



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**ESCOLA DE NUTRIÇÃO**  
**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS – DEALI**



Camila Pereira Barbosa Pedra Hume

**KOMBUCHA ARTESANAL E COMERCIAL: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

**Ouro Preto**  
**2021**

Camila Pereira Barbosa Pedra Hume

**KOMBUCHA ARTESANAL E COMERCIAL: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientadora: Profa. Maria Tereza de Freitas

**Ouro Preto  
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE NUTRIÇÃO



**Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:**

**" KOMBUCHA ARTESANAL E COMERCIAL: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS "**

Aos 02 dias do mês de setembro de 2021, remotamente (on-line) pelo aplicativo Google meet no link: <https://meet.google.com/evj-tmhw-fty?hs=122&authuser=0>, para a Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso do/da estudante **Camila Pereira Barbosa Pedra Hume** orientada pela Profa. Maria Tereza de Freitas. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROVAR** a estudante.

Membros da Banca Examinadora:

MARIA TEREZA DE FREITAS 70990161667  
Assinado de forma digital por MARIA TEREZA DE FREITAS 70990161667

**Profª. Maria Tereza de Freitas**  
Presidente (DEALI/ENUT/UFOP)

CAMILA CARVALHO MENEZES SALIERNO 128586000  
Assinado de forma digital por CAMILA CARVALHO MENEZES SALIERNO 128586000  
Data: 2021.09.02 14:01:04 -03'00'

**Profª. Camila Carvalho Menezes Salierno**  
Examinadora (DEALI/ENUT/UFOP)

*Natália Caldeira de Carvalho*

**Profª. Natália Caldeira de Carvalho.**  
Examinadora (DEALI/ENUT/UFOP)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, meu irmão e toda a minha família pelo apoio que sempre me deram, em especial aos meus primos Matheus e Roberta.

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto e a todo o corpo docente pelo comprometimento com a qualidade e excelência do ensino. Em especial, à minha orientadora, Maria Tereza, por toda a dedicação, paciência e pela confiança depositada. Obrigada por me manter otimista durante todo esse processo. Sem sua ajuda e sem seus ensinamentos nada disso seria possível.

Agradeço à Escola de Nutrição, a todos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, em especial, ao Rafael da Bromatologia.

Agradeço imensamente à minha amiga Camila (Passada) pela enorme contribuição para que esse projeto acontecesse. Obrigada por estar comigo nesse desafio.

Agradeço as amigas feitas durante essa trajetória, Felipe, Úrsula, Pampers, Luana Oliveira, Júlia Campolina, Paula, Maria Emília, Camila Laisa, Laura, Sávvia e toda a turma.

Agradeço, em especial, à minhas amigas Natália, Lucilaine e Sirlaine, que se tornaram grandes companheiras nessa caminhada, deixando tudo mais leve e divertido. Agradeço, também, ao meu eterno trio, Gabriela Martins e Izabella (Carvão), que vou levar comigo para vida toda.

Agradeço à República Eclipse por ter me acolhido durante esses anos e por se tornar minha segunda família. Obrigada por todos os ensinamentos, por me ampararem nos momentos em que mais precisei e por me fazerem dar boas risadas, mesmo em meio ao caos.

Também quero agradecer às Profas. Camila Menezes e Natália Carvalho por aceitarem participar da minha banca de defesa.

Por fim, sou grata a todos que, de alguma forma, contribuíram para esse processo!

“Viva no presente, aproveite-o ao máximo,  
isso é tudo que você tem.”

*(Margaret Atwood)*

## RESUMO

A kombucha é uma bebida milenar, de origem asiática, fermentada e levemente adoçada, popularmente associada a propriedades benéficas para a saúde humana. Usualmente, ela é produzida a partir da fermentação do chá preto ou verde adoçado com açúcar, ao qual é adicionado um biofilme composto pela associação simbiótica de bactérias e leveduras, denominado SCOBY. Seu consumo tem sido associado a diversas atividades biológicas, como propriedades antioxidantes e potencial anti-inflamatório. Ainda há uma certa dificuldade em definir os microrganismos exatos que estão presentes na bebida, pois a composição varia entre as fermentações. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar os aspectos microbiológicos e físico-químicos das kombuchas artesanal (KA) e comercial (KC) provenientes do chá verde. As bactérias lácticas, acéticas e as leveduras foram isoladas das amostras e submetidas à contagem das células viáveis. Posteriormente, foram feitos o teste de catalase, a coloração de Gram e a observação microscópica. Além disso, foi mensurado o pH e realizada a acidez titulável ( $\text{g/L}^{-1}$  de ácido acético). Todas as análises foram realizadas com as KAs após 7 dias de fermentação e, com as KCs, assim que os frascos foram abertos. Os resultados encontrados em relação à contagem de células viáveis de bactérias lácticas tiveram valores médios de  $5 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  (KC) e  $6 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  (KA). Para as bactérias acéticas foram encontrados valores médios de  $7 \log \text{UFCmL}^{-1}$  (KC) e  $6 \log \text{UFC mL}^{-1}$  (KA). Já para as leveduras, encontrou-se valores médios de  $6 \log \text{UFC mL}^{-1}$  para ambos os tipos de kombuchas. Os resultados de acidez titulável tiveram variações médias de 3,6 a 4,5  $\text{g/L}^{-1}$  entre as KAs e, para as KCs, de 0,8 a 3,5. Em relação ao pH, os valores na KA variaram de 3,97 a 4,0, já para KC variaram de 3,5 a 3,7. Os valores de pH encontrados estão dentro dos limites estabelecidos pelo regulamento técnico de identidade e qualidade publicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. De acordo com os resultados, conclui-se que a quantidade de células viáveis de bactérias lácticas, acéticas e leveduras apresentaram-se coerentes com base na literatura. No entanto, não há uma legislação específica no parâmetro microbiológico para a kombucha. A variação dos valores de acidez titulável pode ser explicada devido ao fato que a composição do chá é influenciada por diversos fatores, logo, isso afeta diretamente na produção dos ácidos orgânicos. Os valores de pH mais baixos indicam que a kombucha pode ser consumida de forma segura. O mercado da kombucha está crescendo de forma acelerada e as análises do presente estudo podem contribuir na caracterização microbiológica e físico-química da bebida, além de poder auxiliar em estudos futuros para uma possível padronização em escala industrial afim de obter um produto final com características sensoriais desejáveis e seguro para o consumo.

**Palavras-chave:** chá fermentado; bactérias lácticas; bactérias acéticas; leveduras.

## ABSTRACT

Kombucha is an ancient drink, of Asian origin, fermented and slightly sweetened, popularly associated with beneficial properties for human health. It is usually produced from the fermentation of black or green tea sweetened with sugar, to which is added a biofilm composed by the symbiotic association of bacteria and yeasts called SCOBY. Its consumption has been associated with several biological activities, such as antioxidant properties and anti-inflammatory potential. There is still some difficulty in defining the exact microorganisms that are present in the drink, as the composition varies between fermentations. Given the above, this study aimed to analyze the microbiological and physicochemical aspects of artisanal kombucha (KA) and commercial kombucha (KC) from green tea. Lactic, acetic and yeast bacteria were isolated from the samples and submitted to viable cell count. Subsequently, catalase test, Gram stain and microscopic observation were performed. In addition, the pH was measured and the titratable acidity (g/L<sup>-1</sup> of acetic acid) was performed. All analyzes were performed with the KAs after 7 days of fermentation and, with the KCs, as soon as the bottles were opened. The results found in relation to viable lactic bacteria cell count had mean values of 5 log.UFC.mL<sup>-1</sup> (KC) and 6 log.UFC.mL<sup>-1</sup> (KA). For bacteria, the mean values found were 7 log CFU mL<sup>-1</sup> (KC) and 6 log CFU mL<sup>-1</sup> (KA). As for yeasts, mean values of 6 log CFU mL<sup>-1</sup> were found for both types of kombucha. The titratable acidity results had mean variations from 3.6 to 4.5 g/L<sup>-1</sup> between the KAs and, for the KCs, from 0.8 to 3.5. Regarding pH, the values for KA ranged from 3.97 to 4.0, while for KC they ranged from 3.5 to 3.7. The pH values found are within the limits established by the technical regulation of identity and quality published by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. According to the results, it is possible to conclude that the number of viable cells of lactic, acetic and yeast bacteria were consistent with the literature. However, there is no specific legislation on the microbiological parameter for kombucha. The variation in titratable acidity values can be explained by the fact that the composition of tea is influenced by several factors, therefore, this directly affects the production of organic acids. Lower pH values indicate that kombucha can be safely consumed. The kombucha market is growing rapidly and the analyzes of this study can contribute to the microbiological and physicochemical characterization of the drink, in addition to being able to assist in future studies for a possible standardization on an industrial scale in order to obtain a final product with characteristics desirable sensors and safe for consumption.

