

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB  
CURSO DE FARMÁCIA**

**NICOLLE SILVA SANTOS**

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA, CARACTERIZAÇÃO DE SUA MICROBIOTA E  
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

**BRASÍLIA, DF  
2021**

Sp Santos, Nicolle  
Produção de kombucha, caracterização de sua microbiota e análises físico-químicas / Nicolle Santos; orientador Daniela Castilho Orsi ; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva . -- Brasília, 2021.  
40 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Kombucha. 2. Chá verde. 3. SCOBY. 4. Fermentação. 5. Bebida probiótica . I. Castilho Orsi , Daniela , orient. II. Cristina Rodrigues da Silva , Izabel, co-orient. III. Título.

NICOLLE SILVA SANTOS

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA, CARACTERIZAÇÃO DE SUA MICROBIOTA E  
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para obtenção  
do grau de Bacharel em Farmácia, na  
Universidade de Brasília, Faculdade de  
Ceilândia.

**Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**  
**Co-orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF

2021

NICOLLE SILVA SANTOS

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA, CARACTERIZAÇÃO DE SUA MICROBIOTA E  
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Erika da Silva Monteiro  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Sabrina Lunara Santos Pavelquesi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

*Dedico esse trabalho à minha mãe, Geni  
Ferreira, pois não há exemplo maior de dedicação.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por me guiar e me amparar dia após dia, e me ajudar a fazer as escolhas certas durante minha caminhada.

A minha mãe e aos meus irmãos, por serem sempre os meus pilares, minhas motivações diárias, e o significado de amor na minha vida.

Ao meu parceiro de vida que conquistei durante a faculdade, Rafael, por ter sido tão prestativo, compreensivo e amoroso, tanto nos momentos difíceis quanto nos mais felizes.

À Daniela Orsi, minha professora e orientadora, pelo apoio e dedicação à esse trabalho.

À todos os amigos que me acompanharam na minha formação pessoal e profissional, em especial Karla, que esteve e está presente em várias fases da minha vida.

## RESUMO

Kombucha é uma bebida fermentada, com sabor agridoce, levemente gaseificada, resultante da fermentação do chá verde açucarado por bactérias e leveduras presentes em um biofilme denominado SCOBY. A procura pela bebida vem aumentando nos últimos anos graças aos seus potenciais efeitos benéficos a saúde. O presente trabalho teve como objetivo produzir e avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da kombucha. Utilizou-se três amostras diferentes de SCOBYs, que foram adicionadas ao mosto, composto por água (900 mL), sacarose (80 g) e folhas de chá verde (8 g). A fermentação ocorreu por 7 dias em temperatura ambiente. Foram feitas as seguintes análises físico-químicas: determinação do pH, acidez total, teor de sólidos solúveis, sacarose, compostos fenólicos totais e grau alcoólico. Nas análises microbiológicas, foi feito o isolamento e contagem de bactérias acéticas, lácticas e leveduras, e o estudo da atividade antimicrobiana da kombucha através do teste de antagonismo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Observou-se que o pH do chá verde foi de 5,90 e o pH das amostras de kombucha variaram de 3,36-3,58. As amostras de kombucha 1 e 3 tiveram valores similares de acidez (2,10-2,40 g/L) e na amostra 2, notou-se uma quantidade menor de ácido acético (1,26 g/L). Os valores de compostos fenólicos das bebidas foram de 62,5-95,0 mg/mL. O chá verde apresentou 7,74% de sacarose e nas amostras de kombucha 1 e 3 a porcentagem de sacarose foi menor (3,60-4,66%) em relação a amostra 2 (7,12%). Na amostra 2 ocorreu uma mínima redução de sacarose durante o processo de fermentação, visto que o SCOBY utilizado estava com atividade reduzida e, portanto, para essa amostra seria necessário um tempo maior de fermentação de 10-14 dias. Em relação a composição da microbiota, as amostras 1 e 3 mostraram uma predominância de bactérias acéticas ( $4,8-5,8 \times 10^6$  UFC/mL), seguida de leveduras ( $1,3 \times 10^5-4,3 \times 10^6$  UFC/mL) e de bactérias lácticas ( $2,6-4,5 \times 10^4$  UFC/mL). Para o teste do antagonismo contra *E. coli*, os resultados revelaram que a microbiota de todas as amostras da kombucha inibiram completamente o seu crescimento. No teste do antagonismo contra *S. aureus*, as amostras 2 e 3 de kombucha inibiram o seu crescimento. Com esses resultados, pode-se afirmar que a kombucha tem propriedades antimicrobianas e impossibilita o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Na bebida kombucha a presença de bactérias

