fermentação mista, como a minimização de riscos de uma fermentação emperrada, a eficiência na adição de aromas e sabores (flavorizantes), além da flexibilidade de modificação de parâmetros indesejados. Neste sentido, as leveduras do Kombucha provaram ser um consórcio gerador de características finais desejáveis (SUN et al., 2014).

### 3.1.2 Dinâmica microbiana e bioquímica

Dentre os vários obstáculos no entendimento do ecossistema microbiano do fungo de kombucha está a enorme diversidade e complexidade da simbiose em questão. Logo, exemplifica-se que certos microrganismos desta comunidade participam em paralelo durante a fermentação enquanto outros atuam de maneira sequencial com uma evolução dominante ao longo do processo (CHAKRAVORTY et al., 2016).

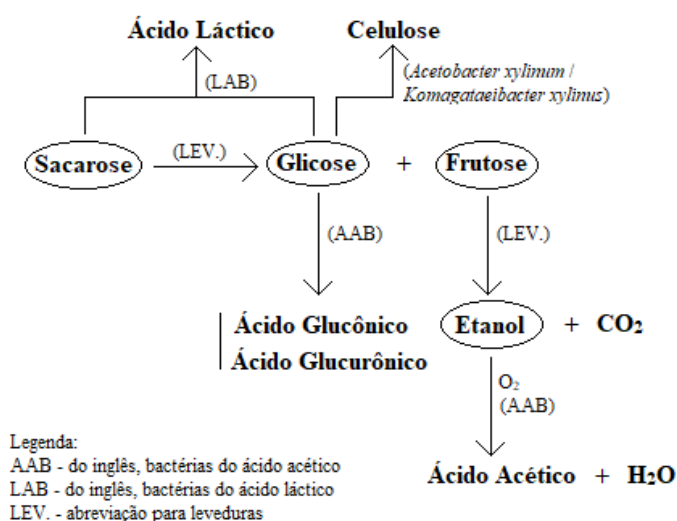
Estudos relatam que a fermentação do chá de kombucha é iniciado pelos microrganismos osmotolerantes e finalmente dominado pelas espécies tolerantes aos ácidos (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Assim, após a inoculação do SCOBY, leveduras hidrolisam a sacarose em glicose e frutose por invertase, e produzem etanol e gás carbônico por glicólise preferindo a frutose como substrato (JAYABALAN et al., 2014). Em sincronia, as bactérias do ácido acético se utilizam da glicose para produzir ácido glucônico e do etanol para

produzir ácido acético. Concomitantemente, a glicose também é transformada em ácido glucurônico por oxidação da sua molécula na posição C-6, enquanto o ácido láctico é formado a partir da glicose e sacarose por meio de bactérias lácticas (DUTTA e PAUL, 2019).

As bactérias acéticas supramencionadas, ao contrário das leveduras, requerem grandes quantidades de oxigênio para seu crescimento e atividade (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Por esta razão, as bactérias produtoras de celulose aumentam sua população, inicialmente por meio do consumo de oxigênio dissolvido no meio líquido, a fim de sintetizarem uma quantidade de celulose suficiente para estabelecer condições em que apenas as bactérias presentes na interface ar/meio consiga manter suas atividades e, conseqüentemente, a síntese do referido composto. Desta forma, o crescimento da zoogleia se dá pela formação de camadas sobrepostas, o que confere vantagens quanto à produção de celulose devido ao rápido crescimento bacteriano em condições controladas e a partir de uma variedade de substratos que incluem glicose, etanol, sacarose e glicerol (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

A Figura 3.2 esquematiza a atividade metabólica principal do chá de Kombucha. Estudos revelam que as concentrações residuais de açúcar podem variar de uma fermentação para outra, indicando que a via metabólica nem sempre se dá da mesma maneira e, conseqüentemente, a composição da bebida (CHEN e LIU, 2000).

Figura 3.2 - Representação esquemática da atividade metabólica principal do chá de Kombucha.



Fonte: Adaptado de Dutta e Paul (2019).

### 3.1.3 Composição química e seus influentes

O conhecimento detalhado acerca da composição química e das propriedades do chá de Kombucha são essenciais para um melhor entendimento cinético do processo fermentativo. Contudo, é sabido que os metabólitos gerados em suas respectivas concentrações dependem da fonte do inóculo (NGUYEN et al., 2015), das quantidades de substratos (FU et al., 2014; WATAWANA et al., 2017), do tempo de fermentação (CHEN e LIU, 2000) e da temperatura utilizada ao longo do processo (LONCAR et al., 2006; JAYABALAN et al., 2008).

Desta maneira, mudanças nas condições de fermentação do chá de kombucha podem alterar a composição final da bebida (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Apesar disso, os principais componentes e alguns metabólitos essenciais produzidos ao longo do processo fermentativo do kombucha aparecem listados na Tabela 3.1, bem como suas respectivas composições médias relacionadas ao tempo e à concentração inicial de sacarose.

Tabela 3.1 - Composição química geral do chá de Kombucha

| Composto         |                                                                                                                                                                   | Composição média  | Sacarose inicial | Tempo (dias) | Referências                               |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|--------------|-------------------------------------------|
| Ácidos orgânicos | Ácido acético                                                                                                                                                     | 5,6 g/L           | 70 g/L           | 15 d         | Blanc (1996)                              |
|                  | Ácido acético                                                                                                                                                     | 8,36 g/L          | 100 g/L          | 18 d         | Jayabalan et al.                          |
|                  | Ácido acético                                                                                                                                                     | 11 g/L            | 100 g/L          | 30 d         | (2007)                                    |
|                  | Ácido glucônico                                                                                                                                                   | 39 g/L            | 100 g/L          | 60 d         | Chen e Liu (2000)                         |
|                  | Ácido glucurônico                                                                                                                                                 | 0,0160 g/L        | 70 g/L           | 21 d         | Chen e Liu (2000)                         |
|                  | Ácido láctico                                                                                                                                                     | 0,18 g/L          | 100 g/L          | 18 d         | Loncar et al. (2006)                      |
|                  |                                                                                                                                                                   |                   |                  |              | Jayabalan et al. (2007)                   |
| Vitaminas        | Vitamina B1                                                                                                                                                       | 0,74 mg/mL        | 70 g/L           | 15 d         | Bauer-Petroska e                          |
|                  | Vitamina B2                                                                                                                                                       | 8 mg/100 mL       | 70 g/L           | 10 d         | Petrushevska-Tozi                         |
|                  | Vitamina B6                                                                                                                                                       |                   | 70 g/L           | 15 d         | (2000)                                    |
|                  | Vitamina B12                                                                                                                                                      | 0,52 mg/mL        | 70 g/L           | 15 d         | Bauer-Petroska e                          |
|                  | Vitamina C                                                                                                                                                        | 0,84 mg/mL        | 70 g/L           | 10 d         | Petrushevska-Tozi (2000)                  |
|                  |                                                                                                                                                                   | 25 mg/L           |                  |              | Malbasa et al. (2011)                     |
| Compostos gerais | Etanol                                                                                                                                                            | 5,5 g/L           | 100 g/L          | 20 d         | Chen e Liu (2000)                         |
|                  | Proteínas                                                                                                                                                         | 3 mg/mL           | 100 g/L          | 12 d         | Jayabalan et al.                          |
|                  | Polifenóis do chá                                                                                                                                                 | 7,8 Mm GAE        | 100 g/L          | 15 d         | (2007)                                    |
|                  |                                                                                                                                                                   |                   |                  |              | Chu e Chen (2006)                         |
| Minerais         | Cu, Fe, Mn, Ni, Zn                                                                                                                                                | 0,1 to 0,4 µg/mL  | 70 g/L           | 15 d         | Bauer-Petroska e Petrushevska-Tozi (2000) |
| Ânions           | F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> | 0,04 to 3,20 mg/g | 100 g/L          | 7 d          | Kumar, Narayan e Hassarajani (2008)       |

Fonte: Adaptada de Villarreal-Soto et al. (2018).

Segundo Czaja et al. (2006), o etanol e os ácidos acético e glucônico são os principais componentes do líquido e do biofilme, o qual possui alta capacidade de absorção de água. Ademais, o biofilme apresenta em sua constituição um alto teor de fibras, proteínas brutas e do aminoácido lisina, acrescidos no decurso da fermentação (JAYABALAN et al., 2010). Dentre os ácidos apontados, relatou-se a presença dos tartáricos, málicos e cítrico em menor proporção, os quais são responsáveis pelo sabor azedo característico do chá de kombucha (JAYABALAN, MARIMUTHU e SWAMINATHAN, 2007).

Bauer-Petrovska e Petrushevska-Tozi (2000) determinaram o conteúdo de manganês, ferro, níquel, cobre, zinco, chumbo, cobalto, cromo e cádmio no chá de kombucha. As concentrações de minerais observadas por estes pesquisadores foram de 0,004 µg/mL para cobalto, 0,462 µg/mL para manganês, 0,005 µg/mL para chumbo e 0,001 µg/mL para cromo. O cádmio não foi detectado em quantidade significativa.

Ademais, Kumar, Narayan e Hassarajani (2008) concluíram, por meio de estudos cromatográficos, que ocorre um aumento de minerais essenciais (Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) ao longo do processo fermentativo e relataram diferenças significativas entre as composições mineral aniônica (nomeadamente fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, fosfato e sulfato) entre o kombucha de chá preto e de chá verde. O teor de cobalto, no entanto, não foi alterado possivelmente devido sua inclusão na vitamina B<sub>12</sub> (BAUER-PETROVSKA e PETRUSHEVSKA-TOZI, 2000).

A Tabela 3.2 indica os componentes predominantes da bebida tradicional de kombucha. Entretanto, verifica-se, por meio dos estudos investigados, relação entre os principais constituintes do fermentado com o tempo e o teor de chá preto. Os trabalhos referenciados relatam a utilização inicial de 10% de sacarose (CHEN e LIU, 2000; LONCAR et al., 2000; JAYABALAN et al., 2007) e valores de 20% (CHEN e LIU, 2000) e 10% (LONCAR et al., 2000; MALBASA et al., 2002a; JAYABALAN et al., 2007) de solução acidificante do chá (*starter*) no preparo do meio. Vale destacar que as fermentações foram realizadas em reatores de até 1 L de volume.

Tabela 3.2 - Componentes predominantes no chá de kombucha tradicional em diferentes tempos de fermentação e teores de chá preto adoçado com sacarose

| Composto          | Composição média (g/L)             | Sacarose inicial (%) | Chá preto                               | Temperatura (°C)        | Tempo (dias)                 | Referências                                                                                     |
|-------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ácido acético     | 8<br>4,69                          | 10<br>10             | 2 bolsas<br>12 g/L                      | 24 ±3<br>24 ±3          | 60 d<br>18 d                 | Chen e Liu (2000)<br>Jayabalan et al. (2007)                                                    |
| Ácido glucurônico | 0,0031<br>0,0026<br>0,0034<br>1,71 | 5<br>7<br>10<br>10   | 1,5 g/L<br>1,5 g/L<br>1,5 g/L<br>12 g/L | 28<br>28<br>28<br>24 ±3 | 21 d<br>21 d<br>21 d<br>18 d | Loncar et al. (2000)<br>Loncar et al. (2000)<br>Loncar et al. (2000)<br>Jayabalan et al. (2007) |
| Ácido glucônico   | 39                                 | 10                   | 2 bolsas                                | 24 ±3                   | 60 d                         | Chen e Liu (2000)                                                                               |
| Glicose           | 179,5<br>24,59<br>12               | 7<br>7<br>10         | 1,5 g/L<br>1,5 g/L<br>2 bolsas          | 28<br>28<br>24 ±3       | 21 d<br>21 d<br>60 d         | Malbasa et al. (2002a)<br>Loncar et al. (2000)<br>Chen e Liu (2000)                             |
| Frutose           | 76,9<br>5,40<br>55                 | 7<br>7<br>10         | 1,5 g/L<br>1,5 g/L<br>2 bolsas          | 28<br>28<br>24 ±3       | 21 d<br>21 d<br>60 d         | Malbasa et al. (2002a)<br>Loncar et al. (2000)<br>Chen e Liu (2000)                             |
| Sacarose restante | 192,8<br>11<br>2,09                | 7<br>10<br>7         | 1,5 g/L<br>2 bolsas<br>1,5 g/L          | 28<br>24 ±3<br>28       | 21 d<br>60 d<br>21 d         | Malbasa et al. (2002a)<br>Chen e Liu (2000)<br>Loncar et al. (2000)                             |

Fonte: Adaptada de Jayabalan et al. (2014).

O teor acético do chá de kombucha foi avaliado por Chen e Liu (2000) os quais determinaram uma taxa maior de ácido acético de 11 g/L após 30 dias de fermentação, com tendência a decaimento gradual para 8 g/L ao término do processo em 60 dias. Semelhantemente, Jayabalan et al. (2007) monitoraram a fermentação do chá de kombucha em chá verde (12 g/L) adoçado com 10% de sacarose por 18 dias, relatando pico de concentração de ácido de 9,5 g/L no 15º dia.

A utilização do melaço como fonte de carbono alternativa à sacarose no cultivo de kombucha resultou na produção de apenas 50% do ácido acético em comparação ao substrato

tradicional no mesmo estágio de fermentação. Tal fato possivelmente está associado ao fraco crescimento de bactérias acéticas em melaço (MALBASA et al., 2008a, 2008b). Trabalhos semelhantes registraram um alto valor de pH ( $> 6,0$ ) em amostras de melaço a uma concentração 70 g/L, como também um teor de ácidos totais de aproximadamente 2,4 g/L. Assim, os autores concluíram que o kombucha produzido a partir do melaço seria menos azedo, embora dotado com um alto teor de ácidos orgânicos (DUTTA e PAUL, 2019).

Loncar et al. (2000) estudaram a concentração de ácido glucurônico no kombucha de chá preto adoçado com sacarose e relataram picos de 0,0034 g/L nos dias 7 e 21, conforme mostra a Tabela 3.2. O máximo valor relatado de ácido D-glucurônico foi de 2,33 g/L no 12º dia (JAYABALAN et al., 2007). Segundo Chen e Liu (2000), o início da produção de ácido glucônico se dá somente a partir do 6º dia de fermentação. Para este, a concentração final constatada foi de aproximadamente 39 g/L após 60 dias de processo (Tabela 3.2).

Embora não seja um composto característico do chá de kombucha, o ácido L-lático é detectável e determinável principalmente na bebida preparada à base de chá verde, sendo registrado valor máximo de 0,54 g/L no 3º dia de fermentação (JAYABALAN et al., 2007). Ainda, Malbasa et al. (2008a, 2008b) afirmam que o alto teor de ácido L-lático detectado após a fermentação do kombucha no melaço pode estar relacionado ao conteúdo do referido composto no próprio substrato, o qual resulta da degradação do açúcar invertido deste.

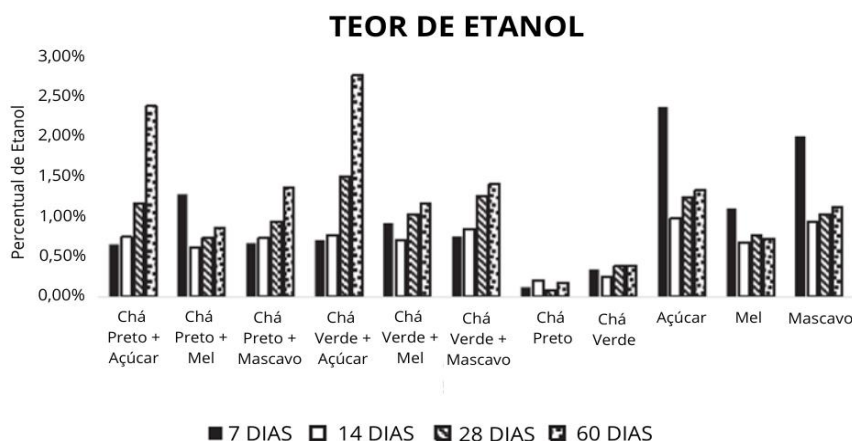
O carboidrato mais comumente utilizado na fermentação do chá de kombucha é a sacarose, embora se observe que uma quantidade considerável deste composto permaneça não fermentada durante o bioprocessamento (MALBASA et al., 2002a). De acordo com as investigações relatadas na Tabela 3.2, foram encontrados 34,06% de sacarose residual após 7 dias de processo com decaimento para 19,28% após 21 dias (JAYABALAN et al., 2014).

Neste contexto, Jayabalan et al. (2014) afirmam que a concentração inicial de sacarose de 7% é a ideal para a produção de baixos níveis de ácido acético (menos desejado) e altos níveis de ácido L-lático (fisiologicamente importante). Por outro lado, o açúcar mascavo e o melaço podem ser utilizados como substratos alternativos, sendo o mascavo caracterizado por cadeias carbônicas mais complexas e consequentemente mais difíceis de serem assimiladas, refletindo assim em maiores leituras de pH após a fermentação do chá de kombucha.

Quanto à composição química do substrato elaborado com a sacarose pura em comparação ao melaço, este último apresentou-se consideravelmente mais rico em minerais, compostos orgânicos e vitaminas úteis ao processo fermentativo (RODRIGUES et al., 2006). No melaço encontrou-se também amino nitrogênio e biotina, que afetam positivamente a intensidade de fermentação do chá de kombucha (JAYABALAN et al., 2014).

A Figura 3.3 revela investigações acerca do percentual de etanol em amostras de chá de kombucha em diferentes composições de meio e tempo de fermentação. Sua análise permite constatar que ambos os chás, preto e verde, combinados com os açúcares branco e mascavo apresentaram um teor de etanol crescente no decurso do processo (VOHRA et al., 2019).

Figura 3.3 - Percentual de etanol em amostras de chá de kombucha em relação à variação do meio e tempo de fermentação.



Fonte: Adaptada de Vohra et al. (2019).

Como previsto, o valor mínimo de etanol foi encontrado nos chás fermentados com ausência de fonte de carbono. As combinações dos chás com mel, por sua vez, apontaram um menor teor de etanol no 14º dia seguindo de um aumento nos dias 28 e 60 da fermentação. As combinações de açúcar branco com os chás preto e verde apontaram uma produção máxima de etanol no 60º dia, com valores de 2,37% e 2,75%, respectivamente. Assim, comprovou-se que o uso de açúcar branco como substrato do chá de Kombucha contribui para a síntese de altos teores de etanol em tempos prolongados de fermentação (VOHRA et al., 2019). Considerando que autores relatam níveis de etanol superiores ao limite legal de 0,5% ABV (*Alcohol By Volume*) em diferentes amostras de chá de kombucha, pode-se considerar que a bebida é de fato alcoólica (TALEBI et al., 2017; VOHRA et al., 2019).

Em síntese, na composição química do chá de kombucha constata-se a presença de diversos ácidos orgânicos como acético, glucônico, glucurônico, cítrico, L-lático, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico e usínico. Também estão presentes açúcares como sacarose, glicose e frutose. As vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e C estão presentes, assim como aminoácidos, aminas biogênicas, purinas, pigmentos, lipídios, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas, etanol, matéria antibiótica ativa, dióxido de carbono, fenol, alguns polifenóis do chá, minerais, ânions, ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL) e produtos insuficientemente conhecidos de leveduras e metabolitos bacterianos (KONOVALOV e SEMENOVA, 1955;

STEIGER e STEINEGGER, 1957; REISS, 1987; HAUSER, 1990; SIEVERS et al., 1995; BLANC, 1996; LIU et al., 1996; ROUSSIN, 1996; PETROVIC et al., 1999; BAUER-PETROVSKA e PETRUSHEVSKA-TOZI, 2000; CHEN e LIU, 2000; LONCAR et al., 2000; MALBASA et al., 2002a, 2008a, 2008b, 2011; CHU e CHEN, 2006; FRANCO et al., 2006; JAYABALAN et al., 2007, 2008; KUMAR et al., 2008; WANG et al., 2010; YANG et al., 2010; YAVARI et al., 2010, 2011; VELÍČANSKI et al., 2013; VITAS et al., 2013). Deste modo, em virtude do número substancial de moléculas funcionais encontradas no chá de kombucha, a bebida é bastante valorizada por sua bioquímica multifacetada (DUTTA e PAUL, 2019).