**Keywords:** fermented tea; lactic acid bacteria; acetic bacteria; yeasts.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Método tradicional de preparação da kombucha .....	27
Figura 2 - Kombucha artesanal com 7 dias de fermentação. ....	28
Figura 3 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias lácticas.....	32
Figura 4 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias acéticas.....	32
Figura 5 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das leveduras.....	33



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros analíticos da bebida kombucha destinado ao consumo humano exigidos pela legislação brasileira. ....	18
Tabela 2 - Quantificação de bactérias lácticas nas amostras de kombucha artesanal (7 dias de fermentação) e kombucha comercial. ....	34
Tabela 3 - Quantificação de bactérias acéticas nas amostras de kombucha artesanal (7 dias de fermentação) e kombucha comercial. ....	35
Tabela 4 - Quantificação de leveduras nas amostras de kombucha artesanal (7 dias de fermentação) e kombucha artesanal. ....	36
Tabela 5 - Resultados dos valores de acidez titulável (AT), com média e desvio padrão (DP) da kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação e da kombucha comercial (KC), ambas à base de chá verde. ....	38
Tabela 6 - Resultados dos valores de pH da kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação e da kombucha comercial (KC), ambas à base de chá verde. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B1 – Tiamina

B12 – Cobalamina

B2 – Riboflavina

B6 – Piridoxina

BAA – Bactérias ácido acéticas

BAL – Bactérias ácido lácticas

BDA – Ágar Batata Dextrose

BOD – Biochemical Oxygen Demand

Br- - Brometo

Ca – Cálcio

Cl- - Cloreto

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

Cu – Cobre

ENUT – Escola de Nutrição

F- - Fluoreto

Fe – Ferro

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> – Hidrogenofosfato

I- - Iodeto

IN – Instrução Normativa

K – Potássio

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MEP – Manitol Gema de Ovo Polimixina

Mn – Manganês

MRS – Man, rogosa e sharpe

Na – Sódio

Ni – Níquel

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato

O<sub>2</sub> - Oxigênio

pH – Potencial de hidrogênio

SCOBY – Cultura simbiótica de bactérias e leveduras

SO<sub>4</sub><sup>-</sup> - Sulfato

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

Zn – Zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Kombucha</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Consumo da Kombucha e legislação</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Benefícios atribuídos ao consumo da kombucha</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Composição microbiológica e química da kombucha</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Obtenção da Kombucha</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção da kombucha artesanal</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção da kombucha comercial</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das amostras</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Quantificação das bactérias ácido lácticas</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Quantificação das bactérias ácido acéticas</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Quantificação de leveduras</b> .....	<b>30</b>
<b>4.7</b>	<b>Caracterização dos microrganismos isolados das amostras de kombucha</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8</b>	<b>Análises físico-químicas</b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>Quantificação e caracterização de bactérias acéticas, lácticas e leveduras</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2</b>	<b>Acidez Titulável</b> .....	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>pH</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>

<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os séculos passados até o momento atual, o papel dos alimentos na promoção da saúde humana tem se tornado cada vez mais elucidado. Estudos concluem que alguns alimentos, especialmente da origem vegetal (frutas, legumes, frutas, oleaginosas, sementes), além da função de suprir as necessidades nutricionais básicas para o corpo, também fornecem diversos componentes bioativos que conferem benefícios à saúde humana, sendo considerados alimentos funcionais. Neste contexto, a kombucha tem ganhado cada vez mais popularidade pelas suas inúmeras atividades biológicas, como propriedades antioxidantes e potencial anti-inflamatório. (JAYABALAN; WAISUNDARA, 2019).

A bebida, kombucha, é conhecida desde tempos imemoriais, consumida primordialmente na China, onde era conceituada por suas supostas propriedades estimulantes e desintoxicantes. A kombucha é uma bebida fermentada, feita tipicamente a partir do chá verde açucarado, acrescido de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) que formam uma película celulósica. O tempo médio de fermentação é de 7 dias, entretanto, o sabor pode variar de espumante sidra de maçã a sabor de vinagre azedo a depender do tempo de fermentação (CHANDRAKALA; LOBO; DIAS, 2019).

A kombucha tem maior aceitação entre os seus consumidores por possuir, geralmente, um sabor ligeiramente ácido e parcialmente carbonatado. Possui atividade antibacteriana, o que evita a contaminação da bebida por bactérias patogênicas e isso se deve a alguns produtos metabólicos do SCOBY, como ácido acético e outros ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação diminuem o pH do chá, levando a uma falta de oxigênio induzida por acidez. Por conseguinte, isso reduz o número de possíveis patógenos, o que resulta em uma bebida segura para consumo, mesmo sendo de origem microbiana (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

Fatores como a fonte de inóculo, a concentração de açúcar e chá, localização geográfica, o tempo de fermentação e a temperatura usada vão influenciar diretamente na concentração, na composição de metabólitos e microbiota da kombucha. Há diversos tipos de fermentação e produtos adquiridos a depender da via metabólica seguida. A fermentação da bebida é uma junção de três delas: alcóolica,

lática e acética, isso pela existência de várias bactérias e leveduras coexistentes no meio. Logo, a cultura do chá é uma simbiose de bactérias ácido acéticas; ácido láticas e leveduras. (SINIR; TAMER; SUNA, 2019; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Dentre os ácidos orgânicos presentes na kombucha, estão o ácido glucurônico, glucônico, etanoico, ácido acético e lático. Além disso, a bebida kombucha contém polifenóis, proteínas, vitaminas e minerais. As atividades dos polifenóis presentes no chá, do efeito sinérgico de diferentes compostos encontrados no chá e também dos compostos produzidos durante a fermentação do chá são responsáveis pelo efeito protetor da kombucha. Os polifenóis representam o maior grupo de fitoquímicos e são os mais abundantes antioxidantes presentes na dieta à base de produtos vegetais. (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018; MOUSAVI *et al.*, 2020).

No Brasil, apesar de haver legislação para a kombucha, ela ainda não está completa e segura, entretanto, sua produção artesanal (caseira) e industrial (comercial) vem crescendo, mesmo na ausência de padrões para sua produção. Em vista disso, em julho de 2018, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou para consulta pública um projeto no qual existiam parâmetros máximos permitidos para análise físico-químicas. Como desfecho, foi publicado a Instrução Normativa (IN) nº 41, em 2019, que estabelece os padrões de qualidade para as kombuchas comercializadas (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

O interesse dos consumidores por alimentos seguros e que promovam a saúde, tem impulsionado a procura por aqueles com alegações funcionais, o que se reflete no consumo da bebida kombucha. Seu consumo vem aumentando exponencialmente, tanto na forma caseira quanto na comercial. Dessa forma, a caracterização microbiológica e físico-química da kombucha artesanal e comercial irá proporcionar mais informações sobre a bebida, assim como contribuirá na expansão do conhecimento do consumidor sobre ela.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos microbiológicos e físico-químicos das kombuchas artesanal e comercial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar microrganismos das amostras de kombucha artesanal e comercial quanto ao teste de catalase e coloração de Gram.

- Quantificar as bactérias acéticas, lácticas e leveduras das amostras de kombucha artesanal e comercial e verificar se estão em consonância com a literatura.

- Verificar se a quantidade de bactérias acéticas, lácticas e leveduras das amostras de kombucha artesanal e comercial estão em consonância com a literatura.

- Avaliar se os valores de pH e acidez titulável das amostras de kombucha artesanal e comercial estão de acordo com a literatura e a legislação vigente.



### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Kombucha

Alimentos e bebidas fermentadas são produzidos e consumidos desde o desenvolvimento das civilizações e eram os alimentos básicos da dieta humana (MARCO *et al.*, 2017). A fermentação é considerada um dos métodos de preparo e conservação dos alimentos mais antigos e econômicos do mundo. Por ser um processo de custo relativamente baixo, com pouca demanda de energia, ela é a principal estratégia para produção de alimentos em determinadas culturas (ŞANLIER; GÖKCEN; SEZGIN, 2019).

O processo de fermentação utiliza o crescimento e as atividades metabólicas de microrganismos para a transformação e a conservação de alimentos, de forma a aumentar sua vida útil. Além da conservação, a fermentação atribui aos alimentos sabor, aparência, aroma, textura e funcionalidades exclusivas (TEREFE, 2016). Os alimentos fermentados já eram elaborados propositalmente muito antes do surgimento da ciência da nutrição e serviam como fontes importantes e estáveis de minerais, vitaminas, calorias e outros nutrientes (TAMANG *et al.*, 2020).

A fermentação pode ser dividida em duas categorias: fermentação anaeróbia, e fermentação aeróbica. Na tecnologia da fermentação, os microrganismos quebram os carboidratos fermentáveis em produtos finais, como ácido orgânico, álcool e dióxido de carbono. Metabólitos antimicrobianos, como as bacteriocinas, também estão presentes nesses produtos finais e têm como função matar ou inibir patógenos presentes, promovendo segurança alimentar (ŞANLIER; GÖKCEN; SEZGIN, 2019).

A kombucha ou kombuchá faz parte dos grupos de alimentos fermentados. Refere-se a uma bebida refrescante fermentada produzida por meio de uma técnica de fermentação do chá preto ou chá verde adoçados, por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras. Essa cultura simbiótica, denominada SCOBY, caracteriza-se por ser uma esponja celulósica que se forma superficialmente, também conhecida como “fungo do chá” (DUTTA; PAUL, 2019).

Os produtos metabólicos derivados da cultura de bactérias e leveduras, como ácido acético e outros ácidos orgânicos, apresentam alto potencial antibacteriano e impedem a contaminação de bactérias patogênicas na bebida. Por ter um sabor

adocicado, levemente ácido e gaseificado, a bebida tem uma grande aceitação pelos consumidores (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

A origem da kombucha ainda é discutida, mas frequentemente está atribuída à China. Segundo a literatura disponível, o imperador da China, Shen Nong preparava a bebida a 2700 a.C. O povo chinês rapidamente percebeu que o chá proporcionava vários benefícios à saúde e, de forma acelerada, a bebida se popularizou entre todos os residentes daquele local, desde os escalões superiores da sociedade até os soldados e pessoas que viviam em humildes vilas remotas (YOUNG, 2019).

Em torno de 220 a.C., no decorrer da Dinastia Tsin ('Ling Chin'), o fungo do chá era denominado como o divino 'Ling-tche' ou 'Che' e era usado no nordeste da China (Manchúria) por ter propriedades desintoxicantes e energizantes. Em torno de 414 d.C., por intermédio de um médico chamado Kombu, o chá foi inserido no Japão para tratar dos problemas digestivos do imperador Ynkyo. Dessa forma, Kombu trouxe consigo o divino Che, que mais tarde se popularizou como kombucha (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

Os guerreiros japoneses costumavam carregar o chá para o campo de batalha para aumentar sua força e energia. Essa prática de consumir chá cultivado com fermento também era popular na Rússia (DUTTA; PAUL, 2019). Estudos apontam que isso tenha ocorrido no final do século XIX, quando soldados da China, Japão, Coreia e Rússia se envolveram em conflitos territoriais e como consequência tiveram uma mistura de suas práticas culturais (YOUNG, 2019). Os moradores dessa região ficaram conhecidos por apresentarem um envelhecimento retardado com uma expectativa de vida superior a cem anos (DUTTA; PAUL, 2019).