e leveduras tem propriedades benéficas para a microbiota intestinal humana, sendo a kombucha uma bebida probiótica.

**Palavras-chave:** Kombucha. Chá verde. Fermentação. SCOBY. Bebida probiótica.



## ABSTRACT

Kombucha is a fermented drink, with a bittersweet flavor, slightly carbonated, resulting from the fermentation of green tea sweetened by bacteria and yeasts present in a biofilm called SCOBY. The demand for the drink has been increasing in recent years thanks to its potential beneficial effects on health. The present work aimed to produce and evaluate the physical-chemical and microbiological parameters of the kombucha. Three different samples of SCOBYs were used, which were added to the wort, composed of water (900 mL), sucrose (80 g) and green tea leaves (8 g). Fermentation took place for 7 days at room temperature. The following physicochemical analyzes were performed: determination of pH, total acidity, soluble solids content, sucrose, total phenolic compounds, and alcoholic strength. In the microbiological analyzes, the isolation and counting of acetic and lactic bacteria and yeast was carried out, and the antimicrobial activity of the kombucha was also studied with the test of antagonism against the strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 bacteria. It was observed that the pH of green tea was 5.90 and the pH of the kombucha samples ranged from 3.36-3.58. The samples of kombucha 1 and 3 had similar values of acidity (2.10-2.40 g/L) and in sample 2, a smaller amount of acetic acid (1.26 g/L) was noted. The values of phenolic compounds in the beverages were 62.5-95.0 mg/mL. Green tea showed 7.74% sucrose and in kombucha samples 1 and 3 the percentage of sucrose was lower (3.60-4.66%) compared to sample 2 (7.12%). In sample 2 there was a minimal reduction in sucrose during the fermentation process, since the SCOBY used was with reduced activity and, therefore, for this sample a longer fermentation time of 10-14 days would be necessary. Regarding the composition of the microbiota, samples 1 and 3 showed a predominance of acetic bacteria ( $4.8-5.8 \times 10^6$  CFU/mL), followed by yeasts ( $1.3 \times 10^5-4.3 \times 10^6$  CFU/mL) and lactic acid bacteria. ( $2.6-4.5 \times 10^4$  CFU/mL). For the test of *E. coli* antagonism, the results revealed that the microbiota of all samples of the kombucha completely inhibited its growth. In the antagonism test against *S. aureus*, samples 2 and 3 of kombucha inhibited its growth. With these results, it can be said that the kombucha has antimicrobial properties and prevents the growth of potentially pathogenic bacteria. In the kombucha drink, the presence of bacteria and yeast has beneficial properties for the human intestinal microbiota, with kombucha being a probiotic drink.

**Keywords:** Kombucha. Green tea. Fermentation. SCOBY. Probiotic drink.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Gráfico de buscas em sites de pesquisa pelo termo kombucha.....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> - Marcas de kombucha vendidas em supermercados.....	<b>16</b>
<b>Figura 3</b> – Processo de produção da bebida kombucha.....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b> - Resultados do teste de antagonismo das amostras de kombucha contra <i>S. aureus</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 5</b> – Resultados do teste de antagonismo das amostras de kombucha contra <i>E. coli</i> .....	<b>30</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros analíticos de kombucha exigidos pela legislação brasileira.....	<b>18</b>
<b>Tabela 2</b> - Caracterização físico-química do chá verde e das amostras de kombucha após 7 dias de fermentação.....	<b>26</b>
<b>Tabela 3</b> - Caracterização microbiológica das amostras de kombucha após 7 dias de fermentação.....	<b>29</b>

