UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

JONATHAN FERREIRA TAVARES DA SILVEIRA

MÉTODOS DE MONITORAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE KOMBUCHA: UMA REVISÃO

JOÃO PESSOA
2024

JONATHAN FERREIRA TAVARES DA SILVEIRA

MÉTODOS DE MONITORAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE KOMBUCHA: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Química Industrial da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

JOÃO PESSOA

2024

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S587m Silveira, Jonathan Ferreira Tavares da.
Métodos de monitoramento do pocesso fermentativo de kombucha : uma revisão / Jonathan Ferreira Tavares da Silveira. - João Pessoa, 2024.
61 f. : il.

Orientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Camellia sinensis. 2. Fermentação acética. 3. Teor de etanol. 4. Açúcares redutores. I. Sousa, Carlos Alberto Bispo de. II. Título.

UFPB/CT CDU 66.01(043.2)

Elaborado por ROSANGELA GONCALVES PALMEIRA - CRB-CRB15/216

JONATHAN FERREIRA TAVARES DA SILVEIRA

MÉTODOS DE MONITORAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE KOMBUCHA: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação de Química Industrial da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovada em 25 de Novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA
Data: 26/11/2024 05:49:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

Orientador - Departamento de Engenharia Química/ Centro de Tecnologia/ UFPB

Documento assinado digitalmente
gov.br
ANA FLAVIA SANTOS COELHO
Data: 25/11/2024 15:58:14-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Ana Flávia Santos Coelho

Examinadora - Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
gov.br
LEANDERSON TULIO MARQUES LEMOS
Data: 25/11/2024 16:30:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr. Leanderson Túlio Marques Lemos

Examinador - Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de agradecer primeiro a Deus por esse trabalho e pela minha trajetória. Agradeço a minha mãe, Cláudia, por me fazer ser quem sou, e também ao restante de minha família por todo o apoio. Quero lembrar dos meus amigos que me acompanharam durante o curso, Natália Donato, Lucas Peres, e minha amiga Ruth, que nunca mediu esforços para me ajudar; aos amigos Railton, Yane e Thayana do LMMRQ e a todos os meus colegas do LPFD, Nathália, Thais, Yohan, e tantos outros.

Também gostaria de agradecer aos meus professores pela minha formação e por toda assistência, em especial aos professores Carlos Bispo e Sófacles. Acredito ser importante agradecer a todos que passam por nossa vida, que Deus nos deu a oportunidade de conhecer. Todos contribuem de alguma forma para quem somos, e seja pra bom ou mal, cabe a nós decidir.

RESUMO

Com o crescimento do mercado de bebidas funcionais, e a procura por alimentos considerados mais saudáveis, o Kombucha se apresenta como um possível substituto para refrigerantes, cervejas, champanhes, e outras bebidas populares, por ter gaseificação natural e sabor característico de um fermentado, porém sem os aditivos ou o teor de álcool considerados prejudiciais presentes nelas. Assim como para outros produtos fermentados, é indispensável o acompanhamento e controle do processo de fabricação do kombucha, não só para assegurar a qualidade e as características desejadas, mas também para manter os parâmetros de acordo com a legislação. No Brasil a Normativa 41, de 17 de setembro de 2019, é responsável por ditar esses parâmetros; no qual são determinados valores de pH, graduação alcoólica, acidez e pressão do recipiente. O seguinte estudo teve como objetivo discutir sobre os métodos utilizados na avaliação final e no monitoramento do processo fermentativo de kombucha; através de uma revisão narrativa da literatura científica. Foram analisados artigos coletados nas bases de dados da Scholar Google, SciELO, CAPES e PubMed, publicados entre os anos de 2017 e 2024. Na maioria dos estudos avaliados observou-se o uso de métodos clássicos, como titulação, e equipamentos relativamente baratos como potenciômetro e refratômetro. Porém, para certas análises, como a de teor alcoólico e de açúcares, também foram encontrados estudos que utilizaram técnicas mais robustas e mais caras, com o uso de HPLC, cromatógrafo a gás, espectrofotômetro, entre outros. Em síntese, a escolha da técnica a ser utilizada vai depender da exatidão e precisão necessárias, dos equipamentos disponíveis e da escala de produção.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, fermentação acética, teor de etanol, açúcares redutores.

ABSTRACT

With the growth of the functional beverage market and the demand for foods considered healthier, Kombucha is presented as a possible substitute for soft drinks, beers, champagnes, and other popular beverages, as it has natural carbonation and a characteristic flavor of a fermented product, but without the additives or alcohol considered harmful present in them. As with other fermented products, monitoring and controlling the kombucha manufacturing process is essential, not only to ensure the desired quality and characteristics, but also to maintain the parameters in accordance with the legislation. In Brazil, Normative 41, of September 17, 2019, is responsible for dictating these parameters; where pH values, alcohol content, acidity, and container pressure are determined. The following study aimed to discuss the methods used in the final evaluation and monitoring of the kombucha fermentation process; through a narrative review of the scientific literature. Articles collected from the Google Scholar, SciELO, CAPES and PubMed databases, published between 2017 and 2024, were analyzed. Most of the studies evaluated used classical methods, such as titration, and relatively inexpensive equipment such as potentiometers and refractometers. However, for certain analyses, such as alcohol and sugar content, studies were also found that used more robust and more expensive techniques, such as the use of HPLC, gas chromatograph, spectrophotometer, among others. In short, the choice of the technique to be used will depend on the accuracy and resolution, the equipment available and the scale of production.

Keywords: *Camellia sinensis*, acetic fermentation, ethanol content, reducing sugars.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Descrição da produção de kombucha.....17

Figura 3.2 - Principais rotas bioquímicas da fermentação de kombucha.....22

Tabela 3.1- Concentração de alguns compostos presentes em kombuchas ao longo do tempo de fermentação.....24

Figura 3.3 - Hidrólise de sacarose e Consumo de açúcar ao longo do tempo de fermentação de 3 kombuchas (F, G e H).....28

Tabela 3.2- Valores mínimo e máximo para parâmetros da kombucha de acordo com a normativa Nº 41, de 17 de Setembro de 2019.....29

Tabela 5.1 - Análises e métodos de alguns parâmetros monitorados na fermentação de kombucha.....31

Figura 5.1 -Variação no pH (a) e na acidez (b) em kombuchas de chá verde, oolong e preto, durante 15 dias de fermentação.....33

Figura 5.2 -Variação no pH (a) e na acidez (b) e na concentração de etanol (c) com a adição de menta de cozinha em kombuchas de chá oolong, ao longo do tempo de fermentação.....34

Figura 5.3 -Variação no pH (a) e na acidez (b) em função do valor do Brix do xarope de tâmara como fonte de açúcares para kombucha, durante 15 dias de fermentação.....35

Figura 5.4 - pH ao longo da fermentação de produtos de kombucha de chá preto feitos com diferentes proporções de açúcar mascavo e cascas e caroços de abacaxi.....36

Figura 5.5 - Teor de açúcar ao longo da fermentação de produtos de kombucha de chá preto feitos com diferentes proporções de açúcar mascavo e cascas e caroços de abacaxi.....36

Figura 5.6 -Variação no valor do Brix em kombuchas de chá verde, oolong e preto, durante 15 dias de fermentação.....37

Figura 5.7 - Concentração de etanol (v/v) em kombuchas armazenadas sob refrigeração e a temperatura ambiente, até 60 dias.....38

Figura 5.8 - valores de pH (A) e concentração de etanol (B) em 9 produtos de kombucha vendidos nos EUA.....39

Figura 5.9 - Teor de etanol (ABV) em diferentes kombuchas comerciais compradas nos períodos de Março de 2021 e Abril de 2022.....39

Figura 5.10 - pH e acidez titulável em kombuchas de flor de ervilha borboleta com e sem

adição de probiótico L. plantarum Dad-13, durante 8 dias.....40
Figura 5.11 - pH e acidez titulável em kombuchas de flor de ervilha borboleta com e sem adição de probiótico L. plantarum Dad-13, durante 28 dias de armazenamento.....41
Figura 5.12 - pH e Grau Brix em kombuchas de milho germinado, durante 18 dias de fermentação.....41
Figura 5.13 - Principais reações do método DNS.....43
Figura 5.14 - Principais reações do método de Antrona.....44
Figura 5.15 - Principais reações do método fenol-sulfúrico.....45
Figura 5.16 - Esquema dos equipamentos de HPLC.....46
Figura 5.17 - Esquema da cromatografia em camada delgada.....47
Figura 5.18 - Componentes de um ebuliômetro.....48
Figura 5.19 - Reações de oxidação do Etanol por NAD+.....49
Figura 5.20 - Esquema das reações no método Folin-Ciocalteu.....53
Figura 5.21 - Concentrações de açúcar medidas e as previstas no modelo com NIR.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAB - Acetic Acid Bacteria (Bactérias do ácido acético)

ABV - Álcool por volume

ACAO - Associação de Químicos Agrícolas Oficiais

ADH - Álcool desidrogenase

ALDH - Aldeído desidrogenase

AR - Açúcares redutores

CCD - Cromatografia em camada delgada

CG - Cromatografia gasosa

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FID - Flame Ionization Detector

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography

LAB - Lactic Acid Bacteria (Bactérias do ácido láctico)

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

NAD^+ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

MS - Mass spectrometry

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN 1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SST - Sólidos Solúveis Totais

SCOBY - Symbiotic culture of bacteria and yeast

TCA - Ciclo do ácido cítrico

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFC - Unidades formadoras de colônia

UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13

2 OBJETIVOS.....15

2.1 OBJETIVO GERAL..... 15

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....15

3 REVISÃO DE LITERATURA.....16

3.1 KOMBUCHA..... 16

3.1.1 Preparo da bebida.....17

3.1.2 Microrganismos envolvidos na fermentação..... 19

3.1.3 Interações microbianas e bioquímicas na fermentação.....22

3.1.4 Principais compostos químicos presentes.....23

3.1.5 Aspectos nutricionais e funcionais relatados..... 25

3.1.6 Segurança da bebida.....26

3.1.7 Parâmetros físico-químicos analisados na fermentação.....26

3.1.8 Legislação da bebida.....29

4 METODOLOGIA..... 30

5 TRABALHOS SELECIONADOS.....31

5.1 COMPORTAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO.....32

5.2 KOMBUCHAS COMERCIAIS..... 38

5.3 OUTRAS KOMBUCHAS..... 40

5.4 MÉTODOS DE ANÁLISE.....42

5.4.1 Acidez Total..... 42

5.4.2 Açúcares.....43

5.4.2.1 Métodos colorimetricos.....43

5.4.2.2 Métodos cromatograficos.....45

5.4.3 Teor alcoólico.....47

5.4.3.1 Ebuliometria.....47

5.4.3.2 Testes enzimaticos..... 49

5.4.3.3 Redução com dicromato de potássio.....50

5.4.3.4 Cromatografia.....*50*

5.4.3.5 Ressonância magnética nuclear.....*51*

5.4.4 pH.....51

5.4.5 Sólidos solúveis totais.....52

5.4.6 Análise de ácidos orgânicos e compostos fenólicos..... 52

5.4.7 Modelagem para acompanhamento dos parâmetros ao longo do processo..... 53

6 CONCLUSÕES.....56

REFERÊNCIAS.....57

1 INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada de origem asiática, preparada tradicionalmente com uma infusão de folhas de *Camellia sinensis* e açúcar (Gaggìa et al., 2019). Apesar de ser relativamente nova no ocidente, vem se destacando entre os consumidores de produtos funcionais, e estima-se que deve ganhar globalmente até 2025 um valor de mercado na ordem de 3,5 a 5 US$ bilhões (Ohwofasa et al., 2024). O kombucha também se apresenta como uma alternativa a outras bebidas como refrigerantes convencionais (Ariff et al., 2023) e cervejas, por ter carbonatação natural, porém com menor concentração de etanol, aditivos ou açúcar encontrados nessas bebidas.

Mesmo tendo um preparo simples, o processo de fabricação de kombucha pode ser influenciado por diversos fatores ambientais e de modo de produção; os produtos comerciais geralmente são fermentados naturalmente, usando a comunidade microbiana de produções anteriores, ao qual varia continuamente, e é difícil de controlar; às vezes cepas selecionadas são usadas para o controle de qualidade do produto (Kitwetcharoen et al., 2023). Muitos ingredientes também são adicionados para suplementar kombuchas, com o intuito de melhorar sabor, aroma, e aumentar o apelo funcional da bebida, essas adições acrescentam mais componentes e impactam diretamente nas propriedades físico-química da bebida (Kitwetcharoen et al., 2023).

Além de ajudar a manter os parâmetros de acordo com a legislação vigente, o monitoramento do processo fermentativo do kombucha é importante para avaliar a qualidade, e padronizar a produção da bebida (Ariff et al., 2023). O uso de técnicas e métodos que reduzem o tempo de análise e os gastos, principalmente a curto prazo, são indispensáveis para proporcionar uma produção em larga escala mais viável e eficiente. Para tal, podem ser feitas análises para controle da acidez, pH, concentração de açúcar; em que são utilizados os mais diversos métodos. O controle do processo produtivo em larga escala também apresenta outras dificuldades, como a temperatura e aeração, além da escolha do ponto ideal para interromper a fermentação; a bebida ainda precisa ter acidez e doçura específicas, cor e aroma agradáveis, além da gaseificação precisa.

Outra preocupação é com o etanol, que é um subproduto comum durante processos fermentativos, com níveis finais entre 0 e 3% (Jang et al., 2021). O fato de geralmente as kombuchas não serem pasteurizadas também contribui para aumento do etanol (Ivory et al., 2021), pois quando a bebida é saborizada, e armazenada, os carboidratos adicionados servem de substrato para que as leveduras presentes realizam fermentação alcoólica. A concentração

elevada de etanol é especialmente preocupante para mulheres grávidas, por poder ser prejudicial ao feto; e crianças pequenas, por não metabolizarem o etanol de forma eficiente, podendo ter sintomas de hipoglicemia, além de ter problemas devido a própria toxicidade do etanol (Jang et al., 2021).

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo discutir diferentes métodos e técnicas utilizados para mensurar os principais parâmetros analisados durante a produção de kombucha, visando também ressaltar a importância dessas análises e as implicações que essas variáveis têm para a qualidade final da bebida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento dos procedimentos analíticos e principais técnicas utilizadas no controle de qualidade e de processo na produção de kombucha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar busca nas bases de dados com os termos: *kombucha fermentation*, kombucha AND “pH”, “*ethanol*”, “*sugar”*;
- Ler títulos e resumos;
- Selecionar estudos relacionados com o tema no intervalo de 2017 a 2024;
- Analisar os métodos e técnicas utilizadas na análise de acidez, açúcares, etanol, pH e sólidos solúveis totais (SST).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 KOMBUCHA

O Kombucha é uma bebida fermentada um tanto doce e ácida, geralmente sem teor alcoólico significativo, e levemente gaseificada (Chandrakala et al., 2019), às vezes com sabor semelhante a uma bebida espumante. Surgida a mais de 2000 mil anos na região nordeste da China, se espalhou nos séculos seguintes para outros países asiáticos, e nas últimas décadas vem ganhando espaço no ocidente; muito por conta de seu apelo como bebida funcional, com supostos benefícios à saúde, relatados por seus consumidores (Coton et al., 2017; Chandrakala et al., 2019; Bortolomedi et al., 2022). No oriente também são dados outros nomes, como *kocha kinoko*, no Japão, *shenxian cu*, na China, *hongcha beoseo-tcha*, na Coreia, e *Cha-mug* na Tailândia (Kitwetcharoen et al., 2023).

A bebida é normalmente preparada pela fermentação de folhas de chá preto ou verde (*Camellia sinensis*), mas outras espécies já foram exploradas, como o caruru-azedo (*Hibiscus sabdariffa*), casca de mangostim (*Garcinia mangostana*), folhas de graviola, acácia-branca (*Moringa oleifera*), murta-dos-jardins (*Murraya paniculata*) (Primiani et al., 2018), açafrão-da-terra (*Curcuma longa*) (Zubaidah et al., 2021); folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) (Jiménez et al., 2018); açafrão Javanês (*Curcuma xanthorrhiza*) (Zubaidah et al., 2022), folha de erva de mangue (*Rhizophora mucronata*) (Hardoko et al., 2020), folhas de rooibos (*Aspalathus linearis*) (Gaggìa et al., 2019), flor de ervilha de borboleta (*Clitoria ternatea L.*) (Majid et al., 2023), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e verbena-limão (*Lippia citriodora*) (Valiyan et al., 2021), erva mate (Tsuru et al., 2021), entre outras espécies. Ao chá acrescenta-se normalmente sacarose, mas também já foi feito o uso de açúcar de coco, melaço, mel, xarope de tâmaras, açúcar de palmeira (Bortolomedi et al., 2022), cascas e caroços de abacaxi (Phung et al., 2023), e mel de cacau (Yuliana et al., 2023).