Por volta de 1900, a Kombucha se popularizou em grande parte da Rússia. Durante a Primeira Guerra Mundial, um cientista alemão Dr. Rudolf Sklenar presenciou os camponeses russos usando a Kombucha para ajudar os soldados feridos. Ao se intrigar com o seu potencial efeito na saúde, voltou para a Alemanha e começou a usar o chá no tratamento de pacientes com câncer (YOUNG, 2019).

Durante a Segunda Guerra Mundial, o hábito de consumir a kombucha se tornou costumeiro por toda a Europa. Como consequência, esse alto consumo causou escassez tanto das folhas do chá quanto do açúcar (SINIR; TAMER; SUNA, 2019).

Na década de 1950, o seu consumo se tornou muito popular na França, seguido pelo Norte da África. Nos anos pós-guerra o consumo da kombucha atingiu o auge na sociedade italiana (conhecido como 'Funkochinese'), até o momento em que se espalhou um boato sobre o efeito tóxico da bebida (DUTTA; PAUL, 2019; JAYABALAN *et al.*, 2014).

Diante do ocorrido, durante a década de 1960, pesquisadores científicos na Suíça compararam a kombucha com o iogurte e concluíram que o hábito de beber kombucha era tão benéfico quanto tomar iogurte (JAYABALAN *et al.*, 2014). A popularidade da kombucha se expandiu ainda mais após o desastre de Chernobyl em 1986. Médicos que monitoravam a saúde das pessoas que moravam nas cidades ao redor de Chernobyl, perceberam que os indivíduos que faziam uso da kombucha eram mais resistentes aos efeitos da radiação nuclear (YOUNG, 2019).

Durante a epidemia de HIV, a Kombucha ganhou popularidade nos Estados Unidos na década de 1980, devido à crença de que a bebida pudesse fortalecer o sistema imunológico comprometido. Entretanto, em 1995 foi publicado um estudo que relacionava o chá a dois casos de acidose metabólica grave, sendo um fatal. Isso levou à obscuridade sobre os benefícios da bebida (SURHE, 2020).

Nas últimas duas décadas, a kombucha recuperou a sua popularidade nos Estados Unidos e em outras partes do mundo. A bebida é produzida em larga escala para comercialização, bem como de forma caseira para o consumo doméstico, visto que o método de preparação em casa é acessível e descomplicado. Hoje em dia, a cultura do kombucha e o chá podem ser produzidos com diversos sabores e são facilmente encontrados em *sites online* ou lojas de alimentos (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

### 3.2 Consumo da Kombucha e legislação

Para produzir o chá em casa de forma tradicional, é necessário adquirir as colônias do chá do Kombucha (SCOBY) por meio de doações, ou pode ser obtida por fornecedores que comercializam tanto o SCOBY quanto o chá de kombucha já pronto. A produção caseira além de ser mais econômica, devido aos ingredientes utilizados na bebida serem de baixo valor, tem melhor qualidade, pois pode proporcionar uma

variedade maior de microrganismos (BRUSCHI; SOUSA; MODESTO, 2018). Entretanto, é importante ressaltar que a produção, se feita em ambiente não favorável e com materiais não esterilizados, pode promover a contaminação por outros microrganismos indesejáveis.

Em 2016, os Estados Unidos foram responsáveis por 51% das vendas de kombucha mundialmente e sua taxa de crescimento anual é de 14% a 25%. Na América Latina, estima-se nos próximos anos, uma forte demanda pela bebida kombucha, juntamente com um crescimento econômico, sendo essa demanda maior no Brasil, Venezuela e Argentina (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

Em decorrência dos efeitos positivos presentes nos alimentos fermentados, um dos setores da indústria que mais tem crescido é o mercado global de alimentos e bebidas probióticas. Em 2020, a indústria atingiu cerca de US\$ 2,5 bilhões em equipamentos para alimentos e ingredientes probióticos. A expectativa é que esse crescimento permaneça ao longo dos anos, uma vez que há um aumento da consciência global sobre o seu consumo, que levam a melhorias no estilo de vida e na saúde (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

Ademais, a Kombucha tem tido outras aplicações interessantes. Tanto o chá quanto o biofilme estão se mostrando como opções promissoras no desenvolvimento de novas bebidas. A kombucha tem sido utilizada como cultura inicial para fermentação de leite, soro de queijo, laranja, uva, cereja azeda, alcachofra de Jerusalém, equinácea, groselha preta, eucalipto, menta, café, água de coco, afim de melhorar suas propriedades funcionais (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021; XIA *et al.*, 2019).

O mercado da kombucha no Brasil é relativamente recente e as produções artesanais para consumo próprio, e as industriais, para a comercialização, começaram a crescer de forma acelerada, mesmo sem haver controle das características físico-químicas e microbiológicas (SUHRE, 2020). Em vista disso, em 28 de janeiro de 2018 foi fundada a Associação Brasileira de Kombucha (ABKom, 2018), uma entidade civil de âmbito nacional, sem fins lucrativos, na qual um dos seus objetivos seria incluir a kombucha na legislação brasileira, para que, dessa forma, todas as marcas sigam um padrão de qualidade para produzir a bebida.

Devido ao grande interesse da indústria de alimentos em ampliar os processos de produção da bebida para atender a grande demanda, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Portaria nº 103, de 20 de setembro de 2018, lançou para consulta pública, o Projeto de Instrução Normativa com as normas que pretendiam estabelecer em todo o território nacional os Padrões de Identidade e Qualidade da Kombucha (BRASIL, 2018). Posteriormente, foi publicado no Diário Oficial da União a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, que estabelece os padrões de qualidade para as kombuchas comercializadas. A partir da data de publicação, os comercializadores tiveram o prazo de 365 dias para efetuar as adequações às regras estabelecidas quanto ao registro e rotulagem da bebida (BRASIL, 2019). Os parâmetros descritos na Instrução Normativa estão exibidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros analíticos da bebida kombucha destinado ao consumo humano exigidos pela legislação brasileira.

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

Fonte: Adaptado de Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019/MAPA

### 3.3 Benefícios atribuídos ao consumo da kombucha

Atualmente, com o aumento da conscientização da população sobre a qualidade de sua alimentação, observa-se uma forte tendência ao consumo de alimentos minimamente processados e/ou *in natura*, com alto valor nutricional, sem aditivos e que tenham algum benefício à saúde. Dentro desse contexto, devido aos microrganismos presentes, a kombucha traz diversos benefícios à saúde com seus

efeitos probióticos. Os principais benefícios oferecidos pela bebida incluem os efeitos antidiabéticos, anticarcinogênicos, anti-hiperglicêmicos, atividade anti-inflamatória e antioxidante, melhora no colesterol, melhora nas funções gastrointestinais, fígado e sistema imunológico (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Sabe-se que todos os alimentos existentes possuem, de certa forma, características funcionais pelo fato de oferecerem nutrientes e energia para o corpo de um ser humano. Todavia, é possível encontrar evidências da existência de componentes alimentares bioativos que podem proporcionar efeitos benéficos à saúde humana, mesmo não sendo considerados nutrientes (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

Segundo a Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999, na qual estabelece as diretrizes para alimento com propriedades funcionais, o alimento com alegação de propriedade funcional é definido como sendo aquele alimento ou ingrediente que quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde, além das suas funções nutritivas básicas, devendo ser seguro para o consumo sem a necessidade de supervisão médica (BRASIL, 1999).

Nas últimas décadas, os probióticos, prebióticos e simbióticos têm sido alvo de extensas pesquisas pelos benefícios proporcionados à saúde. Esses alimentos, intitulados alimentos com alegação de propriedades funcionais, têm a capacidade de alterar, modificar temporariamente, enquanto consumidos, e reestabelecer a flora intestinal existente, além de facilitar e regular o funcionamento do intestino (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

Os probióticos são bactérias vivas que, quando ingeridas em quantidades adequadas, propiciam benefícios à saúde do hospedeiro, as mais comumente utilizadas são: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae* e *Bacillus coagulans*. Os prebióticos são principalmente fibras, que são ingredientes alimentares não digeríveis cujo papel é estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de alguns gêneros de microrganismos no cólon, a fim de melhorar a saúde do hospedeiro (VIRAMONTES HÖRNER; AVERY; STOW, 2017).

Tradicionalmente, os probióticos estão associados aos produtos lácteos, no entanto, bactérias encontradas em laticínios, vegetais e outras fórmulas também são vistas como probióticas. Com o avanço dos estudos sobre probióticos é possível observar

que novas formulações são aceitas, principalmente as originadas de comunidades microbianas simbióticas. Logo, ao considerar que a kombucha é uma cultura simbiótica de bactérias e que, além disso, as leveduras reconhecidas como sendo probióticas, como a *S. cerevisiae*, também estão presentes na bebida, isso desperta a curiosidade de pesquisadores em explorar melhor a relação entre a kombucha e seus alegados benefícios à saúde (KOZYROVSKA *et. al*, 2012).

Os prebióticos fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), xilo-oligossacarídeos (XOS) e inulina são as fibras mais frequentemente utilizadas e quando estão em conjunto com os probióticos, são denominados simbióticos. Além disso, quando são usados juntos, têm a capacidade de aprimorar a viabilidade dos microrganismos em questão. Os efeitos benéficos documentados dos probióticos compreendem a prevenção de diarreia e constipação, aumento da atividade anti-inflamatória e antibacteriana e alterações na conjugação dos sais biliares. Eles também contribuem para a síntese de nutrientes e melhoraram sua biodisponibilidade (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

Desde o momento que a kombucha ganhou popularidade, principalmente no mundo ocidental, a bebida é considerada por diversas vezes como possuidora de propriedades saudáveis, sendo essas propriedades advindas do próprio chá ou metabólitos produzidos durante a fermentação pelos microrganismos. Embora existam alegações sobre suas propriedades funcionais e probióticas, ainda são necessários mais estudos que realizem a caracterização dos seus componentes bioativos, suas propriedades farmacológicas e sua evolução durante a fermentação (COTON *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos que estão presentes na kombucha, como polifenóis e ácido glucurônico, atuam de forma sinérgica. Os benefícios atribuídos ao chá preto e o chá verde são provenientes das catequinas neles presentes. A catequina é um polifenol, da classe dos flavonoides, que atua como antioxidante e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças. Dessa forma, ao considerar que a kombucha é produzida a partir do chá preto ou verde, os resultados benéficos do seu consumo estão diretamente associados ao efeito sinérgico de seus componentes (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

Juntamente com as atividades antioxidantes, a kombucha pode apresentar toxicidade seletiva em células cancerígenas colorretais Caco-2, além da atividade inibitória contra bactérias entéricas patogênicas. Estudos atribuem o efeito antibacteriano aos ácidos orgânicos presentes no chá, que são eficazes contra os patógenos *Escherichia coli*, *E. coli* O157: H7, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Typhi e *Vibrio cholerae*, bem como atividade antioxidante contra radicais DPPH. Contudo, os grandes benefícios à saúde promovidos pela kombucha estão relacionados com a promoção da função saudável do sistema digestivo no trato gastrointestinal e a inibição de bactérias patogênicas (KAEWKOD; BOVONSOMBUT; TRAGOOLPUA, 2019).