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2 . REVISÃO DA LITERATURA .....	14
2.1. Kombucha: definição, consumo e produção .....	14
2.1.1. Definição .....	14
2.1.2. Consumo.....	15
2.1.3. Produção.....	16
2.2. Legislação.....	18
2.3. Efeitos benéficos do consumo da kombucha.....	19
2.4. Microbiota da kombucha.....	20
2.5. Antagonismo entre bactérias .....	21
3. OBJETIVO GERAL.....	22
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. JUSTIFICATIVA .....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1. Obtenção dos SCOBYs de kombucha e das bebidas fermentadas.....	24
5.2. Caracterização físico-química do chá verde e das bebidas fermentadas .....	24
5.3. Caracterização microbiológica das bebidas fermentadas.....	25
5.4. Estudo da atividade antimicrobiana da kombucha.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
6.1. Caracterização físico-química do chá verde e das amostras de kombucha.....	27
6.2. Caracterização microbiológica das bebidas fermentadas.....	29
6.3. Estudo da atividade antimicrobiana das amostras de kombucha.....	30
7. CONCLUSÃO .....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

SCOBY - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast

Caldo LB - caldo Luria Bertani

Cepas ATCC - Cepas American Type Culture Collection

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SST – Sólidos Solúveis Totais

## 1. INTRODUÇÃO

O surgimento da bebida kombucha ocorreu na China, sendo que os primeiros registros desta bebida datam de 221 a.C. Em 414 d.C., um médico chamado Kombu teria levado a bebida da Coreia para o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador Inkyo e surgiria daí o nome “Kombucha” ou “chá do Kombu” (AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y, 2018; JAYABALAN et al., 2014; PALUDO, 2017).

Kombucha é uma bebida fermentada preparada com chá açucarado (geralmente se usa o chá verde - *Camellia sinensis*) ao qual é adicionado o SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), uma película de celulose contendo bactérias e leveduras. A composição da bebida kombucha pode variar, dependendo do tipo de SCOBY inoculado, do chá utilizado, do tempo e, também, da temperatura de fermentação (AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y, 2018; JAYABALAN et al., 2014; FU et al., 2014).

A kombucha é uma bebida consumida há centenas de anos e contém em sua composição vários tipos de ácidos orgânicos (acético, glicônico, cítrico, láctico, málico, tartárico, oxálico, succínico, pirúvico), açúcares (sacarose, glicose e frutose), vitaminas B1, B2, B6, B12 e C, glicerol, aminoácidos, algumas enzimas hidrolíticas, compostos com propriedades antibióticas, dióxido de carbono, compostos fenólicos, antioxidantes e minerais (AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y., 2018; JAYABALAN et al., 2014; FU et al., 2014).

Trata-se de uma bebida probiótica e os principais benefícios do consumo regular da kombucha são o equilíbrio da flora intestinal, fortalecimento do sistema imunológico pela ação dos antioxidantes e a melhor absorção de nutrientes no intestino delgado (AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y, 2018; FU et al., 2014). Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas podem ser agregados como suplementos na dieta, afetando de forma benéfica o desenvolvimento da flora microbiana no intestino. Os alimentos probióticos são considerados alimentos funcionais e o consumo regular de alimentos funcionais promove efeitos benéficos para a saúde, podendo retardar o estabelecimento de doenças crônico-degenerativas e melhorar a

saúde e a expectativa de vida das pessoas (BALLUS et al., 2010; SANTOS, R. B; BARBOSA, L. P. J. L; BARBOSA, F. H. F., 2011). Alimentos funcionais são aqueles que contribuem com uma nutrição básica e promovem benefícios a saúde (BRASIL, 1999).