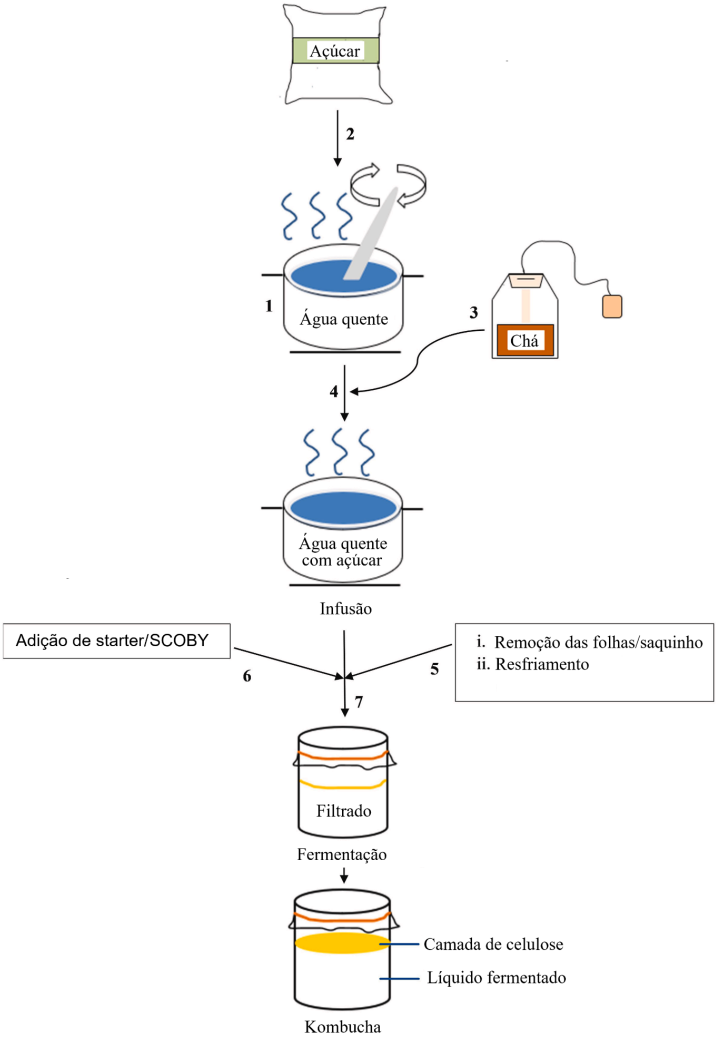
A fermentação do kombucha envolve processos complexos, e varia de acordo com a composição microbiana da cultura inicial, e das condições ambientais (Santos et al., 2023); apesar disso, as principais rotas bioquímicas são conhecidas, com a produção de etanol pelas leveduras, e a formação de ácidos orgânicos pelas bactérias presentes. Na superfície da bebida também se forma uma película de celulose contendo microrganismos chamada de SCOBY, abreviação em inglês para: *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*, que significa cultura simbiótica de bactérias e leveduras; a cada fermentação um nova camada é formada, se sobrepondo a anterior (Oliveira et al., 2023).

Alguns trabalhos também já utilizaram o kombucha como inóculo para produção de outras bebidas, como Cerveja (Silva et al., 2022), *kombucha cascara*, que utiliza cascas secas de cereja de café (Muzaifa et al., 2021; Sales et al., 2023) e leite fermentado (Kanurić et al., 2022).

3.1.1 Preparo da bebida

Os ingredientes e as quantidades utilizadas no preparo da kombucha podem variar de acordo com as características e sabor da bebida que se deseja obter (Kim; Adhikari, 2020), mas tradicionalmente são usadas folhas de *Camellia sinensis* e uma fonte de açúcar (Freitas et al, 2022; Miranda et al., 2022); na Figura 3.1 apresenta um esquema do preparo da bebida.

Figura 3.1 - Descrição da produção de kombucha.



Fonte: Adaptado de Ariff et al. (2023).

Primeiro é feita adição de açúcar em água quente ou fervente, normalmente entre 5% a 15% (m/v) (Freitas et al, 2022), depois as folhas ou um saquinho contendo elas são colocadas na água quente para infusão, que frequentemente varia de 5-10 minutos, (Freitas et al, 2022). Após ser feita a filtração, é necessário esperar o líquido esfriar até que atinja a temperatura ambiente (Kim; Adhikari, 2020), pois os microrganismos podem ser afetados pela diferença de temperatura. A inoculação é feita com parte do volume de uma kombucha já fermentada (10% v/v) (Freitas et al, 2022; Phung et al., 2023), que recebe o nome de starter de kombucha; também pode ser adicionado um SCOBY ou parte dele (Santos et al., 2023); depois disso, o recipiente deve ser coberto com um tecido para evitar a entrada de insetos (Kim; Adhikari, 2020).

Normalmente entre 6 e 10 dias a bebida começa ter um cheiro característico de fermentado, e bolhas de gás surgem devido à formação de gás carbônico (Chandrakala et al., 2019). Com o passar dos dias o sabor passa de doce para levemente ácido, como uma sidra, e continua se tornando mais azedo até um sabor semelhante ao vinagre (Chandrakala et al., 2019). O intervalo mais comum para o consumo ou armazenamento é por volta de 8 a 15 dias; o processo deve ocorrer sem incidência direta de luz e preferencialmente em temperaturas entre 18 a 28°C (Santos et al., 2023). Locais de temperatura mais elevada exigem menos tempo de fermentação, enquanto temperaturas menores demandam mais tempo (Chandrakala et al., 2019). Durante todo o processo é necessário ter muito cuidado para evitar contaminação por bactérias e fungos nocivos; os materiais utilizados devem ser higienizados e se possível esterilizados (Chandrakala et al., 2019; Ariff et al., 2023).

O tipo de chá e o tempo de infusão também influenciam diretamente no sabor final; as folhas de chá fornecem nitrogênio, purinas e minerais, que são nutrientes importantes. O chá preto tem mais nitrogênio e purina do que o chá verde e dá um sabor mais suave; enquanto taninos extras no chá verde dão a kombucha um gosto levemente amargo e adstringente (Chandrakala et al., 2019). Dartora et al. (2023) fez um estudo sensorial de kombucha de chá verde, e relatou que com 4 dias de fermentação a infusão apresentou aromas de ervas, grama e cogumelo, o que estava de acordo com o perfil de compostos voláteis analisados na bebida, enquanto a fermentação entre 7 e 10 dias produziu um aspecto relacionado álcoois superiores, o que foi observado por consumidores na análise sensorial realizada.

Antes de consumir ou armazenar o kombucha é possível fazer a saborização da bebida; esse processo consiste em utilizar especiarias, frutas, plantas e outros ingredientes com intuito de dar cor, aroma e sabor específicos; essa é uma prática comum em países como Brasil e os Estados Unidos, tanto na produção artesanal quanto comercial da bebida

(Bortolomedi et al., 2022). Nos EUA sabores comuns de kombuchas comerciais costumam ser gengibre, limão siciliano, mirtilo, framboesa, morango, limão-taiti, hortelã e manga; a maioria dos produtos tem sabores complexos com vários ingredientes; algumas dessas bebida adicionam o suco da fruta, já outros utilizam aromatizantes aromatizantes (Kim; Adhikari, 2020).

O açúcar residual ou adicionado na saborização, acaba sendo o substrato para uma segunda fermentação, dessa vez anaeróbica (Rossini; Bogsan, 2023), que pode durar de três a quatro dias, e tem o intuito de aumentar a carbonatação natural. Em escala industrial, a carbonatação geralmente é forçada com cilindro de CO_2, já que além de produzir gás a segunda fermentação também produz álcool, o que pode fazer com que a bebida saia dos limites da legislação (Talebi et al., 2017; Bortolomedi et al., 2022).

Após a saborização, também pode ser feito o armazenamento direto em temperatura baixa ou a pasteurização, impedindo o consumo total de açúcares, residuais ou adicionados, o que pode deixar o sabor mais doce. Muitos produtores não pasteurizam suas kombuchas, alegando que manter os micróbios naturais da bebida, traria função probiótica à bebida; algumas poucas empresas optam por pasteurizam seus produtos e inoculam com probióticos conhecidos, como *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus rhamnosus*, entre outros (Kim; Adhikari, 2020).

3.1.2 Microrganismos envolvidos na fermentação

Existe considerável variação nas composições microbianas de kombuchas (Sales et al., 2023), apesar disso, estudos indicam a presença principalmente de gêneros de bactérias do ácido-acéticas (AAB), leveduras e bactérias do ácido-lácticas (LAB) (Barbosa et al., 2021). As populações das espécies variam ao longo do processo de fermentação; além disso, escolhas como o tipo de chá e fonte de açúcar têm um grande impacto na dominância das espécies bacterianas e fúngicas ao longo do processo (Coton et al., 2017; Gaggìa et al., 2019).

Marsh et al. (2014) conduziram um estudo em culturas de kombucha provenientes do Canadá (2), Reino Unido (1), Estados Unidos (1) e Irlanda (1), e constataram a presença majoritária de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (>85%), com vestígios de *Acetobacter* (<2%); também foi constatado a presença do gênero Lactobacilo (até 30%); em relação às leveduras, o estudo apontou *Zygosaccharomyces* (> 95%) como o gênero dominante.

Outros estudos também citaram *Zygosaccharomyces* (Wang et al., 2023) como dominante, enquanto que em muitos casos a maior população de procariontes pertenceu ao

gênero *Komagataeibacter* (Majid et al., 2023; Sales et al., 2023; Wang et al., 2023), que recentemente passou a incluir muitas espécies que antes eram classificadas como *Gluconacetobacter e Acetobacter* (Barbosa et al., 2021). É interessante que a presença de *Acetobacter* foi associada a um ambiente altamente alcoólico, devido a sua capacidade de oxidação do etanol, já o gênero *Komagataeibacter* utiliza tanto frutose, glicose e sacarose como o etanol durante o metabolismo (Phung et al., 2023).

Villarreal-Soto et al (2020) analisaram kombuchas preparadas com culturas adquiridas na França, e relataram a presença predominante das bactérias *Komagataeibacter rhaeticus* e *Komagataeibacter xylinus,* além de identificar outras espécies como *komagataeibacter europaeus, komagataeibacter intermedius*, *Gluconacetobacter* sp. SXCC1, *Gluconobacter oxydans, A. malorum, A. pasteurianus, A. pomorum* e *A. tropicalis*; já em relação ao conteúdo fúngico foram identificadas predominantementes as especies *Brettanomyces bruxellensis, Schizosaccharomyces pombe*.

Yang et al. (2022) investigaram a cultura de nove produtos de kombucha dos EUA, e relataram que a maioria era dominada pelo probiótico *Bacillus coagulans* ou bactérias capazes de realizar fermentação, incluindo *Lactobacillus nagelii*, *Gluconacetobacter*, espécies de *Gluconobacter* e *Komagataeibacter*; já a composição fúngica foi caracterizada pela predominância de leveduras fermentadoras, incluindo espécies de *Brettanomyces* e *Cyberlindnera jadinii*.

Ainda em relação a amostras nos EUA, Mendelson et al. (2023) examinaram a microbiota de uma kombucha comercial da área de Washington, D.C., e relataram que a comunidade bacteriana consistia principalmente (>80%) de Bacillota, com vários gêneros dentro da família Lactobacillaceae como os membros predominantes; o outro filo principal, com 12% de abundância, foi o Pseudomonadota, que consistia em vários gêneros de bactérias de ácido acético, incluindo *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter*. Em relação aos fungos, o kombucha era composto principalmente de espécies do gênero *Dekkera* e da ordem *Sordariales*. As espécies indentificadas incluíam: *Calycina discreta*, *Candida ethanolica*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia kudriavzevii, Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora vineae* e *Ramularia robusta*.

Estudando a fermentação com cultura inicial da Nova Zelândia, Wang et al. (2023) identificaram uma maior concentração de cepas de *Komagataeibacter rhaeticus*; e de leveduras *Debaryomyces prosopidis* e *Zygosaccharomyces lentus*.

Phung et al. (2023) estudaram a composição de kombucha preparada com cultura inicial comprada na Tailândia, após 7 dias de fermentação. A análise da comunidade

microbiana revelou que *Acetobacter* (>82%) e *Komagataeibacter* (7,35%) foram os gêneros predominantes; outras bactérias incluíram *Bacillus* (1,36%), *Bosea*, *Blautia*, *Cellvibrio* e *Faecalibacterium* (valores até 0,32%). *O Bacillus* é responsável por produzir ácido lático e têm sido utilizados como probióticos em vários produtos alimentares e bebidas. *Blautia* sp. e *Faecalibacterium* sp. são conhecidos como produtores de ácido acético, ácido butírico e ácidos graxos de cadeia curta. *Dekkera* (>89%) foi a levedura predominante, outros fungos detectados em abundância relativamente baixa, foram *Cloridium*, *Archaeorhizomyces*, *Trichoderma*, *Rhizospogon*, *Saitozyma* e *Suillus* (valores até 0,74%) .A parte são fungos que se associam a plantas, encontrados suas superfícies na rizosfera; *Trichoderma* é associada a produção de enzimas celulolíticas e *Saitozyma* são conhecidas por produzir ácido glucônico; a presença relativamente pequena desses fungos, provavelmente não desempenha papel importante na fermentação da kombucha.

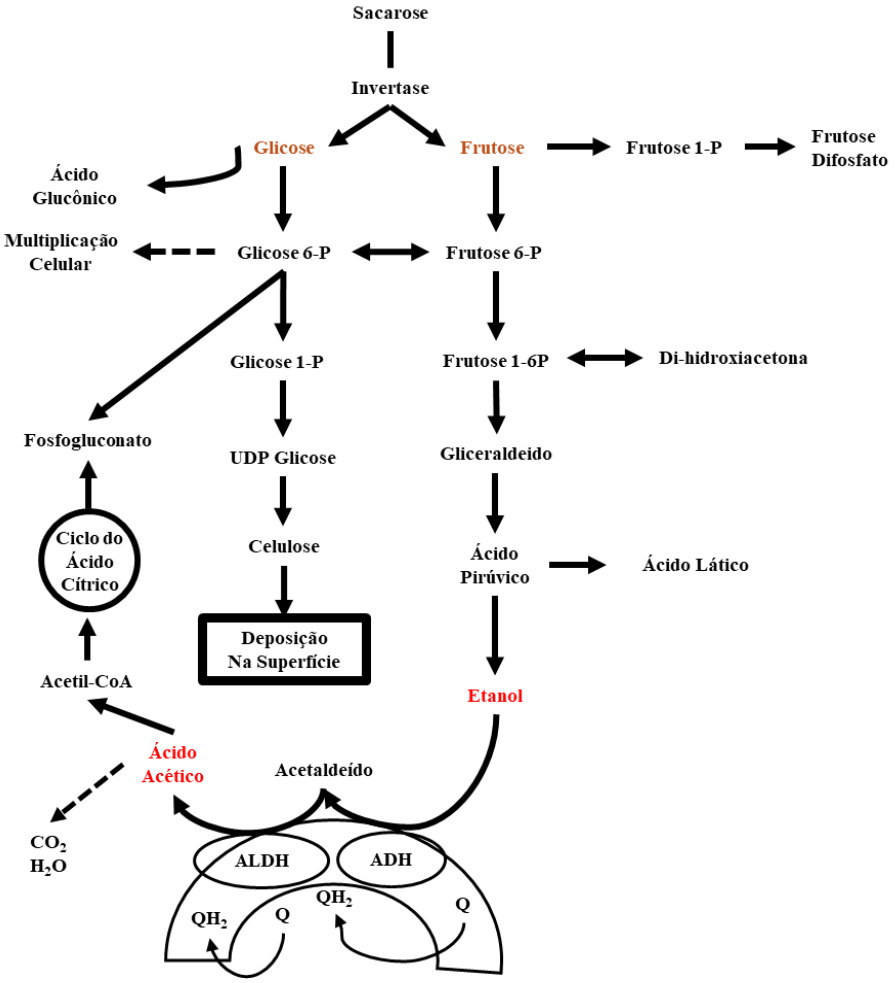
Sales et al. (2023) analisaram uma kombucha de chá preto, inoculada com uma cultura fornecida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); em que foi identificado o gênero *Komagateibacter* como dominante (>40%) entre os procariontes, além da presença de organismos *Staphylococcus* (24%), *Enterobacteriaceae* (18%), *Latilactobacillus* (15%) e *Pediococo* (0,4%). A família Enterobacteriaceae possui um grupo muito grande de microrganismos; alguns desses organismos estão envolvidos na deterioração de alimentos, outros são patógenos, e outros indicadores de contaminação; baseado em estudos anteriores Sales et al. (2023) consideraram que a bebida era microbiologicamente segura em relação à contaminação por Enterobactérias, considerando a temperatura próxima a 100ºC a que foi submetida no preparo.