Segundo Dutta e Paul (2019), uma quantidade representativa dos metabólitos mapeados é originária das folhas do chá utilizadas como matéria-prima para o substrato. O chá contém diversos compostos como polifenóis, flavonóides (teaflavinas e thearubigins), catequinas, cafeína, galatos de catequina, adenina, teobromina, teofilina, ácidos gálicos, taninos e galotanino, os quais conferem complexidade e um alto potencial antioxidante à bebida. Observa-se, contudo, que o teor de compostos fenólicos presentes nos chás de *Camelia sinensis* podem variar de acordo com as condições de crescimento da planta, época de colheita, temperatura de processamento, local de armazenamento, assim como o tempo e quantidade de água utilizada na infusão das folhas (Firmino e Miranda, 2015; Reygaert, 2018).

Neste sentido, Jayabalan et al. (2014) ressaltam que o chá de kombucha apresenta maior atividade antioxidante do que o chá não fermentado devido principalmente à presença dos polifenóis, ácido ascórbico e D-sacárico-1,4-lactona (DSL). Além destes, a produção de componentes de baixo peso molecular e as modificações estruturais dos polifenóis por enzimas sintetizadas a partir de microrganismos, contribuem para uma maior eliminação de radicais livres associados a diversos benefícios à saúde.

### **3.1.4 Potencial nutricional e bioativo**

O consumo de chá de kombucha é tradicionalmente associado a inúmeros benefícios fisiológicos aos seres humanos, relativos às suas propriedades antibióticas, antioxidantes e aos efeitos antiolesterolêmicos da bebida. Por essa razão, investigações acerca das características inerentes ao chá têm sido continuamente conduzidas, a fim de validar os impactos de sua ingestão em apoio à saúde (DUTTA e PAUL, 2019).

Segundo Jayabalan et al. (2014), embora alegações oficiais dos órgãos mundiais de saúde pública ainda não possam ser apresentadas em virtude da carência de evidências científicas a respeito das atividades biológicas do kombucha em seres humanos, a bebida pode

ser reconhecida como parte importante de uma dieta saudável. Relatórios recentes atentam para uma melhoria significativa na saúde geral de grupos populacionais que consomem regularmente o chá de kombucha (SUZUKI et al., 2012). De acordo com Suzuki et al. (2012), esses estudos vinculam a prática de consumo da bebida aos metabólitos presentes e respectivas ações à saúde. A Tabela 3.3 é apresentada um levantamento de algumas pesquisas, enquanto outros mecanismos moleculares benéficos credíveis ainda precisam ser explorados e revelados.

Tabela 3.3 - Efeitos fisiológicos e de saúde dos constituintes do chá de Kombucha obtidos de diferentes fontes prontamente disponíveis

| continua                 |                                                                                                                 |                                                                                                                                                                  |                                                                                 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Metabólito               | Fonte                                                                                                           | Efeitos fisiológicos e de saúde                                                                                                                                  | Referências                                                                     |
| Ácido acético            | Vinagres diversos                                                                                               | Hipertensão, obesidade, hiperlipidemia e hipolipidemia                                                                                                           | Samad et al. (2016);<br>Chen et al. (2016)                                      |
| Ácido láctico            | Cultura probiótica de bactérias lácticas                                                                        | Saúde do cólon, saúde vaginal e uterina, saúde do cérebro, redução da toxicidade de mercúrio nos alimentos, entrega de macromoléculas bioativas, modulação imune | Tachedjian et al. (2017);<br>Genís et al. (2017);<br>Jadán-Piedra et al. (2017) |
| Ácido glucônico          | Gluconatos comerciais                                                                                           | Saúde do cólon e reparação de tecidos                                                                                                                            | Asono et al. (1994)                                                             |
| Ácido glucurônico        | Gluconolactona e lucouronolactona comerciais                                                                    | Precursor do ácido ascórbico em mamíferos, regulação inflamatória                                                                                                | Lewis et al. (2013)                                                             |
| Invertase                | Leveduras ( <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. utilis</i> , <i>A. niger</i> ) e $\beta$ -fructofuranosidase comercial | Fabricação de mel artificial, atividade antimicrobiana e antioxidante                                                                                            | Kulshrestha et al. (2013)                                                       |
| Ácido cítrico            | Frutas cítricas, fermentação com <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>                                        | Regula a enzima acetil-CoA carboxilase, melhora a densidade óssea                                                                                                | Kamzolova e Morgunov (2017)                                                     |
| Ácido tartárico          | Vinho                                                                                                           | Expectorante, antioxidante, melhora a função intestinal, tolerância à glicose                                                                                    | Jadán-Piedra et al. (2017)                                                      |
| Ácidos malônico e málico | Maçãs                                                                                                           | Regulador de acidez, reduz a dor muscular na fibromialgia                                                                                                        | Jadán-Piedra et al. (2017)                                                      |
| Ácido succínico          | Microrganismos ( <i>E.coli</i> , <i>A. succinogenes</i> , <i>A. succiniciproducens</i> )                        | Regulador de acidez, agente aromatizante                                                                                                                         | McKinlay et al. (2007) e<br>Liu et al. (2005)                                   |

conclusão

| Metabólito        | Fonte                                                               | Efeitos fisiológicos e de saúde                                              | Referências                                   |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Ácido pirúvico    | Sal de piruvato de cálcio adicionado em suplementos de saúde        | Perda de peso, melhora a função cardíaca                                     | Onakpoya et al. (2014) e Jaimes et al. (2016) |
| Ácido úsnico      | Líquen                                                              | Antimicrobiano                                                               | Guo et al. (2008)                             |
| Ácido ascórbico   | Vinho comercial                                                     | Antioxidante, conservante, cofator metabólico                                | Jaimes et al. (2016)                          |
| Aminas biogênicas | Vinho, frutos do mar, carne, queijo, linguiça fermentada e vegetais | Neurotransmissor                                                             | Sumbhate et al. (2012)                        |
| Purinas           | Produtos à base de carne (em especial órgãos)                       | Neuro-regeneração e neuro-proteção                                           | Lahiri et al. (2007)                          |
| Teaflavinas       | Chá preto                                                           | Antioxidante, atividade anti-HIV-1, reduz o colesterol no sangue, anticâncer | Liu et al. (2005) e Senanayake (2013)         |
| Catequinas        | Chá preto, chá verde, vinho, cacau e pomóideas                      | Regulação do fluxo sanguíneo, absorção intestinal, efeito antidiabético      | Matsui (2015)                                 |
| Ácido gálico      | Punicagranatum L., vinho                                            | Efeito antifibrótico, previne a doença de Parkinson, efeito antipatogênico   | Vaquero et al. (2007)                         |

Fonte: Adaptado de Dutta e Paul (2019).

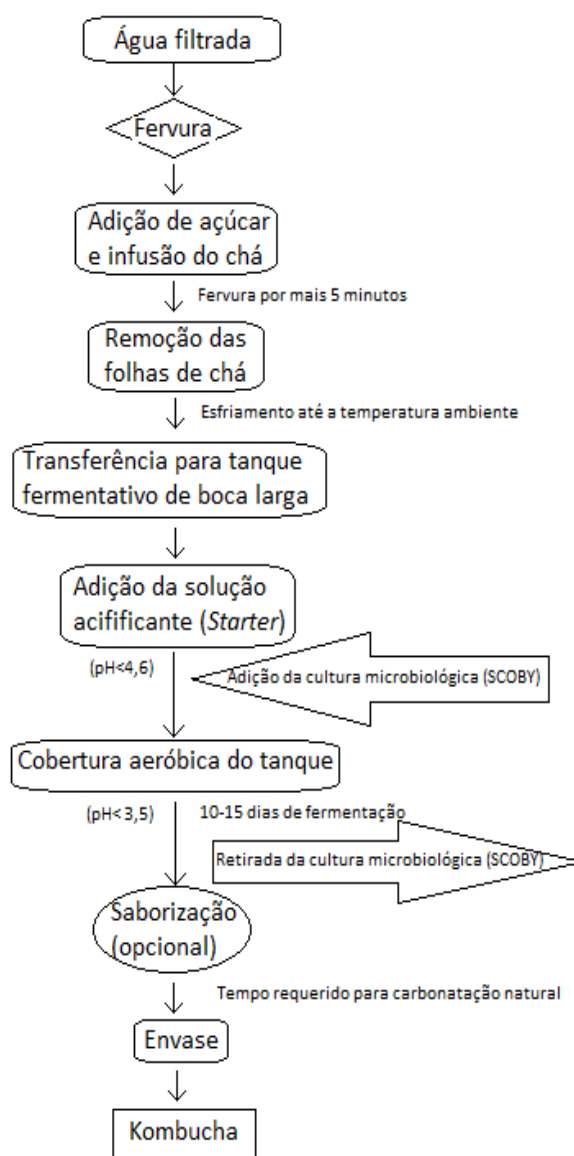
Entretanto, existem alertas para a ingestão do chá de kombucha por mulheres grávidas e lactantes, tendo sido relatados casos de intoxicação por chumbo e toxicidade gastrointestinal em dois indivíduos (JAYABALAN et al., 2014). Além disso, Sabouraud et al. (2009) relataram casos de intoxicação por chumbo em adultos identificados com anemia, a qual foi associada ao uso de um jarro de barro com vidro de chumbo para o armazenamento do kombucha. Também Gamundi e Valdivia (1995) e Srinivasan et al. (1997) contraindicaram o consumo da bebida por pacientes HIV positivos, apontando reações alérgicas, icterícia, náusea, vômito e dores de cabeça e pescoço como efeitos colaterais em quatro pacientes. Todavia, tais casos foram isolados e envolveram apenas um pequeno número de indivíduos em situações muito específicas. Ademais, não há evidências substanciais que confirmem a toxicidade de qualquer chá de kombucha ou a ocorrência de doenças por estudos anteriores (VIJAYARAGHAVAN et al., 2000).

### 3.2 PRODUÇÃO: TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO DO CHÁ DE KOMBUCHA

De acordo com Villarreal-Soto et al. (2018), a produção do chá de kombucha deve ser fundamentada em aspectos tecnológicos de fabricação que considerem a microbiota, os subprodutos e as propriedades físico-químicas da bebida. Para tanto, Marsh et al. (2014) destacam a influência de parâmetros como tempo, temperatura, pH, teores de oxigênio e gás carbônico dissolvidos, além da composição do meio, do modo de condução do processo e da taxa de cisalhamento no fermentador sobre os metabólitos da bebida e a cinética da fermentação. Neste contexto, a Figura 3.4 é apresentada com o objetivo de elucidar o processo fermentativo do kombucha.

O processo é iniciado com a adição de água filtrada e, se possível, deionizada e esterilizada, no recipiente em que as folhas do chá deverão ser infundidas. A utilização de água sem filtrar não é recomendada em decorrência da presença de minerais, sais e alcalinos que podem dificultar o crescimento do SCOBY (DUTTA e PAUL, 2019). Momentos após o início da fervura da água, a sacarose (50 g/L) deve ser diluída, seguida da adição das folhas de chá ou extratos de plantas (5 g/L) as quais devem permanecer em infusão por cerca de 10 a 15 minutos e posteriormente removidas (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Figura 3.4 - Fluxograma do processo fermentativo do chá de kombucha

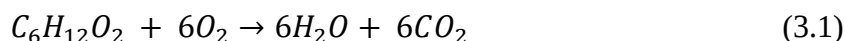


Fonte: Adaptado de Dutta e Paul (2019).

Estudos indicaram que o chá preto é a matéria-prima superior para a fermentação do chá de kombucha. Contudo, se o crescimento do SCOBY não for inibido pelos metabólitos formados e estes estiverem em paridade com os efeitos estimulantes da bebida, qualquer extrato de planta comestível pode ser utilizado (DUTTA e PAUL, 2019). Assim, Greenwalt et al. (1998) e Velíćanski et al. (2007) relataram uma diminuição do tempo de processo em fermentações do kombucha de chá verde e de erva-cidreira. De semelhante modo, Dutta e Paul (2019) afirmam que a sacarose é o carboidrato ideal para a produção necessária de etanol e ácido lático na bebida. Não obstante, o melaço (70 g/L) teria como atributo desejável à comercialização do kombucha, o sabor azedo reduzido, apesar do alto teor de ácidos orgânicos (aproximadamente 2,4 g/L) encontrado em amostras desse substrato.

O chá adoçado e filtrado, quando esfriado até a temperatura ambiente, deve então ser vertido no fermentador previamente esterilizado junto com cerca de 3% (p/v) do biofilme de kombucha e 10% (p/v) da cultura iniciadora "*starter*" (suficiente para resultar em pH inferior a 4,6 e controlar o crescimento de micróbios contaminantes indesejáveis). Em seguida, o recipiente é coberto por um pano esterilizado, e o chá é incubado durante 8 a 15 dias na ausência de luz direta e a temperatura de 18 a 28°C (VILLARREAL-SOTO et al., 2018; DUTTA e PAUL, 2019). Isso porque, de acordo com Dutta e Paul (2019), é necessário proporcionar à fermentação do chá de Kombucha condições aeróbias parciais suficientes para a entrada do oxigênio requerido e para a liberação do CO<sub>2</sub> formado. Para tanto, a cobertura escolhida deve ter encerramento adequado de seus fios propiciando a passagem de gases e ao mesmo tempo impedindo o acesso de insetos e microrganismos contaminantes da bebida.

O teor de oxigênio requerido pelo processo fermentativo é determinado a partir da estequiometria da respiração por oxidação de glicose, descrita de modo simplificado na Equação 3.1. Por meio desta, calcula-se serem necessárias 192 gramas de oxigênio para a oxidação completa de 180 gramas de glicose.



No entanto, devido à exigência de que ambos os componentes estejam dissolvidos em solução antes de estarem disponíveis aos microrganismos e sendo o oxigênio aproximadamente 6000 vezes menos solúvel em água do que a glicose, autores afirmam não ser possível fornecer à cultura microbiana do kombucha a quantidade de oxigênio suficiente para completar a oxidação da glicose ou qualquer outra fonte de carbono escolhida (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Por este motivo, o bioprocesso deve ser suprido com oxigênio (STANBURY et al., 2013).

Chu e Chen (2006) afirmam que normalmente o tempo de fermentação do chá de kombucha varia de 7 a 60 dias, sendo os melhores resultados registrados em média aos 15 dias. Os autores alertam que embora a atividade antioxidante da bebida aumente de acordo com o tempo de incubação, a fermentação prolongada do kombucha não é recomendada devido ao acúmulo de ácidos orgânicos que podem atingir níveis prejudiciais para o consumo direto. Além disso, pode haver acúmulo de gás carbônico na interface biofilme e caldo, resultando no bloqueio da transferência de nutrientes e consequentemente em um ambiente faminto.

Segundo Villarreal-Soto et al. (2018), durante todo o tempo fermentativo a faixa de temperatura ideal (18 a 28°C) deve ser mantida, pois resulta em melhor crescimento microbiano e atividade enzimática. Apesar disso, Loncar et al. (2006) apontam que as quantidades de

vitamina C, ácidos e metabólitos gerados foram maiores em amostras produzidas em temperaturas superiores.

Outro parâmetro que deve ser monitorado ao longo da fermentação do chá de kombucha é o pH em decorrência à associação aos ácidos (em sua maioria acético e glucônico) os quais podem ser responsabilizados pela atividade biológica da bebida. O pH também interfere no crescimento microbiano e nas mudanças estruturais dos compostos fitoquímicos, influenciadores da atividade antioxidante da bebida (HUR et al., 2014). Importa ressaltar ainda que o menor valor de pH aceito para o consumo direto do chá é 3,0 pois este não deve ser inferior ao do trato digestório (LONCAR et al., 2006). Além disso, de acordo com Hur et al. (2014), a fermentação deve ser interrompida quando a acidez total da bebida atingir o valor ideal de 4 a 5 g/L, com a intenção de garantir características organolépticas agradáveis.

Nesse sentido, a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2019), estabelece o padrão de identidade e qualidade do kombucha em todo território brasileiro. O referido documento estabelece, além da definição e composição da bebida, parâmetros analíticos (Tabela 3.4) que devem ser respeitados para seu registro e comercialização.

Tabela 3.4 – Parâmetros analíticos para registro e comercialização de kombucha no Brasil

| Parâmetros Analíticos                                          | Mínimo | Máximo |
|----------------------------------------------------------------|--------|--------|
| pH                                                             | 2,5    | 4,2    |
| Graduação alcoólica (% v/v) kombucha sem álcool                | -      | 0,5    |
| Graduação alcoólica (% v/v) kombucha com álcool                | 0,6    | 8,0    |
| Acidez volátil (mEq/L)                                         | 30     | 130    |
| Pressão (ATM a 20°C) na kombucha adicionada de CO <sub>2</sub> | 1,1    | 3,9    |

Fonte: Brasil (2019).

Assim sendo, um método de dois estágios de fermentação é descrito por vários fabricantes de kombucha. O primeiro relaciona-se à fermentação do chá e o segundo à saborização (opcional) e à carbonatação natural ou artificial da bebida. Desta maneira, decorrido o tempo fermentativo, alguns produtores avançam com a fermentação secundária, transferindo o SCOBY e parte do líquido fermentado para reservatórios de armazenamento, enquanto decantam e retiram do chá resultante os aglomerados de leveduras por filtração.

Industrialmente, isso acontece após a sinalização do término da fermentação (pH próximo a 3,0) quando o licor é transferido para um tanque de brite de aço inoxidável revestido

de glicol. O kombucha é então resfriado a temperaturas abaixo de zero a fim de precipitar os microrganismos presentes no líquido. Nesta fase, disponibiliza-se a opção de incorporar diferentes sabores à bebida por meio de técnicas de infusão de frutas e especiarias, ou ainda extratos nominados genericamente como saborizantes ou flavorizantes. A integração total dos sabores no licor leva cerca de 2 a 5 dias, dependendo da potência do composto aromatizante (DUTTA e PAUL, 2019).

Logo após a etapa de saborização, o chá de kombucha é novamente filtrado e, assim como a bebida de sabor original, segue para o envase, carbonatação e posterior armazenagem das garrafas a frio (2 a 4°C) e, se possível, em barris que garantam o frescor da bebida. Vale salientar ainda que, precedente ao envase, os frascos e tampas devem ser esterilizados para evitar a contaminação cruzada (DUTTA e PAUL, 2019). Neste contexto, a gaseificação natural do chá de kombucha é decorrida da atividade de leveduras remanescentes no licor as quais permanecem capazes de fermentar o material mesmo em anaerobiose. Tal fato supostamente aumenta o conteúdo de gás carbônico dissolvido na bebida (DUTTA e PAUL, 2019).