A microbiota da kombucha é composta de bactérias e leveduras, encontra-se dispersa na bebida e acomodada no SCOBY, sendo este responsável pela fermentação da bebida kombucha. Estes microrganismos formam uma associação simbiótica cuja atividade é capaz de inibir o crescimento de potenciais bactérias contaminantes (AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y, 2018; JAYABALAN et al., 2014; FU et al., 2014).

A composição dos microrganismos presentes na bebida kombucha é variável. As leveduras que já foram isoladas de kombucha pertencem a vários gêneros: *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera* e *Candida*. As bactérias predominantes na bebida kombucha são as acéticas. Pertencem aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*, sendo a bactéria mais relevante a *Gluconacetobacter xylinus*, pois é a responsável pela produção do SCOBY, ou seja, produz uma membrana de celulose na interface ar-líquido (MAHMOUDI et al., 2016; MARSH et al., 2014).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Kombucha: definição, consumo e produção

#### 2.1.1. Definição

Kombucha é uma bebida antiga, originada da Ásia, conhecida pelo seu sabor agridoce, a qual é originalmente produzida a partir do chá preto ou verde (*Camellia sinensis*) adoçado e fermentado em temperatura ambiente por um consórcio simbiótico de bactérias acéticas e leveduras denominado de SCOBY (PALUDO, 2017; SANTOS, 2016).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2019):

A kombucha é a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY), resultando em uma bebida ácida e doce, com pH entre 2,5 e 3,5 e acidez titulável mínima de 6,0 % de acidez volátil, expresso em % de equivalentes grama de ácido acético, podendo ser adicionada de suco, polpa de fruta, extrato vegetal, especiaria, mel, aroma natural e de outros aditivos permitido em legislação específica da ANVISA.

Recentemente, notou-se um aumento da procura pela bebida kombucha devido aos seus potenciais efeitos benéficos à saúde. Acredita-se que os efeitos terapêuticos desta bebida sejam derivados da sua composição química, contendo principalmente polifenóis e metabólitos secundários produzidos durante a fermentação (WATAWANA et al., 2015). A partir da fermentação, se obtém uma bebida agridoce e carbonatada, que para muitos consumidores se compara sensorialmente com a sidra. O tempo de fermentação pode variar de 7 a 12 dias, considerando que quanto maior o período de fermentação, mais a bebida adquire o sabor avinagrado (SANTOS, 2016).

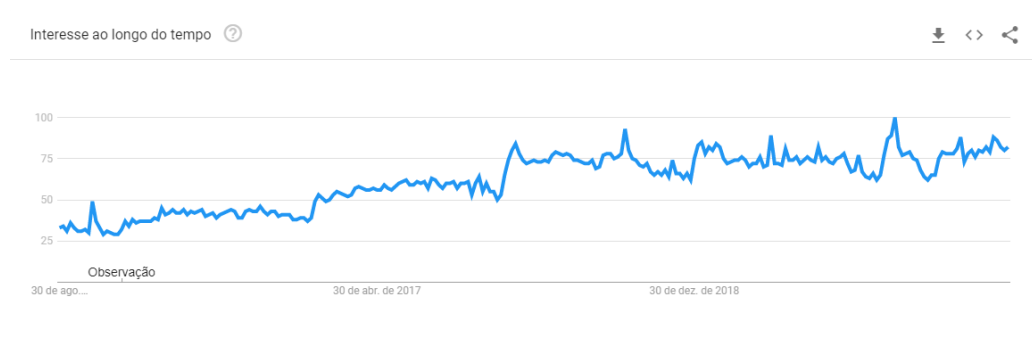


### 2.1.2. Consumo

O aumento da popularidade da bebida kombucha nesses últimos anos é devido aos seus potenciais benefícios à saúde humana. A procura por uma vida mais saudável, faz com que as pessoas se tornem mais interessadas na sua alimentação e nos benefícios dos alimentos que consomem (SANTOS, 2016).

De acordo com o Google Trends (<https://trends.google.com/>), nos últimos 5 anos a busca pelo termo kombucha no Brasil e no mundo vêm aumentando consideravelmente (Figura 1). Os três países com mais buscas são: Nova Zelândia, Austrália e Canadá, sendo que os termos com maior número de pesquisas são os benefícios, como produzir o chá e sobre o SCOBY.