Sales et al. (2023) examinaram ainda a microbiota de kombuchas cascaras, em que também foi relatada presença majoritária de bactérias do gênero *Komagateibacter*, *K. rhaeticus* (>60%), *K. europaeus* (15-36%), *K. intermedius* (0.2%), além de *Gluconacetobacter entanii* (0.5%), *Latilactobacillus* e *Pediococcus* (0.08–0.9%), *Enterobacteriaceae* (0.06–0.6%), e *Staphylococcus* (1.3%). As espécies *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus* que foram identificados nas kombuchas de chá preto e cascaras são cepas de Staphylococcus spp. coagulase-negativas, encontradas em produtos alimentares fermentados, e frequentemente reconhecidas como microbiota não infecciosa. Em relação ao conteúdo fúngico, o gênero de levedura predominante foi o *Pichia* (>90%) em todas as kombuchas; leveduras *Brettanomyces bruxellensis* (5%) também estiveram presentes, além de organismos do gênero *Saccharomyces* (-2%).

3.1.3 Interações microbianas e bioquímicas na fermentação

A fermentação da kombucha é um processo complexo, e envolve principalmente a atividade de leveduras e bactérias ácido-acéticas; no qual as principais rotas bioquímicas são conhecidas, a fermentação alcoólica e acética (Sanwal et al., 2023); na Figura 3.2, é mostrado um esquema desses processos.

Figura 3.2 - Principais rotas bioquímicas da fermentação de kombucha.



Fonte: Adaptado de Barbosa (2020).

Os açúcares são a principal fonte de carbono para que os microrganismos completem seus processos metabólicos, as leveduras do meio produzem enzimas, como a invertase, que promovem a hidrólise da sacarose, formando glicose e frutose (Barbosa, 2020). Alguns conjuntos de bactérias acéticas vão consumir a glicose e transformá-la em celulose, esses organismos são estritamente aeróbios, por isso a formação das fibras se dá na superfície do

líquido; esse processo é considerado um mecanismo tanto de defesa contra o meio externo, quando uma maneira de ter mais oxigênio disponível (Balasubramanian; Praharaj, 2023); a glicose também é transformada em ácido Glucônico e Glucurônico (Barbosa, 2020; Ariff et al., 2023).

As leveduras podem obter energia tanto pela respiração celular, quanto pela fermentação; elas têm preferência pela frutose, e na via fermentativa eles produzem etanol e gás carbônico; o ácido pirúvico intermediário desse processo também pode ser metabolizado por LAB para produção de Ácido Lático. Posteriormente, o etanol é oxidado pela ação de enzima álcool desidrogenase (ADH), que converte etanol em acetaldeído, removendo átomos de hidrogênio; enquanto a aldeído desidrogenase (ALDH) é usadas pelas AAB para transformar o acetaldeído em ácido acético (Barbosa, 2020; Freitas et al, 2022).

Ao longo da fermentação, quando os níveis de etanol se tornam muito baixo, o acetato acumulado pode ser utilizado como fonte de carbono e energia, através da enzima acetil-CoA, no ciclo do ácido cítrico (TCA), esse processo é denominado super oxidação do acetato (Barbosa, 2020).

3.1.4 Principais compostos químicos presentes

Na literatura foram relatadas diversas substâncias presentes em fermentados de kombucha, incluindo ácidos orgânicos como acético, glucônico, glucurônico e láctico; açúcares como frutose, glicose e sacarose; polifenóis vindos do chá; vitaminas (B1, B2, B6, B12 e C) (Chandrakala et al., 2019; Freitas et al, 2022; Sanwal et al., 2023); aminas biogênicas, aminoácidos, purinas, lipídios, algumas enzimas hidrolíticas, etanol, ânions, minerais e dióxido de carbono (Chandrakala et al., 2019; Villarreal-Soto et al., 2020; Sanwal et al., 2023).

A composição e as quantidades dos compostos presentes na kombucha podem variar de acordo com as condições do processo fermentativo, da cultura inicial, do tipo de chá, da fonte de sacarose, e das quantidades dos ingredientes (Talebi et al., 2017; Bortolomedi et al., 2022; Yang et al., 2022; Rossini; Bogsan, 2023; Santos et al., 2023). Um exemplo disso seria o teor de ácidos orgânicos em termos de ácido glucurônico, glucônico, ascórbico, acético e ácido succínico, que se mostra maior quando utilizado o chá preto, quando comparado com chá oolong e chá verde (Kaewkod et al., 2019).

Outra fato constatado é que kombuchas preparadas com folhas de chá verde apresentaram maior produção de celulose, provavelmente por não passarem pelo mesmo

processo de oxidação que as folhas de chá preto e outros tipos de chás, tendo assim um maior conteúdo de compostos bioativos com atividade contra bactérias contaminantes, permitindo que as AAB produzam mais celulose, já que sua atividade não é perturbada pelos micróbios invasores (Primiani et al, 2018). Alguns estudos também se propuseram a controlar a produção de metabólitos a partir da modificação da população microbiana, melhorando a produção de ácido glucurônico, por exemplo (Rossini; Bogsan, 2023). Na Tabela 1 são mostrados as quantidades de alguns compostos presentes na kombucha em diferentes tempos de fermentação, e concentrações de sacarose inicial.

Tabela 3.1- Concentração de alguns compostos presentes em kombuchas ao longo do tempo de fermentação.

	Composto	**Composição média**	**Sacarose inicial**	**Tempo (dias)**
Ácidos orgânicos	Ácido acético	5,6 g/L	70 g/L	15
	Ácido acético	8,36 g/L	100 g/L	18
	Ácido acético	11 g/L	100 g/L	30
	Ácido glucônico	39 g/L	100 g/L	60
	Ácido glucurônico	0,0160 g/L	70 g/L	21
	Ácido lático	0,18 g/L	100 g/L	18
Vitaminas	B1	0,74 mg/mL	70 g/L	15
	B2	8 mg/100mL	70 g/L	10
	B6	0,52 mg/mL	70 g/L	15
	B12	0,84 mg/mL	70 g/L	15
	C	25 mg/mL	70 g/L	10
Compostos gerais	Etanol	5,5 g/L	100 g/L	20
	Proteínas	3 mg/mL	100 g/L	12
	Polifenóis do chá	7,8 Mm GAE	100 g/L	15
Minerais	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn		70 g/L	15
Ânions	F^-, Cl^-, Br^-, I^-, NO_3^-, HPO_3^-, SO_4^-		100 g/L	7

Fonte: Adaptado de Santos (2023)

O tempo e as condições de armazenamento também podem afetar o perfil de kombuchas; Torre et al. (2021), por exemplo, analisaram kombuchas caseiras de chá preto

armazenadas sob refrigeração, e relataram que a partir do 4º mês houve uma redução significativa do conteúdo de polifenóis.

3.1.5 Aspectos nutricionais e funcionais relatados

As substâncias presentes na kombucha são associadas a vários benefícios, o ácido acético ajuda no combate a hipertensão; os ácidos glucônico e lático estão associados a uma melhor saúde do cólon; as catequinas, teaflavinas e outros polifenóis têm a capacidade de eliminar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Santos et al., 2023); as catequinas também são associadas a regulação do fluxo sanguíneo, absorção intestinal, efeito antidiabético; enquanto as teaflavinas, a atividade anticâncer, regulação da microbiota intestinal, combate a síndromes anti-metabólicas e atividade antiviral (Bortolomedi et al., 2022). O ácido glucurônico desempenha um papel importante na desintoxicação do fígado e no processo associado à excreção de produtos químicos exógenos (Kaewkod et al., 2019); já as vitaminas presentes como a C (ácido ascórbico) são co-fatores em múltiplas vias bioquímicas importantes (Bortolomedi et al., 2022).

Em relação a bebida, tem-se uma carência de pesquisas acompanhando os efeitos e os benefícios do consumo contínuo do kombucha em humanos (Mendelson et al., 2023); porém, existem diversos estudos que se propuseram a investigar a atividade biológica, relatando atividade antioxidante (Gaggìa et al., 2019; Kaewkod et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Tanticharakunsiri et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2020; Torre et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Tsuru et al., 2021; Mohsin et al., 2022; Choi et al., 2023; Phung et al., 2023; Kim et al., 2023; Oliveira et al., 2023; Yuliana et al., 2023; Khazi et al., 2024), anti-inflamatória (Marzban et al., 2015; Villarreal-Soto et al., 2020), anticancerígena (Kaewkod et al., 2019; Villarreal-Soto et al., 2020), antimicrobiana (Primiani et al, 2018; Kaewkod et al., 2019; Brewer et al., 2021; Valiyan et al., 2021; Zubaidah et al., 2021; Jarrell et al., 2022; Mohsin et al., 2022: Phung et al., 2023; Khazi et al., 2024), anti-glicêmica (Hardoko et al., 2020; Mendelson et al., 2023; Oliveira et al., 2023) e hepatoprotetora (Choi et al., 2023).

Marzban et al. (2015) testaram o efeito terapêutico do chá de kombucha em 18 camundongos fêmeas submetidos a encefalomielite autoimune experimental, que é um modelo para estudo de esclerose múltipla; o consumo de chá demonstrou melhorar a gravidade da encefalomielite e atenuar a infiltração de células inflamatórias no sistema nervoso central dos indivíduos.

Oliveira et al. (2023) relataram que a bebida apresentou capacidade de inibitória frente a enzima α-glucosidase, que participa da digestão de oligossacarídeos, proporcionando potencial benefício para indivíduos com diabetes; já Mendelson et al. (2023) realizaram um estudo clínico em adultos com diabetes mellitus tipo II; os participantes (*n*- 12) foram instruídos a consumir um produto de kombucha ou um controle placebo (cada 240 mL) por de 4 semanas. O Kombucha reduziu os níveis médios de glicose no sangue em jejum em comparação com a linha de base, enquanto o placebo não foi associado a uma alteração estatisticamente significativa.

3.1.6 Segurança da bebida

Do ponto de vista alimentar o kombucha é geralmente considerado seguro se for preparado e armazenado corretamente, e se consumido com moderação; em condições erradas a bebida pode oferecer riscos; durante o preparo, patógenos podem contaminar a bebida; se mal condicionada o baixo nível de pH pode causar corrosão do recipiente (Kitwetcharoen et al., 2023). O consumo excessivo também pode causar acidose láctica, um acúmulo de ácido no sangue, ao qual pessoas com sistemas imunológicos comprometidos são mais suscetíveis; além de que a presença de etanol em kombuchas pode ser preocupante para mulheres grávidas e crianças (Kitwetcharoen et al., 2023).

3.1.7 Parâmetros físico-químicos analisados na fermentação

Diversas são as variáveis que podem influenciar a fermentação e consequentemente a qualidade final da kombucha. Alguns parâmetros podem ser analisados para acompanhar o processo fermentativo, e determinar o melhor momento para o consumo ou armazenamento da bebida. Durante a fermentação do kombucha, à medida que os dias passam, mais ácidos orgânicos são formados (ácido acético, ácido glucônico, ácido glucurônico e ácido láctico), o que faz com que a acidez total aumente. A acidez é um fator muito importante para avaliar a qualidade da bebida, valores muito altos podem deixar o sabor avinagrado, enquanto uma baixa acidez pode significar que a bebida ainda não foi fermentada o suficiente (Chandrakala et al., 2019).

A formação de ácidos orgânicos durante o processo também causa a diminuição dos valores de pH. No início da fermentação, em especial nos três primeiros dias, o pH diminui rapidamente, devido ao metabolismo inicial da cultura inoculada, após esse período a redução

se torna mais lenta e gradual (Bortolomedi et al., 2022). Em torno de 7 a 10 dias a bebida já se encontra levemente carbonatada e ácida, com pH abaixo de 4 (Oliveira et al., 2023); por um lado, um valor de pH baixo pode contribuir para manter a bioatividade dos polifenóis, e para a redução de microrganismos indesejados, que possam competir pelos nutrientes, e liberar toxinas (Bortolomedi et al., 2022); porém, valores muito baixos podem prejudicar o crescimento das espécies presentes na kombucha, além de serem prejudiciais ao estômago humano (Chandrakala et al., 2019; Dartora et al., 2023).

O pH pode ser influenciado pela composição e pelo tipo de chá, devido a diferenças na quantidade de compostos polifenóis, como catequinas, o que afeta a atividade dos microrganismos na decomposição da sacarose, que é metabolizada até a formação dos ácidos; na literatura a faixa considerada ideal indicada é de 2,7 a 3,2 (Primiani et al, 2018).

A temperatura é outro parâmetro a ser monitorado durante a produção de kombucha, valores na faixa de 22 a 30ºC, favorecem a propagação de AAB e a formação dos compostos desejáveis como o ácido glucônico; abaixo de 18°C, por exemplo, o processo fermentativo fica consideravelmente mais lento (Chandrakala et al., 2019). Temperaturas mais elevadas favorecem a produção de ácido acético, aumentando a inibição da via da glicólise, e favorecendo a produção de ácido glucurônico, que é um metabólito importante por conta das características sensoriais que a traz a bebida (Bortolomedi et al., 2022). Apesar disso, o excesso de acidez é considerado um fator sensorial desagradavel, e em temperaturas acima de 30 °C a bebida pode se tornar viscosa (Chandrakala et al., 2019).

Ao longo da fermentação, o etanol é convertido em ácidos orgânicos, e sua concentração passa a diminuir; altas concentrações de álcool muitas vezes não são desejadas na kombucha, devido ao suposto apelo funcional da bebida (Barbosa, 2020; Freitas et al, 2022). Após o envase do kombucha, o fluxo de oxigênio é cortado, o que favorece a fermentação alcoólica, produzindo mais etanol. Para reduzir esse teor final, podem ser usados equipamentos de extração de álcool; a bebida pode ser diluída ou a fermentação pode ser cuidadosamente monitorada para retirada da bebida com um valor inferior (Ariff et al., 2023), e pasteurizada antes do envase.

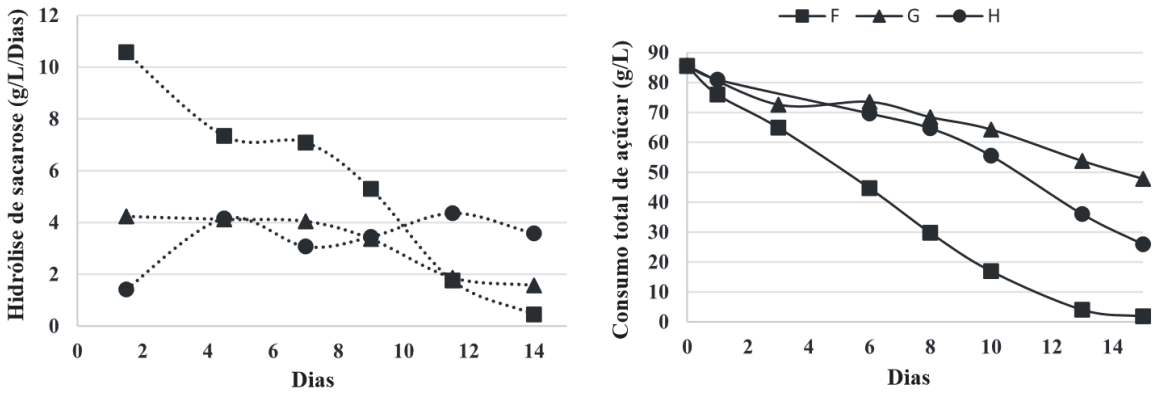
Nos processos bioquímicos que ocorrem na kombucha, os açúcares são transformados em diversos compostos, além de serem acumulados no exterior das células como fibras de celulose; por tudo isso espera-se que o nível de açúcar caia com o passar dos dias (Primiani et al., 2018). Carboidratos ou açúcares são polihidroxialdeídos, poliidroxicetonas e seus derivados compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio, geralmente na proporção $[C(H_2O)]_n$. São classificados de acordo com o número de unidades estruturais, como monossacarídeos (1

unidade), como glicose e frutose; dissacarídeos (2), como sacarose; além de oligossacarídeos (2-10) e polissacarídeos, que possuem cadeias mais longas (Campbell-Platt, 2015). Assim como a sacarose, durante a fermentação os polissacarídeos podem ser hidrolisados produzindo formas de menor peso molecular (Zoecklein et al., 1999).

A concentração inicial de sacarose no início da fermentação é proporcional à concentração final do ácido lático e dos ácidos totais; porém, níveis de açúcar acima de 12,5% podem apresentar redução na quantidade final de ácido glucurônico; além disso, altas quantidades iniciais de açúcar também podem causar estresse osmótico que suprime o crescimento de microrganismos (Bortolomedi et al., 2022). O controle da quantidade de açúcar residual na fermentação também é importante para estimar o dulçor da bebida, e estimar o nível de gaseificação natural após o envase, caso o kombucha não seja pasteurizado.

A Figura 3.3 mostra a evolução na taxa de hidrólise (esquerda) e o consumo de açúcar durante 15 dias de fermentação, a 25 ºC, em três diferentes kombuchas (F, G e H) preparadas com chá preto e nas mesmas condições; as diferença nos perfis provavelmente se devem a composição microbiana das culturas inoculadas, que são diferentes entre si, o que altera o tempo de processo e a concentração final dos metabólitos (Villarreal-Soto et al., 2020).

Figura 3.3 - Hidrólise de sacarose e Consumo de açúcar ao longo do tempo de fermentação de 3 kombuchas (F, G e H).