Salienta-se ainda que o chá pode ser capaz de reduzir a captação de colesterol pelo sangue. Elevados níveis de colesterol e, dependendo da situação, triglicerídeos são classificados como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e aterosclerose. Estudos *in vivo* demonstraram que a kombucha reduz significativamente os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol LDL no sangue, sendo assim, o chá pode ajudar na prevenção de doenças cardiovasculares (DOUDI *et al.*, 2020).

Além das possíveis atividades antilipídêmicas, a kombucha pode apresentar propriedades hipoglicêmicas, uma vez que a bebida supostamente reduz a atividade da  $\alpha$ -amilase pancreática. A  $\alpha$ -amilase desempenha um papel essencial na digestão dos carboidratos. A inibição da sua atividade no trato digestivo de pacientes diabéticos não-insulino dependentes é um dos métodos terapêuticos utilizados corriqueiramente para o controle e prevenção da hiperglicemia pós-prandial. Isso acontece em decorrência da redução da captação de glicose liberada por essas enzimas do amido. Logo, a kombucha tem um importante potencial para ser usado futuramente no tratamento ou na prevenção de diabetes (ALLOULOU *et al.*, 2012).

A kombucha ganhou popularidade como alimento funcional devido aos seus supostos benefícios para a saúde. Essa popularidade se expandiu junto com o movimento científico que investiga o papel dos componentes do chá. Todavia, as evidências que apoiam os benefícios do kombucha para a saúde humana, ainda são consideradas escassas. Dessa forma, mais pesquisas nessa área se fazem necessárias para comprovar os reais benefícios da bebida para o organismo dos seres humanos (PINTO *et al.*, 2019).



### 3.4 Composição microbiológica e química da kombucha

A comunidade microbiana da kombucha se desenvolve em dois compartimentos mutuamente não exclusivos: o chá ou a bebida (fase líquida) e o biofilme celulósico flutuante nele, também conhecido como película (SCOBY). Essa película tem um formato de disco achatado, com aspecto liso e gelatinoso e de cor bege, cobrindo a superfície do chá (CHANDRAKALA; LOBO; DIAS, 2019). Uma poderosa simbiose é criada no meio, pelas bactérias e leveduras, que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos contaminantes (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Os microrganismos que se encontram presentes na kombucha têm uma relação simbiótica e favorecem a produção extracelular de fibrilas de celulase, ajudando a formar o biofilme na interface ar-líquido (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). Os constituintes da fase líquida são o ácido acético, ácido glucônico e o etanol. Entretanto, eles também fazem parte do biofilme uma vez que possuem alta capacidade de absorção de água (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Os microrganismos indígenas produzem o biofilme no qual é diretamente responsável pela fermentação da kombucha (COTON *et al.*, 2017). Cada fermentação leva a uma nova camada de biofilme, e a mesma pode ser utilizada em fermentações futuras funcionando como iniciador, ou também conhecida como “backslopping”, uma técnica na qual uma nova fermentação é obtida a partir de uma pequena quantidade da fermentação anterior usada como matéria-prima (KIM *et al.*, 2018).

Na kombucha, os gêneros bacterianos disponíveis em abundância são *Acetobacter* e *Gluconobacter*. As principais cepas de bactérias do ácido acético já encontradas são *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurinus* e *Gluconobacter oxydans*. A *Acetobacter xylinum* é responsável pela produção de celulose que flutua na superfície do caldo do chá em fermentação, e essa rede celulósica potencializa a associação entre as bactérias e fungos. No processo de fermentação, as células bacterianas e de leveduras se fixam à rede celulósica para, em seguida, se incorporar na camada tornando-a mais espessa. Em cerca de 14 dias de fermentação o SCOBY atinge espessura de 8 a 12 mm. (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016; SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

As leveduras associadas ao kombucha são do gênero *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Koleckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora* e *Zygosaccharomyces*. As espécies relatadas no gênero *Candida* são *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. obtusa*, *C. stellate*, *C. colliculosa*, *C. Kefyr* e *C. krusei*. O gênero *Brettanomyces* inclui *B. intermedius*, *B. bruxellensis* e *B. claussenii*. As espécies de *Saccharomyces* identificadas foram *S. cerevisiae* e *S. bisporus*. *Zygosaccharomyces* identificados foram *Z. rouxii*, *Z. baili* e *Z. Kombuchaensis* sp e a espécie do *Schizosaccharomyces* entrada foi *S. pombe* (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

A levedura, considerada um anaeróbico facultativo, tem a capacidade de metabolizar a glicose tanto na ausência de oxigênio quanto na presença dele. Enzimas como a invertase, produzida a partir das leveduras, decompõe a sacarose em glicose, frutose e dióxido de carbono, que proporciona a efervescência e os aspecto cintilante. Em condições aeróbicas, o açúcar é convertido em CO<sub>2</sub>, energia e água, não havendo produção de álcool. Entretanto, nas condições anaeróbicas, a levedura muda para a fermentação utilizando em torno de 5% apenas da energia contida na glicose para produzir etanol como produto final. O fermento prefere a frutose como substrato na produção de etanol (CHANDRAKALA; LOBO; DIAS, 2019; WATAWANA *et al.*, 2015). Quanto às bactérias do ácido láctico, os *Lactobacillus* são predominantes na kombucha, em particular nos estágios posteriores de fermentação. O gênero mais abundante é o *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. Pode haver também a presença de *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lutetiensis* e *Brevibacterium* sp. como constituintes em inóculos de kombucha feita com chá preto.

Por conseguinte, é possível perceber que inúmeras espécies de bactérias e leveduras estão presentes no SCOBY e juntas formam uma forte simbiose que previnem o crescimento de bactérias contaminantes. As leveduras convertem o açúcar em ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub> e etanol. Posteriormente, o etanol produzido é oxidado pelas bactérias do ácido acético e se transforma em ácido acético pela enzima acetaldéido desidrogenase. As bactérias do ácido acético também utilizam da glicose e frutose para sintetizar ácido glucônico e ácido acético, respectivamente. Tanto o etanol quanto o ácido acético são antimicrobianos contra patógenos (LAAVANYA;

SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; SINIR; TAMER; SUNA, 2019; SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

O pH da kombucha diminui quando a sua população de bactérias do ácido láctico e ácidos acéticos aumentam (SINIR; TAMER; SUNA, 2019). Entretanto, uma produção excessiva de ácidos orgânicos podem prejudicar a aceitação do sabor (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

O período de fermentação do chá requer um mínimo 3 e um máximo de 60 dias, variando de acordo as práticas culturais (WATAWANA *et al.*, 2015). Para otimizar o tempo de fermentação, a kombucha é fermentada à temperatura ambiente. A principal fonte de carbono é a sacarose a uma concentração de 5 a 20%, oferecendo o meio e os nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos. Por fim, utiliza-se um SCOBY ou o líquido a uma concentração de 10% de uma fermentação anterior que será utilizado como cultura inicial para a fermentação (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

Em síntese, variações no processo de fermentação como a temperatura, concentração de sacarose e o tempo, irão definir a concentração final das substâncias orgânicas como ácidos e o pH. Durante esse processo, os ácidos orgânicos produzidos são capazes de reduzir o valor do pH do chá, o que resulta na falta de oxigênio induzida pela acidez. Conseqüentemente, apesar da bebida ser de origem microbiana, o número de possíveis células microbianas patogênicas são reduzidos nesse processo, permitindo que a bebida seja consumida de forma segura (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

A composição e a concentração de metabólitos vão depender sempre da tecnologia utilizada, da fonte de inóculo, da concentração de açúcar e chá, o tempo de fermentação e temperatura. Qualquer mudança em alguma dessas condições, afeta o produto final. Podem haver diferentes concentrações de açúcar entre uma fermentação e outra, e devido a isso, a via metabólica nem sempre acontece do da mesma forma (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

No processo de fermentação do açúcar pelas bactérias, há a produção de um coquetel complexo de moléculas. A composição final consiste compostos gerais como etanol, aminoácidos, polifenóis e ácidos orgânicos como ácido láctico, cítrico, oxálico, glucônico, glucurônico e málico. Minerais como Na, K, Ca, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e

vitaminas solúveis em água como vit. C, vit. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>. Ânions como F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, além das catalases, dióxido de carbono, substâncias antibióticas e enzimas hidrolíticas (MOUSAVI *et al.*, 2020; WATAWANA *et al.*, 2015).