**Figura 1** - Gráfico de buscas em sites de pesquisa pelo termo kombucha



Fonte: Google Trends (<https://trends.google.com/>). Acesso em 7 mar. 2021.

No Brasil, o consumo da kombucha começou de forma artesanal, por grupos de pessoas que se interessaram em produzir a bebida em casa, e compartilhavam o SCOBY. Somente há 3 anos começaram a surgir indústrias de pequeno porte para produção da bebida para venda em mercados regionais. A kombucha despertou o interesse dos consumidores, especialmente como alternativa ao refrigerante, por ser gaseificada e ter vantagens como baixo teor de açúcar e poucas calorias (Associação Nacional dos exportadores de suco cítrico, 2018).

Uma das primeiras fabricantes da kombucha no Brasil começou com dois amigos que produziam a bebida por hobby, e rapidamente a demanda de venda aumentou, fazendo com que surgisse a necessidade de produção em escala

industrial. Após 2 meses de operação, a produção já tinha alcançado 2 mil garrafas, um objetivo que a empresa só esperava alcançar após 6 meses de operação.

A rápida expansão do consumo da kombucha não é um fator isolado no Brasil, estima-se que as vendas cresçam anualmente 25% e que movimentem cerca de US\$1,8 bilhões mundialmente (Associação Nacional dos exportadores de suco cítrico, 2018). Atualmente o produto é encontrado nas prateleiras de supermercados, com variedades de sabores e embalagens personalizadas, que contribuem para popularização da bebida (Figura 2).

**Figura 2** - Marcas de kombucha vendidas em supermercados



Fonte: próprio autor (2020).

A produção industrial da bebida é supervisionada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e o preço de uma garrafa de 300 mL pode variar entre R\$10,00 e R\$15,00 (Associação Nacional dos exportadores de suco cítrico, 2018).

### 2.1.3. Produção

Para o preparo da kombucha são utilizados o chá preto e/ou o chá verde, tanto a mistura de ambos ou separadamente e açúcar (PALUDO, 2017). A proporção utilizada de chá e açúcar no preparo da kombucha varia de acordo com os estudos na literatura. AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y, (2018), descreveram o preparo da kombucha com 15 g/L de sacarose e 10 g/L de ervas secas na infusão. No estudo de FU et al. (2018), a proporção foi de 50 g/L de sacarose com 7,5 g/L de chá seco. Após o preparo do chá açucarado, o líquido deverá

ser resfriado até temperatura ambiente e transferido para um recipiente de vidro. Esse chá receberá o SCOBY e pode ser adicionado um volume de 10-20% de kombucha já fermentado anteriormente para diminuir o pH e evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis (WATAWANA et al., 2015). O tempo de fermentação do kombucha varia conforme os estudos em 3-14 dias e a temperatura de fermentação pode variar entre 18 e 30°C (JAYABALAN et al., 2014).

Após a fermentação, esse processo pode ser realizado novamente em um recipiente vedado para que o gás carbônico seja formado, com o intuito de deixar a bebida gaseificada, além disso, é adicionado sucos ou pedaços de fruta e/ou ervas para a saborização. Quanto maior a quantidade de açúcar dos insumos maior será a carbonatação, esse processo consiste na atividade das leveduras que irão converter o açúcar em energia (sacarose em frutose e glicose), assim produzindo CO<sub>2</sub> e etanol. Após a bebida estar pronta, é recomendado acondicionar em ambiente refrigerado, melhorando seu aspecto sensorial e reduzindo a velocidade da fermentação com a redução da temperatura (MOURA, 2019).