Todavia, grandes fabricantes como a *Happy Leaf Kombucha*, buscam melhorar a carbonatação de seu produto por meio do bombeamento de gás carbônico pressurizado em barris de kombucha já saborizada (DUTTA e PAUL, 2019). Nestes casos, a norma brasileira exige que a concentração de gás carbônico na garrafa seja superior a 1 ATM (BRASIL, 2019). Alternativamente, a fermentação da bebida pode ser evitada através da eliminação dos microrganismos ativos por pasteurização (82°C durante 15 segundos) ou ainda através da utilização de concentrações de 0,1% benzoato de sódio e sorbato de potássio que em adição à kombucha impedem o crescimento de fungos (DUTTA e PAUL, 2019). Nesta perspectiva, especifica-se que os chás comercializados pasteurizados devam apresentar valores de pH inferiores a 4,6 enquanto os não pasteurizados valores de no máximo 4,2. Em ambos os casos, o teor alcoólico da garrafa deve permanecer abaixo de 0,5% (v/v) para ser vendida como bebida não alcoólica, e entre 0,5 e 8% (v/v) como alcoólica (BRASIL, 2019).

A comercialização do chá de kombucha em larga escala é viabilizada por meio de instalações industriais que preservam o método e as condições de fermentação da escala doméstica. Contudo, enfatiza-se que cuidados devem ser intensificados para que se assegure a qualidade da bebida produzida em grandes volumes (DUTTA e PAUL, 2019). As indústrias em questão frequentemente realizam o processo de fermentação do kombucha em tanques de capacidade superior a 3500 L e com culturas microbiológicas que chegam a pesar 90 kg (DUTTA e PAUL, 2019). Logo, além da escala em volume, parâmetros como a geometria dos

vasos e o tipo de agitação devem ser considerados como parâmetros influentes no bioprocesso (JUNKER, 2004).

No caso específico do processo descontínuo de fabricação do chá de Kombucha, a ausência de agitação pode ocasionar uma desintegração microbiana do SCOBY pela ascensão de bactérias acéticas (aeróbicas) à camada superficial da dorna e precipitação de leveduras, resultando em prejuízos à fermentação (LONCAR et al., 2006). Isto porque, em culturas estáticas, os substratos devem ser inteiramente transportados por difusão, o que limita a disponibilidade de oxigênio ao metabolismo das células e consequentemente à produção de celulose (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). No entanto, de acordo com Chawla et al. (2009), o processamento da agitação durante a fermentação do kombucha pode afetar a estrutura do biofilme em decorrência da perda de resistência mecânica no processo. Deste modo, pontua-se que as informações disponíveis na literatura para a definição de critérios de desenvolvimento do fermentador, como superfície/volume ou superfície/altura, são limitadas (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

De acordo com Cvetković et al. (2008), o fator cinético que expressa a relação entre o oxigênio dissolvido e a superfície/volume do meio é a área interfacial específica. Este, está diretamente relacionado a fatores como a seção transversal do reator e o coeficiente de transferência de massa, o que implica na dependência entre a taxa fermentativa e a área interfacial específica em processos de fermentação do kombucha sem agitação e sem a introdução de gás. Assim, modelos matemáticos foram desenvolvidos a fim de dimensionar a fermentação do chá de kombucha a partir de várias áreas interfaciais específicas. Através destes padronizou-se valores de área interfacial de 0,0231 a 0,0642  $\text{cm}^{-1}$  que, se constantes, podem garantir propriedades semelhantes à bebida independentemente do volume do tanque (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Investigações realizadas por Goh et al. (2012a) apontaram a relação entre o rendimento do processo, as propriedades do biofilme do kombucha e a área superficial constatando um aumento na produção da película com uma intensificação da área superficial e diminuição da profundidade do tanque. Isto porque, o processo fermentativo é completamente aeróbico e gerador de dióxido de carbono, o qual pode ficar preso na película e ser acumulado em meios mais profundos. Entretanto, Caicedo, Franca e Lopez (2001) observaram que é necessário reservar uma altura mínima do fermentador para o desenvolvimento das camadas de celulose ao longo da fermentação.

Por fim, Malbasa et al. (2006) ampliou a fermentação do chá preto em diferentes tamanhos de vasos e relacionou as variáveis do processo e alteração de pH com a forma

geométrica dos tanques. Deste modo, foi observado que fermentadores de alto volume e com geometrias semelhantes seguem uma correlação entre o tamanho do vaso e a duração do processo em função da mudança de pH. Esta variável pode ser utilizada para estimar o aumento de escala, o que reduz significativamente os custos de entrada de fungos, eletricidade, máquinas e despesas como aluguel (MALBASA et al., 2006; MOHAMMADSHIRAZI e KALHOR, 2016).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

Para a realização da pesquisa foram necessários os seguintes materiais: Insumos primários como chá verde (Yamamotoyama®), açúcar cristal (Alegre®) e água filtrada; cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY; White Labs®); solução acidificante proveniente da fermentação prolongada do chá (*starter*); polpas comerciais de cajá e caju (Pé de Fruta®); aromas naturais de cajá e caju (BrauFlavors®); panela cervejeira; pá cervejeira; bolsas de infusão de tecido tipo voal; pipeta volumétrica graduada de 20 mL; 2 fermentadores de 22 L; 16 fermentadores de 1,2 L; 4 fermentadores de 10 L; 60 garrafas de vidro âmbar de 275 mL com tampas; 6 garrafas PET de 250 mL com tampas; 6 manômetros para garrafas; 150 tubos Falcon de 50 mL.

### 4.2 PRODUÇÃO DO KOMBUCHA

A presente pesquisa foi realizada em parceria com a Bauá Indústria e Comércio de Bebidas e Alimentos LTDA®, que forneceu o inóculo (SCOBY e solução acidificante) e os insumos primários (chá verde e açúcar cristal) necessários à sua realização. Estabeleceu-se como base a receita utilizada pela empresa para a produção de kombucha tradicional, dita não alcoólica. Devido ao sigilo industrial, a receita padrão em questão é apresentada de forma generalizada na Tabela 4.1. Em suma, a metodologia de preparo do chá consistiu, na infusão (por meio de *bags* ou bolsas de infusão) de folhas de chá verde em água filtrada aquecida até cerca de 85 °C por cerca de 10 minutos, seguida da solubilização completa da fonte de carbono.

Tabela 4.1 - Receita padrão generalizada do mosto de primeira fermentação da Bauá Kombucha®

| Insumos        | Concentrações  |
|----------------|----------------|
| Chá verde      | 0,5-0,7%       |
| Açúcar cristal | C <sub>1</sub> |
| <i>Starter</i> | 10-15%         |
| SCOBY          | 3%             |

O inóculo disponibilizado, por sua vez, foi adquirido em um laboratório especializado e sua viabilidade de composição majoritária segue descrita na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Viabilidade da composição majoritária do SCOBY

| BACTÉRIAS                                               | Viabilidade majoritária |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i>                           | 99%                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                                  | 99%                     |
| <i>Bacillus pumilus/aerophilus/safensis/altitudinis</i> | 99%                     |
| <i>Acetobacter tropicalis</i>                           | 99%                     |
| <i>Bacillus aerophilus</i>                              | 96%                     |
| <i>Bacillus aryabhattai</i>                             | 98%                     |
| <i>Gluconacetobacter saccharivorans</i>                 | 99%                     |
| <i>Micrococcus sp.</i>                                  | 98%                     |
| <i>Gluconacetobacter rhaeticus</i>                      | 98%                     |
| <i>Paenibacillus taichungensis</i>                      | 97%                     |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                | 99%                     |
| LEVEDURAS                                               | Viabilidade majoritária |
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i>                       | 99%                     |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                         | 92%                     |
| <i>Zygosaccharomyces sp.</i>                            | 97%                     |
| <i>Candida sp.</i>                                      | 97%                     |

Fonte: White Labs (2020).

A obtenção do kombucha com os parâmetros mais adequados apontados pela literatura ocorreu por meio de ensaios que consistiram na avaliação da influência da concentração de sacarose sobre a cinética da primeira fermentação do chá de kombucha, utilizando a concentração de açúcar padrão Bauá® (C<sub>1</sub>) e o dobro desta, C<sub>2</sub>. Duplicatas de 2L foram preparadas para cada uma das referidas concentrações. Logo, ao longo de 312 horas de fermentação, amostras de 30 mL foram retiradas e congeladas a cada 24 horas para posterior avaliação de parâmetros como pH, temperatura, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável total (ATT), cor e relação SST/ATT (*Ratio*).

A partir do melhor resultado obtido, avançou-se com os ensaios para avaliação da segunda fermentação do chá, referente à saborização e gaseificação natural da bebida. A Bauá Kombucha® comercializa a bebida na versão não alcoólica de sabor cajá e caju há cerca de um ano e busca aperfeiçoar características como sabor, odor, gaseificação e turbidez, além de atribuir maior estabilidade e tempo de prateleira aos produtos. Com isso, este estudo buscou avaliar a aplicabilidade de aromas naturais para a saborização do kombucha como substituto das polpas naturais, atualmente utilizadas na produção em escala da marca.

De início, as polpas comerciais e aromas naturais de cajá e de caju foram centrifugadas e caracterizadas quanto às suas composições e características físico-químicas. Também foram estabelecidas, para testes iniciais de bancada, duas concentrações de polpas [P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>] e duas concentrações de aromas [A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>] de cajá e de caju, baseadas, respectivamente, nas atuais receitas industriais da Bauá® e na dosagem indicada pelo fabricante.

Para a determinação das melhores concentrações dos referidos insumos flavorizantes foram esboçados os esquemas de teste apresentados nas Tabela 4.3 e 4.4. Estes consistiram na fermentação prévia de 20 L de um novo chá de kombucha no qual, após 312 horas, infusionou-se em duplicatas de 1,2 L e a temperatura ambiente (28°C±1), as concentrações de aroma natural e de polpa comercial (fruta processada sem conservantes) com o auxílio de uma pipeta volumétrica graduada e *bags* de voal (bolsas de infusão), nesta ordem. Assim, ao longo de 72h, referentes à etapa de saborização do chá, amostras de 30 mL foram retiradas e congeladas a cada 12 horas para posterior centrifugação e avaliação de parâmetros como pH, SST, ATT, cor e *Ratio*.

Vale ressaltar que para ambos os sabores e tipos de insumos optou-se pelo sigilo das concentrações utilizadas no estudo devido a possibilidade de geração de patentes industriais. Contudo, declarou-se [P<sub>2</sub>] o dobro de [P<sub>1</sub>], sendo respeitada a diluição máxima de até 10% (v/v)

na infusão das polpas. No caso da adição de aromas naturais, a diluição máxima foi de até 0,1% (v/v), sendo  $[A_2]$  o dobro de  $[A_1]$ .

Tabela 4.3 - Esquema de testes iniciais de bancada para determinação das melhores concentrações de polpa e aroma natural de cajá para a saborização do kombucha

|      | Concentração de Insumo          | Volume (L) Replicata 1 | Volume(L) Replicata 2 |
|------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| CAJÁ | [P <sub>1</sub> ] Polpa         | 1,2                    | 1,2                   |
|      | [P <sub>2</sub> ] Polpa         | 1,2                    | 1,2                   |
|      | [A <sub>1</sub> ] Aroma natural | 1,2                    | 1,2                   |
|      | [A <sub>2</sub> ] Aroma natural | 1,2                    | 1,2                   |
|      | TOTAL                           | 4,8                    | 4,8                   |

Tabela 4.4 - Esquema de testes iniciais de bancada para determinação das melhores concentrações de polpa e aroma natural de caju para a saborização do kombucha

|      | Concentração de Insumo          | Volume (L)Replicata 1 | Volume(L) Replicata 2 |
|------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| CAJU | [P <sub>1</sub> ] Polpa         | 1,2                   | 1,2                   |
|      | [P <sub>2</sub> ] Polpa         | 1,2                   | 1,2                   |
|      | [A <sub>1</sub> ] Aroma natural | 1,2                   | 1,2                   |
|      | [A <sub>2</sub> ] Aroma natural | 1,2                   | 1,2                   |
|      | TOTAL                           | 4,8                   | 4,8                   |

A partir dos resultados obtidos em escala de bancada, prosseguiu-se com a avaliação cinética da segunda etapa de fermentação do kombucha. Para tanto, uma nova batelada de testes foi iniciada, partindo da fermentação de 22 L de mosto nas mesmas condições descritas e por 312 horas. Após esse período e retirada do SCOBY, o chá foi transferido para 4 recipientes de

volumes distintos, nos quais foram adicionados os flavorizantes de cajá e de caju nas melhores concentrações previamente determinadas e conforme o esquema descrito nas Tabelas 4.5 e 4.6. A saborização da bebida foi então acompanhada no decorrer de 72 horas.

Tabela 4.5 - Esquema de testes para avaliação cinética da segunda etapa de fermentação do kombucha sabor cajá

|      | Concentração de Insumo              | Volume(L) |
|------|-------------------------------------|-----------|
| CAJÁ | [melhor concentração] Polpa         | 4         |
|      | [melhor concentração] Aroma natural | 6,5       |
|      | TOTAL                               | 10,5      |

Tabela 4.6 - Esquema de testes para avaliação cinética da segunda etapa de fermentação do kombucha sabor caju

|      | Concentração de Insumo              | Volume (L) |
|------|-------------------------------------|------------|
| CAJU | [melhor concentração] Polpa         | 4          |
|      | [melhor concentração] Aroma natural | 6,5        |
|      | TOTAL                               | 10,5       |

Em seguida, o volume teste foi envasado em garrafas de vidro âmbar de 275 mL e, conforme os esquemas apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8, para avaliação da maturação e gaseificação natural do kombucha. Ao todo foram 33 garrafas para cada um dos sabores, sendo 3 delas do tipo PET (250 mL) e 3 delas destinadas à verificação da pressão interna por intermédio de manômetros acoplados a garrafas modelo. Também, somente para os testes com aromas naturais, foram envasados o kombucha sabor cajá e caju com adição de *priming* (3 g/L). Desta forma, buscou-se avaliar a suplementação de sacarose destinado à gaseificação na garrafa.

Tabela 4.7 - Esquema de envase do volume teste para avaliação da maturação e gaseificação natural do kombucha sabor cajá

|       | Polpa                            | Aroma natural                                          |
|-------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|
| CAJÁ  | 9 garrafas de vidro              | 9 garrafas de vidro                                    |
|       | 1 garrafa de vidro com manômetro | 1 garrafa de vidro com manômetro                       |
|       | 1 garrafa PET                    | 1 garrafa PET                                          |
|       | -                                | 9 garrafas de vidro (com <i>priming</i> )              |
|       | -                                | 1 garrafa de vidro com manômetro (com <i>priming</i> ) |
|       | -                                | 1 garrafa PET (com <i>priming</i> )                    |
| TOTAL | 11 Garrafas                      | 22 Garrafas                                            |

Tabela 4.8 - Esquema de envase do volume teste para avaliação da maturação e gaseificação natural do kombucha sabor caju

|       | Polpa                            | Aroma natural                                          |
|-------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|
| CAJU  | 9 garrafas de vidro              | 9 garrafas de vidro                                    |
|       | 1 garrafa de vidro com manômetro | 1 garrafa de vidro com manômetro                       |
|       | 1 garrafa PET                    | 1 garrafa PET                                          |
|       | -                                | 9 garrafas de vidro (com <i>priming</i> )              |
|       | -                                | 1 garrafa de vidro com manômetro (com <i>priming</i> ) |
|       | -                                | 1 garrafa PET (com <i>priming</i> )                    |
| TOTAL | 11 Garrafas                      | 22 Garrafas                                            |

Todas as garrafas foram mantidas à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) e ao abrigo do sol durante 15 dias (360 horas) para gaseificação natural da bebida. Durante esse período e a cada 5 dias (120 horas), triplicatas de 275 mL foram abertas para avaliação imediata da espumabilidade por intermédio de 3 provetas de 50 mL, cronômetro e ferramentas de filmagem.

Também foram coletadas, em tubos de centrífuga tipo falcon de 50 mL, amostras de 30 mL de cada triplicata. Estas, após descongelamento e centrifugação para redução de possíveis interferentes, serviram para avaliação de parâmetros químicos e físico-químicos como pH, temperatura, SST, ATT, cor e densidade. A produção de  $\text{CO}_2$ , por sua vez, foi verificada visualmente nas garrafas PET e quantitativamente através da leitura dos manômetros acoplados nas garrafas modelo.

Por fim, as amostras obtidas nas melhores condições do processo foram avaliadas quanto a resíduo seco, cinzas e composição nutricional (proteínas solúveis e carboidratos totais). A influência de uma possível substituição de polpas comerciais por aromas naturais na segunda fermentação do kombucha também foi verificada a partir de análise cromatográfica de fenólicos individuais e quanto à atividade antioxidante.

#### 4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

As amostras coletadas durante a segunda fermentação do chá de kombucha (referente à etapa de saborização e gaseificação natural da bebida) foram descongeladas e centrifugadas a 4000 rpm, por 5 minutos em centrífuga refrigerada de Falcon de 50 mL (Novatecnica®). Posteriormente, análises foram realizadas conforme metodologias descritas a seguir.

##### 4.3.1 pH

O pH das suspensões foi determinado através de um medidor digital de pH/EC e temperatura, modelo EC-3587 (Boyn Industrial CO., LTDA®), segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

##### 4.3.2 Temperatura

A temperatura das amostras foi determinada paralelamente ao pH por meio do mesmo instrumento de medição descrito acima.

##### 4.3.3 Sólidos Solúveis Totais

Esta leitura foi feita em refratômetro portátil, modelo RT-30ATC (0-32% Brix; Instrutherm®), segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Assim, os resultados foram

expressos em grau Brix (°Bx), correspondente a 1g de sólidos solúveis totais em suspensão por 100 g de solução.

#### 4.3.4 Açúcares Redutores Totais

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método de DNS, segundo Miller (1959). Este baseia-se na inversão prévia da sacarose, seguida da reação de oxidação dos açúcares redutores (monossacarídeos) pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), o qual passa da cor amarela à avermelhada quando reduzido ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Assim, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro U2M (Quimis®) com comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.3.5 Acidez Total Titulável

A acidez total das amostras foi determinada com base na neutralização dos ácidos por titulação com solução de hidróxido de sódio padronizado (0,1 M) e indicador de fenolftaleína (1%) até o ponto de equivalência. A Equação 4.1 expressa o referido parâmetro em g de ácido acético por 100 mL de amostra (MERTENS, 2005), onde: V = Volume (mL) de hidróxido de sódio gasto na titulação; M = Concentração real da solução de hidróxido de sódio; MM = Massa molecular do ácido acético (60 g/mol); Va = Volume tomado da amostra em mL.

$$Acidez\ Total = \frac{V \times M \times MM}{10 \times V_a} \quad (4.1)$$

#### 4.3.6 Ratio

O parâmetro de *Ratio* representa o equilíbrio entre os sabores ácido e doce, sendo o seu valor calculado conforme a Equação 4.2 para cada amostra. Variações de sólidos solúveis totais (SST) e acidez são aceitáveis enquanto o valor de *Ratio* se mantiver constante pois, desta forma, as alterações não são perceptíveis sensorialmente (RODRIGUES et al., 2018).

$$Ratio = \frac{SST\ (^{\circ}Brix)}{Acidez\ Total\ (\frac{g\ \acute{a}c.\ Ac\acute{e}tico}{100\ mL})} \quad (4.2)$$

#### 4.3.7 Cor

As amostras foram avaliadas quanto à cor através da leitura de absorbância a 430 nm, em espectrofotômetro U2M (Quimis®), segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). A

Figura 4.1 é apresentada a fim de auxiliar a interpretação da análise, sendo a cor da solução determinada pela cor da luz transmitida (complementar).