O ácido glucurônico está associado a um papel na desintoxicação xenobiótica dos rins, devido a sua capacidade de se ligar com as moléculas tóxicas que entram no corpo, e juntamente com a capacidade de aumentar a excreção delas por meio da ajuda dos rins e intestino (JAYABALAN; WAISUNDARA, 2019). Ele também está envolvido na eliminação endobiótica, principalmente da bilirrubina. O processo de glucoronidação previne os efeitos tóxicos desses pigmentos, além de impedir a inibição de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidrato e proteínas. Acrescenta-se ainda que o ácido glucurônico aumenta a biodisponibilidade dos polifenóis, uma vez que ele se conjuga junto com os fenóis, melhorando seu transporte (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

Os polifenóis por sua vez, são compostos ativos com mais de uma unidade estrutural de fenol por molécula. São considerados os antioxidantes mais abundantes presentes na dieta, desempenhando papel na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. A kombucha tem seu efeito protetor em maior parte devido à atividade dos polifenóis, compostos produzidos durante a fermentação. O teor de polifenol aumenta durante o tempo de fermentação. A epigalocatequina e a epicatequina são as catequinas mais predominantes no chá (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

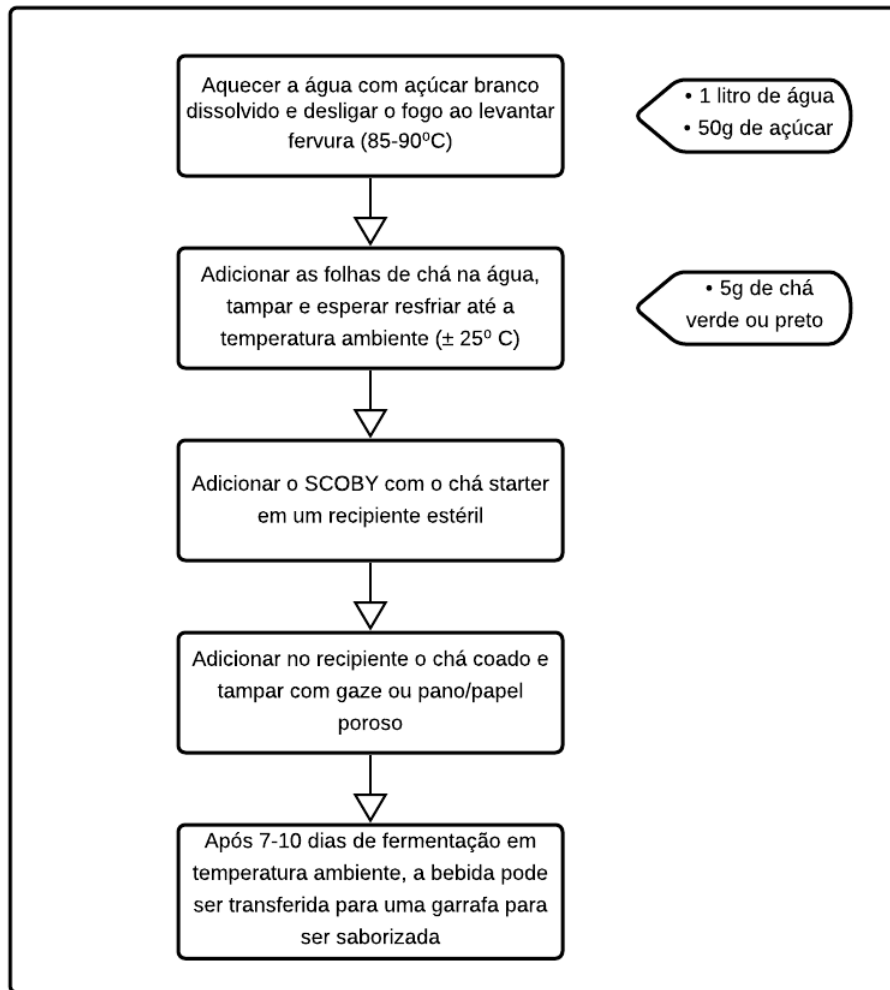
### 3.5 Obtenção da Kombucha

O chá da espécie *Camellia sinensis* é um dos mais populares para produzir a bebida Kombuch. Existem três tipos principais: o chá preto, chá verde e o chá oolong, sendo o preto mais utilizado, representando cerca de 80% do chá consumido em todo o mundo. Os componentes básicos do chá são os alcaloides purínicos, como cafeína, teaflavinas, galotaninos, triterpeno, saponinas, flavonoides, compostos minerais, vitaminas e carboidratos. O chá preto é popular por suas propriedades de eliminação de radicais com a ajuda dos polifenóis (WATAWANA *et al.*, 2015).

Nesse sentido, o tipo de chá utilizado influencia diretamente no produto final. O chá verde, por ter taninos em sua composição, concedem um sabor ligeiramente amargo na bebida. Por outro lado, o chá preto tem mais nitrogênio e purinas em sua composição, tendo um sabor mais suave. Outros tipos de chá também podem ser utilizados como substratos como o chá de jasmim, chá de amora, chá verde japonês, entre outros (CHANDRAKALA; LOBO; DIAS, 2019).

Em um período de 7 a 10 dias, o consórcio simbiótico da kombucha é capaz de converter, em condições aeróbicas e temperatura ambiente, o açúcar e o chá em uma bebida marcada por um sabor ligeiramente ácido, sendo considerada refrescante e bem aceita pelos consumidores, além de ser composta por vários ácidos, aminoácidos, vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Períodos prolongados de fermentação leva a um sabor de vinagre no produto final. Isso acontece por causa dos ácidos orgânicos, sobretudo o acético e láctico, assim como outros metabólitos liberados pelos microrganismos, em conjunto com o CO<sub>2</sub> da fermentação alcoólica da levedura (COTON *et al.*, 2017). Na Figura 1, o fluxograma representa o método de preparação tradicional do chá.

Figura 1 - Método tradicional de preparação da kombucha.



Fonte: Do Autor.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção da kombucha artesanal

O SCOBY foi obtido por meio da doação de uma discente do curso de Nutrição. O método artesanal foi desenvolvido a partir do modo padrão. Para o preparo da bebida utilizou-se 1 litro da água destilada, chá verde (*Camellia sinensis*) a 10% (p/v) com 20% de sacarose (p/v) em ebulição por 15 minutos. O chá foi deixado em repouso até que atingisse a temperatura ambiente. Em seguida, ele foi coado com uma peneira de alumínio esterilizada e transferido para um béquer de vidro com capacidade para 2 L. No mesmo béquer, acrescentou-se o SCOBY juntamente com o chá *starter*, sua superfície foi coberta com um papel toalha poroso e o recipiente foi incubado em temperatura ambiente ao abrigo de luz para a fermentação por 7 dias. Na Figura 2 está representada a kombucha artesanal com 7 dias de fermentação.

Este procedimento foi realizado três vezes, obtendo-se, portanto, três amostras.

Figura 2 - Kombucha artesanal com 7 dias de fermentação.



Fonte: Do Autor.

### 4.2 Obtenção da kombucha comercial

Como amostra de kombucha comercial, foi utilizada uma marca de kombucha adquirida no mercado local do município de Ouro Preto - MG. Foram obtidas 3 unidades de uma mesma marca, sendo todas do mesmo lote e com sabor original de chá verde. Ao serem adquiridas, as garrafas foram levadas para o Laboratório de

Microbiologia dos Alimentos da Escola de Nutrição (ENUT) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) para realização das análises microbiológicas.

#### 4.3 Preparo das amostras

As amostras de kombucha foram submetidas à contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras. Realizou-se o preparo das diluições decimais seriadas. Para realizar as diluições, utilizou-se  $25 \pm 0,2$  mL de cada amostra da bebida kombucha que foi imediatamente diluída em 225 mL de solução peptonada tamponada 0,1% esterilizada. Em seguida, a mistura foi homogeneizada manualmente por 2 minutos para, dessa forma, obter a primeira diluição,  $10^{-1}$ . Posteriormente, foi transferido 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio, contendo 9 mL de solução peptonada tamponada a 0,1%, homogeneizou-se o tubo com auxílio de vórtex e, sendo assim, adquiriu-se a diluição  $10^{-2}$  e, assim, sucessivamente até a diluição  $10^{-6}$ . Todas as análises foram realizadas em duplicata e somente da parte líquida das amostras.

#### 4.4 Quantificação das bactérias ácido lácticas

A enumeração das bactérias ácido lácticas (BAL) foi realizada de acordo com a metodologia da *The International Organization Standardization* (ISO, 1998). Foi realizado o plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em ágar *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), previamente esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Foram inoculadas as diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  das amostras das kombuchas artesanal e comercial. As placas foram colocadas na jarra de anaerobiose e incubadas a  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. Após o tempo de incubação, foi realizada a contagem das colônias isoladas no contador de colônias Phoenix CP 602<sup>®</sup> e os resultados foram expressos em Log UFC  $\text{mL}^{-1}$  (Logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias). As colônias que cresceram nos meios de cultura foram submetidas ao teste de catalase com peróxido de hidrogênio a 3% e coloração de Gram.

#### 4.5 Quantificação das bactérias ácido acéticas

Para a quantificação de bactérias ácido acéticas (BAA) foi realizado o plaqueamento em superfície (*spread plate*) das diluições em ágar MEP (CAMU *et al.*, 2007). Foram inoculadas as diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  das kombuchas artesanal e comercial e as placas foram incubadas em BOD Cienlab a  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 3 a 4 dias. Após o tempo de



incubação, foi realizada a contagem das colônias isoladas e os resultados foram expressos em Log UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6 Quantificação de leveduras

Para a quantificação de leveduras foi realizado o plaqueamento em superfície (*spread plate*) das diluições em ágar batata dextrose (BDA) acidificado com solução de ácido tartárico 10% para cada 100 mL (MORTON, 2001). Foram inoculadas as diluições 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> das kombuchas artesanal e comercial. Incubaram-se as placas em aerobiose a 25±1°C C por 4 dias. Após o tempo de incubação, foi realizada a contagem das colônias e os resultados foram expressos em Log UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 4.7 Caracterização dos microrganismos isolados das amostras de kombucha

As colônias isoladas das amostras de kombucha foram submetidas ao teste de catalase com peróxido de hidrogênio a 3% e coloração de Gram, seguida de observação microscópica em microscópio Bioval®.