Fonte: Adaptado de Villarreal-Soto (2020)

Medições de Sólidos Solúveis Totais (SST) também são usadas para monitorar o progresso da fermentação, já que à medida que o açúcar vai sendo consumido pelas leveduras e os ácidos vão sendo formados pelas AAB, o valor desse parâmetro vai mudando. Além de açúcares, esses sólidos incluem pigmentos, ácidos, e uma série de substâncias; mas no geral

esse parâmetro fornece uma boa aproximação dos níveis de açúcar e do curso da fermentação (Zoecklein et al., 1999).

3.1.8 Legislação da bebida

Países como Canadá e os Estados Unidos possuem regulamentos e orientações para a fabricação de kombucha e teor alcoólico máximo permitido, no entanto, apenas o Brasil tem legislação específica (Dartora et al., 2023; Rossini; Bogsan, 2023). A instrução normativa Nº 41, de 17 de Setembro de 2019 estabelece o padrão de identidade e qualidade da Kombucha em todo o território nacional.

De acordo com a normativa, é considerado Kombucha Original, àquela não alcoólica e preparada através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia, realizada por cultura simbiótica da bactéria e leveduras (SCOBY), no mosto obtido da infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares. É possível também fazer kombuchas diferentes, com o uso de outras espécies vegetais antes da fermentação com *camellia sinensis*; adição de frutas, mel, melado, aditivos e aromatizantes naturais (Brasil, 2019). Na tabela 3.2 são mostrados os intervalos dos parâmetros analíticos determinados pela normativa.

Tabela 3.2- Valores mínimo e máximo para parâmetros da kombucha de acordo com a normativa Nº 41, de 17 de Setembro de 2019.

Parâmetro	**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 CO2	1,1	3,9

Fonte: Brasil (2019).

4 METODOLOGIA

As revisões narrativas são altamente úteis para divulgação de conhecimentos específicos e pesquisas recentes. Embora uma revisão sistemática, que descreve o passo a passo da obtenção dos dados e suas quantidades, muitas vezes seja considerada um método mais apropriado para sintetizar descobertas de estudos semelhantes, uma revisão narrativa pode discutir uma variedade de estudos, relatar avanços e fornecer uma visão mais ampla dos assuntos (Sukhera, 2022). Além disso, podem ser úteis para explorar tópicos pouco pesquisados e sintetizar com detalhes as evidências científicas (Sukhera, 2022).

O presente estudo se propõe a ser uma revisão narrativa, desenvolvendo os assuntos e as metodologias encontradas nos trabalhos selecionados (Cavalcante; Oliveira, 2020). Por ser narrativa, não foram registrados dados quantitativos acerca da produção analisada (Cavalcante; Oliveira, 2020), porém, pela forma com foi feita a seleção de artigos, é possível encontrar a maioria deles nas primeiras páginas das fontes de dados.

Para a pesquisa foram utilizadas as páginas de busca do Periódicos CAPES, PubMed e Scholar Google. Os termos empregados foram: *kombucha fermentation*, “kombucha” AND “pH”, “kombucha” AND “ethanol”, “kombucha” AND “sugar”; foi feita a seleção de artigo entre os anos de 2017 e 2023 que apresentavam estudos e quantificação de parâmetros físico-químicos de kombuchas, validações de métodos analiticos em kombuchas e analises de kombuchas comerciais. Para a discussão dos assuntos abordados e das metodologias analíticas também foram usadas dissertações, teses e capítulos de livros.

5 TRABALHOS SELECIONADOS

Na Tabela 5.1 encontram-se a indicação dos trabalhos selecionados, os parâmetros e métodos de análise que cada um se propôs a monitorar durante a fermentação de kombucha.

Tabela 5.1 - Análises e métodos de alguns parâmetros monitorados na fermentação de kombucha.

Analise	**Método**	**Referência**
Acidez total	Titulação com NaOH 0,1 N e indicador	Primiani et al., 2018; Kaewkod et al., 2019; Barbosa et al., 2020; Hardoko et al., 2020; Tanticharakunsiri et al., 2020; Treviño-Garza et al., 2020; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Tsuru et al., 2021; Zubaidah et al., 2021; Aung; Eun, 2022; Zubaidah et al., 2022; Dartora et al., 2023; Frolova et al., 2023; Kim et al., 2023; Majid et al., 2023; Oliveira et al., 2023; Phung et al., 2023; Sales et al., 2023.
	Titulação potenciométrica	Khosravi et al., 2019; Alderson et al., 2021; Wang et al., 2023; Yuliana et al., 2023; Zhao et al., 2023b.
Açúcares	Antrona	Zubaidah et al., 2021; Kang et al., 2023; Zhao et al., 2023a; Zhao et al., 2023b.
	DNS	Barbosa et al., 2020; Aung; Eun, 2022; Vukmanović et al., 2024.
	Ácido fenol-sulfúrico	Treviño-Garza et al., 2020; Phung et al., 2023.
	CCD	Kim et al., 2023.
	HPLC	Gaggìa et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Leonarski et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Frolova et al., 2023; Sales et al., 2023; Tsuru et al., 2021; Ohwofasa et al., 2024.
	UPLC	Jiménez et al., 2018.
Etanol	Ebuliômetro	Kaewkod et al., 2019; Alderson et al., 2021; Tsuru et al., 2021.
	Kit enzimático	Lacorn; Hektor, 2018; Ivory et al., 2021; Kim et al., 2023.
	Reação com $K_2Cr_2O_7$	Barbosa et al., 2020.
	HPLC	Gaggìa et al., 2019; Leonarski et al., 2021; Dartora et al., 2023; Mendelson et al., 2023.

	CG	Talebi et al., 2017; Liu et al., 2019; Tanticharakunsiri et al., 2020; Chan et al., 2021; Jang et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Yang et al., 2022; Frolova et al., 2023; Majid et al., 2023; Phung et al., 2023; Rossini; Bogsan, 2023.
	RMN 1H	Mohsin et al., 2022.
pH	Medidor digital de pH	Primiani et al., 2018; Kaewkod et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Barbosa et al., 2020 ;Hardoko et al., 2020; Tanticharakunsiri et al., 2020; Treviño-Garza et al., 2020; Brewer et al., 2021; Francisco et al., 2021; Leonarski et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Torre et al., 2021; Tsuru et al., 2021; Valiyan et al., 2021; Zubaidah et al., 2021; Aung; Eun, 2022; Jarrell et al., 2022; Yang et al., 2022; Zubaidah et al., 2022; Dartora et al., 2023; Frolova et al., 2023; Kim et al., 2023; Majid et al., 2023; Oliveira et al., 2023; Phung et al., 2023; Sales et al., 2023; Wang et al., 2023; Yuliana et al., 2023; Ohwofasa et al., 2024.
	Titulador automático	Alderson et al., 2021
Sólidos solúveis totais	Refratômetro	Kaewkod et al., 2019; Treviño-Garza et al., 2020; Alderson et al., 2021; Brewer et al., 2021; Francisco et al., 2021; Tsuru et al., 2021; Mohsin et al., 2022; Oliveira et al., 2023; Sales et al., 2023; Wang et al., 2023; Yuliana et al., 2023.

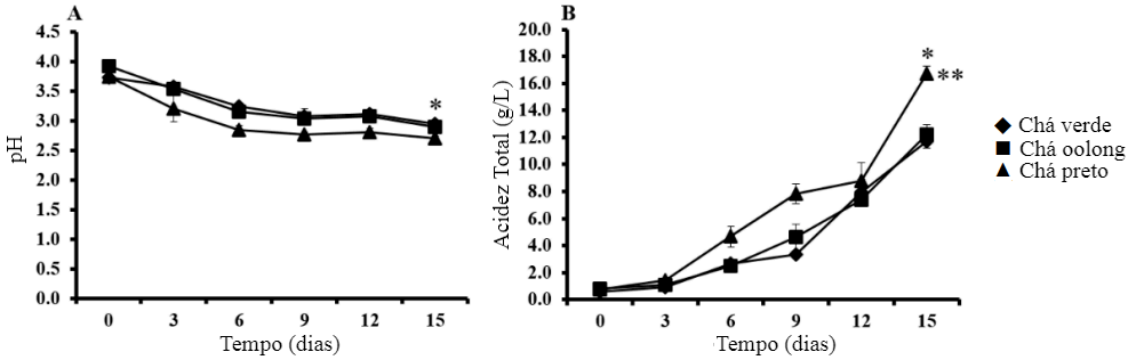
Fonte: Autor (2024).

5.1 COMPORTAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO

A diminuição do pH e o aumento do percentual de acidez total ao longo do processo de fermentação de kombucha, devido a formação de ácidos orgânicos, já estão bem estabelecidos na literatura (Oliveira et al., 2023); porém nos trabalhos podemos ver diferenças nos valores finais e nas concentrações dos metabólitos quando comparamos os diversos tipos de folhas utilizadas.

Analisando três chás de *Camellia sinensis*, Kaewkod et al. (2019) observaram que a bebida preparada com chá preto apresentava o pH mais baixo (2,70), seguida do chá oolong (2,89) e chá verde (2,94). A acidez mais alta também foi relatada para o fermentado de chá preto (16,75 g/L), seguido novamente de chá oolong (12,24 g/L) e do chá verde (11,72 g/L); na Figura 5.1 pode ser vista a mudança nesses parâmetros durante 15 dias de fermentação.

Figura 5.1 -Variação no pH (a) e na acidez (b) em kombuchas de chá verde, oolong e preto, durante 15 dias de fermentação.



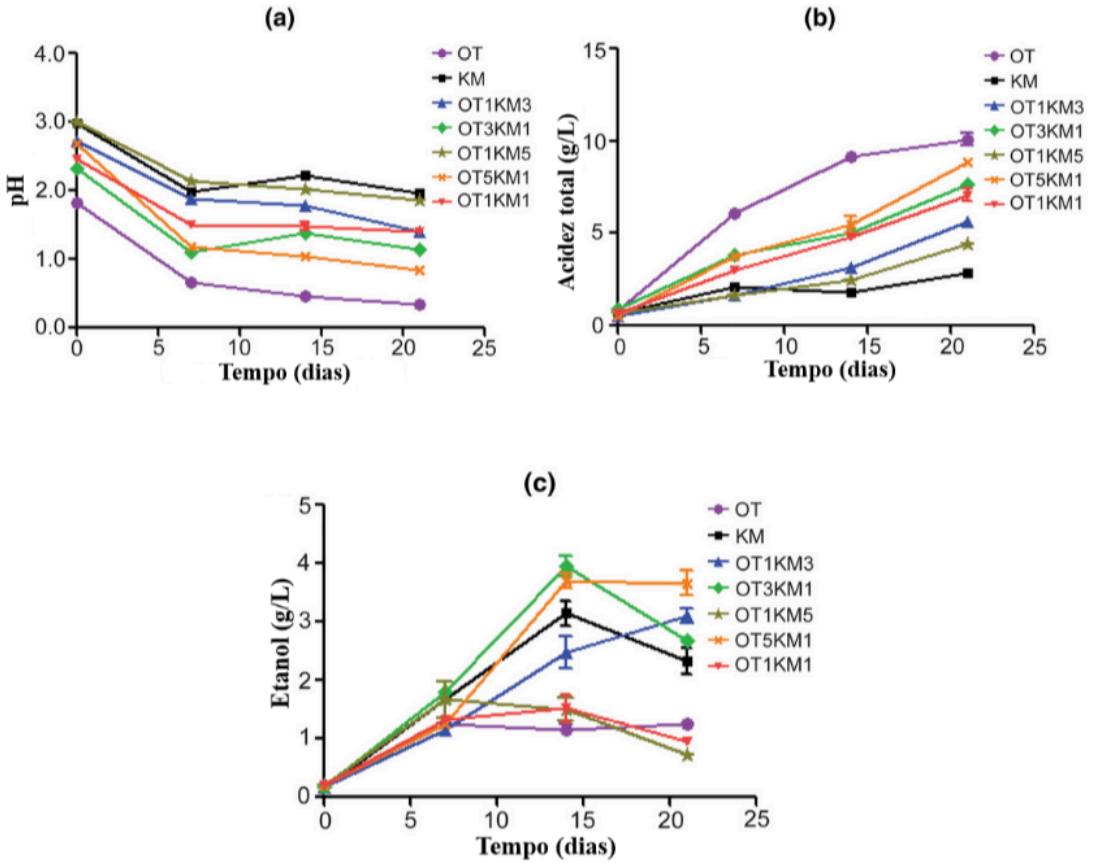
Fonte: Adaptado de Kaewkod et al.(2019).

Zubaidah et al (2021) prepararam kombuchas com Açafrão-da-terra (0,4%; 0,8%; 0,12%; 1,6%; 2%), e constataram entre 0,09%-0,13% de acidez a mais no 12ª dia de fermentação; sendo as medidas de acidez total cerca de 50% menores quando comparadas com uma kombucha preparada com chá preto nas mesmas condições; já o pH diminuiu para valores muito próximos uns dos outros, de aproximadamente 4 para 3.

Primiani et al. (2018) relataram um aumento de acidez e redução de pH maiores em kombuchas feitas com caruru-azedo, casca de mangostim, folhas de graviola, acácia-branca, murta-dos-jardins, frente a uma kombucha de chá verde, após 8 dias de fermentação.

Tanticharakunsiri et al. (2020) misturaram chá oolong e folhas de menta de cozinha (*Mentha cordifolia* Opiz. Ex Fresen), uma erva popular na Tailândia, e perceberam que o pH aumentou e a acidez diminuiu à medida que se adicionava uma fração maior de menta (KM) para a fermentação (Figuras 5.2a e 5.2b). Já a produção de etanol não parece ter uma tendência clara (Figura 5.2c).

Figura 5.2 -Variação no pH (a) e na acidez (b) e na concentração de etanol (c) com a adição de menta de cozinha em kombuchas de chá oolong, ao longo do tempo de fermentação.



Fonte: Adaptado de Tanticharakunsiri et al. (2020).

Jiménez et al. (2018) observaram uma menor taxa de consumo de sacarose e uma menor produção de ácidos orgânicos em kombucha feita com folhas de goiabeira, quando comparada com uma feita de chá preto; já Gaggìa et al. (2019) constataram que para uma kombucha preparada com folhas de rooibos, após 14 dias de de fermentação, a bebida apresentava uma baixa concentração de etanol e ácido acético, e uma quantidade de ácido glucurônico comparável a kombucha de chá preto.

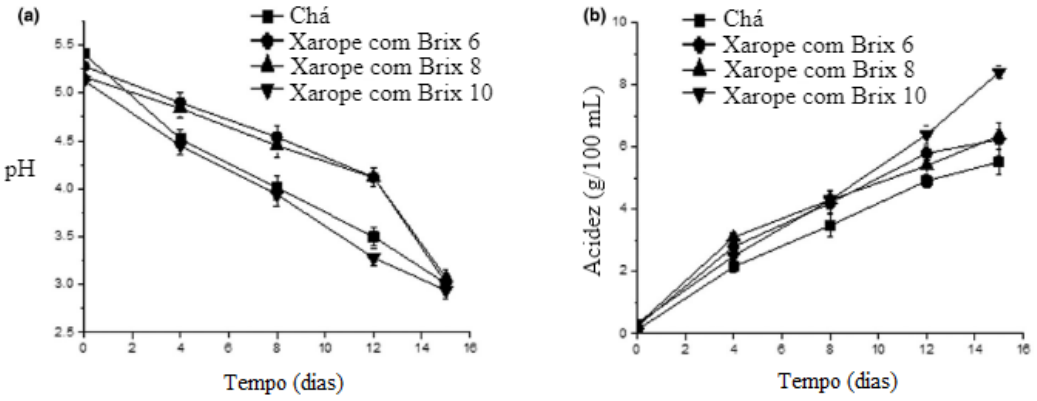
Esses resultados distintos nas medidas de acidez e de pH com a infusão de diferentes espécies de plantas, pode ser explicado pela variação na composição e na quantidade de catequinas e outros compostos fenólicos presentes nelas, o que afeta a atividade das bactérias e leveduras na decomposição da sacarose e consequentemente na produção dos ácidos orgânicos (Primiani et al, 2018).

Várias mudanças também são relatadas com relação a concentração e fonte de açúcar; Jarrell et al (2022) utilizou chá preto com diferentes fontes de açúcares, e constatou, partindo de amostras com pH=3,2 (+/− 0,1), que houve pouca mudança no pH para as culturas com

galactose, lactose e maltose (3,3-4,0), enquanto culturas de frutose, glicose, manose e sacarose continuaram a se tornar cada vez mais ácidas (1,7-2,0), ao longo de 15 dias de fermentação.

Khosravi et al. (2019) relataram que após 15 dias da infusão, a acidez titulável de uma kombucha de xarope de tâmara foi maior do que a preparada com sacarose. Ao aumentar o °Brix do xarope utilizado entre 6 e 10, observou-se elevação no teor de acidez titulável, diminuição no pH, e aumento na quantidade de ácidos orgânicos; os gráficos do pH e acidez em função do tempo podem ser vistos na Figura 5.3.