Essa cultura simbiótica (SCOBY) pode ser obtida a partir de uma fermentação anterior, doado ou até mesmo comprado. O SCOBY que é inicialmente adicionado ao chá é chamado de "fungo mãe" e durante a fermentação acontece o desenvolvimento de um "fungo filho". A película celulósica (SCOBY) repousa sobre o chá e produz uma nova camada fina de película celulósica que fica disponível como uma nova camada acima da antiga camada. Esta nova película celulósica é formada com sucesso durante cada etapa de fermentação e é usada para reinocular um novo lote de chá (WATAWANA et al., 2015).

Para que ocorra essa formação do SCOBY, é necessária a atividade da bactéria acética *Gluconacetobacter xylinus* e suas células se juntam com as nanofibrilas de celulose para formar uma película durante a fermentação acética. Além disso, outro fator importante e indispensável é que o recipiente de fermentação tenha o bocal largo para que haja troca de ar com o ambiente, pois é nessa superfície que vai se formar a nova película acima da antiga, e a cobertura com gaze limpa ou pano que proporcione passagem de ar para evitar contaminações de esporos ou insetos (BRUSCHI; SOUSA; MODESTO, 2018).

## 2.2. Legislação

Como o consumo de kombucha tem ganhado popularidade em todo o mundo, muitas pessoas estão produzindo a bebida artesanalmente com pouco ou praticamente nenhum tipo de controle de qualidade (SUHRE, 2020). Assim, devido ao grande interesse em ampliar a produção de kombucha para atender às demandas da indústria de alimentos, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) promoveu uma consulta pública, em junho de 2018, sobre as diretrizes que pretendiam determinar os padrões de identidade e qualidade da bebida kombucha produzida e comercializada no País (SANTOS, 2016).

O resultado foi a Instrução Normativa nº 41/2019 (BRASIL, 2019), publicada no Diário Oficial da União em setembro de 2019. Como consequência disso, o Brasil foi o primeiro país do mundo a estabelecer e possuir uma legislação específica referente a composição e características físico-químicas da kombucha, exigindo dos fabricantes os parâmetros exibidos na Tabela 1. É importante destacar a exigência da declaração do teor alcoólico no rótulo dos produtos, e se contiver álcool acima de 0,5% (v/v), fica proibido o uso de expressões que atribuam propriedades funcionais. A legislação também permite o uso de processos tecnológicos apropriados para a produção do kombucha, como pasteurização, filtração e ultracentrifugação e proíbe a inclusão de microrganismos após o procedimento da fermentação (SUHRE, 2020).

**Tabela 1-** Parâmetros analíticos de kombucha exigidos pela legislação brasileira

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

Fonte: BRASIL, 2019

### 2.3. Efeitos benéficos do consumo da kombucha

Na Rússia, durante a Primeira Guerra Mundial, houve relatos onde afirmavam a existência do “remédio caseiro secreto russo”, como era nomeada de kombucha. Tal remédio auxiliava em dores de cabeça, doenças gástricas e, especialmente, na regulação do trânsito intestinal muitas vezes desequilibrado pelas condições de vida no exército. E, nos últimos 15 anos, tem havido maior atenção e estudos sobre a eficácia dos possíveis benefícios para a saúde decorrentes do consumo de kombucha (VINA et al., 2014).

Embora as campanhas de marketing apontem diversas características funcionais e benéficas da kombucha como atividade antioxidante e anticarcinogênica, ainda há pouca informação sobre a definição de seus componentes bioativos, sua evolução durante a fermentação e seus efeitos farmacológicos (COTON et al., 2017). Apesar da maior parte dos ensaios biológicos com kombucha terem sido realizados in vitro, alguns estudos in vivo, conduzidos em ratos, mostraram resultados positivos (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

A atividade antioxidante é uns dos benefícios mais relevantes da kombucha e de acordo com MOHAMMADSHIRAZI e KALHOR (2016), os substratos utilizados para fermentação de kombucha contêm antioxidantes que provém das folhas de chá. Eles são principalmente polifenóis, especialmente catequinas, que fazem parte do grupo dos flavonoides. Além de ter polifenóis, a kombucha contém vitamina C, B2, B6 e catalase, que têm a capacidade de aprisionar radicais livres ou podem atuar sinergicamente com antioxidantes como o ácido cítrico. Para JAYABALAN et al. (2014) estes fitoquímicos são responsáveis por várias das propriedades funcionais da bebida correlacionadas com prevenção de câncer, aumento da imunidade e alívio de inflamações e artrite.