Figura 4.1 - Relação entre comprimento de onda e as características de cor.

| Comprimento de onda |                                                                                    | Cor absorvida   |                                                                                      | Cor complementar |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| abaixo de 380 nm    |                                                                                    | ultravioleta    |                                                                                      |                  |
| 380 a 435 nm        |   | violeta         |   | verde-amarelado  |
| 435 a 480 nm        |   | azul            |   | amarelo          |
| 480 a 490 nm        |   | azul-esverdeado |   | laranja          |
| 490 a 500 nm        |   | verde-azulado   |   | vermelho         |
| 500 a 560 nm        |   | verde           |   | púrpura          |
| 560 a 580 nm        |   | verde-amarelado |   | violeta          |
| 580 a 595 nm        |   | amarelo         |   | azul             |
| 595 a 650 nm        |   | laranja         |   | azul-esverdeado  |
| 650 a 780 nm        |  | vermelho        |  | verde-azulado    |
| acima de 780 nm     |                                                                                    | infravermelho   |                                                                                      |                  |

Fonte: Dias et al. (2016).

#### 4.3.8 Espumabilidade

A espumabilidade das amostras foi avaliada quanto à persistência e volume (altura). Para tanto, cada uma das garrafas, em triplicata, foi aberta à temperatura ambiente e cerca de 30 mL da bebida foi vertida imediatamente em provetas posicionadas em fundo branco para facilitar a visualização. Nesse momento, o cronômetro e a câmera para filmagem da análise foram acionados, enquanto a altura (cm) e o tempo (s) de duração da espuma foram anotadas.

#### 4.3.9 Densidade Relativa

A determinação da densidade relativa foi realizada conforme metodologia proposta por Adolfo Lutz (1985) e por meio da equação 4.3, onde: A = massa do conjunto picnômetro e amostra menos a tara picnômetro; B = massa do conjunto picnômetro e água menos a tara picnômetro.

$$\text{Densidade relativa (20/20 °C)} = \frac{A}{B} \quad (4.3)$$

#### 4.3.10 Resíduo seco

A umidade corresponde à perda em peso sofrida pela amostra quando aquecida em condições nas quais a água e substâncias voláteis são removidas. Por sua vez, o resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco, importante para produtos líquidos ou de alto teor de umidade. A determinação deste parâmetro foi realizada conforme metodologia proposta no Adolfo Lutz (1985) e por meio da equação 4.4, onde: N = n° de g de resíduo seco; A = n° de mL da amostra (ou n° de gramas).

$$\text{Resíduo seco por amostra} = \frac{100 \times N}{A} \quad (4.4)$$

#### 4.3.11 Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada conforme metodologia proposta por Adolfo Lutz (1985) e por meio da equação 4.5, onde: N = n° de g de cinzas; A = n° de g da amostra.

$$\text{Cinzas por amostra} = \frac{100 \times N}{P} \quad (4.5)$$

#### 4.3.12 Proteínas Solúveis

A determinação de proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na adição de etanol, ácido fosfórico e um corante chamado Azul Brilhante de Coomassie G-250 à solução contendo proteínas. O deslocamento de equilíbrio do corante para a forma catiônica (azul), é bastante absorvido a 595 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi feita a partir da albumina, proteína encontrada na clara de ovo.

#### 4.3.13 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram quantificados em espectrofotômetro a 620 nm, usando o reagente Anthrone (YEMM e WILLIS, 1954).

#### 4.3.14 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante das amostras foi avaliada pelos métodos de eliminação de radicais livres ABTS•+ (SAIMAITI et al., 2022) e DPPH• (SILVA JÚNIOR et al., 2021), bem como pelo ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP).

A atividade de eliminação de DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi medida por espectrofotômetro a 517 nm. A análise foi realizada misturando-se uma amostra diluída de 30 µL com 3,0 mL de solução etanólica radical DPPH• (60 µM) e, em seguida, incubando no escuro por 30 min. Trolox foi utilizado como padrão para a construção de uma curva analítica e os resultados foram expressos como Trolox equivalente por mililitro (µmol TE·mL<sup>-1</sup>).

A solução estoque de ABTS•+ foi preparada misturando 5 mL de solução de ABTS•+ (7 mM) e 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM). Em seguida, a mistura foi armazenada no escuro por 16 horas antes do uso. A solução estoque ABTS•+ foi diluída com etanol perfazendo sua absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm e configurada como solução de reação ABTS•+. A amostra diluída de 30 µL foi adicionada a 3,0 mL de solução de reação ABTS•+ e, em seguida, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 6 min no escuro. Finalmente, a absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 734 nm. As curvas padrão foram feitas usando soluções com diferentes concentrações de Trolox. Os valores da Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox (TEAC) foram apresentados como µmol Trolox/mL.

O método FRAP foi realizado conforme Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado misturando 250 mL de solução tampão de acetato (300 mM; pH 3,6), 25 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 25 mL de solução aquosa de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (20 mM). Após, 90 µL da amostra diluída e 270 µL de água destilada foram adicionados a 2,7 mL do reagente FRAP e então incubados a 37 °C por 30 min. A absorbância foi medida a 595 nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva Trolox padrão (100 – 800 µmol·L<sup>-1</sup>) e expressos em mmol TE por mililitro de amostra.

#### 4.3.15 Fenólicos

A análise dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se um sistema Sykam HPLC-DAD (Sykam®, Alemanha) com um sistema de Bomba Quaternária S 1125, Injetor de Amostra S 5250, Detector UV/Vis S 3245 e um forno de coluna S 4120, conforme metodologia proposta por Silveira e Meinhart (2017) com modificações. A coluna foi uma ReproSil 100 C18 (150 x 4,6 mm ID, tamanho de partícula de 5 µm; Dr. Maisch®, Tuebingen, Alemanha), eluída a 0,8 mL·min<sup>-1</sup> com solvente A (solução de ácido fosfórico 0,1 M com pH = 2,0) e solvente B (metanol acidificado com ácido fosfórico a 0,5%), de acordo com o seguinte programa: solvente B a 5% por 5 min, depois um gradiente linear de 5% a 23% B por 9 min, seguido por um gradiente linear de 23% a 50% B por 16 min e 80% B por 10 min. A temperatura da coluna do forno foi fixada em 35°C. Compostos fenólicos foram detectados a 220 nm para

(+) catequina, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido fumárico; 280 nm para os ácidos gálico, transcinâmico e siringico; 320 nm para os ácidos ferúlico, cafeico, clorogênico e p-cumárico; 360 nm para quercetina, rutina, ácido elágico e D-vanilina. A coleta e o processamento dos dados foram realizados no *software* ClarityChromatography v8.2 (DataApex LTDA®, Praga, República Tcheca).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

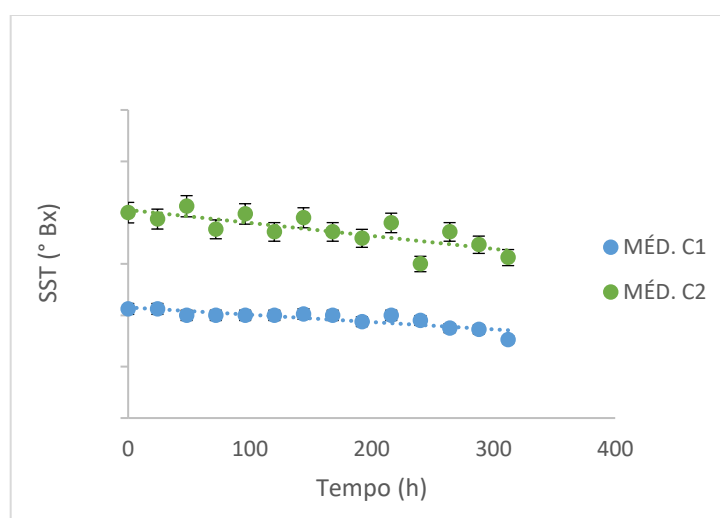
A análise estatística dos resultados apresentados na presente pesquisa correspondeu a média  $\pm$  desvio padrão (Dp) de três repetições, comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para identificar diferenças entre as amostras por meio do programa Sisvar (FERREIRA, 2019). As médias foram significativas em nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A execução da presente pesquisa se deu por meio de três etapas fundamentais: ensaios preliminares, ensaios iniciais de bancada e ensaios de avaliação cinética da segunda fermentação. Os ensaios preliminares foram realizados com o objetivo de avaliar a influência da concentração de açúcar cristal sobre a cinética da primeira fermentação do chá de kombucha. Para tanto, a concentração padrão de sacarose utilizada pela Bauá® ( $C_1$ ) foi comparada com a concentração  $C_2$ , em termos de sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e *Ratio*.

Nesse sentido, a Figura 5.1 expõe a tendência dos resultados obtidos a partir da análise de SST de ambas as concentrações de açúcar, em duplicata. Por questão de sigilo, os valores da ordenada do gráfico foram ocultados sendo, contudo, possível observar o decaimento das curvas  $C_1$  e  $C_2$  ao fim de 312 horas.

Figura 5.1 - Análise média de sólidos solúveis totais em ensaios preliminares de concentração  $C_1$  e  $C_2$



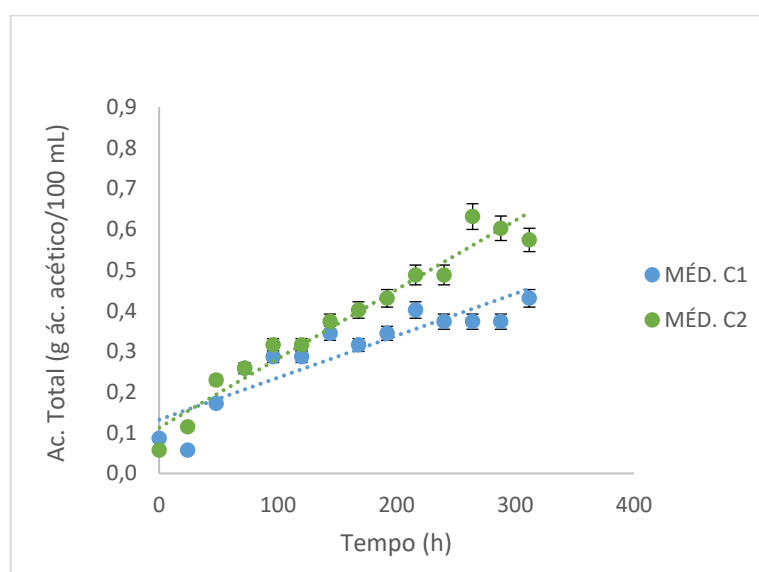
Os SST presentes no chá de kombucha são, em sua maioria, caracterizados pela sacarose solubilizada no início do processo. Assim, a redução deste parâmetro ao longo do tempo, indica que os microrganismos adicionados consumiram o açúcar ao longo da fermentação. Ao término dessa etapa, é possível observar valores residuais de sacarose para ambas as concentrações testadas. No entanto nota-se, um maior valor residual para concentração  $C_2$  quando comparada à  $C_1$ , indicando que essa possivelmente estava em excesso.

O carboidrato é o substrato para a cultura simbiótica de bactérias e leveduras na fermentação do chá de kombucha. As leveduras convertem a fonte de açúcar em etanol e dióxido de carbono, enquanto as bactérias acéticas metabolizam o etanol gerado, sintetizando

ácidos orgânicos e uma nova camada de celulose para o SCOBY (JAYABALAN et al., 2010). Importa, portanto, o uso de uma proporção adequada de sacarose uma vez que, se em excesso, a bebida pode ficar excessivamente ácida e alcoólica. Além disso, o tipo de açúcar utilizado pode resultar em alterações tanto na composição química quanto nas características sensoriais (VOHRA et al., 2019).

A evolução média das curvas de acidez total titulável é evidenciada na Figura 5.2. Neste caso, a fermentação do mosto de concentração  $C_2$  culminou em aumento de 32,56% na quantidade de ácido acético por 100 mL de amostra, quando comparada à concentração  $C_1$ . O aumento da acidez total titulável se deve ao consumo dos açúcares presentes no meio e o aumento da concentração de ácidos orgânicos, característico do metabolismo das bactérias acéticas.

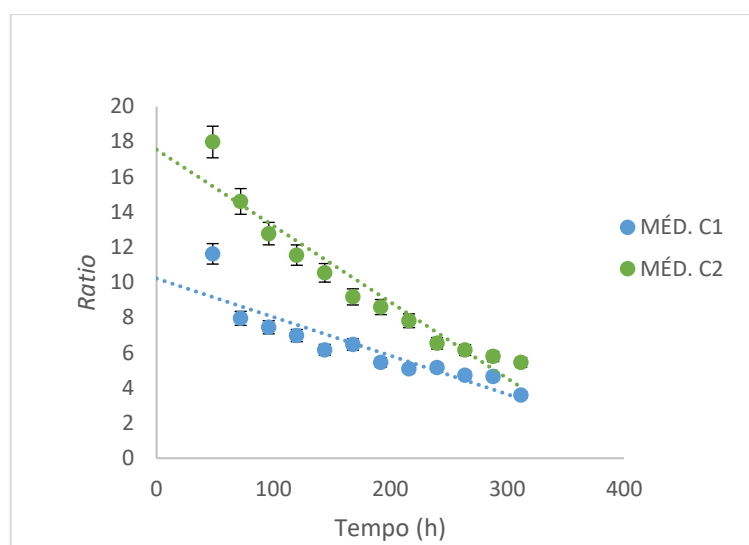
Figura 5.2 - Análise média de acidez total titulável em ensaios preliminares de concentração  $C_1$  e  $C_2$



O processo metabólico da produção do chá de kombucha ocorre de forma complementar entre leveduras e bactérias, ocorrendo duas fermentações até a obtenção do produto. Inicialmente, através da enzima invertase, as leveduras hidrolisam a sacarose adicionada ao chá em frutose e glicose, resultando em etanol e dióxido de carbono, processo denominado fermentação alcoólica. Posteriormente, as bactérias presentes realizam a fermentação acética da mistura, processo caracterizado pela transformação do álcool em ácido acético, conferindo o sabor característico de vinagre ao produto. Na fermentação do chá de kombucha as bactérias acéticas realizam a conversão da glicose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético (JAYABALAN et al., 2014; DADA et al., 2021).

A Figura 5.3 expõe a variação média de *Ratio* de  $C_1$  e  $C_2$  condizente com a transformação sensorial relativa à doçura e à acidez, perceptíveis ao longo da elaboração da bebida. As equações de ambas as curvas de concentração são mostradas a fim de constatar o decaimento mais acentuado da reta  $C_2$ , ratificado pelo coeficiente angular exposto (Tabela 5.1). As referidas equações foram geradas por regressão linear simples no programa Excel, utilizado para tratamento de dados e plotagem de gráficos.

Figura 5.3 - Análise média de *Ratio* em ensaios preliminares de concentração  $C_1$  e  $C_2$



É plausível que a curva de *Ratio* apresente a tendência a decair, uma vez que a sacarose é consumida e os ácidos orgânicos são gerados durante a produção do kombucha. A composição final da bebida é determinada por diversos fatores, sendo determinantes a concentração de chá e o tempo de fermentação (JAYABALAN et al., 2008; JAYABALAN et al., 2014). Dada et al. (2021) realizaram a caracterização do kombucha de chá verde e obtiveram valores de *Ratio* de  $1,83 \pm 0,03$ , valor bem abaixo dos valores encontrados no presente trabalho, o que indica uma doçura menos pronunciada na bebida. Conclui-se que a concentração padrão de sacarose utilizado pela Bauá® ( $C_1$ ) resultou em uma bebida com menores quantidades de ácido acético e açúcar residual, quando comparada à concentração  $C_2$ . O teste com a concentração  $C_1$  portanto, foi definido como o melhor resultado.

Tabela 5.1 - Equações das retas  $C_1$  e  $C_2$  referentes à análise média de *Ratio* em ensaios preliminares

| Concentrações | Equação da reta                            |
|---------------|--------------------------------------------|
| $C_1$         | $Y = - 0,0219x + 10,219$<br>$R^2 = 0,8092$ |
| $C_2$         | $Y = - 0,0433x + 17,543$<br>$R^2 = 0,9247$ |

A partir disso, prosseguiu-se com os ensaios iniciais de bancada da segunda fermentação do kombucha para determinação das melhores concentrações de flavorizantes nos sabores cajá e caju. Para tanto, as amostras de polpas e aromas naturais foram previamente caracterizadas, obtendo os seguintes valores médios dos parâmetros analisados (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Caracterização físico-química dos flavorizantes nos sabores cajá e caju

| CAJÁ                                    |                  |                  | CAJU             |                  |
|-----------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Parâmetros                              | Polpa            | Aroma Natural    | Polpa            | Aroma Natural    |
| pH                                      | $2,13 \pm 0,02$  | $3,33 \pm 0,02$  | $3,92 \pm 0,03$  | $4,14 \pm 0,02$  |
| SST (° Brix)                            | $10 \pm 1,00$    | 0                | $8,5 \pm 1,00$   | 0                |
| Cor (SRM)                               | $0,899 \pm 0,01$ | $0,015 \pm 0,00$ | $0,236 \pm 0,01$ | $0,077 \pm 0,00$ |
| ART (g/L)                               | $8,56 \pm 0,05$  | -                | $28,02 \pm 0,03$ | -                |
| Acidez Total<br>(g ác. acético/ 100 mL) | $1,38 \pm 0,02$  | $0,78 \pm 0,05$  | $0,24 \pm 0,04$  | $0,18 \pm 0,03$  |
| Cinzas (%)                              | $0,095 \pm 0,03$ | -                | $0,33 \pm 0,01$  | -                |
| Resíduo seco (%)                        | $7,7 \pm 0,01$   | $0,1 \pm 0,01$   | $8,6 \pm 0,02$   | $0,1 \pm 0,02$   |

Os sólidos solúveis totais (°Brix) são usados como índice de maturidade para alguns frutos ao indicar a quantidade de substâncias, principalmente açúcares, dissolvidas no suco. Rodrigues et al. (2018) avaliou os frutos do cajá e encontrou valores de SST entre 8,25% e 15,42%, conforme o estágio de maturação. A deterioração do alimento deve-se à multiplicação

de microrganismos e está relacionada com o parâmetro de pH que também influencia as atividades enzimáticas e contribui com a retenção de sabor e odor (SILVA et al., 2022).

O cajá, embora muito aromático, é um fruto com baixo teor de açúcar e que apresenta uma acidez bastante pronunciada equiparada a outros frutos tropicais como o maracujá e o abacaxi. Silva et al. (2022) apontam ainda que o pH deve estar abaixo de 4,5 para assegurar a conservação da polpa sem que haja necessidade de tratamento térmico muito elevado evitando assim afetar a qualidade nutricional da polpa de fruta.

Para a comercialização de polpas de frutas no Brasil deve-se obedecer a Instrução Normativa nº 49/18 (BRASIL, 2018) que estabelece critérios de valores mínimos de Sólidos Solúveis (SST), pH e Acidez Total Titulável (ATT) para cada tipo de fruto. Os valores para a polpa de caju são SS de 10 °Brix, pH de 3,8 e ATT de 0,18 g de ácido acético/100 g de amostra. Já para a polpa de cajá tem-se SS de 9 °Brix, pH de 2,2 e ATT de 0,9 g de ácido acético /100 g de amostra. Logo, as polpas comerciais utilizadas nos ensaios obedecem aos parâmetros legais apontados, podendo ser utilizadas na produção do kombucha.

Na Tabela 5.2 nota-se que os flavorizantes sabor cajá contêm maior quantidade de SST, são mais ácidos (pH e ATT) e a polpa, especificamente, apresenta a cor amarela esverdeada bastante pronunciada (absorbância registrada: 0,899). Quando se comparou os dois tipos de insumo entre si e para cada um dos sabores, observou-se que tanto para o cajá quanto para o caju as polpas apresentaram maior teor de SST, eram mais ácidas (pH e ATT) e apresentavam cores mais expressivas em relação aos aromas naturais.