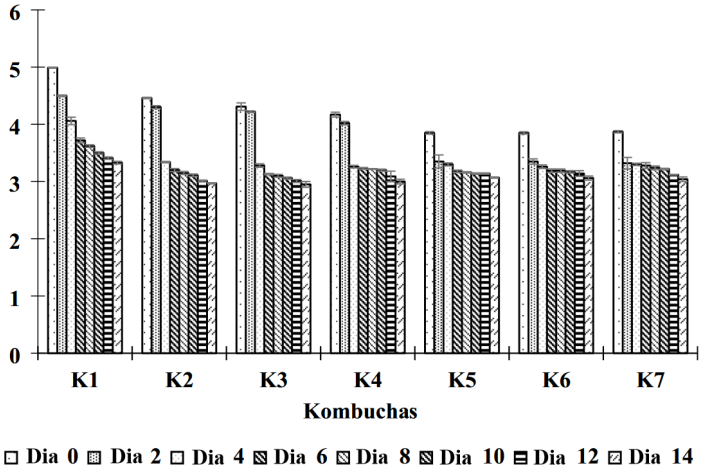
Figura 5.3 -Variação no pH (a) e na acidez (b) em função do valor do Brix do xarope de tâmara como fonte de açúcares para kombucha, durante 15 dias de fermentação.



Fonte: Adaptado de Khosravi et al. (2019).

Phung et al. (2023) produziram kombuchas de chá preto com adição de açúcar mascavo e cascas e caroços de abacaxi em diferentes proporções, K1: 60 g e 0 g respectivamente; K2: 50 g e 10 g; K3: 40 g e 20 g; K4: 30 g e 30 g; K5: 20 g e 40 g; K6: 10 g e 50 g; K7: 0 g e 60 g; as concentrações totais de açúcar também foram ajustadas para 60 g/L com suco de abacaxi. No início o pH do kombucha de açúcar (K1) (pH 4,99) foi ligeiramente maior do que o dos kombuchas com adição de abacaxi (K2–K7), que variou de 3,85 a 4,46; essa diminuição pode estar relacionada com o alto teor de ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ao ácido ascórbico presentes no abacaxi. Ao longo da fermentação, o pH de todas as amostras diminuiu, novamente as amostras com adição de abacaxi tinham valores de pH menores (Figura 5.4).

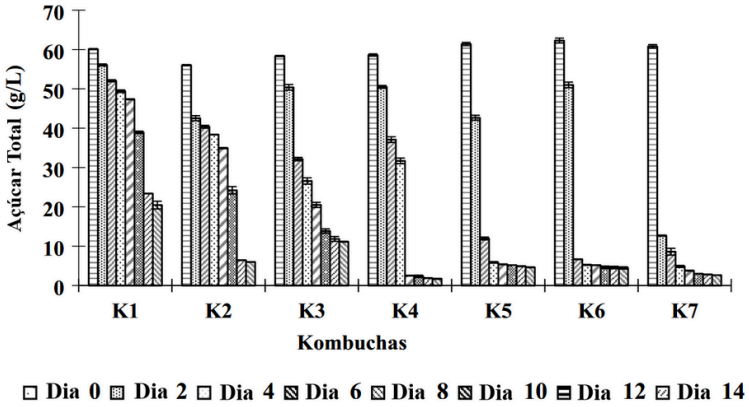
Figura 5.4 - pH ao longo da fermentação de produtos de kombucha de chá preto feitos com diferentes proporções de açúcar mascavo e cascas e caroços de abacaxi.



Fonte: Adaptado de Phung et al. (2023).

Houve considerável redução de açúcar em todas as kombuchas entre o 2º e 8º dias de fermentação; porém, com o aumento da proporção de abacaxi, as amostras apresentaram uma maior taxa de consumo de açúcar (Figura 5.5). Phung et al. (2023) citaram que isso provavelmente se deve ao fato que as cascas terem glicose e frutose como principais carboidratos, que são mais fáceis de serem metabolizados. As concentrações finais de K2 á K7 variaram de 1,70 a 11,13 g/L, menores que K1, com 20,45 g/L; Phung et al. (2023) também sugeriram que a adição foi benéfica para o crescimento da comunidade microbiana e consequentemente da produção de metabólitos valiosos.

Figura 5.5 - Teor de açúcar ao longo da fermentação de produtos de kombucha de chá preto feitos com diferentes proporções de açúcar mascavo e cascas e caroços de abacaxi.

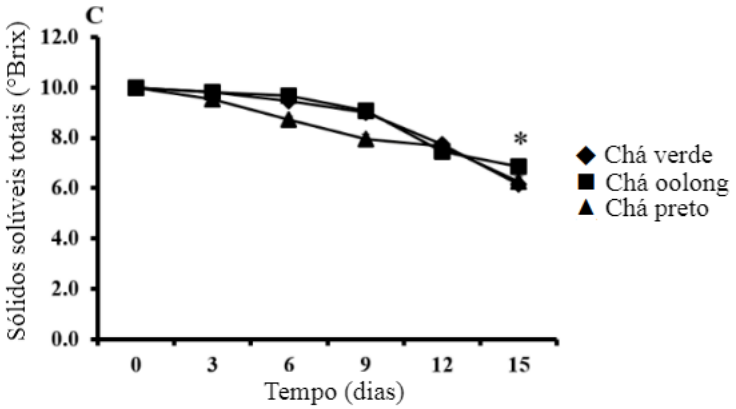


Fonte: Adaptado de Phung et al. (2023).

Valiyan et al. (2021) compararam o pH de fermentados de chá preto, verde, verbena-limão e hortelã-pimenta, com diferentes concentrações de açúcar (2, 5 e 8%). Em todas as bebidas, com aumento da concentração de açúcar, o pH diminuiu; o menor valor de pH foi a amostra preparada com verbena-limão a 8% de açúcar e com 21 dias de fermentação. As variáveis independentes concentração de açúcar e tipo de chá de ervas, tiveram efeitos significativos sobre o pH das bebidas; uma porcentagem muito baixa de açúcar resultou em um aumento do pH da kombucha de hortelã-pimenta e de verbena-limão ao final do processo; já o tempo de fermentação não afetou significativamente o pH quando comparado com os outros efeitos.

Analisando os sólidos solúveis totais, Kaewkod et al. (2019) constataram diminuição quase igual de aproximadamente 10 °Brix para 6 °Brix em 15 dias de fermentação, nas kombuchas de chá verde, oolong e preto (Figura 5.6).

Figura 5.6 -Variação no valor do Brix em kombuchas de chá verde, oolong e preto, durante 15 dias de fermentação.



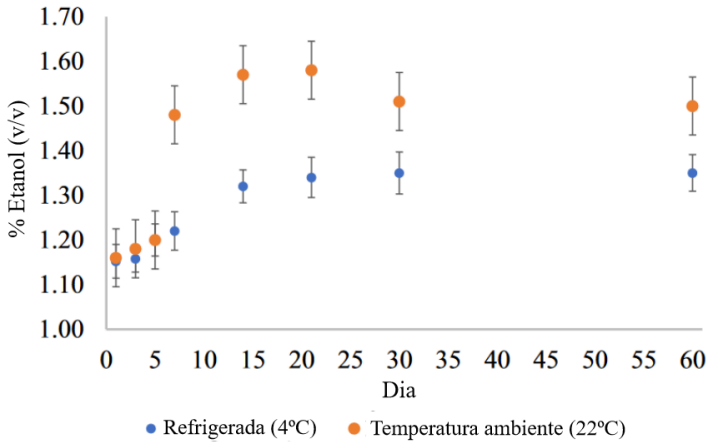
Fonte: Adaptado de Kaewkod et al. (2019).

Torre et al. (2021) estudaram o efeito do tempo de armazenamento, em kombucha de chá preto, refrigeradas a 4ºC, durante nove meses com amostragem a cada 30 dias. O valor de pH do chá era de 5,59, e caiu para 2,82 na kombucha obtida após 30 dias de fermentação; nos cinco meses foram as mudanças foram menores que 0,2 unidades, ao passo que no sexto mês, o valor de pH da amostra aumentou significativamente até 3,24, e permaneceu constante dentro do erro experimental pelos últimos três meses. Torre et al. (2021) sugeriram que esse aumento de pH provavelmente teria sido devido ao uso subsequente de ácidos por bactérias como fonte de carbono, na condição de escassez de açúcar.

5.2 KOMBUCHAS COMERCIAIS

Talebi et al. (2017) determinaram a concentração de etanol de 18 amostras de kombuchas vendidas nos EUA, e a faixa de etanol identificada foi de 1,12 - 2,00 % (v/v), o que excedeu o limite de regulação americana para bebidas não alcoólicas. Também foi investigado o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento; para isso, kombuchas do mesmo lote foram submetidas a refrigeração (4 ºC) ou a temperatura ambiente (22 ºC) (Figura 5.7); mesmo com refrigeração houve um aumento na quantidade de etanol, o que pode estar associado a hidrólise de ésteres etílicos, ou leveduras ativas junto a presença de açúcar residual.

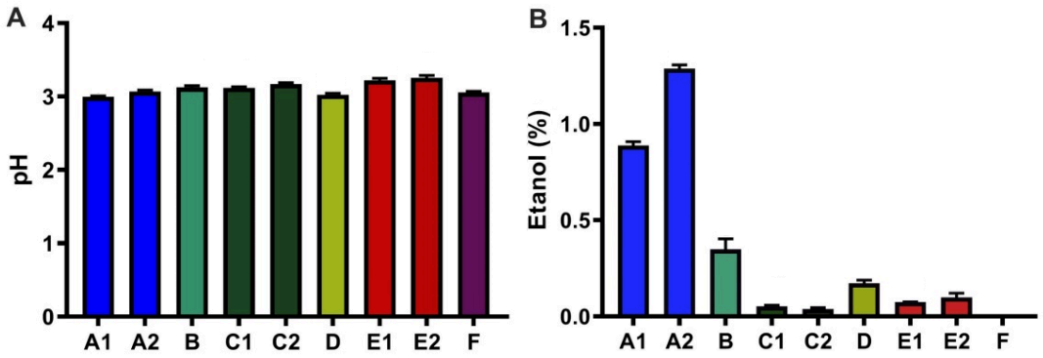
Figura 5.7 - Concentração de etanol (v/v) em kombuchas armazenadas sob refrigeração e a temperatura ambiente, até 60 dias.



Fonte: Adaptado de Talebi et al. (2017).

Jang et al. (2021) analisaram 684 amostras de kombuchas comerciais vendidas na região da Colúmbia Britânica (Canadá), e identificaram que 31,5 % das amostras tinham volumes de etanol superiores ao valor de regulação local, de até 1 % ABV (álcool por volume); enquanto Yang et al. (2022) analisaram nove diferentes produtos de kombucha de seis fabricantes (3 amostras por produto), comprados de supermercados de Los Angeles, EUA, em fevereiro de 2021. As bebidas tinham pequenas variações no pH entre si, na faixa de 3,2 a 3,3 (Figura 5.8A); etanol, que foi detectado em oito dos produtos (Figura 5.8B), sendo que a maioria estava abaixo de 0,5 %.

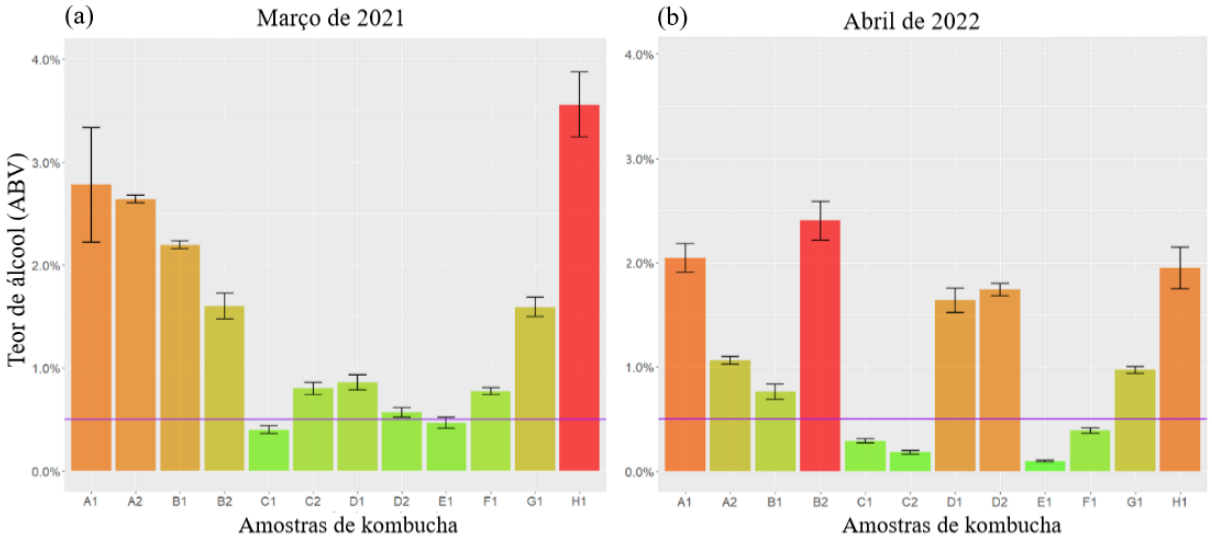
Figura 5.8 - valores de pH (A) e concentração de etanol (B) em 9 produtos de kombucha vendidos nos EUA.



Fonte: Adaptado de Yang et al. (2022)

Rossini e Bogsan (2023) coletaram kombuchas comerciais em 2021 antes da implementação da legislação específica brasileira, e perceberam que para 12 amostras analisadas, só uma tinha teor de etanol abaixo de 0,5 % ABV, considerando o limite superior dentro intervalo de confiança (95 %) (Figura 5.9a). O mesmo procedimento foi feito no ano seguinte, já com a legislação em vigor; e constataram que dessa vez oito das doze amostras ainda tinham um teor de etanol acima de 0,50% ABV (Figura 5.9b).

Figura 5.9 - Teor de etanol (ABV) em diferentes kombuchas comerciais compradas nos períodos de Março de 2021 e Abril de 2022.



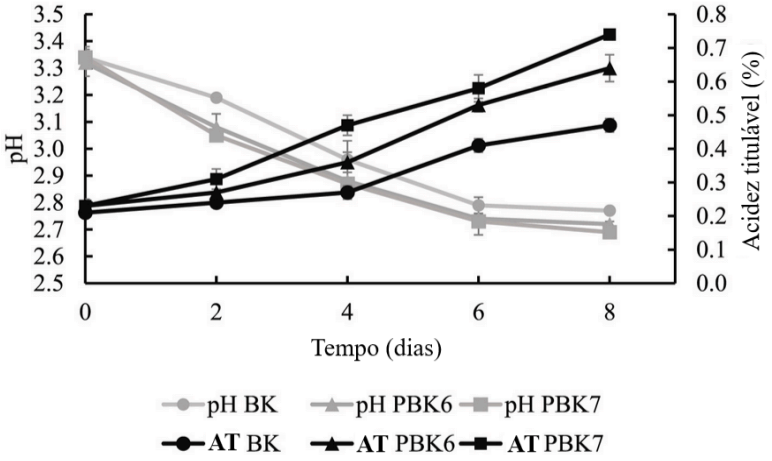
Fonte: Adaptado de Rossini e Bogsan (2023).

5.3 OUTRAS KOMBUCHAS

Para estudar a fabricação de uma kombucha em pó, Mohsin et al. (2022) avaliaram os efeitos da secagem por pulverização em kombuchas, utilizando goma arábica como agente encapsulador. A análise revelou que o ácido acético foi significativamente reduzido, e o etanol foi degradado na secagem por spray; o processo também melhorou as propriedades físico-químicas e manteve suas atividades antioxidantes.

Majid et al. (2023) prepararam kombuchas com flor de ervilha borboleta 0,5% (m/v), e acrescentaram a duas delas uma bactéria probiótica local, a *L. plantarum* Dad-13; às quantidades adicionadas foram 0 (BK), 10^6 (PBK6) e 10^7 (PBK7) UFC/mL. As kombuchas com os probióticos apresentaram um pH mais baixo e maior acidez titulável (Figura 5.10); além disso a produção de ácido acético em kombucha com probióticos foi menor, enquanto o etanol não foi detectado, que são características desejáveis para a bebida.

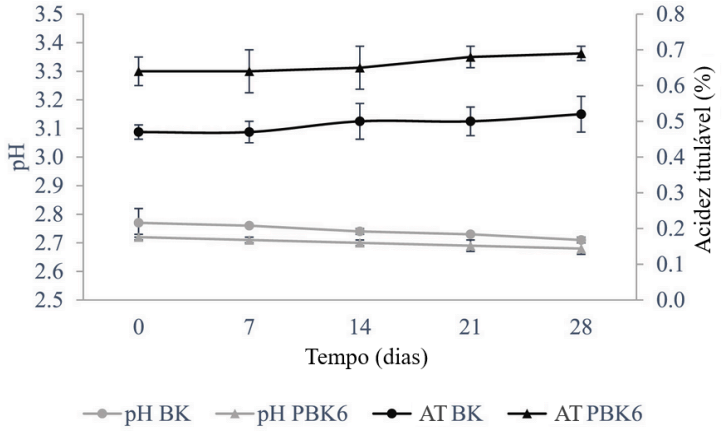
Figura 5.10 - pH e acidez titulável em kombuchas de flor de ervilha borboleta com e sem adição de probiótico *L. plantarum* Dad-13, durante 8 dias.