#### 4.8 Análises físico-químicas

##### 4.8.1 Acidez titulável

A análise de acidez titulável foi realizada no Laboratório de Bromatologia da ENUT pelo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Com o auxílio de uma pipeta de vidro, foram transferidos 50 mL de kombucha artesanal para um erlenmeyer de 250 mL, sendo a análise feita em triplicata, caracterizando-as como V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> e V<sub>3</sub>. O mesmo procedimento foi realizado para a kombucha comercial. A acidez titulável foi obtida por meio da titulação, adicionando 5 gotas de fenolftaleína em cada erlenmeyer e em seguida titulou-se a amostra com uma solução de NaOH padronizada 0,1 mol/L até a amostra atingir uma coloração rósea. A acidez titulável foi calculada conforme a Equação 1 e os resultados expressos como g L<sup>-1</sup> de ácido acético.

$$\text{Acidez total titulável (A\%)} = \left( \frac{V \times F \times M \times PM}{10 \times P \times n} \right) \times 10$$

Sendo:

A= Acidez total titulável (%), em g de ácido orgânico por cento (m/m ou m/v);

V= Volume gasto na titulação de NaOH (mL);

$F$ = Fator de correção da solução de NaOH;

$M$ = Molaridade da solução de NaOH;

$PM$ = Peso molecular do ácido correspondente (g);

$P$ = Massa da amostra (g);

$N$ = Número de hidrogênios ionizáveis.

#### 4.8.2 pH

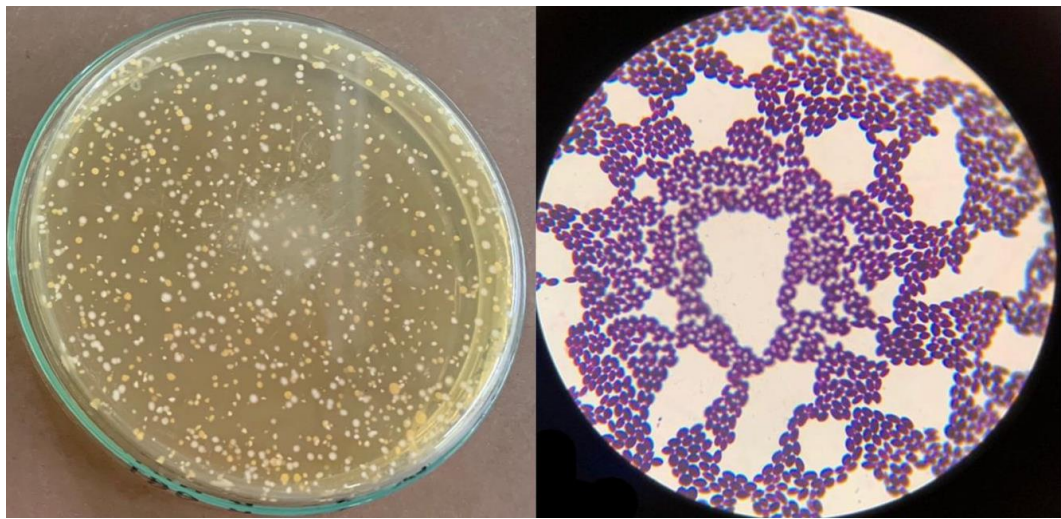
Em um béquer com capacidade de 50 mL, foi adicionado 20 mL de amostra, sendo uma de kombucha artesanal e outra de kombucha comercial, ambas foram submetidas a análise de determinação de pH com auxílio de um pHmetro BEL Engineering S.r.l.<sup>®</sup>, previamente calibrado, seguindo as instruções do próprio fabricante. Os resultados foram coletados de forma direta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Quantificação e caracterização de bactérias acéticas, lácticas e leveduras

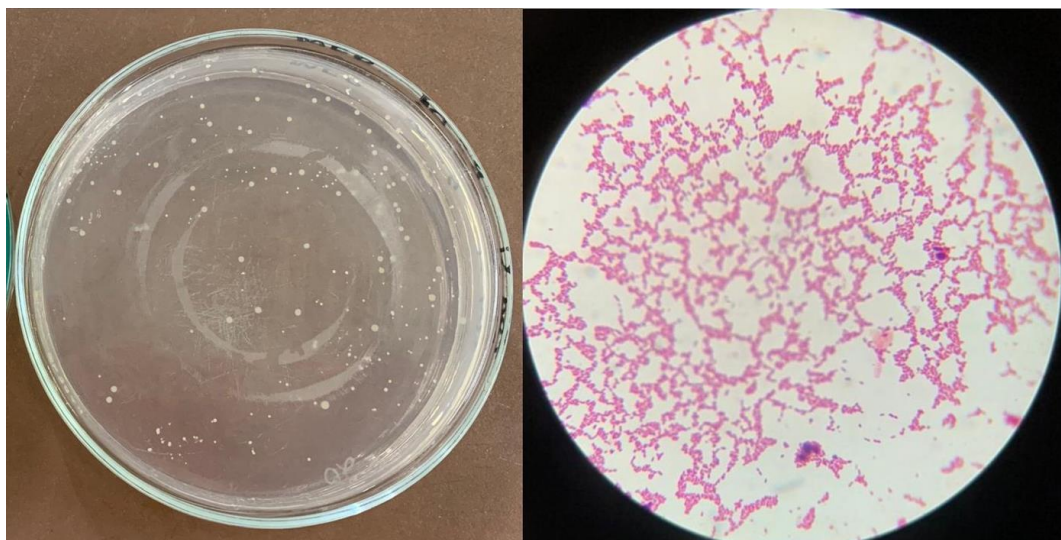
Os microrganismos quantificados em cada amostra foram submetidos aos testes de catalase e coloração de Gram para confirmação das características inerentes a cada tipo. As figuras 3, 4 e 5 exemplificam as placas contendo colônias de bactérias acéticas, lácticas e leveduras e seus respectivos testes de coloração de Gram.

Figura 3 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias lácticas.



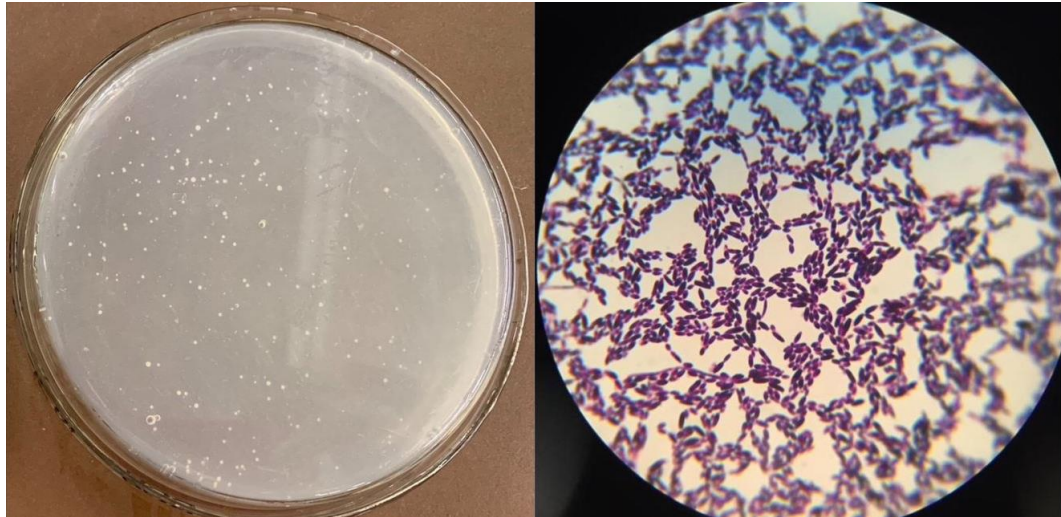
Fonte: Do Autor.

Figura 4 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das bactérias acéticas.



Fonte: Do Autor.

Figura 5 - Microrganismos isolados para a quantificação e caracterização das leveduras.



Fonte: Do Autor.

De acordo com a literatura, as bactérias lácticas, de modo geral, apresentam-se negativas para o teste de catalase, isso significa que elas não liberam gás  $O_2$  na presença de  $H_2O_2$ , não havendo produção de bolhas. Na caracterização microscópica, elas são Gram-positivas (+) e morfológicamente se apresentam como bastonetes ou cocos (ANDRES BARRAO, 2012). No presente estudo, é possível observar que as colônias de bactérias lácticas isoladas (Figura 3) estão condizentes com a literatura.

As bactérias acéticas respondem de forma positiva ao teste de catalase, o que indica que elas liberam gases. Na coloração de Gram, elas definem-se em forma de bastonetes e são Gram-negativas (-), podendo ocorrer de forma única, em pares ou cadeias (GOMES *et al*, 2019). Pode-se perceber que as colônias de bactérias acéticas isoladas (Figura 4) nesse estudo se encontram de acordo com o descrito na literatura.

Já as leveduras, em relação ao teste de catalase, também se apresentam positiva, liberando gás  $O_2$  na presença de  $H_2O_2$ . Por fim, na coloração de Gram, as leveduras geralmente são Gram-positivas (+), ou, a depender, podem se apresentar indefinidas (ANDRES BARRAO, 2012). Dessa forma, ao realizar o teste de catalase e coloração de Gram em leveduras isoladas (Figura 5) pode-se considerar que estas estão em adequação com a literatura.

Portanto, no presente estudo foi possível verificar, por meio do teste de catalase e coloração de Gram, que as bactérias láticas, acéticas e as leveduras presentes na kombucha apresentaram características coerentes ao que está descrito na literatura (ANDRES BARRAO, 2012; GOMES *et al*, 2019).

Na Tabela 2 encontram-se os resultados das contagens de células viáveis de bactérias láticas das amostras de kombucha artesanal (KA) e comercial (KC). Foram encontrados, em ambos os tipos, valores médios entre 5 Log UFC mL<sup>-1</sup> (KC) e 6 log UFC mL<sup>-1</sup> (KA), verificando-se que as amostras de KC apresentaram uma maior variação.

Tabela 2 - Quantificação de bactérias láticas nas amostras de kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação e kombucha comercial (KC).