Segundo KOZYROVSKA et al. (2012), na análise da composição microbiana, foi observado que a kombucha oferece uma rica fonte de bactérias e leveduras probióticas. A bebida também fornece constituintes probióticos que ajudam na nutrição e crescimento desses microrganismos benéficos no trato digestivo. No entanto, é preciso que mais pesquisas e estudos sejam realizados, para comprovar esses e outros benefícios alegados pelos consumidores e corroborar as verdadeiras vantagens que a bebida pode trazer para a saúde de seres humanos (NGUYEN et al., 2015; MATEI, 2018).

É importante ressaltar uma das atividades mais relatadas por consumidores de kombucha, no entanto ainda com informação científica escassa, se trata do fator antiobesidade. A bebida teria a capacidade de manter o equilíbrio do metabolismo em geral, limitando a acumulação de gordura (DANIELIAN, 2005). No estudo de YANG et al. (2009) foi verificado o efeito hipolipidêmico da kombucha em ratos. O estudo in vivo demonstrou que a kombucha pode prevenir a hiperlipidemia diminuindo o colesterol total sérico e o LDL. Outra observação neste estudo foi a perda de peso causada pelo consumo da kombucha.

## 2.5. Microbiota da kombucha

A princípio, a fermentação da kombucha é realizada a partir de microrganismos que têm a capacidade de desenvolver-se em meios com grandes variabilidades da concentração osmótica e por espécies tolerantes a acidez. Em função da coexistência de numerosas espécies de microrganismos no meio, na kombucha há uma associação de três tipos de fermentação: alcoólica, láctica e acética (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Foi observado por WATAWANA et al. (2015) e COTON et al. (2017) que a composição da microbiota do SCOBY tem variação, de acordo com sua origem, clima, localização geográfica e meio utilizado para o processo de fermentação.

A kombucha é obtida de uma cultura simbiótica de bactérias do ácido acético (*Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e espécies de acetobactérias) (ROOS & VUYST, 2018), bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) (MARSH et al., 2014), e leveduras (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*) (COTON et al., 2017).

Na constituição bacteriana da kombucha os gêneros predominantes encontrados são as bactérias do ácido acético. As bactérias acéticas oxidam o etanol e os carboidratos em ácidos orgânicos para obter energia, esse processo é denominado de fermentação acética, a qual pode estar relacionada a filogenia das destas bactérias (BARJA et al., 2016; MATSUSHITA; MATSUTANI, 2016; OKAMOTO-KAINUMA; ISHIKAWA, 2016). As bactérias essenciais são *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter acetie* e *Acetobacter pasteurianus*. A espécie mais presente é a

*Gluconacetobacter xylinus*, ela é uma das principais bactérias responsáveis pela produção de uma rede da celulose flutuante (SCOBY) que melhora a associação formada entre bactérias e fungos (PALUDO, 2017).

## 2.6. Antagonismo entre bactérias

Em relação ao processo metabólico e o potencial antimicrobiano da kombucha, LIMA et al. (2019, p. 5) explicam as interações:

As leveduras e as bactérias do kombucha utilizam os substratos das suas atividades metabólicas de forma complementar. As leveduras hidrolisam a sacarose da base de chá em frutose e glicose pela ação da enzima invertase e produzem etanol e dióxido de carbono. As bactérias acéticas convertem a glicose em ácido glicônico e a frutose em ácido acético. A presença deste ácido estimula as leveduras a produzir etanol que depois é utilizado pelas bactérias acéticas para o seu crescimento e para a produção de mais ácido acético. Tanto o etanol como o ácido acético apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, o que significa que o ambiente fermentativo da kombucha tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes.