Fonte: Adaptado de Majid et al. (2023).

A kombucha ainda passou 28 dias armazenada, a temperatura de 4 ºC, durante esse período ainda houve uma pequena diminuição do pH e uma pequena elevação de acidez Figura 5.11). Após esse tempo ainda existia 6,26 log UFC/mL do probiótico adicionado, o que caracterizava o produto como probiótico.

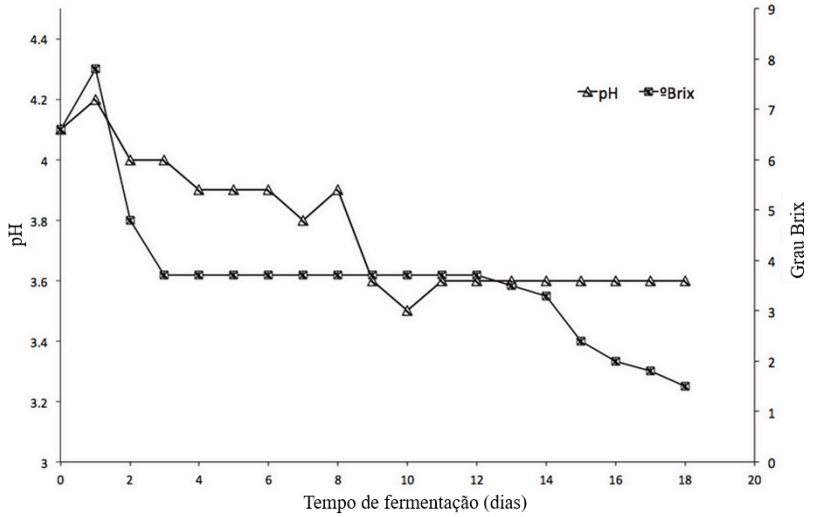
Figura 5.11 - pH e acidez titulável em kombuchas de flor de ervilha borboleta com e sem adição de probiótico *L. plantarum* Dad-13, durante 28 dias de armazenamento.



Fonte: Adaptado de Majid et al. (2023).

Com o intuito de preparar a bebida sem adição de açúcar, Francisco et al. (2021) fizeram uma kombucha de milho germinado. A fermentação aeróbica durou 5 dias, onde o ºBrix diminui e o pH mudou de 4,0 para 3,8; passado esse tempo, o líquido foi armazenado em recipiente fechado, onde passou mais 13 dias em análises (Figura 5.12). O pH continuou diminuindo, provavelmente devido à formação de ácido carbônico, até 3,6, já o ºBrix permaneceu constante até o 12ª dia, e então caiu para 1,5, significativamente menor que kombuchas comerciais.

Figura 5.12 - pH e Grau Brix em kombuchas de milho germinado, durante 18 dias de fermentação.



Fonte: Adaptado de Francisco et al (2021).

5.4 MÉTODOS DE ANÁLISE

5.4.1 Acidez Total

A titulação ácido-base é um procedimento simples e barato, e que traz resultados com exatidão considerável; todos os trabalhos analisados utilizaram essa técnica (ver Tabela 3). De acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008) o procedimento consiste em transferir a amostra para um frasco Erlenmeyer, adicionar 0,5 mL do indicador fenolftaleína 1%, e titular com a solução de com hidróxido de sódio previamente padronizado (NaOH 0,1 N) até coloração rósea. Também é possível fazer como Zhao et al., 2023b, transferir a amostra para um béquer e titular até o ponto de viragem, pH 8,2 - 8,4, medido em um pHmetro, o que é relativamente útil quando se tem amostras mais escuras. O resultado geralmente é dado em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra, conforme a Equação 5.1.

$$Acidez\ total\ = \frac{V.M.f.pm}{10\ .Va}\ , \tag{5.1}$$

sendo V é o volume (mL) de hidróxido de sódio gasto na titulação, M a molaridade da solução de hidróxido de sódio, f o fator de correção da solução de hidróxido de sódio, pm o peso molecular do ácido acético (60 g) e Va o volume (mL) tomado da amostra.

A instrução normativa Nº 41 não faz referência a acidez total, mas sim a acidez volátil, que pode ser obtida pela titulação da amostra após destilação. De acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008) é utilizado um aparelho gerador de vapor de Cazenave-Ferré ou um conjunto similar, até obtenção de 100 mL do destilado, e então é feito a titulação da mesma forma que na acidez total. A unidade também é diferente, sendo expressa em meq/L, obtida pela Equação 5.2.

$$Acidez\ volátil\ = \frac{V.N.f.1000}{Va}\ , \tag{5.2}$$

onde, como antes, V é o volume (mL) de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, f é fator de correção da solução de hidróxido de sódio, N é normalidade da solução de hidróxido de sódio, e Va é volume da amostra.

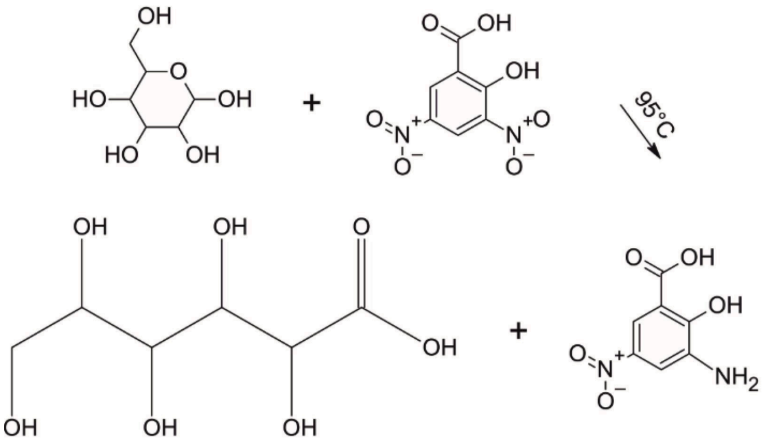
5.4.2 Açúcares

Dentre os métodos de análise de carboidratos identificados na pesquisa (ver Tab. 3) encontram-se colorimétricos, como DNS, Antrona e fenol-sulfúrico, e cromatográficos, como CCD, HPLC e UPLC. Antes de realizar as análise as amostras passem por um pré-tratamento, para retirada de impurezas, podendo ser filtradas, ou passar por um processo de extração líquido-líquido, no qual os solventes empregados são geralmente água, álcool (metanol ou etanol), clorofórmio ou misturas deles (Kurzyna-Szklarek et al., 2022).

5.4.2.1 Métodos colorimetricos

Os açúcares de seis carbonos, glicose e frutose, utilizados pela levedura na fermentação também são chamados de açúcares redutores, por conterem grupos funcionais capazes de serem oxidados, provocando então, redução de outros compostos (Zoecklein et al., 1999). No método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), os açúcares redutores reagem com o ácido (inicialmente de cor amarela), em aquecimento, dando origem ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de cor avermelhada). O composto resultante absorve a luz a 540 nm, que é lido em espectrofotômetro, e a curva padrão é preparada com soluções conhecidas de glicose. O procedimento é considerado simples, de rápida execução, e é capaz de determinar concentrações de até 5,5 mM (Kurzyna-Szklarek et al., 2022). Na Figura 5.13 é apresentada a reação da glicose no método DNS.

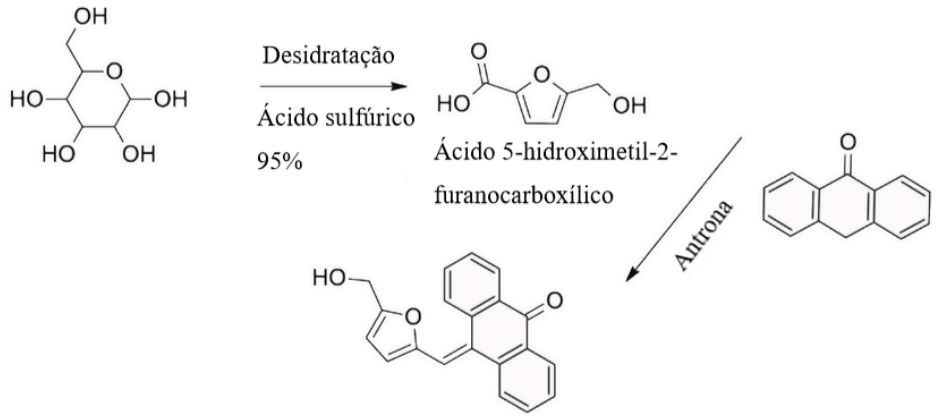
Figura 5.13 - Principais reações do método DNS.



Fonte: Adaptado de Kurzyna-Szklarek et al. (2022).

A sacarose também é chamada de "açúcar invertido", e em sua configuração nativa não é redutor, e portanto, não pode ser medido diretamente com as técnicas de redução; porém, após um processo de hidrólise, ou inversão, seus componentes glicose e frutose podem ser medidos (Zoecklein et al., 1999). No método de Antrona (Figura 5.14), ácido sulfúrico concentrado é utilizado para transformar os polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos (como a sacarose), em carboidratos simples, monossacarídeos, que serão desidratados pelo próprio ácido para a formação de compostos derivados de furfural. Com a adição de antrona (9,10-dihidro-9-ozoantraceno), esses compostos formam complexos de cor azul-verde com máxima absorção a 625 nm. A intensidade da cor no comprimento de onda máximo de absorbância varia com a composição do polissacarídeo (Kurzyna-Szklarek et al., 2022). O método antrona-sulfúrico é um dos métodos padrão para análise de açúcar do protocolo analítico oficial da China (Zhao et al., 2023).

Figura 5.14 - Principais reações do método de Antrona.



Fonte: Adaptado de Kurzyna-Szklarek et al. (2022).

O método do ácido fenol-sulfúrico é utilizado para diversas aplicações, devido a sua sensibilidade e simplicidade, além de poder ser usado na presença de sais e resíduos de proteínas. Esse método é semelhante ao de Antrona, na primeira fase, o ácido sulfúrico concentrado também quebra quaisquer carboidratos maiores em monossacarídeos; que também são desidratados com ácido sulfúrico concentrado para formar derivados de furfural (Figura 5.15); dessa vez, é utilizado fenol para reagir com os derivados furfurais, formando complexos de cor amarelo-ouro; a absorção é a 490 nm para hexoses e 480 nm para pentoses e ácidos urônicos (Kurzyna-Szklarek et al., 2022). É considerado simples, de baixo custo, relativamente rápido, e o equipamento necessário é mínimo; porém exige uma grande

quantidade de ácido sulfúrico, fora que o fenol que apresenta múltiplos riscos para a saúde (Kurzyna-Szklarek et al., 2022).

Figura 5.15 - Principais reações do método fenol-sulfúrico.

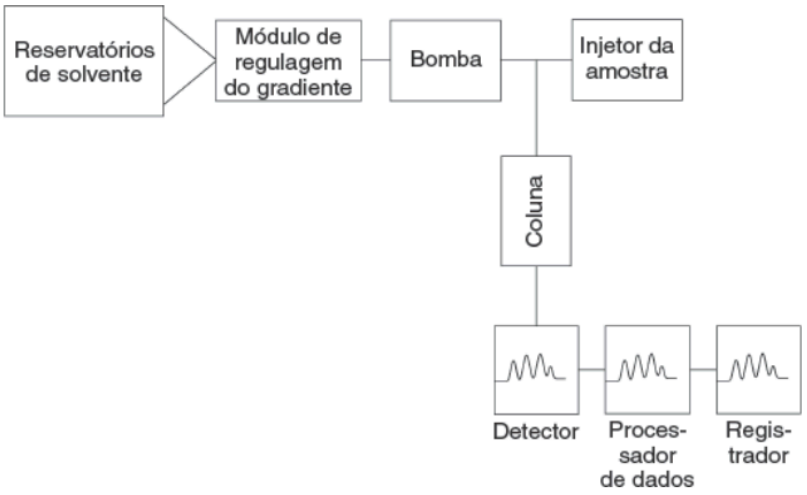
Fonte: Adaptado de Kurzyna-Szklarek et al. (2022).

5.4.2.2 Métodos cromatograficos

A Cromatografia líquida é uma técnica físico-química de separação de componentes de uma mistura. O sistema consiste em um leito compactado de algum material sólido (ou sólido revestido de líquido) com uma fase móvel (um líquido ou um gás) percolando através dele; os solutos colocados nesse sistema se distribuem entre essas duas fases, e, portanto, movem-se em taxas diferentes, sendo então separados (Zoecklein et al., 1999). Dentre os diferentes mecanismos usados em sistemas cromatográficos, os mais comuns são partição, adsorção, troca iônica e exclusão de tamanho (Zoecklein et al., 1999).

Os sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência, comumente chamados pela sigla em inglês HPLC (*high-performance liquid chromatography*), são constituídos de colunas embaladas com fase estacionária, através das quais os analitos e a fase móvel percorrem para separação (Poole, 2003). No equipamento (Figura 5.16) os solventes são armazenados em reservatórios na parte de cima; também existem misturadores, válvulas, bombas, amortecedores e controladores que mantêm o fluxo e composição da fase móvel adequados para a análise; existe uma válvula de injeção conectada à coluna para inserir volumes específicos da amostra no fluxo de fase móvel totalmente pressurizado; quando saem da coluna os componentes são registrados continuamente usando um detector on-line com alta sensibilidade e resposta rápida (Poole, 2003).

Figura 5.16 - Esquema dos equipamentos de HPLC



Fonte: Adaptado de Vogel (2002)

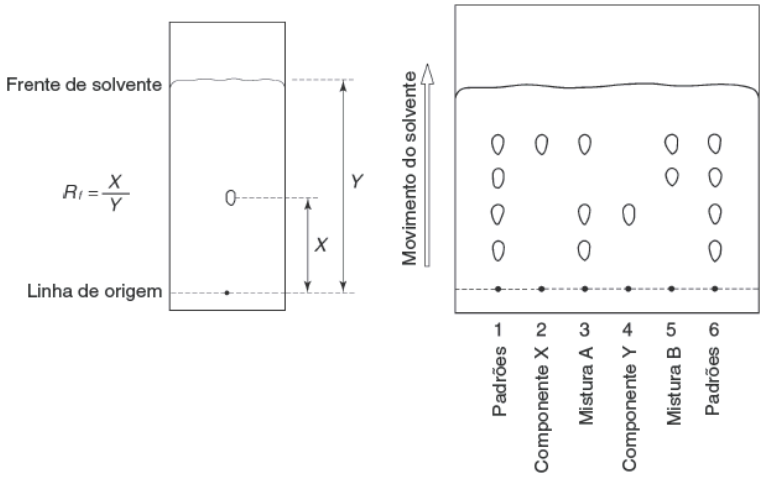
O HPLC é listado pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) como uma técnica padrão na análise de carboidratos (Kurzyna-Szklarek et al., 2022). Nos trabalhos foram utilizados como fase móvel ácido sulfúrico (Khosravi et al., 2019; Leonarski et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Sales et al., 2023), acetonitrila (Ohwofasa et al., 2024), NaOH (Gaggìa et al., 2019) e água ultrapura (Tsuru et al., 2021); as concentrações de açúcares foram determinadas a partir de curvas de padrão externo multiplicadas pelos fatores de diluição, que o procedimento padrão (Khosravi et al., 2019). Foram usados principalmente detectores de índice de refração (RI) (Gaggìa et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Leonarski et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Sales et al., 2023), mas também detector de arranjo linear de diodos (DAD) (Osiripun; Apisittiwong, 2021; Tsuru et al., 2021) e detector por espalhamento de luz evaporativo (ELSD) (Ohwofasa et al., 2024).

Os equipamentos de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) tem melhorias em relação ao HPLC, permitindo o uso de colunas com um menor comprimento, partículas menores na fase estacionária, e pressões mais elevadas; também apresenta uma maior resolução (grau de separação entre os picos) e maior sensibilidade de detecção (Porto, 2014). Jiménez et al. (2018) fizeram a analisa de carboidratos com um equipamento UPLC, utilizando uma fase móvel constituída por solução de acetonitrila:água com 0,1% de hidróxido de amônio (80:20); amostras puras de sacarose, glicose e frutose foram usadas como padrões; e o controle e análise de dados foram feitos com software MassLinx.

A cromatografia em camada delgada é um tipo de cromatografia líquida em que são usadas placas revestidas com uma camada fina de material sorvente, como sílica (SiO_2),

alumina (Al_2O_3) e celulose cristalina, em vez de coluna (Zoecklein et al., 1999). A separação é realizada em uma câmara fechada, onde uma fase móvel de solvente sobe por ação capilar, e as moléculas de soluto são transportadas em função de seus coeficientes de partição; também pode ser aplicado fluxo forçado ao solvente (Poole, 2003); e a determinação das substâncias é feita analisando as distâncias que elas percorreram, o fator de retenção (R_f) delas, e comparando com padrões, que são desenvolvidos ao mesmo tempo que as misturas (figura 5.17).

Figura 5.17 - Esquema da cromatografia em camada delgada.



Fonte: Adaptado de Vogel (2002).