A realização dos ensaios de bancada para avaliar a saborização do kombucha foi então iniciada pela fermentação do chá verde adoçado com concentração C<sub>1</sub> de açúcar cristal, por 13 dias. A partir disso, prosseguiu-se com a flavorização da bebida em volumes de bancada (1,2 L) e conforme metodologia descrita previamente. Assim, ao longo de 72 horas, a segunda fermentação do chá foi avaliada a partir de um comparativo entre as concentrações de Polpa (P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>) e de Aroma (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) para cada um dos sabores. Deste modo, intencionou-se escolher uma concentração em detrimento da outra, por meio do estudo dos parâmetros analisados.

De início, o indicador de sólidos solúveis é avaliado para os ensaios de cajá e de caju (Figuras 5.4 e 5.5, respectivamente). Os resultados obtidos a partir da infusão de aromas naturais apontam, para ambos os sabores, uma relativa constância de valores de SST sem sinalização de diferenças significativas entre as concentrações A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> estudadas. Nos casos em que a flavorização da bebida foi feita a partir de polpas, ocorreu algum decaimento do referido parâmetro, visível principalmente nas curvas de menor concentração (P<sub>1</sub>), quando comparadas às de concentração P<sub>2</sub>. Isso devido ao consumo de açúcares pelos microrganismos do SCOBY

que, em um ambiente com maior disponibilidade de alimento, pode realizar a hidrólise em um maior período (CHU e CHEN, 2006).

Figura 5.4 – A. Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Cajá; B. Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Cajá

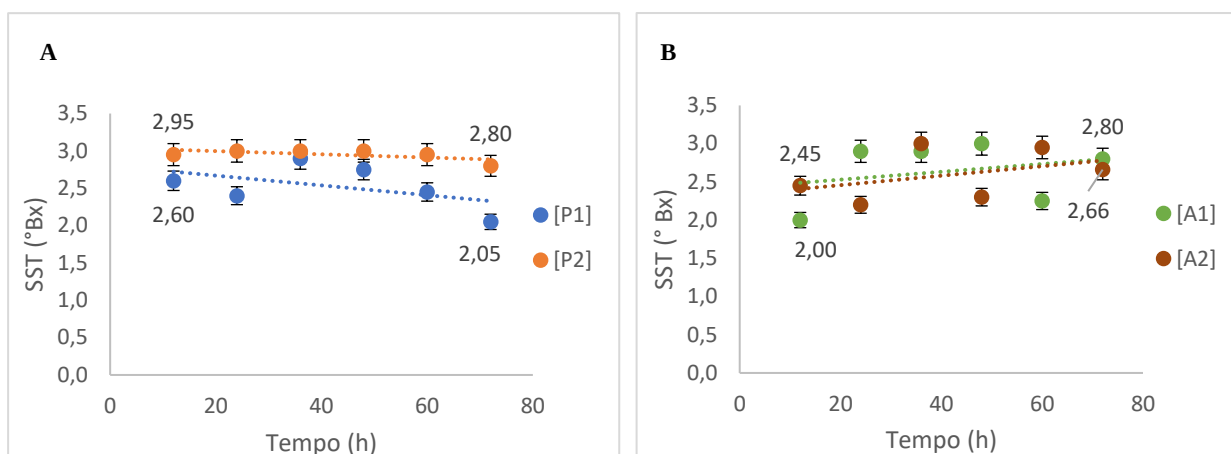
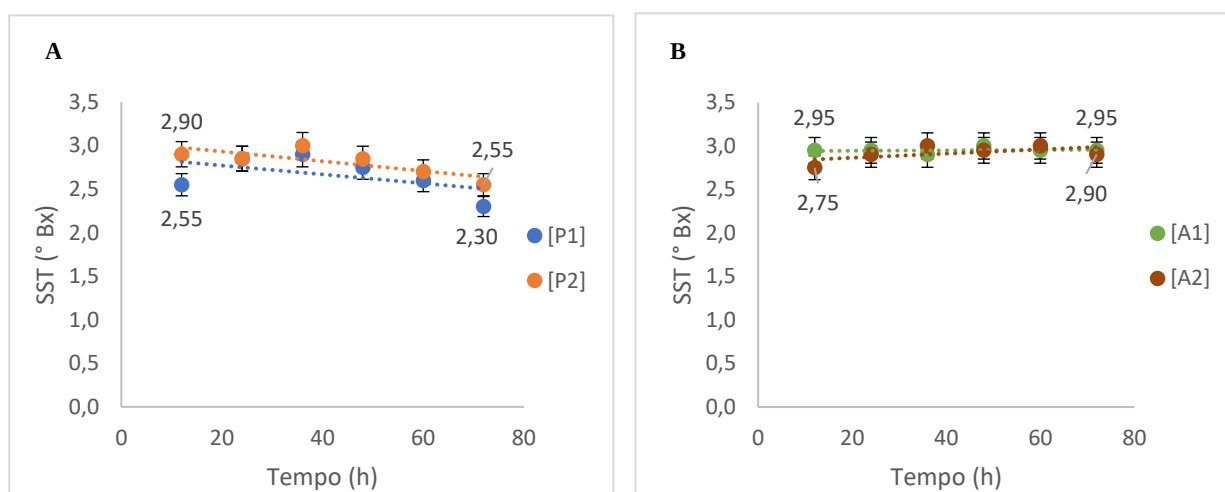


Figura 5.5 – A. Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Caju; B. Análise de SST em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Caju



As Figuras 5.6 e 5.7 são apresentadas para avaliação dos valores de pH ao longo da segunda fermentação do kombucha com adição de cajá e caju, nesta ordem. Observa-se que, para ambos os sabores e seus respectivos tipos de insumo, a curva de pH decai sem sinalizar diferenças significativas entre as concentrações analisadas. Nota-se ainda que a flavorização da bebida por polpas de cajá e de caju acarretou maior decaimento do citado parâmetro ao longo do tempo, chegando a estar em desacordo com a legislação brasileira (que exige  $pH > 2,5$ ), a partir de 48 e 72 horas, respectivamente. Para esse tipo de insumo, ressalta-se então a necessidade de um maior controle de pH.

Figura 5.6 – A. Análise de pH com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Cajá; B. Análise de pH em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Cajá

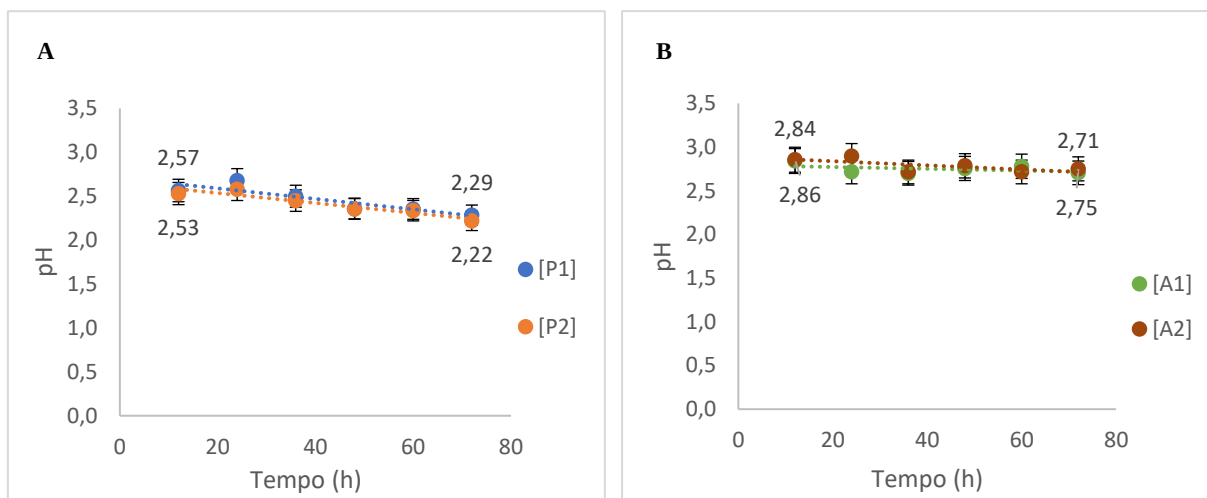
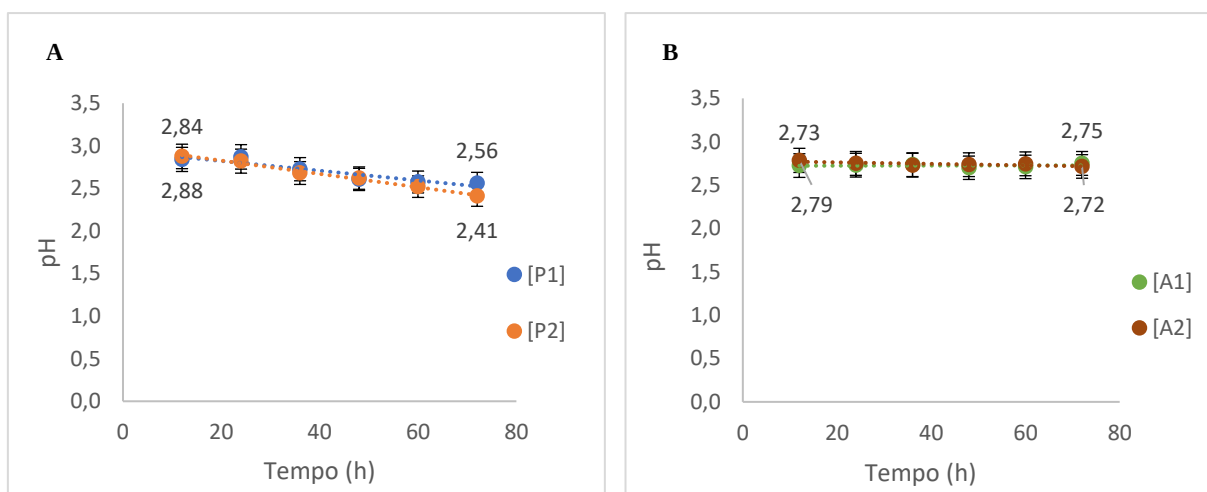


Figura 5.7 – A. Análise de pH em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Caju; B. Análise de pH em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Caju



A ATT do kombucha de cajá e de caju é mostrada em termos de produção de ácido acético nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente. Para ambos os sabores e tipos de insumos testados observou-se aumento na acidez da bebida em conformidade com a queda de pH anteriormente relatada. Os ensaios preliminares não apontaram diferenças significativas entre as concentrações de polpas e aromas naturais. Contudo, nota-se maior ascensão da curva de ATT nos ensaios de sabor cajá.

Figura 5.8 – A. Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de Polpa (P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>) sabor Cajá; B. Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de aroma natural (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) sabor Cajá.

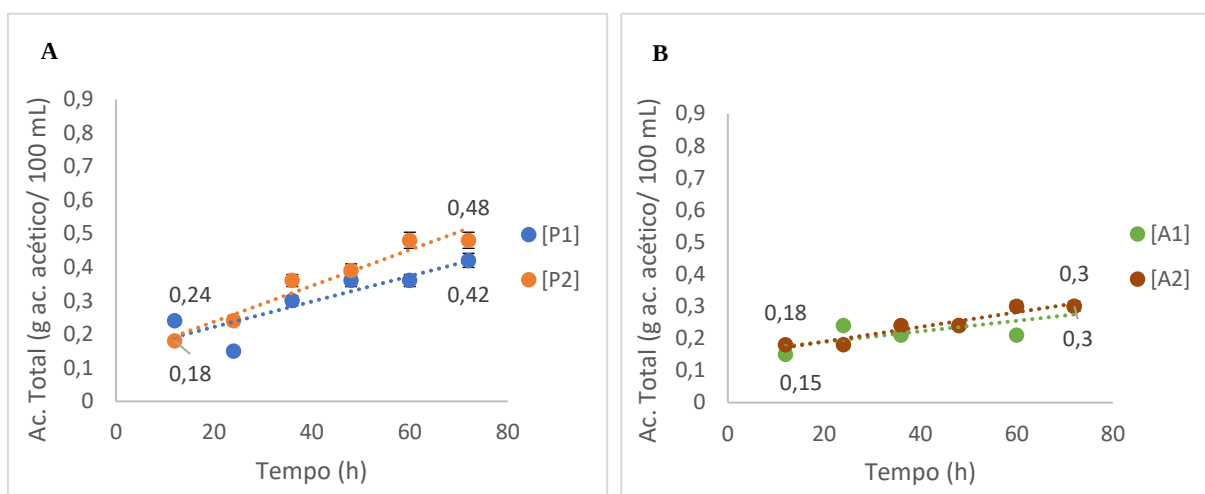
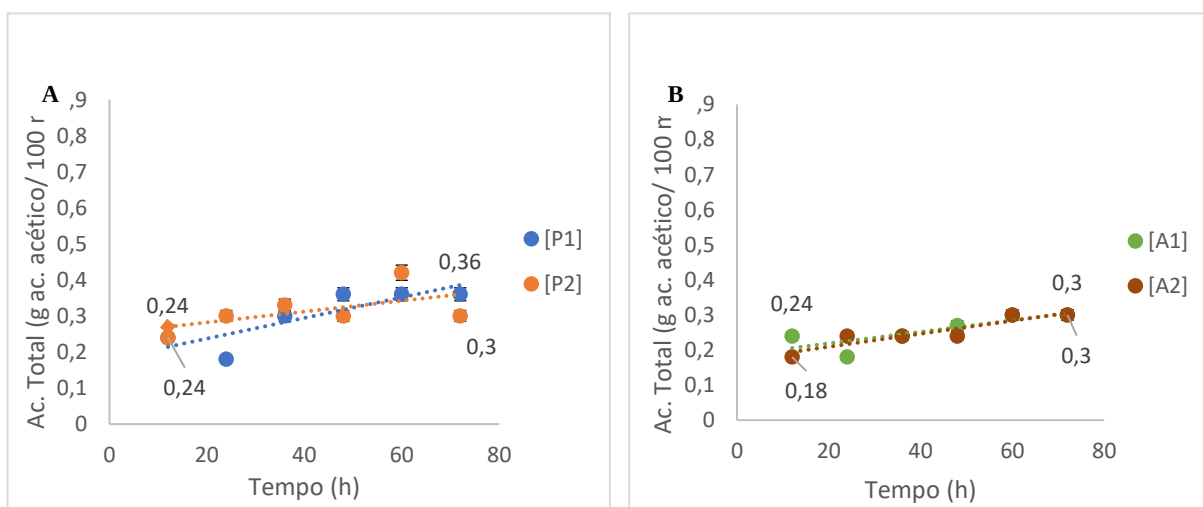


Figura 5.9 – A. Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de Polpa (P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>) sabor Caju; B. Análise de acidez total titulável em ensaios com adição de concentrações de aroma natural (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) sabor Caju.



As Figuras 5.10 e 5.11 ilustram a análise de cor do kombucha de cajá e de caju, respectivamente. É possível inferir um aumento da cor da bebida ao longo da segunda fermentação, provavelmente relativo à pigmentação das amostras pela infusão dos flavorizantes.

Figura 5.10 – A. Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Cajá; B. Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Cajá

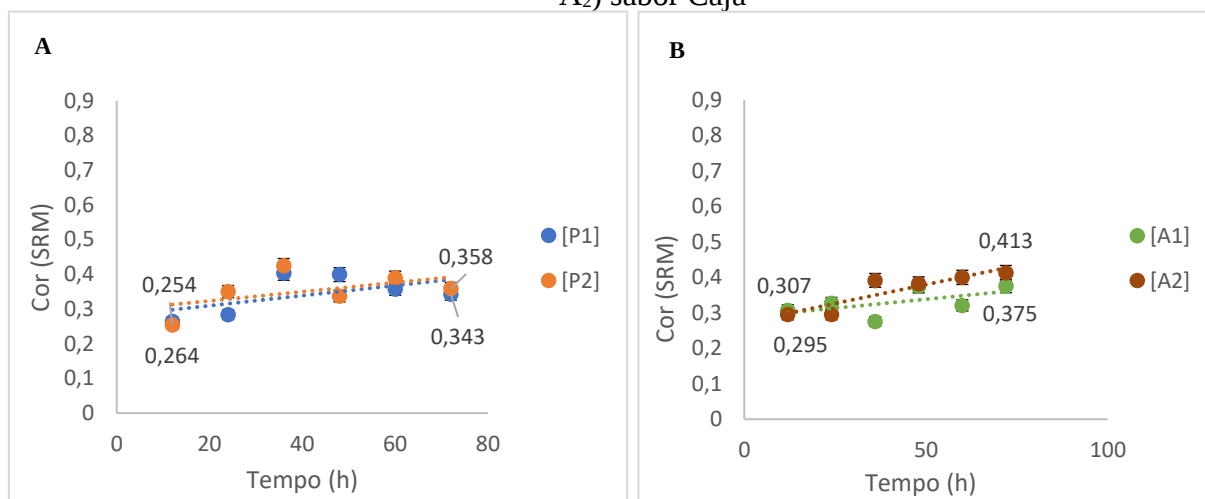
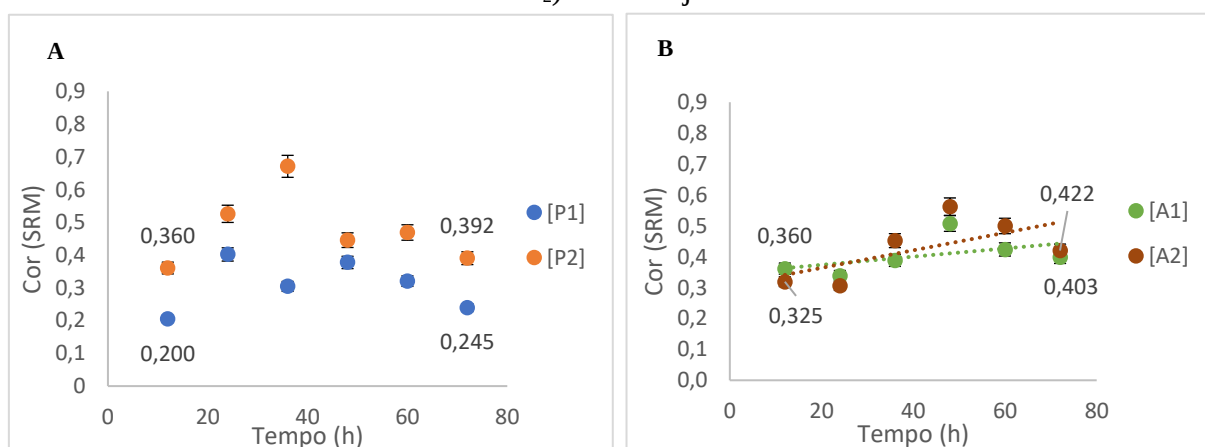


Figura 5.11 - A. Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Caju; B. Análise de cor em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Caju



Os ensaios de bancada também foram avaliados quanto ao *Ratio* (Figuras 5.12 e 5.13). É possível observar, respectivamente para o cajá e o caju, curvas decrescentes que não sinalizam diferenças significativas quanto à concentração de insumos analisados. Assim, o decaimento do referido parâmetro é expressivo e entendido como um indicador de alteração de sabor, correlacionada à etapa de infusão dos flavorizantes. Logo, nos estudos avaliados, as características sensoriais da bebida tendem a um menor dulçor e uma maior acidez, principalmente no caso das polpas que apresentam queda mais acentuada de valores de *Ratio*.