<b>Bactérias Látricas (Log UFC mL<sup>-1</sup>)</b>		
Amostras	KA	KC
1	5,98	5,60
2	7,08	6,78
3	6,20	4,00
Média ± desvio padrão	6,42 ± 0,58	5,46 ± 1,39

Coton *et al.* (2017) realizaram a enumeração de bactérias láticas de kombuchas de chás verde e preto tanto no biofilme quanto no líquido obtidos de fermentação realizada no período de 0 a 8 dias. Os resultados da contagem de bactérias láticas para a kombucha do chá verde, com 8 dias de fermentação, foram de aproximadamente 7,0 Log UFC mL<sup>-1</sup>, portanto, esses resultados são semelhantes aos do presente estudo (COTON *et al.*, 2017).

Por outro lado, Santos *et al.* (2017) relataram o valor de apenas 2,95 log UFC mL<sup>-1</sup> de bactérias do ácido láctico, no entanto, a análise foi realizada com 25 dias de fermentação e em chá preto.

A análise molecular de cinco kombuchas de chá preto, provenientes de localizações geográficas distintas (Canadá, Reino Unido, Estados Unidos e Irlanda), identificou proporções consideráveis de bactérias de ácido láctico sendo identificados os gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* (March *et al.*, 2014),

Os resultados das contagens de células viáveis de bactérias acéticas das amostras de KA e KC estão representados na Tabela 3. Os valores médios encontrados foram

em torno de 7 log UFC mL<sup>-1</sup> (KA) e 6 log UFC mL<sup>-1</sup> (KC). Novamente as contagens para ambas as amostras foram semelhantes.

Tabela 3 - Quantificação de bactérias acéticas nas amostras de kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação e kombucha comercial (KC).

<b>Bactérias Acéticas (Log UFC mL<sup>-1</sup>)</b>		
Amostras	KA	KC
1	7,04	5,85
2	7,43	7,04
3	7,43	6,15
Média ± desvio padrão	7,30 ± 0,23	6,34 ± 0,62

Neffe-Skocinska *et al.* (2017) fermentaram uma kombucha mista de chá preto com chá verde, por 10 dias, sob três temperaturas diferentes (20° C, 25° C e 30° C). No sétimo dia de fermentação eles obtiveram uma contagem de bactérias acéticas de 7,1 Log UFC mL<sup>-1</sup>, resultando em uma contagem bem semelhante a encontrada no presente estudo. De acordo com os autores, a concentração de ácido acético e cítrico começam a aumentar após o terceiro dia de fermentação. As bactérias do ácido acético são responsáveis por formar novas camadas de celulose, além de metabolizarem o álcool produzidos pelas leveduras em ácidos orgânicos (ácido acético, glucurônico e glucônio) aos quais são atribuídos aspectos saudáveis da kombucha (NEFFE- SKOCINSKA *et al.*, 2017).

Ademais, Santos, Barbosa e Lacerda (2017) também encontraram valores de bactérias acéticas próximos ao presente estudo (6,90 Log UFC mL<sup>-1</sup>). Assim como Silveira, Almeida e Santos (2019), que realizaram contagem de células viáveis de bactérias acéticas em kombuchas comerciais, e encontraram valor mínimo de 6,04 Log UFC mL<sup>-1</sup> e máximo de 6,30 Log UFC mL<sup>-1</sup>.

Gomes *et al.* (2019) relataram que as principais cepas de bactérias acéticas encontradas na kombucha são *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* e *Komagataeibacter xylinus*, no entanto, as kombuchas podem variar suas conformações de população de acordo com a região, condições de células viáveis, tempo de fermentação e substratos (DUFRESNE & FARNWORTH, 2000).

Na Tabela 4 estão representados os resultados das contagens de células viáveis de leveduras das amostras de KA e KC. Foram encontrados valores médios entre 6 Log UFC mL<sup>-1</sup> para ambos os tipos de kombucha.

Tabela 4 - Quantificação de leveduras nas amostras de kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação) e kombucha comercial (KC).

<b>Leveduras (Log UFC mL<sup>-1</sup>)</b>		
Amostras	KA	KC
1	5,52	5,93
2	7,62	7,26
3	7,30	6,30
Média ± desvio padrão	6,81 ± 1,13	6,50 ± 0,68

O presente estudo obteve contagens similares para leveduras em comparação com Chen e Liu (2000), que realizaram a contagem de células viáveis de leveduras em 9 amostras de kombuchas de diferentes origens de Taiwan, nas quais apresentaram uma elevação inicial com o tempo de incubação (6<sup>o</sup> dia ± 14<sup>o</sup> dia), obtendo contagens de 5 a 6 Log UFC mL<sup>-1</sup>, no entanto, após o período de 14 dias, as leveduras apresentaram uma redução gradual.

Yikmis e Tuggum (2019) realizaram análises microbiológicas e físico-químicas em diferentes preparações de kombucha, à base de chá verde e manjeriço com diferentes proporções de cada ingrediente. Eles encontraram valores médios para contagem de leveduras de 2,48 Log UFC mL<sup>-1</sup> para kombucha à base de chá preto (100%), já para kombucha à base de chá preto e manjeriço roxo (50% de cada), encontraram valores de 2,18 Log UFC mL<sup>-1</sup> de leveduras, ambas com 10 dias de fermentação.

Santos, Barbosa e Lacerda (2017) encontraram valor mínimo de contagem de leveduras de 6,17 Log UFC mL<sup>-1</sup> e máximo de 7 Log UFC mL<sup>-1</sup> em um período de 25 dias de fermentação. As culturas de kombucha de diferentes regiões não têm composições químicas e microbiológicas padronizadas, diversos fatores influenciam na composição do chá, portanto, as variações encontradas no presente estudo em relação aos outros resultados eram esperadas.

Teoh *et al.* (2004), isolaram leveduras em 4 kombuchas comerciais para identificação de diferentes espécies, e foi possível observar que houve variação entre os produtos. As espécies encontradas foram *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*,



*Schizosaccharyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* e *Zygosaccharomyces bailii*. Essas também foram relatadas em outros estudos (JANKOVIC & STOJANOVIC, 1994; FRANK, 1995; MAYSER *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1996). Portanto, pode-se dizer que, apesar das culturas microbianas da kombucha serem diversas, existem espécies que são altamente prevalentes. Nesse mesmo estudo, eles avaliaram o crescimento das leveduras e obtiveram pico de população entre os dias 6 e 8 de fermentação. A população de leveduras variou de  $10^4$  UFC/mL (4 Log UFC mL<sup>-1</sup>) a  $10^6$  UFC/mL (6 Log UFC mL<sup>-1</sup>) (TEOH *et al.*, 2004). O valor máximo da variação foi similar ao valor médio de leveduras presentes nas KA e nas KC do presente estudo.

A quantificação de bactérias lácticas, acéticas e leveduras apresentaram-se coerentes com base na literatura. Não houve diferenças discrepantes entre a kombucha artesanal e comercial nesse quesito. No entanto, ainda não há uma legislação específica da kombucha para o parâmetro microbiológico, dessa forma não é possível alegar que a quantidade de microrganismos encontrados no presente estudo foi satisfatória.

## 5.2 Acidez Titulável

De acordo com os resultados de acidez titulável obtidos (Tabela 5), foi possível verificar que para as amostras de KA houve variação média de  $3,6 \text{ g L}^{-1}$  a  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  e para KC a variação foi de  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  a  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ . Pode-se perceber que a KC apresentou valores de titulação mais baixos do que KA, em específico nas amostras de KC2. No período de análise, a amostra de KC2 foi acidentalmente congelada, logo, esse valor de titulação mais baixo pode ter ocorrido em razão da variação de temperatura que ela foi submetida. ou devido a uma falta padronização durante sua produção.

As amostras de KC apresentaram também mais variações nos valores de acidez do que KA que podem estar associadas à falta de padronização na obtenção industrial do produto. Não foi possível verificar os procedimentos usados na produção em escala industrial dessas kombucha, o que poderia explicar os diferentes resultados de acidez titulável. Além do mais, aspectos como localização geográfica, temperatura, tempo de fermentação influenciam na composição da bebida, logo, podem influenciar diretamente nesses valores (WATAWANA *et al.*, 2015).



Tabela 5 - Resultados dos valores de acidez titulável (AT), fator de correção (FC) do NaOH, média e desvio padrão (DP) da kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação e da kombucha comercial (KC), ambas à base de chá verde.

<b>Acidez Titulável (g.L<sup>-1</sup> de ácido acético)</b>					
Amostra	Volume gasto de NaOH (mL)	FC de NaOH	AT	Média	DP(±)
KA1	32,0	0,9757	3,7499	3,7265	0,0511
	32,1		3,7617		
	31,3		3,6679		
KA2	31,6	0,9299	3,5292	3,6446	0,1235
	33,8		3,7749		
	32,5		3,6298		
KA3	40,0	0,9299	4,4674	4,4823	0,0258
	40,0		4,4674		
	40,4		4,5121		
KC1	23,9	0,9299	2,6693	2,5278	0,1270
	21,7		2,4236		
	22,3		2,4906		
KC2	7,3	0,9299	0,8153	0,8227	0,0129
	7,5		0,8376		
	7,3		0,8153		
KC3	32,8	0,9299	3,6633	3,4920	0,1857
	31,5		3,5181		
	29,5		3,2947		

No estudo de Rodrigues *et al.* (2018), ao realizarem a caracterização físico-química em uma kombucha à base de hibisco, encontraram um valor igual a 0,18% de acidez titulável, o que corresponde a 1,8 g L<sup>-1</sup>. Os valores relatados estão consideravelmente abaixo dos valores encontrados no presente estudo, isso pode ser explicado devido ao fato de que o substrato utilizado para fermentar o chá foi diferente, bem como o tempo de fermentação bem como o SCOBY. Já Santos *et al.* (2019), ao realizarem

análises físico-químicas em kombuchas à base de chá verde, obtiveram valor de 2,07 g L<sup>-1</sup> com 6 dias de fermentação.

Cvetkovic *et al.* (2019), ao fermentarem uma kombucha à base de chá preto por 3 e 4 dias, identificaram valores de 4,32 e 6,23 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, respectivamente. Já Tannticharakunsiri *et al.* (2021), encontraram um valor de acidez titulável de aproximadamente 6 g L<sup>-1</sup> em uma Kombucha fermentada com chá oolong por 7 dias. Um teor de acidez total titulável entre 0,4 e 0,5% (4 a 5 g L<sup>-1</sup>) tem sido relatado como indicativo do término do processo fermentativo associado à qualidade sensorial. (CVETKOVIC, 2008; VELICANSKI *et al.* 2013).