Kim et al. (2023) analisou o teor de sacarose em kombuchas por cromatografia em camada delgada; as amostras foram manchadas em placas e reveladas com ascensões de acetonitrila/água (85:15, v/v); após seca, a placa foi mergulhada em uma solução de coloração de n-(1-naftil)etilenodiamina dicloridrato (0,5 % p/v) e ácido sulfúrico (5 % p/v) em metanol, e aquecida a 120 °C por 10 min. A quantidade de sacarose foi determinada usando um software, o AlphaEaseFC 4.0.

5.4.3 Teor alcoólico

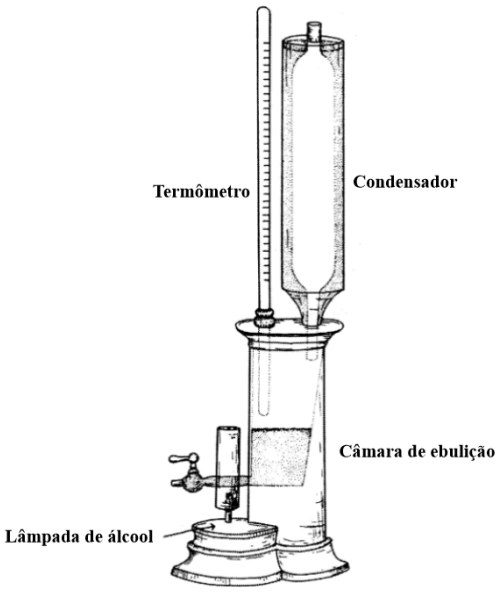
5.4.3.1 Ebuliometria

O ebuliômetro é um equipamento para medição do ponto de ebulição de líquidos, que pode ser usado para medição do teor de álcool baseando-se na lei de Raoult, com a redução no

ponto de ebulição da mistura de água e etanol, à medida que o teor de etanol aumenta. Para corrigir a pressão diferente no laboratório, o método ebuliométrico utiliza uma escala deslizante que permite ajustar o ponto de ebulição real da água (Zoecklein et al., 1999).

Adiciona-se aproximadamente 30 mL de água deionizada à câmara de ebulição, e posiciona-se o instrumento sobre a chama (ver figura 5.18). Quando o termômetro atingir um ponto estável, aguarda-se 30 segundos para o caso de pequenas flutuações, neste momento, faz-se a leitura do ponto de ebulição e ajuste a escala para 0,0% de álcool. Antes de colocar a amostra é importante esfriar e enxágue bem o instrumento, e adicionar água fria da torneira ao condensador, para evitar perda prematura de álcool, resultando em pontos de ebulição erroneamente altos e álcoois aparentes mais baixos (Zoecklein et al., 1999).

Figura 5.18 - Componentes de um ebuliômetro.



Fonte: Adaptado de Zoecklein et al. (1999).

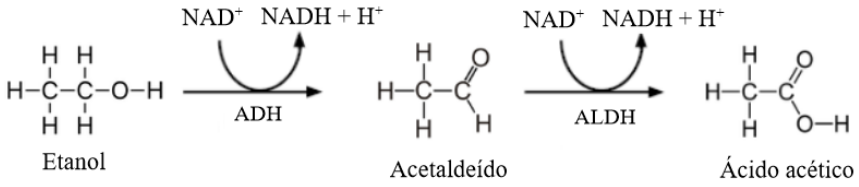
Dentre as interferências a mais importante é o efeito dos açúcares, teoricamente deveria ocorrer uma elevação do ponto de ebulição, no entanto à matriz açúcar-água causa um aumento na pressão de vapor do etanol; para reduzir os erros atribuídos ao açúcar as amostras podem ser diluídos com água para um nível de açúcar menor que 2%. Os aldeídos, ésteres e ácidos têm efeito contrário aumentando o ponto de ebulição; assim, os efeitos combinados acabam aproximando a medida do valor real de teor alcoólico (Zoecklein et al., 1999).

5.4.3.2 Testes enzimaticos

Os kit de ensaio de etanol são considerados uma alternativa mais rápida quando comparados aos métodos cromatográficos, eles são baseados em uma ou duas reações de oxidação do etanol (ver Figura 5.19). A primeira reação é a oxidação do etanol em acetaldeído pela molécula de Dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD^+), catalisada pela enzima álcool desidrogenase, formando NADH (Zoecklein et al., 1999; Lacorn; Hektor, 2018); como o equilíbrio dessa reação está a favor ao etanol, condições experimentais especiais devem ser adotadas (Lacorn; Hektor, 2018).

A segunda reação é a oxidação do acetaldeído em ácido acético na presença da aldeído desidrogenase, formando também NADH. Nos dois casos a quantidade de NADH é mensurada pelo aumento da absorbância a 340 nm, lido em espectrofotômetro. Para os kits com as duas reações, a quantidade de NADH será estequiometricamente o dobro da quantidade de etanol (Ivory et al., 2021).

Figura 5.19 - Reações de oxidação do Etanol por NAD^+.



Fonte: Adaptado de Ivory et al., (2021).

O ensaio é muito sensível e, portanto, é importante que o ambiente laboratorial e o ar estejam livres da presença de etanol; antes de realizar os ensaios a amostra deve ser filtrada para remover os microrganismos, e agitada com um misturador de vortex, por no mínimo 20 s, para remoção de gases residuais (Ivory et al., 2021). Para a análise segue-se a diluição e o passo a passo de acordo com as instruções do fabricante; os cálculos e a equação para conversão dos valores de absorbância em concentrações de etanol também são incluídos em cada kit. As vantagens dessas análises incluem especificidade, custo reduzido, e uma quantidade mínima de "resíduos" que requer descarte adequado; já as desvantagens são os potenciais interferentes que dificultam as análises, volumes muito pequenos de amostras e reagentes, e a necessidade de executar vários padrões para treinar o uso do kit e validar as constantes fornecidas no mesmo (Zoecklein et al., 1999).

5.4.3.3 Redução com dicromato de potássio

Barbosa et al., 2020 determinou a concentração de etanol com base no método descrito por Salik e Povoh (1993). O método se baseia na reação de oxidação do etanol, promovida pelo dicromato de potássio em meio ácido (utiliza-se ácido sulfúrico); no primeiro momento, o etanol reage com os íons dicromato produzindo acetaldeído, que depois é oxidado, produzindo ácido acético, com a correspondente redução dos íons Cr^{4+} para íons Cr^{3+}. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra (Galassi, 2007), que pode ser relacionada aos íons Cr^{3+} através da medição em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Antes das análises as amostras devem ser destiladas, para evitar que os açúcares ou outros compostos interfiram nas medições.

5.4.3.4 Cromatografia

Nos artigos que usaram cromatografia líquida para determinação de etanol, usaram soluções de ácido sulfúrico como fase móvel, detectores RI e padrões externos para análise e quantificação (Gaggìa et al., 2019; Dartora et al., 2023; Mendelson et al., 2023).

Na cromatografia gasosa (CG) a fase móvel é um gás inerte; os analitos são separados de acordo com a facilidade de passar para a fase gasosa, que depende da sua volatilidade e de sua interação com a fase estacionária na coluna. O sistema é composto de uma entrada para vaporizar e misturar a amostra com a fase móvel; um forno para otimizar a temperatura para a separação; coluna e detector (Poole, 2003). Para medir a concentração de uma amostra de teste, um padrão de concentração conhecida é injetado no instrumento de CG. O tempo de retenção de pico e a área do padrão são comparados com os resultados da amostra para determinar sua concentração.

Nos trabalhos utilizou-se principalmente o 1-propanol ou 2-propanol como padrão, e a quantificação foi feita usando uma curva de calibração externa com base na razão do pico do etanol para o pico do propanol; diferentes detectores foram usados como seletivo de massa (MS) (Chan et al., 2021; Jang et al., 2021) e ionização de chama (FID) (Liu et al., 2019; Tanticharakunsiri et al., 2020; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Yang et al., 2022; Phung et al., 2023; Rossini; Bogsan, 2023).

5.4.3.5 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que mede a absorção de radiação eletromagnética entre 4 e 750 MHz (radiofrequência). Nesse tipo de espectroscopia, os núcleos dos átomos absorvem radiação, para isso a amostra é exposta a um campo magnético de vários teslas (T), levando os núcleos de interesse aos estados de energia necessários para que ocorra a absorção (Vogel, 2002). Essa técnica identifica e quantifica, já que a área do sinal integrado é diretamente proporcional ao número de núcleos que originaram aquele sinal.

Mohsin et al (2022) mensuraram o etanol a partir de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H). Para isso dissolveram as amostras de kombucha em solução contendo metanol e KH_2PO_4 tampão em D_2O (Óxido de deutério) na proporção de 50:50 (v/v). A mistura foi submetida a vórtice e sonicada, depois transmitida para o tubo de RMN. O TSP (ácido trimetilsililproanoico) 0,1% foi o padrão interno, utilizado para calcular a concentração expressa em mmol/L. Para os espectros de RMN e a identificação foi usado o software Chenomx.

5.4.4 pH

Quase todos os trabalhos utilizaram medidores digitais de pH (ver Tabela 3), cujo procedimento também está incluído nas normas do Instituto Adolfo Lutz (2008), esses equipamentos são potenciómetros especialmente adaptados que permitem uma determinação direta, simples e precisa do valor. Os pHmetros, como também são chamados, possuem dois eletrodos de vidro, um de referência com potencial constante, e outro com potencial que depende da concentração dos íons $[H_3O^+]$ (Campbell-Platt, 2015). O equipamento é calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7, e então o eletrodo é inserido no béquer contendo a amostra previamente homogeneizada para medição.

Além de um pHmetro convencional, Alderson et al. (2021) também utilizaram um equipamento de titulação automática para medir o pH das amostras. É interessante citar que Ohwofasa et al. (2024) estimaram o pH de kombuchas comerciais utilizando a concentração de ácido glucônico presente nelas, através de modelo linear testado antes em amostras preparadas em laboratório, que se mostrou ser bom preditor desse parâmetro.

5.4.5 Sólidos solúveis totais

A presença de sólidos solúveis na água causa uma alteração no índice de refração, a dimensão dessa mudança pode ser usada para determinar a quantidade de soluto; para isso, utiliza-se um refratômetro, a unidade desse equipamento é o grau Brix (°Bx), que corresponde a 1g de sólidos solúveis em suspensão por 100 g de solução (Zoecklein et al., 1999).

O procedimento também é descrito nas normas do Instituto Adolfo Lutz (2008), e consiste em retirar uma amostra, que é centrifugada para separação de fases, e transferir de 3 a 4 gotas da para o prisma do refratômetro, que depois é fechado, ajusta-se o foco da imagem, e então é feita a leitura diretamente com a escala do equipamento; em refratômetros digitais apenas se coloca a amostra. Também é possível realizar a filtração da amostra com um papel de filtro ou um pedaço de algodão se ainda existirem partículas sólidas no sobrenadante; para refratômetros de bancada, é importante observar a temperatura da medição e corrigir a leitura em relação à ela de acordo com tabelas de referência.

5.4.6 Análise de ácidos orgânicos e compostos fenólicos

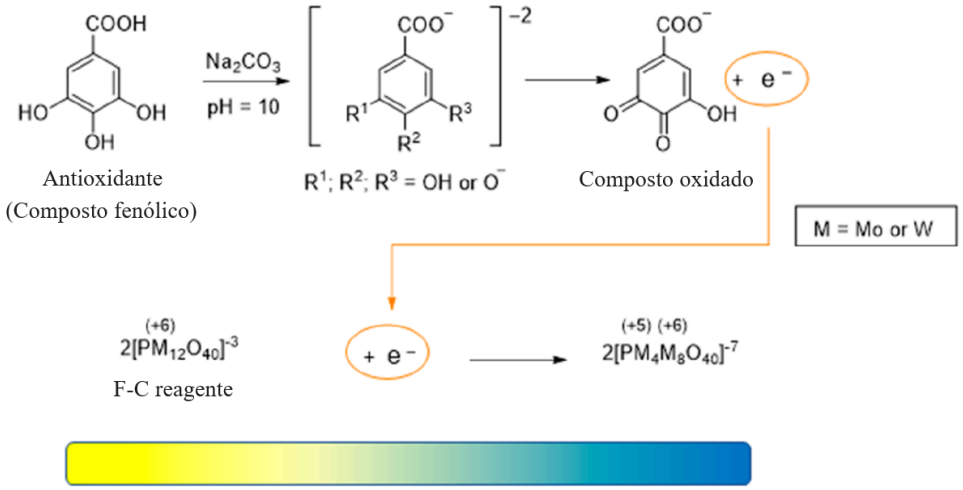
Fora os parâmetros mostrados na Tabela x, muitos trabalhos também decidiram por quantificar os ácidos orgânicos e compostos fenólicos presentes. Apesar de ser ter uma noção das quantidades de ácidos pelo pH e acidez total, é interessante conhecer a quantidade de ácidos glucólico, acético, glucurônico, lático, etc, individualmente na kombucha já que essas informações contribuem para avaliar a qualidade da bebida e seus aspectos sensoriais. Já os polifenóis, são particularmente relevantes devido às suas propriedades antioxidantes e funcionais; esses compostos sofrem processos de biotransformação durante o processo fermentativo, e catequinas e teaflavinas acabam dando origem a novos compostos fenólicos (Zubaidah et al., 2021).

Nos trabalhos, a identificação e quantificação dos ácidos foi feita exclusivamente por métodos cromatográficos, como HPLC (Gaggìa et al., 2019; Kaewkod et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Dartora et al., 2023; Frolova et al., 2023; Kim et al., 2023; Mendelson et al., 2023; Phung et al., 2023; Ohwofasa et al., 2024), UPLC (Jiménez et al., 2018; Barbosa et al., 2020; Majid et al., 2023) e CG (Kang et al., 2023; Khazi et al., 2024). Já as composições fenólicas totais foram quantificadas pelo ensaio Folin-Ciocalteu (Gaggìa et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Tanticharakunsiri et al., 2020; Hardoko et al., 2020; Muzaifa et al., 2021; Osiripun; Apisittiwong, 2021; Zubaidah et al., 2021; Mohsin et

al., 2022; Dartora et al., 2023; Frolova et al., 2023; Kim et al., 2023; Oliveira et al., 2023; Phung et al., 2023; Yuliana et al., 2023; Khazi et al., 2024).

O ensaio Folin-Ciocalteu (F-C) é um método sensível, que pode quantificar uma ampla variedade de compostos fenólicos; além de ser relativamente econômico em comparação a outros métodos e compatível com equipamentos comuns de laboratório (Pérez et al., 2023). O método é baseado na redução dos derivados aniônicos dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolíbdico (reagente F-C) pelas espécies antioxidantes na amostra; uma mudança de cor de amarelo para azul, diretamente proporcional à atividade redutora dos compostos fenólicos. mais detalhadamente os ácido fosfomolíbdico/fosfotúngstico em pH alcalino criam complexos azuis (Figura 5.20) que são detectados espectroscopicamente em cerca de 760 nm. A capacidade redutora é frequentemente como equivalentes de ácido gálico (GAE) (Pérez et al., 2023).

Figura 5.20 - Esquema das reações no método Folin-Ciocalteu.



Fonte: Adaptado de Pérez et al. (2023).

5.4.7 Modelagem para acompanhamento dos parâmetros ao longo do processo

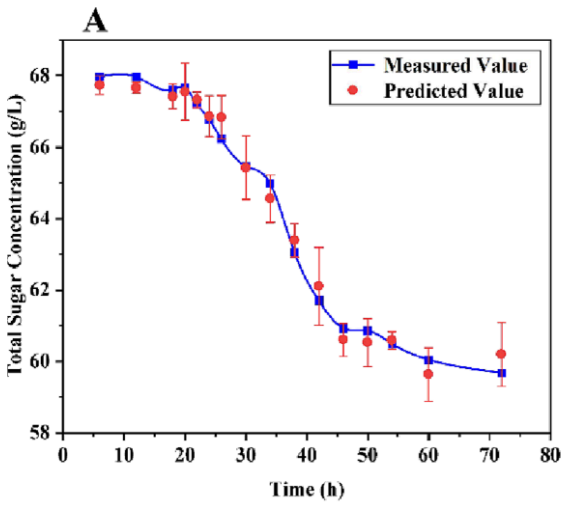
Alguns artigos analisados se propuseram a criar modelos ou métodos para monitorar os parâmetros do processo fermentativo de kombucha. Barbosa et al (2020) analisaram diferentes substâncias no decorrer do processo fermentativo de kombuchas feitas com chá preto e verde através de UPLC, espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), e análises físico-químicas de etanol, pH, açúcares redutores totais e acidez total titulável. Então usaram *Low-level data fusion* para criar um modelo que pudesse identificar as diferentes culturas e

chás utilizados no estudo; a abordagem pode proporcionar diferenciação qualitativa das kombuchas, e análise das alterações bioquímicas na fermentação.