Figura 5.12 – A. Análise de *Ratio* em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Cajá; B. Análise de *Ratio* em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Cajá

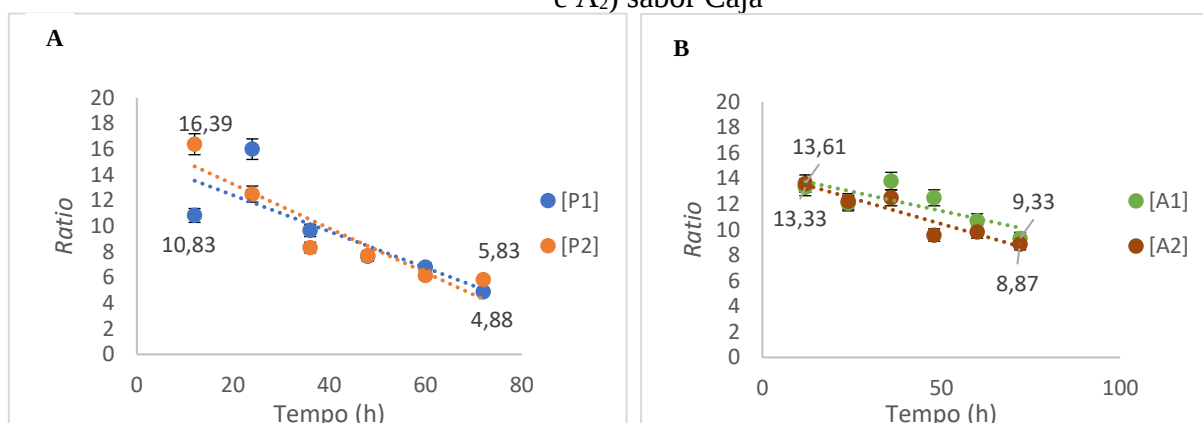
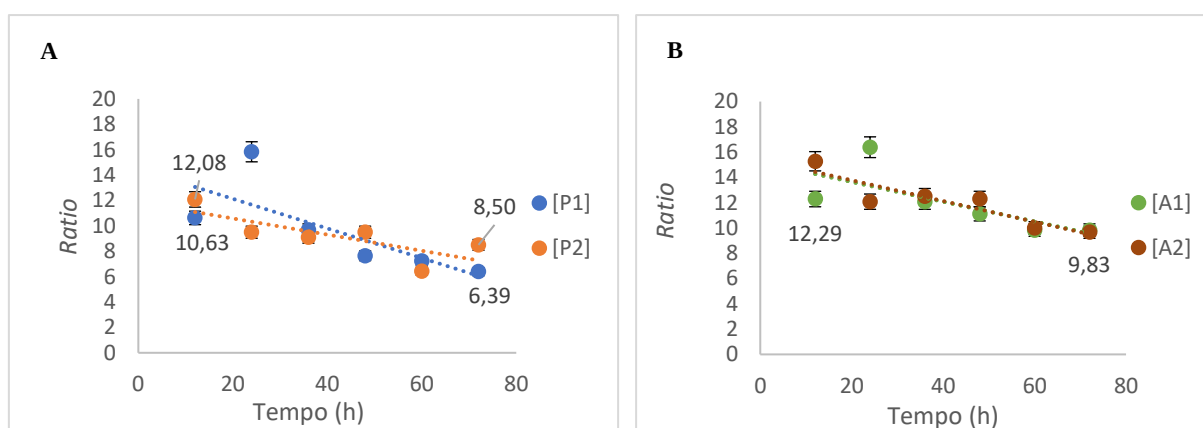


Figura 5.13 – A. Análise de *Ratio* em ensaios com adição de concentrações de Polpa ( $P_1$  e  $P_2$ ) sabor Caju; B. Análise de *Ratio* em ensaios com adição de concentrações de aroma natural ( $A_1$  e  $A_2$ ) sabor Caju



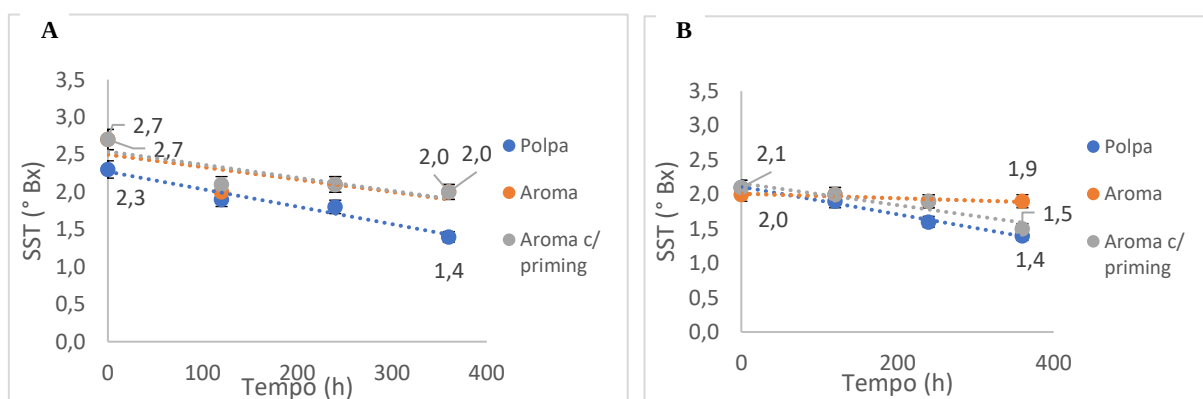
As impressões sensoriais acerca do odor e do reconhecimento gustativo das frutas foram fatores influentes na determinação das melhores concentrações de polpas e aromas naturais. No caso das amostras saborizadas com as maiores concentrações de polpa ( $P_2$ ) de cajá e de caju, foi observado um leve odor de enxofre nas bebidas, provavelmente devido ao excesso de açúcares e/ou fibras presentes. Já para as maiores concentrações de aromas ( $A_2$ ) os sabores e odores foram pronunciados de forma bastante artificial, semelhantes ao aroma de Tutti Frutti, tornando difícil o seu reconhecimento.

A possibilidade de redução de custos relativos à etapa de flavorização do kombucha também conduziu a escolha das menores concentrações de aroma e de polpa ( $A_1$  e  $P_1$ ) para ambos os sabores testados. Desta maneira, prosseguiu-se com a avaliação cinética da segunda fermentação da bebida.

O envase do kombucha de cajá e de caju, saborizados com as melhores concentrações de insumos, ocorreu para as polpas, aromas naturais e aromas adicionados de *priming*. Assim, no decorrer de 15 dias, relativos à maturação e gaseificação natural da bebida, amostragens foram realizadas em triplicatas e a cada 120 horas para avaliação cinética.

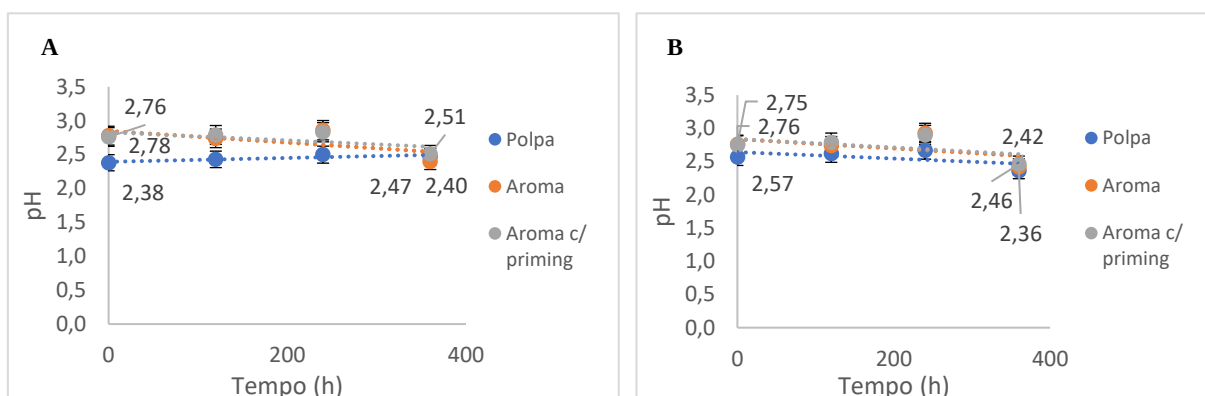
A análise de SST está apresentada na Figura 5.14 a qual revela uma queda do referido parâmetro para todas as curvas de ambos os sabores testados. Foi registrada, contudo, uma variação mais acentuada para as polpas que, ao término de 360 horas, apresentaram valores de 1,4 °Brix enquanto os aromas apontaram 2,0 e 1,9 °Brix para o cajá e caju, respectivamente.

Figura 5.14 – A. Análise de SST em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Cajá; B. Análise de SST em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Caju



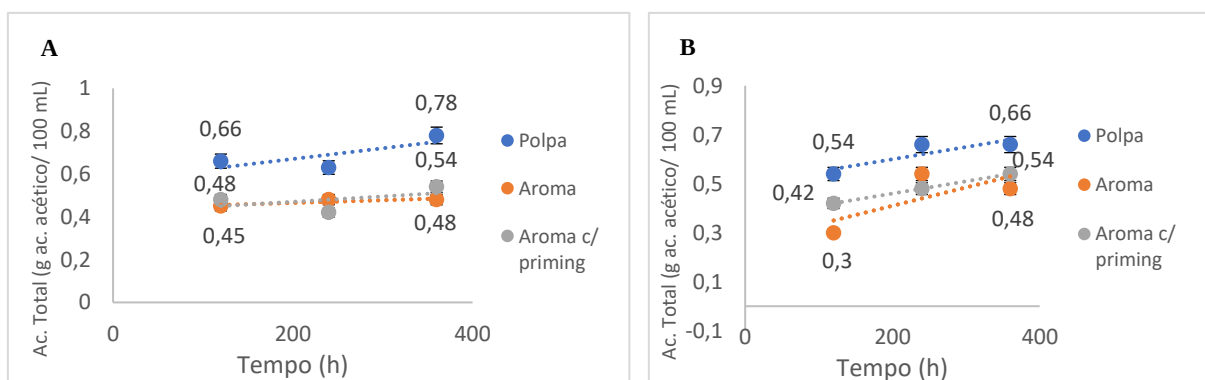
A Figura 5.15 ilustra o parâmetro de pH para os kombuchas de cajá e de caju, nesta ordem. A partir de sua avaliação, nota-se uma relativa queda de valores para os aromas acrescidos ou não de *priming*, enquanto os valores dos ensaios com as polpas quase não variaram. Vale ressaltar ainda que, para ambos os sabores, as amostras de aromas naturais foram iniciadas em pH mais elevado, convergindo ao valor final dos ensaios com polpas.

Figura 5.15 – A. Análise de pH em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Cajá; B. Análise de pH em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Caju



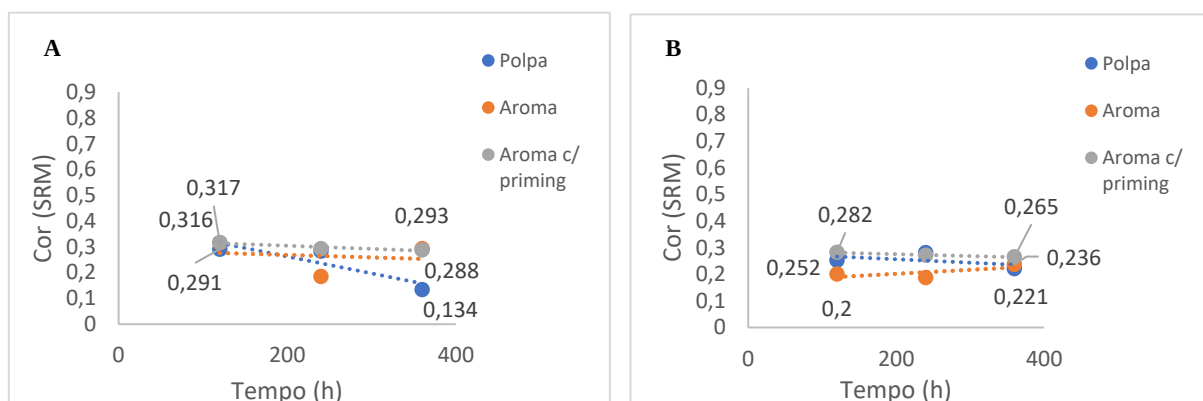
A ATT do kombucha de cajá e de caju é mostrada na Figura 5.16, onde nota-se a relativa ascensão das curvas que ilustram a síntese de ácido acético pelos microrganismos envasados. Observa-se também resultados semelhantes entre os ensaios de aromas naturais sendo, contudo, distintos dos valores finais das amostras saborizadas com polpas. Pode-se supor que outros ácidos foram gerados baixando o pH das amostras de aroma até que as três curvas se igualassem.

Figura 5.16 - A. Análise de acidez total titulável em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Cajá; B. Análise de acidez total titulável em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Caju



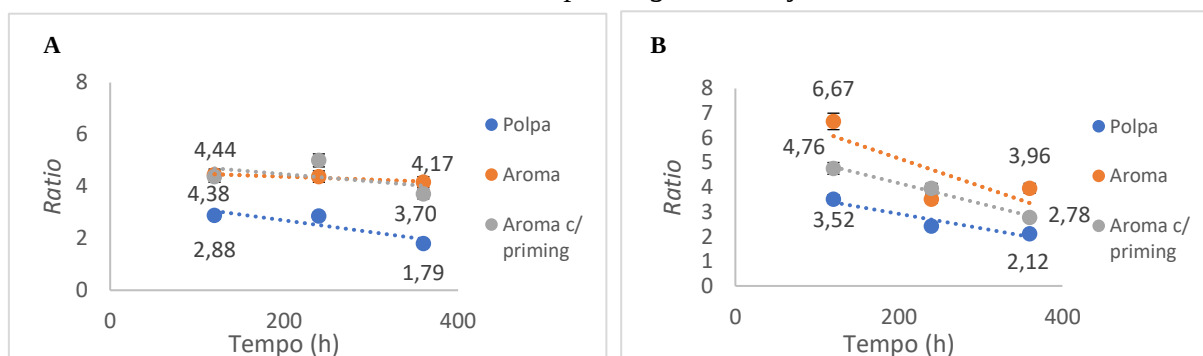
A análise de cor, por sua vez, é mostrada na Figura 5.17. Sua avaliação sugere redução da cor transmitida da bebida ao longo do tempo destinado à maturação e gaseificação. Visualmente, esse aspecto é bastante notado em ambas as amostras analisadas de cajá e de caju como uma espécie de “clarificação”.

Figura 5.17 – A. Análise de cor em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Cajá; B. Análise de cor em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Caju



O *Ratio* foi calculado nos ensaios de avaliação cinética do kombucha saborizado com as melhores concentrações de polpas, aromas e aromas acrescidos de *priming*. A fim de avaliar o referido parâmetro, a Figura 5.18 é apresentada. Nela nota-se um leve decaimento das curvas de cajá, sendo a variação de valores mais expressiva nos ensaios de caju. Deste modo, ressaltamos que para ambos os sabores avaliados, os ensaios com polpas apresentaram características de menor dulçor e maior acidez, demonstradas pelos menores valores de *Ratio*.

Figura 5.18 – A. Análise de *Ratio* em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Cajá; B. Análise de *Ratio* em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor Caju



As amostras foram avaliadas quanto a densidade relativa e os valores com seus respectivos desvios padrão, significativos apenas a partir da quarta casa decimal e os dados estão apresentados na Tabela 5.3 e 5.4 para os tempos de amostragem da etapa de avaliação cinética de cajá e caju, respectivamente. Observa-se que a densidade relativa do kombucha,

bebida composta majoritariamente por água, se assemelha a densidade relativa da água pura (1 a 4°C) em todos os ensaios

Tabela 5.3 – Densidade relativa média para o kombucha sabor Cajá

| Tempo (h) | Polpa                 | Aroma                 | Aroma com<br><i>priming</i> |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 120       | $1,008 \pm 4.10^{-4}$ | $1,009 \pm 4.10^{-4}$ | $1,010 \pm 2.10^{-4}$       |
| 240       | $1,009 \pm 6.10^{-4}$ | $1,010 \pm 5.10^{-4}$ | $1,011 \pm 4.10^{-4}$       |
| 360       | $1,007 \pm 4.10^{-4}$ | $1,010 \pm 3.10^{-4}$ | $1,010 \pm 3.10^{-4}$       |

Tabela 5.4 – Densidade relativa média para o kombucha sabor Caju

| Tempo (h) | Polpa                 | Aroma                 | Aroma com<br><i>priming</i> |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 120       | $1,007 \pm 2.10^{-4}$ | $1,008 \pm 3.10^{-4}$ | $1,006 \pm 2.10^{-4}$       |
| 240       | $1,006 \pm 3.10^{-4}$ | $1,008 \pm 2.10^{-4}$ | $1,011 \pm 4.10^{-4}$       |
| 360       | $1,008 \pm 3.10^{-4}$ | $1,023 \pm 1.10^{-4}$ | $1,006 \pm 5.10^{-4}$       |

O estudo da espumabilidade do kombucha buscou avaliar a produção e a retenção de espuma por intermédio de provetas, cronômetro e ferramentas de filmagem. Tal parâmetro, foi analisado em paralelo à produção de CO<sub>2</sub> que ocorreu mediante a leitura de manômetros acoplados às garrafas modelo e acompanhamento visual da gaseificação em garrafas PETs.

Contudo, é necessário informar que durante o ensaio em questão não foi possível ler a pressão nos manômetros citados devido a erros de encaixe da ferramenta nas garrafas. Nesse contexto, os quadros a seguir são apresentados a fim de ilustrar visualmente, a gaseificação natural da bebida sabor cajá e sabor caju, em triplicatas e nos três pontos de amostragem: D<sub>1</sub> (120h), D<sub>2</sub> (240h) e D<sub>3</sub> (360h), respectivamente.

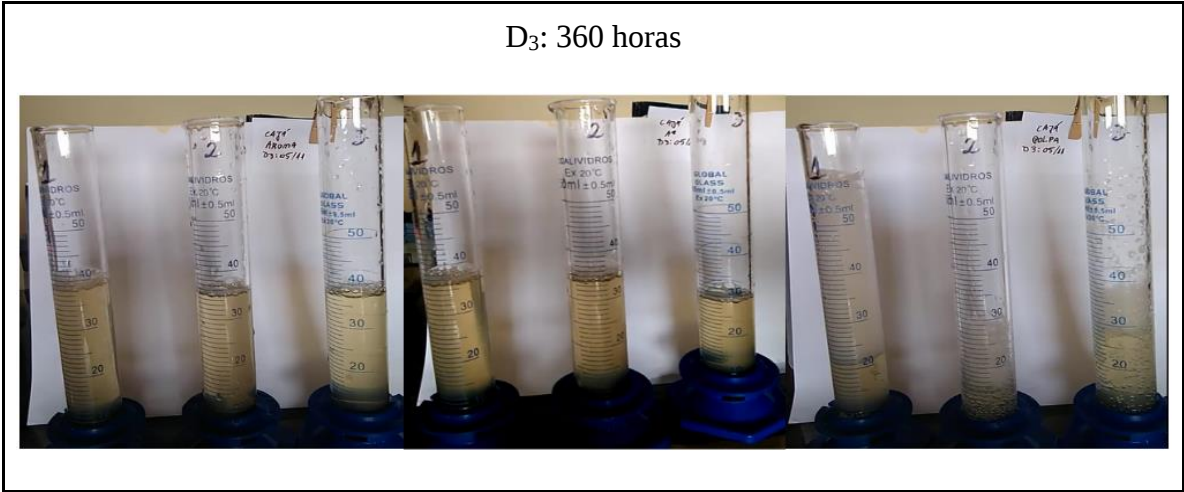
Assim como previsto pelo consumo de valores em Brix após o envase, os ensaios com polpas de ambos os sabores resultaram em maior gaseificação, quando comparados às amostras

saborizadas por aromas naturais. Neste último caso, foi observado que a adição de *priming* não foi suficiente para uma produção satisfatória de CO<sub>2</sub> durante o período avaliado.