Os ácidos orgânicos presentes na kombucha são obtidos durante o processo de fermentação, resultado da simbiose das bactérias e leveduras. Logo, os valores de acidez titulável podem variar devido à comunidade microbiana do chá e outros parâmetros de fermentação serem diferentes e isso reflete no valor final da acidez. Ademais, a acidez titulável da kombucha pode ser influenciada pelos diferentes substratos utilizados e pela adição de componentes na fermentação secundária (SUHRE, 2020).

### 5.3 pH

Os resultados de pH obtidos dos dois tipos de kombucha à base de chá verde podem ser vistos na Tabela 6. Os valores de pH encontrados na KA apresentaram variação mínima de 3,9 e máxima de 4,0. Já para KC, variaram de 3,5 a 3,7.

Tabela 6 - Resultados dos valores de pH da kombucha artesanal (KA) com 7 dias de fermentação e da kombucha comercial (KC), ambas à base de chá verde.

Amostras	Parâmetro pH		Padrão de Identidade e Qualidade* (PIQ)	
	KA	KC	Mín.	Máx.
1	3,9	3,7		
2	3,9	3,7	2,5	4,2
3	4,0	3,5		

\*Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019/MAPA

De acordo com os resultados foi possível observar que não houve grande discrepância entre os valores de pH das amostras de KA e KC. Além disso, ao comparar apenas as amostras de KA, os valores de pH não tiveram grandes variações e o mesmo ocorreu para as amostras de KC. Todos os valores de pH encontrados estão em consonância com o preconizado pela IN 41/2019 do MAPA, indicando que as amostras analisadas podem ser consideradas seguras para o consumo (BRASIL, 2019). Valores mais baixos de pH são desejáveis uma vez que a acidez tem capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patógenos (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

Moura (2019) ao analisar a cinética do pH da kombucha no sétimo dia de fermentação, obteve um resultado próximo a 3,30 e, ao final do décimo dia, a bebida atingiu um pH de 3,14. Santos, Barbosa e Lacerda (2017) ao produzir uma kombucha à base de chá preto fermentada por 25 dias, encontrou um pH de 3,98. Santos (2019), ao fazer análises de pH com kombuchas comerciais, encontrou valores de pH de 3,18 a 3,31, semelhante ao encontrado no presente estudo. Já Neffe-Skocinska *et al.* (2017), avaliaram a fermentação de kombucha de chá verde com chá preto e, com 7 dias de fermentação, obtiveram um valor mínimo de pH de 2,71 e máximo de 2,88 em uma temperatura de 30 °C a 20 °C, respectivamente.

Os ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação são responsáveis por diminuir o valor do pH do chá, logo, quanto maior o tempo de fermentação, mais o pH tende a diminuir. Dessa forma, mesmo que a bebida kombucha seja de origem microbiana, pH mais baixos promovem segurança microbiológica da bebida para o consumo, mantendo apenas a microbiota desejável do produto (MARTINEZ LEAL *et al.*, 2018).

## 6 CONCLUSÃO

A quantificação de bactérias lácticas, acéticas e leveduras apresentaram-se coerentes com base na literatura. Não houve diferenças discrepantes entre a kombucha artesanal e comercial nesse quesito.

De forma geral, a acidez titulável apresentou resultados relativamente distintos em comparação a outros estudos. Entretanto, é fato que diversos fatores influenciam na composição do chá, logo, as variações encontradas no presente estudo em relação aos outros resultados são aceitáveis, sendo essas variações resultado dos diferentes fatores que influenciam a composição da kombucha.

As kombuchas artesanal e comercial apresentaram valores de pH ligeiramente diferentes entre si, mas ambas estavam dentro do parâmetro estabelecido pelo PIQ da bebida, o que a caracteriza segura para consumo.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ressalta-se que este estudo faz parte de um projeto que pretende avaliar o potencial antimicrobiano da kombucha artesanal e comercial consumidas na região de Ouro Preto, portanto, a quantificação e isolamento dos microrganismos presentes são importantes como um processo inicial para a pesquisa. A realização de novos estudos para a identificação dos microrganismos seria muito relevante.

Também seria de igual importância avaliar a cinética tanto do crescimento microbiológico quanto das análises físico-químicas em períodos distintos de fermentação, para determinar o tempo de fermentação que propicia a melhor qualidade da kombucha quanto às suas características. Além disso, a realização da fermentação da kombucha a partir de outros substratos, como outros tipos de chá provenientes da *Camellia sinensis* e verificar a aceitação sensorial das formas artesanal e comercial por parte dos consumidores traria mais contribuições acerca do produto.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOULOU, A. et al. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2012.
- ANDRES BARRAO, C. **Characterization of acetic acid bacteria and study of the molecular strategies involved in the resistance to acetic acid during oxidative fermentation**. 2012. Tese de Doutorado. University of Geneva.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 268 41/2019, de 17 de setembro de 2019**. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo território nacional. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 103 de 20 de setembro de 2018**. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 188, seção 1, p. 18, 28 set. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999**. Estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília: ANVISA, 1999.
- BRUSCHI, J. S.; SOUSA, R. C. S.; MODESTO, K. R. O ressurgimento do chá de kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 1, n. Esp, p. 162-168, 2018.
- CAMU, N. et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, 2007.
- CHANDRAKALA, S. K.; LOBO, Reema Orison; DIAS, Flora Olinda. Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life?. In: **Nutrients in Beverages**. Academic Press, 2019. p. 591-616.
- CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000.
- CVETKOVIC, D. D. **Kombucha made from medical herbs—Biological activity and fermentation parameters** (Tese de Doutorado), University of Novi Sad, Servia, 2008.
- CVETKOVIC, D. et al. Survival of wild strains of lactobacilli during Kombucha fermentation and their contribution to functional characteristics of beverage. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 69, n. 4, 2019.
- COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, 2017.
- DOUDI, M. et al. Effects of Kombucha Tea on Side Effects of High Cholesterol Diet in Rabbits. **Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 6, n. 2, p. 123-132, 2020.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food research international**, v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.

DUTTA, H.; PAUL, S. K. Kombucha drink: production, quality, and safety aspects. In: **Production and management of beverages**. Woodhead Publishing, 2019. p. 259-288.

FRANK, G.W. Kombucha: Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East. Wilhelm Ennsthaler, Austria, 1995.

GOMES, R. J. et al. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 139-151, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria- Colony-count technique at 30°C, 1<sup>a</sup> ed. **The International Organization for standardization**, 1998.

JANKOVIC, I.; STOJANOVIC, M. Microbial and chemical composition, growth, therapeutical and antimicrobial characteristics of tea fungus. **Mikrobiologija (Yugoslavia)**, 1994.

JAYABALAN, R. et al. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. reference module in food sciences. **Elsevier**, p. 1-8, 2016.

JAYABALAN, R.; WAISUNDARA, V. Y. Kombucha as a Functional Beverage. **Functional and Medicinal Beverages**. 2019.

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, p. 700, 2019.

KIM, D. et al. Comparison of traditional and backslipping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. **LWT**, v. 97, p. 503-507, 2018.

KOZYROVSKA, N. O. et al. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, 2012.

LAAVANYA, D.; SHIRKOLE, S.; BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. **Journal of Cleaner Production**, p. 126454, 2021.

LIU, C. H. et al. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. **Food Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 407-415, 1996.

- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current opinion in biotechnology**, v. 44, p. 94-102, 2017.
- MARTINEZ LEAL, J. et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.
- MAYSER, P. et al. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha' Das Hefespektrum des 'Teepilzes Kombucha'. **Mycoses**, v. 38, n. 7-8, p. 289-295, 1995.
- MORTON, R. D. Aerobic plate counte. In: APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: 2001.
- MOURA, A. B. **Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá mate**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso.
- 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.
- MOUSAVI, S. M. et al. Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.
- NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **CyTA-Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601-607, 2017.
- PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015.
- RODRIGUES, R. S. et al. **Características físicas e químicas de Kombucha à base de chá de Hibisco (Hibiscus sabdariffa, L.)**. ANAIS, 2018.
- ŞANLIER, N.; GÖKCEN, B. B.; SEZGIN, A. C. Health benefits of fermented foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 506–527, 2019.
- SANTOS, R. C.; BARBOSA, C. D.; LACERDA, IAC. Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto. **Anais da 69ª Reunião anual da SBPC**, 2017.
- SINIR, G. Ö.; TAMER, C. E.; SUNA, S. **Kombucha tea: A promising fermented functional beverage**. [s.l: s.n.].
- SOARES, M. G. et al. **Propriedades emergentes, aplicações e uso terapêutico do kombucha e seu SCOPY: uma revisão**. 2021.
- SUHRE, T. **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana**. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre.
- TAMANG, J. P. et al. Fermented foods in a global age: East meets West. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 184–217, 2020.
- 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, p. e13574, 2021.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119-126, 2004.

TEREFE, N. S. **Food Fermentation**. [s.l.] Elsevier, 2016.

VELIĆANSKI, A. et al. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 1, p. 8034-8042, 2013.

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

VIRAMONTES HÖRNER, D.; AVERY, A.; STOW, R. The Effects of Probiotics and Symbiotics on Risk Factors for Hepatic Encephalopathy. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 51, n. 4, p. 312–323, 2017.

WATAWANA, M. I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

XIA, X. et al. Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 62, n. September, p. 103549, 2019.

YIKMIŞ, S.; TUĞGÜM, S. Evaluation of Microbiological, Physicochemical and sensorial properties of purple basil Kombucha beverage. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 7, n. 9, p. 1321-1327, 2019.

YOUNG, S. P. (2019). *Kombucha: Revered For Millennia, But Is It Really A Life Saving Brew?*. Disponível em: <https://www.ancient-origins.net/myths-legends-asia/Kombucha-0011948>. Acesso em 14 de maio de 2021.