Mais recente Zhao et al (2023a), utilizaram espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) para monitorar as alterações no açúcar total em kombucha durante o processo fermentativo; mínimos quadrados parciais (PLS), rede neural de retropropagação (BPANN) e a combinação PLS-BPANN foram utilizados para estabelecer modelos de relação entre espectros NIR e açúcar total medido pelo método de Antrona. Foi observado que o modelo combinado teve os melhores resultados com coeficiente de determinação de predição (R^2p) de 0,9437, erro quadrado médio de previsão da predição (RMSEP) de 0,8600 g/L e um bom efeito de verificação. Na Figura 5.21 pode ser visto as concentrações de açúcar medidas e as previstas no modelo, durante a análises para validação.

No mesmo ano o grupo também desenvolveu um sistema de detecção de espectroscopia visível/infravermelho próximo (V-NIR) on-line como método para monitorar a concentração de açúcares solúveis, ácidos totais e bactérias durante a fermentação de kombucha; utilizando como valores de referência os obtidos com método de Antrona, titulação potenciométrica, e valores de densidade óptica para representar o valor de concentração bacteriana; o método mínimos quadrados (PLS) foi acoplado ao algoritmo de busca de pardal (SSA), algoritmo de otimização de baleias (WOA) e algoritmo de otimização abutre Africano (AVOA) para o estudo, que demonstrou que o sistema é aplicável (Zhao et al., 2023b).

Figura 5.21 - Concentrações de açúcar medidas e as previstas no modelo com NIR.



Fonte: Adaptado de Zhao et al (2023a).

Kang et al (2023) acompanharam os constituintes ativos da Kombucha usando um conjunto de sensores colorimétricos nano-compósitos (Nano-CSA) acoplados com espectroscopia de infravermelho próximo (NIR). Sessenta e sete compostos voláteis foram determinados como marcadores por cromatografia gasosa (GC-MS); o Nano-CSA foi composto por corantes quimicamente responsivos dopados com estruturas metal-orgânicas (MOFs). As amostras foram separadas usando métodos quimiométricos, e os sistemas tiveram bons resultados.

6 CONCLUSÕES

Apesar do recente crescimento de sua indústria, o kombucha ainda é uma bebida muito caseira, produzida de maneira simples e com pouco acompanhamento da fermentação. Existe uma enorme variedade de condições de preparo; comunidades microbianas; e substratos adicionados, com o intuito de melhorar as características sensoriais e funcionais da bebida. O kombucha é um fermentado complexo que é influenciado por diversos fatores do modo de produção e do ambiente; e diversas pesquisas vêm sendo feitas com o intuito de estudar os efeitos da adição de ingredientes diferentes, temperatura, tempo de fermentação, e também condições de armazenamento.

O pH baixo por muitas vezes é relacionado a segurança da bebida e com condições ideais para produção dos metabólitos de interesse pelos microrganismos; já a acidez é avaliada por questões sensoriais e como uma medida dos ácidos orgânicos formados, principalmente ácido acético. A taxa de consumo dos açúcares (sacarose, glicose e frutose) está diretamente ligada ao estudo do tempo de fermentação, e a quantidade final é associada à doçura da bebida. Em muitos casos o etanol se mostra uma preocupação constante no final da fermentação, e em alguns casos no armazenamento, principalmente pelo fato das kombuchas geralmente não passarem pelo processo de pasteurização.

Os métodos e equipamentos utilizados na medição do pH, acidez e sólidos solúveis totais são sempre os mesmos, pHmetro, titulação, refratômetro, muito por conta de serem simples, baratos e de fácil disponibilidade em laboratórios de análise de bebidas. Já para a determinação do teor de açúcares e teor alcoólico na bebida encontram-se uma variedade de métodos colorimétricos, como Antrona , DNS e fenol-sulfúrico, cromatográficos, a exemplo do HPLC, GC e CCD, e espectroscópicos.

É imprescindível compreender os efeitos que o controle dos parâmetros pode exercer na seleção e no metabolismo dos microrganismos e, consequentemente, nos sabores e nas características desejados da bebida produzida; o conhecimento dessas variáveis e das análises empregadas no monitoramento delas tem o intuito de contribuir para um processo de produção mais controlado e consistente, que possa garantir a uniformidade dos lotes de kombuchas, não só em relação aos parâmetros sensoriais, como o sabor e aroma, mas também para atender as exigências da legislação.

REFERÊNCIAS

ALDERSON, H. et al. Sensory Profile of Kombucha Brewed with New Zealand Ingredients by Focus Group and Word Clouds. **Fermentation**, v.7, n. 3, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/fermentation7030100.

ARIFF, R. M. et al. Recent trends in Kombucha: Conventional and alternative fermentation in development of novel beverage. **Food Bioscience**, v. 53, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102714.

AUNG, T.; EUN, J. Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (*Porphyra dentata*) during fermentation. **LWT - Food Science and Technology**,v. 154, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112643.

BARBOSA, C. D. **Molecular characterization of the microbiota and physical-chemical evaluation of the fermentative process of kombucha**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

BARBOSA, C. D. et al. Data fusion of UPLC data, NIR spectra and physicochemical parameters with chemometrics as an alternative to evaluating kombucha fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 133, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109875.

BARBOSA, C. D. et al. Microbial–physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 148, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111788

BALASUBRAMANIAN, P.; PRAHARAJ, P. T. Principal component analysis revealed the key influencing factors of kombucha bacterial cellulose yield and productivity. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101539.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 41, de 17 de Setembro De 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. **Diário Oficial da União, Brasília**, D.F., 18 de Setembro de 2019.

BREWER, S. S. et al. Survival of *Salmonella* and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* and Changes in Indigenous Microbiota during Fermentation of Home-Brewed Kombucha. **Journal of Food Protection**, v. 84(8), p. 1366-1373, 2021. DOI: https://doi.org/10.4315/JFP-20-483.

BORTOLOMEDI, B. M.; PAGLARINI, C. S.; BROD, F. C. A. Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions. **Food Chemistry**, v. 385, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132719.

CAMPBELL-PLATT, G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2015.

CAVALCANTE, L. T C.; OLIVEIRA, A. A. S. Métodos de Revisão Bibliográfica nos Estudos Científicos. **Psicologia em Revista**, v. 26, n. 1, p. 83-102, 2020. DOI: https://doi.org/10.5752/P.1678-9563.2020v26n1p82-100.

CHANDRAKALA, S. K.; LOBO, R. O.; DIAS, F. O. Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life?. *In*: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. **Nutrients in Beverages**. Academic Press, 2019. v. 12, cap. 16, p. 591-616.

CHAN, M. et al. Determination of Ethanol Content in Kombucha Using Headspace Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection: Single-Laboratory Validation. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 104, n. 1, p. 122-128, 2021. DOI: https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa094

CHOI, E. J. et al. Hangover-Relieving Effect of Ginseng Berry Kombucha Fermented by Saccharomyces cerevisiae and Gluconobacter oxydans in Ethanol-Treated Cells and Mice Model. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, 2023. https://doi.org/10.3390/antiox12030774.

COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, 2017. DOI: https://doi.org/10.1093/femsec/fix048

DARTORA, B. et al. Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, v. 174, n.1, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113569

FRANCISCO, A. R.; MORÓN, J. de la R.; HERNÁNDEZ, I. Development of a no added sugar kombucha beverage based on germinated corn. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 24, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100355.

FREITAS, A. K. N.; SOUSA, P. H. M.; WURLITZER, N. J. Alternative raw materials in kombucha production. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 30, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100594.

FROLOVA, Y. et al. Development of Fermented Kombucha Tea Beverage Enriched with Inulin and B Vitamins. **Fermentation**, v. 9, n. 6, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/fermentation9060552.

GAGGÌA, F. et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. **Nutrients**, v. 11, n.1, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/nu11010001.

GALASSI, G. R. **Estudo do processo fermentativo contínuo para produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

HARDOKO, H.; HARISMAN, E. K.; PUSPITASARI, Y. E. The kombucha from *Rhizophora mucronata* Lam. herbal tea: Characteristics and the potential as an antidiabetic beverage. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 8 (5), p. 410-421, 2020. DOI: https://doi.org/10.56499/jppres20.810_8.5.410.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. (1ª Edição digital). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IVORY, R. et al. Determination of Ethanol Concentration in Kombucha Beverages: Single-Laboratory Validation of an Enzymatic Method, First Action Method 2019.08. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 104, n. 2, p. 422-430, 2021. DOI: https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa122.

JANG, S. S. et al. Ethanol Concentration of Kombucha Teas in British Columbia, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 11, p. 1878-1883, 2021. DOI: https://doi.org/10.4315/JFP-21-130.

JARRELL, J. A. et al. Inoculation, Growth and Bactericidal Effects of Three Kombucha Cultures. **Microbiology Research**, v. 13(1), p. 128-136, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/microbiolres13010010.

JIMÉNEZ, M. R. M. et al. Polyphenolic Profile, Sugar Consumption and Organic Acids Generation along Fermentation of Infusions from Guava (*Psidium guajava*) by the Kombucha Consortium. **Recent Research in Science and Technology**, v. 10, 2018. DOI: https://doi.org/10.25081/rrst.2018.10.3399.

KAEWKOD, 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. 12, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms7120700.

KANG, W. et al. Determination of active constituents in kombucha fermentation broth using nano-composite colorimetric sensor based on selected volatile markers determined by GC–MS. **Microchemical Journal**, v. 195, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109493.

KANURIĆ, K. G. et al. Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26(4), p. 1229-1234, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.02.002.

KHAZI, M. I. et al. Fermentation, functional analysis, and biological activities of turmeric kombucha. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 104(2), p. 759-768, 2024. DOI: https://doi.org/10.1002/jsfa.12962.

KIM, H. et al. Enhancement of the phenolic compounds and antioxidant activities of Kombucha prepared using specific bacterial and yeast. **Food Bioscience**, v. 56, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103431.

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. **Beverages**, v. 6, n. 1, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/beverages6010015.

KITWETCHAROEN, H. et al. Kombucha Healthy Drink—Recent Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. **Fermentation**, v. 9, n. 1, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/fermentation9010048.

KHOSRAVI, S. et al. Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43(2), 2019. DOI: https://doi.org/10.1111/jfpp.13872.

KURZYNA-SZKLAREK, M.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – An overview of methods. **Food Chemistry**, v. 394, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133466

LACORN, M.; HEKTOR, T. Determination of Ethanol in Kombucha, Juices, and Alcohol-Free Beer by Enzytec™Liquid Ethanol: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.07. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 101, n. 4, p. 1101-1111, 2018. DOI: https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0466.

LEONARSKI, E. et al. Typical kombucha fermentation: Kinetic evaluation of beverage and morphological characterization of bacterial cellulose. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 12, 2021. DOI: https://doi.org/10.1111/jfpp.16100.

LIU, Y. et al. Determination of Ethanol Content in Kombucha Products by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection: A Multilaboratory Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 102, n. 3, p. 878-882, 2019. DOI: https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0190.

MAJID, A. A. et al. Probiotic potential of kombucha drink from butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) flower with the addition of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* Dad-13. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 51, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102776.

MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003

MARZBAN, F. et al. Kombucha tea ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse model of multiple sclerosis. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, n. 6 p. 782-793, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2015.1036353.

MENDELSON, C. et al. Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes – a randomized controlled pilot investigation. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1190248.

MIRANDA, J. F. et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, p. 503-527, 2022. DOI: https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029.

MOHSIN, A. Z. et al. The effects of encapsulation process involving arabic gum on the metabolites, antioxidant and antibacterial activity of kombucha (fermented sugared tea). **Food Hydrocolloids for Health**, v. 2, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100072.

MUZAIFA, M. et al. Novel utilization of coffee processing by-products: *kombucha cascara* originated from 'Gayo-Arabica'. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, v. 644, 2021. DOI: https://doi.org/10.1088/1755-1315/644/1/012048.

OLIVEIRA, J. T. et al. Green tea and kombucha characterization: Phenolic composition, antioxidant capacity and enzymatic inhibition potential. **Food Chemistry**, v. 408, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135206.

OHWOFASA, A. et al. Elevated abundance of *Komagataeibacter* results in a lower pH in kombucha production; insights from microbiomic and chemical analyses. **Current Research in Food Science**, v. 8, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100694.

OSIRIPUN, V.; APISITTIWONG, T. Polyphenol and antioxidant activities of Kombucha fermented from different teas and fruit juices. **Journal of Current Science and Technology**, v. 11, n.2, p. 188-196, 2021. DOI: https://doi.org/10.14456/jcst.2021.20.

PÉREZ, M.; DOMINGUEZ-LÓPEZ, I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. The Chemistry Behind the Folin−Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 46, 2023.

PHUNG, L. T. et al. Changes in the chemical compositions and biological properties of kombucha beverages made from black teas and pineapple peels and cores. **Scientific Reports**, v. 13 , 2023. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-023-34954-7.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

POOLE, C. F. **The Essence of Chromatography**. 1ª ed. Elsevier Science, 2003.

PRIMIANI, C. N. et al. Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. **J. Phys.: Conf. Ser.**, v. 1025, 2018. DOI: https://doi.org/10.1088/1742-6596/1025/1/012073.

ROSSINI, D. Q.; BOGSAN, C. S. B. Is It Possible to Brew Non-Alcoholic Kombucha? Brazilian Scenario after Restrictive Legislation. **Fermentation**, v. 9(9), 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/fermentation9090810.

SALES, A. L. et al. Volatile, Microbial, and Sensory Profiles and Consumer Acceptance of Coffee Cascara Kombuchas. **Foods**, v. 12, n. 14, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/foods12142710.

SALIK, F. L. M.; POVOH, N. P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. *In*: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 1993, Águas de São Pedro.

SANTOS, N. B. et al. Características químicas, microbiológicas e nutricionais da Kombucha: uma revisão narrativa da literatura. **Arquivos do Mudi**, v. 27, n. 1, p. 15-28, 2023. DOI: https://doi.org/10.4025/arqmudi.v27i1.

SANWAL, N. et al. Kombucha fermentation: Recent trends in process dynamics, functional bioactivities, toxicity management, and potential applications. **Food Chemistry Advances**, v. 3, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100421.

SUKHERA, J.; Narrative Reviews: Flexible, Rigorous, and Practical. **Journal of Graduate Medical Education**, v. 14, n. 4, p. 414-417, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.4300/JGME-D-22-00480.1.

SILVA, M. M. da et al. Use of Kombucha SCOBY and Commercial Yeast as Inoculum for the Elaboration of Novel Beer. **Fermentation**, v. 8, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/fermentation8120748.

TALEBI, M. et al. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 4062-4067, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/s12161-017-0980-5.

TANTICHARAKUNSIRI, W. et al. Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 1, 2020. DOI: https://doi.org/10.1111/jfbc.13574.

TREVIÑO-GARZA, M. Z. et al. Production of Microbial Cellulose Films from Green Tea (*Camellia Sinensis*) Kombucha with Various Carbon Sources, **Coatings**, v. 10, n.11, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/coatings10111132.

TORRE, C. La et al. Effects of Long-Term Storage on Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Kombucha from Black Tea. **Molecules**, v. 26, n. 18, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules26185474.

TSURU, V. H. et al. Physicochemical, antioxidant and sensory properties of Kombucha beverages obtained from oolong or yerba mate tea fermentation. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, 2021. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.18790.

VALIYAN, F.; KOOHSARI, H.; FADAVI; A. Use of Response surface methodology to investigate the effect of several fermentation conditions on the antibacterial activity of several kombucha beverages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 5, p.1877-1891, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s13197-020-04699-6.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. Tradução de Júlio Carlos Afonso, Paula Fernandes de Aguiar, Ricardo Bicca de Alencastro. 6ª ed. Rio de Janeiro : LTC, 2022. 488p

VUKMANOVIĆ, S. et al. Influence of main production variables to nutritional characteristics of winery effluent Kombucha. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 4, p. 285-294, 2024. DOI: https://doi.org/10.2298/CICEQ231002001V.

WANG, B. et al. Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Black Tea Kombucha Fermented with a New Zealand Starter Culture. **Foods**, v. 12(12), 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/foods12122314.

YANG, J. et al. Microbial and Chemical Profiles of Commercial Kombucha Products. **Nutrients**, v. 14, n. 3, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/nu14030670.

YULIANA, N. et al. Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. **Applied Food Research**, v. 3, n. 1, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297.

ZHAO, S. et al. On-line monitoring of total sugar during kombucha fermentation process by near-infrared spectroscopy: Comparison of linear and non-linear multiple calibration methods. **Food Chemistry**, v. 423, 2023a. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136208.

ZHAO, S. et al. On-line detecting soluble sugar, total acids, and bacterial concentration during kombucha fermentation based on the visible/near infrared combined meta-heuristic algorithm. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 123, 2023b. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105653.

ZOECKLEIN, B. W. et al. **Wine Analysis and Production**. New York: Springer Science+Business Media, 1999.

ZUBAIDAH, E. et al. Characteristic of microbiological, chemical, and antibacterial activity of turmeric (*Curcuma longa*) kombucha. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, v. 924, 2021. DOI: https://doi.org/10.1088/1755-1315/924/1/012080

ZUBAIDAH, E.; DEA, E. C.; SUJUTI, H. Physicochemical and microbiological characteristics of kombucha based on various concentration of Javanese turmeric (*Curcuma xanthorrhiza*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102467.