Quadro 5.1 - Análise de espumabilidade nos tempos de amostragem em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor cajá.

| CAJÁ                                                                                 |                          |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------|
| Aroma                                                                                | Aroma com <i>priming</i> | Polpa |
| D <sub>1</sub> : 120 horas                                                           |                          |       |
|   |                          |       |
| D <sub>2</sub> : 240 horas                                                           |                          |       |
|  |                          |       |

D<sub>3</sub>: 360 horas



Quadro 5.2 - Análise de espumabilidade em ensaios de avaliação cinética com adição das melhores concentrações de polpa, aroma e aroma com *priming* sabor caju.

| CAJU                       |                          |       |
|----------------------------|--------------------------|-------|
| Aroma                      | Aroma com <i>priming</i> | Polpa |
| D <sub>1</sub> : 120 horas |                          |       |
|                            |                          |       |
| D <sub>2</sub> : 240 horas |                          |       |
|                            |                          |       |

D<sub>3</sub>: 360 horas

A partir das amostras de 360 horas (D<sub>3</sub>), consideradas as melhores condições de processo, quantificou-se cinzas, resíduo seco, proteínas solúveis e carboidratos totais (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Caracterização nutricional do kombucha sabor Cajá e Caju nas melhores condições de processo.

| Compostos                     | CAJÁ             |                 |                             | CAJU            |                 |                             |
|-------------------------------|------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|
|                               | Polpa            | Aroma           | Aroma com<br><i>priming</i> | Polpa           | Aroma           | Aroma com<br><i>priming</i> |
| Cinzas (%)                    | 0,14 ±<br>0,05b  | 0,28 ±<br>0,01a | 0,22±<br>0,03a              | 0,37 ±<br>0,04a | 0,43 ±<br>0,03a | 0,39 ±<br>0,01a             |
| Resíduo seco (%)              | 0,6 ±<br>0,1ab   | 1,7 ±<br>0,2a   | 1,5 ±<br>0,1a               | 0,5 ±<br>0,2b   | 1,3 ±<br>0,2a   | 1,1 ±<br>0,3a               |
| Proteínas solúveis<br>(mg/mL) | 3,63 ±<br>0,12   | 2,84 ±<br>0,015 | 3,57 ±<br>0,046             | 2,96 ±<br>0,05a | 2,98 ±<br>0,16a | 2,29 ±<br>0,09a             |
| Carboidratos<br>totais (%)    | 0,14 ±<br>0,01ab | 1,26 ±<br>0,05a | 1,56 ±<br>0,04a             | 0,13 ±<br>0,02b | 1,16 ±<br>0,03a | 0,94 ±<br>0,04a             |

O teor de cinzas verifica a adição de material inorgânico ao alimento. Durante esta análise, a matéria orgânica é queimada a uma alta temperatura, restando apenas resíduos minerais fixos tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês, dentre outros (MELO FILHO, 2011).

Deste modo, informações prévias sobre o valor nutricional do produto são fornecidas e devem ser utilizadas em análises subsequentes para caracterização dos referidos minerais. Segundo Lima et al. (2009), as folhas do gênero *Camelia sinensis* como substrato é capaz de

acumular minerais, sendo alguns deles essenciais para a saúde humana (K, Mg, Mn, Ca, Zn, Cr, Ni e Se).

Conforme é mostrado na Tabela 5.4, os testes em que a saborização do kombucha foi feita a partir de polpas, resultaram em menores valores de cinzas para ambos os sabores avaliados. Os ensaios de sabor caju apresentaram valores superiores aos de cajá, em consonância com os valores de cinzas quantificados na caracterização dos respectivos flavorizantes (Tabela 5.2). Importa ressaltar ainda que não houve diferença significativa entre os teores de cinzas encontrados nos testes com aroma naturais de cajá e de caju acrescidos ou não de *priming*.

Silva et al. (2013), ao estudar o kombucha de chá verde, apontaram valores de cinzas totais superiores aos valores encontrados (entre 4,59 e 7%), observando a presença de cloreto, zinco e magnésio. Nas análises de Ribeiro et al. (2014) o resíduo mineral fixo esteve entre 0,63% e 0,66%, representando valores mais aproximados ao do presente trabalho.

A análise de umidade em alimentos desempenha um papel fundamental para inspeção do produto, passando pelo controle de qualidade até a logística de armazenamento. No caso de produtos com um alto teor de umidade, quantifica-se o resíduo seco de modo complementar (MELO FILHO et al, 2013).

Assim, quando as substâncias voláteis do kombucha foram evaporadas, o soluto remanescente, outrora dissolvido na bebida, foi determinado (Tabela 5.4). Nota-se valores que variam de 0,6 a 1,5 para o cajá e de 0,5 a 1,3 para o caju. Valores superiores foram encontrados por Castro, Ribeiro e Ribas (2023) no estudo do kombucha de chá verde e chá de hibisco acrescidos de extrato de camu-camu, para os quais foram registrados, após 10 dias de fermentação, valores médios de resíduo seco iguais a 2,25% e 2,15%, respectivamente. Cabral (2021) encontrou valores de umidade entre 90,42% e 96,8% para 15 formulações distintas de sabores de kombucha a partir da infusão de polpas de fruta e especiarias.

No kombucha são encontrados nove aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), sendo estes os constituintes de proteínas, fundamentais para as funções corporais (MALBASA et al., 2011). As quantidades de proteínas solúveis encontradas no presente estudo, não apresentaram variações estatísticas significativas para cada um dos sabores avaliados e os respectivos tipos de insumo (Tabela 5.4).

Cardoso et al. (2020) encontraram 1,74 mg/5ml de proteínas ao analisar amostras de kombucha de chá preto, sendo este um baixo percentual. Rossoni (2019) estudou cinco formulações de kombucha com diferentes carboidratos e constatou valores entre 0,3 e 0,41

mg/mL de proteína com variações mapeadas a cada cinco dias, indicando que a fonte de carboidrato não interferiu significativamente na síntese do referido composto.

Por fim, a Tabela 5.4 mostra os valores de carboidratos totais avaliados após 360 horas de maturação e carbonatação natural da bebida. A partir destes, observa-se menores quantidades de açúcares para o kombucha flavorizado com polpa (cajá: 0,14% e caju: 0,13%) e valores superiores para os aromas naturais de ambos os sabores (cajá: 1,26% e caju: 1,16%), sem diferença significativa em relação aos ensaios acrescidos de *priming* (cajá: 1,56% e caju: 0,94%). Tal resultado infere que nos ensaios com polpas houve uma maior disponibilidade de açúcares simples, ou seja, de fácil absorção pelas leveduras, refletido neste caso, em uma maior produção natural de CO<sub>2</sub> quando comparados aos ensaios com aromas (Quadro 4.1 e 4.2). Os valores constatados de carboidrato também foram condizentes com os valores de *Ratio* percebidos maiores para os aromas de ambos os sabores (Figuras 5.18 - A e B).

Lima et al. (2019), analisaram o consumo de carboidratos ao longo de 25 dias de fermentação do kombucha de chá verde, apontando uma redução média de cerca de 60% nos 6 primeiros dias. Cardoso et al. (2020) encontraram valor de carboidrato de 0,0761 mg/5ml evidenciando a atividade biológica da cultura do Kombucha.

A influência da substituição das polpas por aromas naturais na segunda fermentação do chá também foi verificada quanto à atividade antioxidante e fenólicos individuais após 360 horas de maturação e gaseificação natural da bebida. Segundo Schroeder (2019), a atividade antioxidante do kombucha está relacionada à presença de polifenóis e catequinas, que têm suas concentrações e atividades de reação para eliminação de radicais livres aumentada ao longo do tempo de fermentação.

Para a determinação da atividade antioxidante das amostras, dois métodos de eliminação de radicais livres foram utilizados: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico). O método de FRAP, capaz de medir o poder antioxidante redutor férrico, também foi utilizado. Em todos os casos, o Trolox foi utilizado como padrão para a construção das curvas analíticas e os valores da Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox (TEAC) são mostrados na Tabela 5.6, expressos em µmol/mL.

Tabela 5.6 – Determinação de atividade antioxidante do kombucha sabor Cajá e Caju nas melhores condições de processo

| Método | CAJÁ             |                   |                          | CAJU             |                   |                          |
|--------|------------------|-------------------|--------------------------|------------------|-------------------|--------------------------|
|        | Polpa            | Aroma             | Aroma com <i>priming</i> | Polpa            | Aroma             | Aroma com <i>priming</i> |
| DPPH   | 7,03 ±<br>0,17a  | 6,53 ±<br>0,55a   | 7,43 ±<br>0,45a          | 6,73 ±<br>0,49a  | 7,83 ±<br>0,05a   | 8,03 ±<br>0,21a          |
| ABTS   | 12,92 ±<br>0,17a | 13,42 ±<br>0,81a  | 14,62 ±<br>0,53ab        | 13,42 ±<br>0,21a | 13,92 ±<br>0,35ab | 13,82 ±<br>0,32a         |
| FRAP   | 12,04 ±<br>0,69a | 10,80 ±<br>0,55ab | 12,36 ±<br>1,01a         | 12,11 ±<br>0,63a | 11,87 ±<br>0,50a  | 12,71 ±<br>0,97a         |

Nota-se que os valores obtidos por DPPH foram ligeiramente inferiores aos outros dois métodos testados que resultaram em valores próximos entre si e significativos, sendo possível inferir que os kombuchas avaliados de cajá e de caju, saborizados com polpas e aromas naturais (acrescidos ou não de *priming*), apresentaram alta atividade sequestradora de radicais livres (ABTS > DPPH) e poder redutor de  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ .

Saimaiti et al. (2022) estudaram a fermentação do kombucha de chá verde adoçado relatando valores de FRAP de 7000 e 6500  $\mu\text{mol/L}$  no 15º dia de fermentação, em amostras com a presença e ausência de resíduo de folhas do chá no fermentador, respectivamente. Resultados próximos a estes foram encontrados por Srihari e Satyanarayana (2012) em estudo que quantificou, através da metodologia do ABTS, a atividade antioxidante em 70,1% para o kombucha de chá verde.

Por fim, os valores dos compostos fenólicos, caracterizados por cromatografia para as amostras D3 de cajá e de caju, são apresentados na Tabela 5.7, sendo expressos em mg/L junto aos seus respectivos desvios padrão. As nove substâncias detectadas foram quantificadas, conforme metodologia previamente descrita, dentre quinze padrões de curva: catequina, quercetina, rutina, D-vanilina, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácidos elágico, vanílico, fumárico, gálico, transcinâmico, siringico, ferúlico, cafeico, clorogênico e p-cumárico.

Fenólicos são bioativos que interferem em alvos fisiológicos específicos, fornecendo defesas antioxidantes, inflamatórias e mutagênicas ao corpo humano. Por esse motivo, são considerados essenciais para uma dieta balanceada, podendo ser provenientes de alimentos de origem animal (ácidos graxos como ômega 3, por exemplo), vegetal (carotenoides, compostos fenólicos, fitosteróis) ou do metabolismo de microrganismos (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). Logo, os resultados obtidos podem ser provenientes das folhas do chá e da fonte de carboidrato

utilizados como base para a fermentação do kombucha. Santos et al. (2018) relatam que o consumo contínuo de chás reduz o risco de doenças degenerativas devido aos seus vários antioxidantes e compostos fenólicos, principalmente catequinas e derivados.

Kaewkod et al. (2019) relatam que durante a fermentação do kombucha bactérias formadoras de compostos ativos se multiplicam conforme a qualidade do chá utilizado. Em estudos realizados por Couto e Lima (2020) com o kombucha de chá verde observou-se um aumento considerável de fenólicos, com pico máximo no sétimo dia.

Quantidades consideráveis de ácidos fenólicos, flavonóides, flavonóis e taninos também são encontrados em uma extensa variedade de frutas que podem apresentar propriedades funcionais como efeitos antiestresse oxidativo e anticarcinogênico. Tais atributos, contudo, estariam associados a sabores adstringentes que reduzem a palatabilidade desses alimentos (SGARBIERI e PACHECO, 1999).

Tabela 5.7 – Determinação de compostos fenólicos individuais do kombucha sabor Cajá e Caju nas melhores condições de processo

| Compostos            | CAJÁ              |                   |                             | CAJU              |                   |                             |
|----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
|                      | Polpa             | Aroma             | Aroma com<br><i>priming</i> | Polpa             | Aroma             | Aroma com<br><i>priming</i> |
| Ácido Gálico         | 61,36 ±<br>0,40a  | 40,63 ±<br>1,15b  | 49,16 ±<br>0,21ab           | 54,53 ±<br>1,87a  | 52,01 ±<br>0,02a  | 62,27 ±<br>0,68a            |
| Ácido Siríngico      | 21,78 ±<br>0,90a  | 21,31 ±<br>1,06a  | 30,26 ±<br>1,72a            | 19,78 ±<br>0,35ab | 23,04 ±<br>0,55a  | 21,38 ±<br>1,69a            |
| Ácido<br>Clorogênico | 0,76 ±<br>0,09a   | 0,49 ±<br>0,00b   | 0,65 ±<br>0,03a             | 0,40 ±<br>0,00ab  | 0,56 ±<br>0,02a   | 0,58 ±<br>0,01a             |
| Ácido Cafeico        | 0,21 ±<br>0,02a   | 0,14 ±<br>0,01a   | 0,15 ±<br>0,01a             | 0,13 ±<br>0,02a   | 0,16 ±<br>0,02a   | 0,18 ±<br>0,01ab            |
| Ácido<br>p-coumárico | 1,99 ±<br>0,02a   | 0,97 ±<br>0,79ab  | 2,12 ±<br>0,02a             | 1,83 ±<br>0,02a   | 1,90 ±<br>0,01a   | 1,99 ±<br>0,02a             |
| Ácido<br>Elágico     | 8,15 ±<br>0,03a   | 6,65 ±<br>0,00b   | 8,38 ±<br>0,16a             | 7,41 ±<br>0,01a   | 6,62 ±<br>0,88a   | 7,66 ±<br>0,05a             |
| Catequina            | 221,97 ±<br>0,90a | 177,99 ±<br>1,26a | 220,25 ±<br>2,91a           | 210,66<br>± 1,08a | 204,07 ±<br>2,14a | 222,61 ±<br>0,06a           |
| Rutina               | 13,53 ±<br>0,06a  | 10,30 ±<br>0,00a  | 12,91 ±<br>0,17a            | 10,87 ±<br>0,06a  | 10,12 ±<br>1,24a  | 11,43 ±<br>0,02a            |
| Quercetina           | 0,45 ±<br>0,07a   | 0,30 ±<br>0,01b   | 0,41 ±<br>0,01a             | 0,40 ±<br>0,01a   | 0,40 ±<br>0,03a   | 0,47 ±<br>0,03a             |

Em estudo com kombucha de chá verde adoçado, Saimaiti et al. (2022) quantificaram valores de ácido gálico (4 mg/L), ácido clorogênico (15 mg/L), catequina (57 mg/L), rutina (23 mg/L) e ácido elágico (40 mg/L) em 15 dias de primeira fermentação. Tais valores de fenólicos são, em geral, inferiores aos determinados no presente estudo, possivelmente porque para os ensaios de cajá e de caju, houve a adição de flavorizantes em uma segunda etapa de fermentação, seguida de uma quinzena de dias destinada a maturação e gaseificação natural da bebida.

## 6 CONCLUSÕES

- Os resultados deste estudo mostraram que a concentração padrão de sacarose utilizada pela Bauá® (C1) resultou em uma bebida com menores quantidades de ácido acético e açúcar residual, quando comparada à concentração C<sub>2</sub>. Portanto, o teste com a concentração C<sub>1</sub> foi definido como o melhor resultado.

- As polpas comerciais utilizadas nos ensaios obedeceram aos parâmetros legais confirmados por sua caracterização, podendo ser utilizadas na produção do kombucha. Foram estabelecidas então, duas concentrações de polpas e duas concentrações de aromas naturais de cajá e de caju, com base nas atuais receitas industriais da Bauá Kombucha® e na dosagem indicada pelo fabricante, considerando diluição máxima de até 10% (v/v) e 0,1% (v/v) para os respectivos tipos de insumos.

- A flavorização da bebida por polpas acarretou um maior decaimento do pH ao longo do tempo, chegando a estar em desacordo com a legislação brasileira (que exige pH > 2,5), sendo necessário um maior controle do referido parâmetro. A quantificação de etanol na bebida também é sugerida, a fim de avaliar ainda mais a qualidade e segurança do produto.

- A maior concentração de polpas resultou em um leve odor de enxofre nas bebidas, provavelmente devido ao excesso de açúcares e/ou fibras presentes. Já para as maiores concentrações de aromas, os sabores e odores foram pronunciados de forma bastante artificial, semelhantes ao aroma de *Tutti Frutti*, tornando difícil o seu reconhecimento. Tal fato aliado à possibilidade de redução de custos relativos à etapa de flavorização do kombucha, também conduziu à escolha das menores concentrações de aromas e de polpas (A<sub>1</sub> e P<sub>1</sub>) para ambos os sabores testados.

- Os ensaios com polpas de ambos os sabores resultaram em maior gaseificação, quando comparados às amostras saborizadas por aromas naturais. Neste último caso, foi observado que a adição de *priming* não foi suficiente para uma produção satisfatória de CO<sub>2</sub> durante o período avaliado.

- As quantidades de proteínas solúveis encontradas não apresentaram variações estatísticas significativas para cada um dos sabores avaliados e os respectivos tipos de insumo. Observa-se, contudo, menores quantidades de carboidratos totais para o kombucha flavorizado com polpa e valores superiores para os aromas naturais de ambos os sabores, com e sem *priming*. Tal resultado infere uma maior disponibilidade de açúcares simples, refletido nos ensaios com polpas, em uma maior produção natural de CO<sub>2</sub> e condizente com os valores de *Ratio* percebidos maiores para os aromas de ambos os sabores.

- Por fim, os kombuchas avaliados de cajá e de caju, saborizados com polpas e aromas naturais (acrescidos ou não de *priming*), apresentaram alta atividade sequestradora de radicais livres (ABTS > DPPH) e poder redutor férrico. Em análises, foram detectados e quantificados nove compostos fenólicos dentre quinze padrões de curva.

- Em conjunto, os resultados desta pesquisa permitem concluir que as bebidas desenvolvidas apresentaram excelentes propriedades funcionais e alta capacidade antioxidante. Além disso, podem ser associadas a uma alimentação saudável e ao bom funcionamento do organismo. No entanto, apesar dos resultados serem satisfatórios, não foram encontrados parâmetros conclusivos que indiquem a viabilidade de substituição das polpas por aromas naturais para o kombucha de chá verde saborizado com cajá e com caju.

## REFERÊNCIAS

- ASONO, T.; YUASA, K.; KUNUGITA, K.; TERAJI, T.; MITSUOKA, T. Effects of gluconic acid on human faecal bacteria. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, n. 5, p. 247-256, 1994. DOI: 10.3109/08910609409141362.
- BARBOSA, C. D.; SANTOS, W.C.R.; GOMES, D.; ALBANO, H.C.; TEIXEIRA, P.C.M.; ROSA, C.A.; ALVARENGA, V.O.; LACERDA, I. C. A. Caracterização físico-química, microbiológica e quantificação de compostos fenólicos de Kombucha. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 13., 2019, Campinas. **Anais eletrônicos** [...]. Campinas: Galoá, 2019.
- BAUER-PETROVSKA, B.; PETRUSHEVSKA-TOZI, L. Mineral and water-soluble vitamin contents in the Kombucha drink. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 201-205, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x.
- 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. DOI: 10.1006/abio.1996.0292.
- BLANC, P. J. Characterization of the tea fungus metabolites. **Biotechnology letters**, v. 18, n. 2, p. 139-142, 1996. DOI: 10.1007/BF00128667.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 49**. Estabelece em todo o território nacional a complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Suco e Polpa de Fruta. Diário Oficial da União, Brasília, 2018.
- CABRAL, E. D. **Elaboração de kombuchas artesanais à base de chá verde: Análise físico-química e microbiológica**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) – Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 2021.
- CAICEDO, L. A.; DA FRANÇA, S. P. Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática. **Revista Colombiana de Química**, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2001.
- CASTRO, C. S.; RIBEIRO, T. X.; RIBAS, P. P. **Produção e caracterização de kombuchas obtidas a partir de Chá Verde e Chá de Hibisco com adição de Camu-Camu**. Disponível em: [https://doity.com.br/media/doity/submissoes/artigo-499f96c200597eecbf343c6a26d41d5ea14da419-arquivo\\_revisado\\_segundo\\_arquivo.pdf](https://doity.com.br/media/doity/submissoes/artigo-499f96c200597eecbf343c6a26d41d5ea14da419-arquivo_revisado_segundo_arquivo.pdf). Acesso em: 11 mar. 2023.
- 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. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial cellulose: Fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.

CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x.

CHEN, J.; TIAN, J.; GE, H.; LIU, R.; XIAO, J. Effects of tetramethylpyrazine from Chinese black vinegar on antioxidant and hypolipidemia activities in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, n. 2, p. 930-940, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.12.017.

CHU, S.C.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidante activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502-507, 2006. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.080.

COUTO, G. O.; LIMA, C. P. Determinação de compostos fenólicos totais do chá verde e chá preto e suas respectivas kombuchas. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 20, n. 2, p. 21-30, 2020. DOI: 10.25192/issn.1984-7041.v20i25918.

COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE, L.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1-16, 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix048.

CVETKOVIC, D.; MARKOV, S.; DJURIC, M.; SAVIC, D.; VELICANSKI, A. Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 3, p. 387-392, 2008. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2007.07.021.

CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, M. Microbial cellulose: The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.035.

DADA, A. P.; LAZZARI, A.; CESTÁRIO, A. C. O.; SILVA, D. S.; SARAIVA, B. R.; ROSA, C. I. L. F.; PINTRO, P. T. M. Caracterização de kombucha elaborado a partir de chá verde. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i15.22992.

DIAS, S. P.; VAGHETTI, J. P.; LIMA, É. C.; BRASIL, J. L.. **Química Analítica: Teoria e Prática Essenciais**. São Paulo: Bookman, 2016.

DUTTA, H.; PAUL, S. K. Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. In: GRUMEZESCU, A.; HOLBAN, A. M. (ed.). **Production and Management of Beverages 1: The Science of Beverages**. Sawston: Woodhead Publishing, 2019. p. 259-288.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer Analysis System to Fixed Effects Split Plot Type Designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019. DOI: 10.28951/rbb.v37i4.450.

FIRMINO, L. A.; MIRANDA, M. P. S. Polifenóis totais e flavonóides em amostras de chá verde (*Camellia sinensis* L.) de diferentes marcas comercializadas na cidade de Salvador-BA.

**Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 436-443, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/11\_041.

FRANCO, V. G.; PERÍN, J. C.; MANTOVANI, V. E., GOICOECHEA, H. C. Monitoring substrate and products in a bioprocess with FTIR spectroscopy coupled to artificial neural networks enhanced with a genetic-algorithm-based method for wavelength selection. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 1005-1012, 2006. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.07.003.

FU, C.; YAN, F.; CAO, Z.; XIE, F.; LIN, J. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 123-126, 2014. DOI: 10.1590/S0101-20612014005000012.

GAMUNDI, R.; VALDIVIA, M. El hongo Kombucha: Dos opiniones distintas. **Sidahora**, v. 10-11, p. 34-34, 1995.

GENÍS, S.; BACH, À.; ARÍS, A. Effects of intravaginal lactic acid bacteria on bovine endometrium: Implications in uterine health. **Veterinary Microbiology**, v. 204, p. 174-179, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.04.025.

GOH, W. N.; ROSMA, A.; KAUR, B.; EAZILAH, A.; KARIM, A. A.; BHAT, R. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 109-117, 2012.

GREENWALT, C. J.; LEDFORD, R. A., STEINKRAUS, K. H. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. **LWT: Food, Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 291-296, 1998. DOI: 10.1006/fstl.1997.0354.

GUO, L.; SHI, Q.; FANG, J. L.; MEI, N.; ALI, A. A.; LEWIS, S. M.; LEAKEY, J. E.; FRANKOS, V. H. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 26, n. 4, p. 317-338, 2008. DOI: 10.1080/10590500802533392.

HAUSER, S. P. Teepilz Kombucha nach Dr. med. Sklenar: Eine biologische Krebstherapie. Dokumentation Nr. 18. **Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis**, v. 79, n. 9, p. 243-246, 1990.

HESSELTINE, C. W. A millennium of fungi: Food and fermentation. **Mycologia**, v. 77, n. 2, p. 148-167, 1965. DOI: 10.2307/3756821.

HUR, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, Y. -C.; CHOI, I.; KIM, G. B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346-356, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.112.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz I: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

JADÁN-PIEDRA, C.; ALCÁNTARA, C.; MONEDERO, V.; ZÚÑIGA, M.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. **Food Chemistry**, n. 228, p. 158-166, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.157.

JAIMES, R.; KUZMIK-GLANCY, S.; BROOKS, D. M.; SWIFT, L. M.; POSNACK, N. G.; KAY, M. W. Functional response of the isolated, perfused normoxic heart to pyruvate dehydrogenase activation by dichloroacetate and pyruvate. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 468, n 1, p. 131-142, 2016. DOI: 10.1007/s00424-015-1717-1.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. 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, 2014. DOI: 10.1111/1541-4337.12073.

JAYABALAN, R.; MALINI, K.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K.; YUN, S. E. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 843-847, 2010. DOI: 10.1007/s10068-010-0119-6.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, p. 392-398, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.032.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.12.037.

JUNKER, B. H. Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 347-364, 2004. DOI: 10.1016/S1389-1723(04)70218-2.

KAWEKOD, T.; BOVONSOMBUT, S., TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. **Microorganisms**, v. 7, n. 700, p. 1-18, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7120700.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G. Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 433-440, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.146.

KONOVALOV, I. N.; SEMENOVA, M. N. K. Fiziologii "Cajnogo Griba". **Bot Žurnal**, Moscou, v. 40, p. 567-570, 1955.

KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDHI, V.; YADAVILLI, K. S. Invertase and its applications: A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 792-797, 2013. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.07.014.

KUMAR, S. D.; NARAYAN, G.; HASSARAJANI, S. Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. **Food Chemistry**, v. 111, p. 784-788, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.012.

LAHIRI, S.; MITCHELL, C. H.; REIGADA, D.; ROY, A.; CHERNIACK, N. S. Purines, the Carotid Body and Respiration. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 157, n. 1, p. 123-129, 2007. DOI: 10.1016/j.resp.2007.02.015.

LEWIS, S. S.; HUTCHINSON, M. R.; ZHANG, Y.; HUND, D. K.; MAIER, S. F.; RICE, K. C. WATKINS, L. R. Glucuronic acid and the ethanol metabolite ethyl-glucuronide cause Toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. 30, p. 24-32, 2013. DOI: 10.1016/j.bbi.2013.01.005.

LIMA, N. S.; SILVA, N. F. S.; ABREU, B. S.; MODESTO, K. R. Verificação de viabilidade em amostra de kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. 2, p. 71-75, 2019.

LIU, C. H.; HSU, W. H.; LEE, F. L.; LIAO, C. C. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. **Food Microbiology**, v. 13, p. 407-415, 1996. DOI: 10.1006/fmic.1996.0047.

LIU, S.; LU, H.; ZHAO, Q.; HE, Y.; NIU, J.; DEBNATH, A. K.; WU, S.; JIANG, S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, n. 1, p. 270-281, 2005. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.02.012.

LONČAR, E. S.; PETROVIĆ, S. E.; MALBAŠA, R. V.; VERAC, R. M. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 44, n. 2, p. 138-139, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3803(20000301)44:2<138::AID-FOOD138>3.0.CO;2-%23.

LONČAR, E.; DJURIĆ, M.; MALBAŠA, R.; KOLAROV, L.; KLAŠNJA, M. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 3, p. 186-192, 2006. DOI: 10.1205/fbp.04306.

MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; KOLAROV, L. J. A. Sucrose and inulin balance during tea fungus fermentation. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 7, p. 573-576, 2002.

MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1727-1731, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.048.

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1039-1045, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.020.

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M.; DOŠENOVIĆ, I. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 926-932, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.069.

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M.; KLAŠNJA, M.; KOLAROV, L.; MARKOV, S. Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 3, p. 193-199, 2006. DOI: 10.1205/fbp.05061.

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014. DOI: 10.1016/j.fm.2013.09.003.

MATSUI, T. Condensed catechins and their potential health-benefits. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, p. 495-502, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.09.017.

MAYSER, P.; FROMME, S.; LEITZMANN, C.; GRUNDER, K. The yeast spectrum of “tea fungus Kombucha”. **Mycoodes**, v. 38, p. 289-295, 1995. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x.

MCKINLAY, J. B.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Prospects for a bio-based succinate industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 727-740, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-1057-y.

MELO FILHO, A. B.; SILVA, A. M. A. D.; VASCONCELOS, M. A. S. **Análises físico-químicas dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2014.

MELO FILHO, A. B.; VASCONCELOS, M. A. S. **Química de Alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2011.

MERTENS, D. AOAC Official Method 945.08. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Arlington, Virgínia: AOAC Inc., 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 181, p. 13, 18 set. 2019.

MOHAMMADSHIRAZI, A.; KALHOR, E. B. Energy and cost analyses of kombucha beverage production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 668-673, 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.11.022.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. 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, 2015. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.07.018.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. Phenolic acids bioavailability. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000600023.

ONAKPOYA, I.; HUNT, K.; WIDER, B.; ERNST, E. Pyruvate supplementation for weight loss: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 17-23, 2014. DOI: 10.1080/10408398.2011.565890.

PETROVIĆ, S. E.; SUTUROVIĆ, Z. J.; LONČAR, E. S.; MALBAŠA, R. V. Potentiometric stripping analysis of certain metal ions in tea fungus beverage. **Food / Nahrung**, v. 43, p. 45-46, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3803(19991001)43:5<345::AID-FOOD345>3.0.CO;2-H.

REISS, J. Der Teepilz und seine Stoffwechselprodukte. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 9, p. 286-290.

REYGAERT, W. C. Green tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. **BioMed Research International**, v. 17, 2018. DOI: 10.1155/2018/9105261.

RIBEIRO, O. A. S.; FONSECA, C. M.; FIGUEIREDO, S. P.; BOARI, C. A.; NEUMANN, D.; ABREU, L. R. Bebida láctea fermentada formulada com *Camellia sinensis*. **B. Ceppa**, v. 32, n. 2, p. 289-304, 2014.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006. DOI: 10.1016/j.bej.2006.09.012.

RODRIGUES, E. N. S.; SILVA, S. M.; BULHÕES, T. L.; MELO, R. S.; SOUSA, A. S. B.; LIMA, R. P.; MENDONÇA, R. M. N. Mudanças na qualidade durante a maturação de frutos de cajazeiras. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 39, n. 3, p. 254-263, 2018. DOI: 10.25066/agrotec.v39i3.39463.

ROOS, J. D.; VUYST, L. D. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115-119, 2018. DOI: 10.17113/ftb.61.01.23.7811.

ROSSONI, M. A. **Desenvolvimento e caracterização da bebida kombucha de erva mate (*Ilex paraguariensis*) utilizando diferentes fontes de carboidratos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2019.

ROUSSIN, M. R. **Analyses of Kombucha Ferments**. Fruita, Colorado: Michael R. Roussin, 1996.

SABOURAUD, S.; COPPÉRÉ, B.; ROUSSEAU, C.; TESTUD, F.; PULCE, C.; THOLLY, F.; BLANC, M.; CULOMA, F.; FACCHIN, A.; NINET, J.; CHAMBON, P.; MEDINA, B.; DESCOTES, J. Intoxication environnementale par le plomb liée à la consommation de boisson conservée dans une cruche artisanale en céramique vernissée. **Revue de Médecine Interne**, v. 30, n. 12, p. 1038-1043, 2009. DOI: 10.1016/j.revmed.2008.05.010.

SAIMAITI, A.; HUANG, S.-Y.; XIONG, R.-G.; WU, S.-X.; ZHOU, D.-D.; YANG, Z.-J.; LUO, M. Antioxidant Capacities and Polyphenol Contents of Kombucha Beverages Based on Vine Tea and Sweet Tea. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/antiox11091655.

SAMAD, A.; AZLAN, A.; ISMAIL, A. Therapeutic effects of vinegar: A review. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 56-61, 2016. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.03.001.

SANTOS, Y. M. A.; MOTA, M. M. A.; GOUVEIA, D. S.; DANTAS, R. L.; SILVA M. J. S.; MOREIRA, I. S. Caracterização química de kombucha a base de chás de hibisco e preto. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 8, n. 3, p. 32-37, 2018.

SENANAYAKE, S. N. Green tea extract: chemistry, antioxidant properties and food applications: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1529-1541, 2013. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.011.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 12, p. 7-19, 1999.

SIEVERS, M.; LANINI, C.; WEBER, A.; SCHULER-SCHMID, U.; TEUBER, M. Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 18, p. 590-594, 1995. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80420-0.

SILVA, B. C.; SILVA, F.; MICHELIN, D. C. Avaliação da qualidade de amostras de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) comercializadas no município de Araras/SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 245-250, 2013.

SILVA, E. P.; SANTOS, L. S.; RAPOSO, L. E. P.; SODRÉ, H. P.; BATISTA, M. O. Controle de qualidade de polpas industrializadas e artesanais de caju. **Conjecturas**, v. 22, n. 11, p. 29-43, 2022.

SILVA JÚNIOR, J. C.; MAGNANI, M.; DA COSTA, W. K. A.; MADRUGA, M. S.; OLEGÁRIO, L. S.; BORGES, G. D. S. C.; DE MAGALHÃES CORDEIRO, A. M. T. Traditional and flavored kombuchas with pitanga and umbu-caja pulps: Chemical properties, antioxidants, and bioactive compounds. **Food Bioscience**, v. 4, 2021. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101380.

SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; DE SOUZA, T. C. L.; CUNHA, E. C. E.; DE MORAES, M. R.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimization of the Preparation Conditions of Yerba Mate tea Beverage to Maximize Chlorogenic Acids Extraction. **Plant Foods For Human Nutrition**, v. 72, n. 2; p. 2019-223, 2017. DOI: 10.1007/s11130-017-0613-6.

SRINIVASAN, R.; SMOLINSKE, S.; GREEBAUM, D. Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea: is this beverage healthy or harmful? **Journal of General Internal Medicine**, v. 12, n. 10, p. 643-645, 1997. DOI: 10.1046/j.1525-1497.1997.07127.x.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Oxford: Butterworth Heinemann, 2013.

STEIGER, K. E.; STEINEGGER, E. Über den Teepilz. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 32, p. 133-154, 1957.

SUMBHATE, S.; NAYAK, S.; GOUPALE, D.; TIWARI, A.; JADON, R. S. Colorimetric Method for the Estimation of Ethanol in Alcoholic-Drinks. **Journal of Analytical Techniques**, v. 1, p. 1-6, 2012.

SUN, S. Y.; GONG, H. S.; JIANG, X. M.; ZHAO, Y. P. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behavior and wine aroma of cherry wines. **Food Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 15-23, 2014. DOI: 10.1016/j.fm.2014.05.007.

SUZUKI, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M. Health-promoting effects of green tea. **Proceedings of the Japan Academy, Ser. B**, v. 88, n. 3, p. 88-101, 2012. DOI: 10.2183/pjab.88.88.

TACHEDJIAN, G.; ALDUNATE, M.; BRADSHAW, C. S.; CONE, R. A. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 782-792, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.04.001.

TALEBI, M.; FRINK, L. A.; PATIL, R. A.; ARMSTRONG, D. W. Examination of the varied and changing ethanol content of commercial kombucha products. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 4062-4067, 2017. DOI: 10.1007/s12161-017-0980-5.

VAQUERO, M. R.; ALBERTO, M. R.; DE NADRA, M. M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, n. 2, p. 93-101, 2007. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.08.010.

VELIĆANSKI, A. S.; CVETKOVIĆ, D. D.; MARKOV, S. L. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, p. 8034-8042, 2013.

VELIĆANSKI, A. S.; CVETKOVIĆ, D. D.; MARKOV, S. L.; TUMBAS, V. T.; SAVATOVIĆ, S. M. Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm kombucha. **Acta Periodica Technologica**, v. 38, p. 165-172, 2007. DOI: 10.2298/APT0738165V.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SINGH, M.; RAO, P. V. L.; BHATTACHARYA, R.; KUMAR, P.; SUGENDRAN, K.; KUMAR, O.; PANT, S. C.; SINGH, R. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 293-299, 2000.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUJILLA, J.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018. DOI: 10.1111/1750-3841.14068.

VITAS, J. S.; MALBAŠA, R. V.; GRAHOVAC, J. A.; LONČAR, E. S. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 19, n. 1, p. 129-139, 2013. DOI 10.2298/CICEQ120205048V.

VOHRA, B.; FAZRY, S.; SAIRI, F.; OTHMAN, B. A., Effects of medium variation and fermentation time towards the pH level and ethanol content of Kombucha. In: THE 2018 UKM FST POSTGRADUATE COLLOQUIUM, 2019, Selangor, Malaysia. **Proceedings** [...]. Selangor, Malaysia: AIP Publishing, 2019.

WANG, K.; GAN, X.; TANG, X.; WANG, S.; TAN, H. Determination of D-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 3, p. 371-374, 2010. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.12.003.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with Kombucha "tea fungus." **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 2, p. 490-498, 2016. DOI: 10.1111/ijfs.13006.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; RANASINGHE, S. J.; WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017. DOI: 10.1111/jfpp.12752.

WHITE LABS. **Kombucha Scoby**: WLP600-HB. [S. l.], 2023. Disponível em: [https://www.whitelabs.com/yeast-single?id=175&type=YEAST&style\\_type=7](https://www.whitelabs.com/yeast-single?id=175&type=YEAST&style_type=7). Acesso em: 05 fev. 2023.

YANG, Z.; ZHOU, F.; JI, B.; LI, B.; LUO, Y.; YANG, L.; LI, T. Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 446-455, 2010. DOI: 10.1007/s12010-008-8361-6.

YAVARI, N.; ASSADI, M. M.; MOGHADAM, M. B.; LARIJANI, K. Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1788-1794, 2011.

YAVARI, N.; MAZAHARI, A.; LARIJANI, K.; MOGHADAM, M. B. Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 8, p. 3250-3256, 2010.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3., p. 508-514, 1954. DOI: 10.1042/bj0570508.