SILVA e PAULO (2018) observaram a existência de metabólitos inibitórios sobre patógenos intestinais em amostras de kombucha. Na kombucha artesanal houve a inibição de três potenciais patógenos testados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.). Tal efeito inibitório segundo os autores, provém da alta acidez presente na bebida fermentada, visto que nas análises realizadas, a kombucha apresentou um pH de 2,8. Sendo assim, a produção de ácidos orgânicos se torna um dos principais princípios ativos da inibição de microrganismos. No estudo de LIMA et al. (2019), determinou-se que a bebida kombucha tanto de chá verde como de erva-mate teve a capacidade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli*, porém foi incapaz de inibir o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição microbiológica, a atividade antimicrobiana e aspectos físico-químicos da kombucha.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar aspectos físico-químicos da bebida;
- Caracterizar a sua microbiota;
- Determinar a atividade antimicrobiana da kombucha, testando sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922).



#### **4. JUSTIFICATIVA**

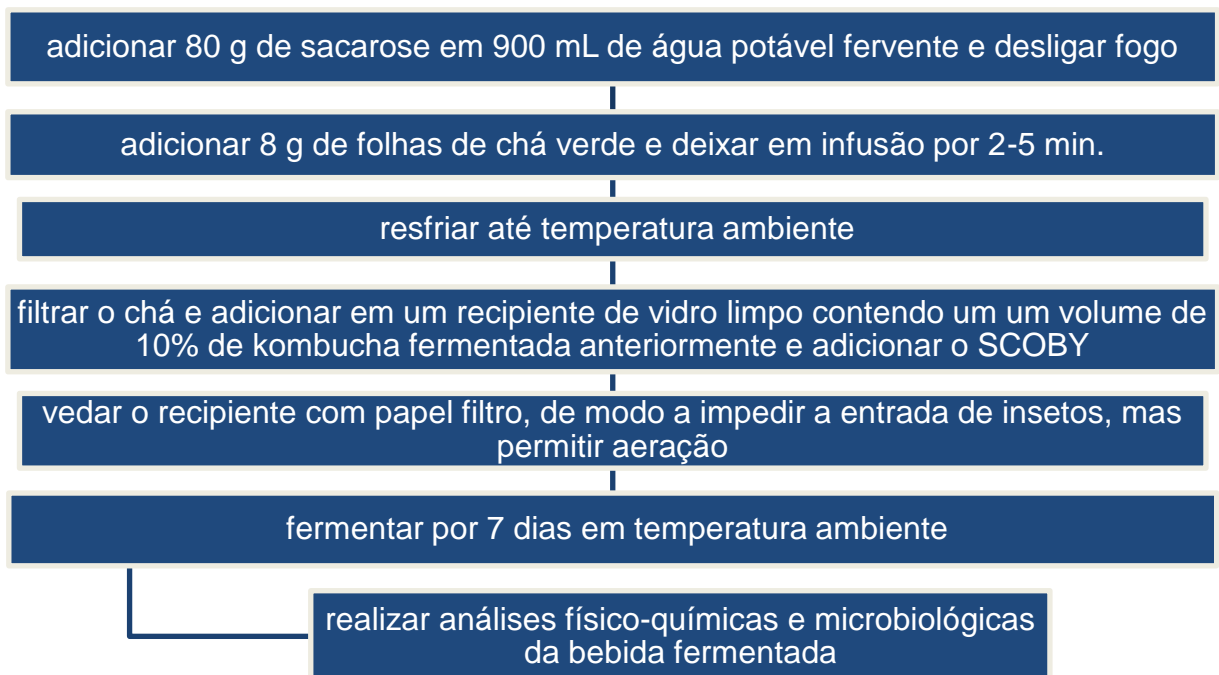
Nos últimos anos tem-se observado uma crescente preocupação da população brasileira em relação à alimentação. Não só em relação aos aspectos nutricionais dos alimentos, como também dos seus efeitos na saúde. Começa-se a observar um aumento na procura por alimentos saudáveis e assim surgem novas oportunidades de negócios que se baseiam na venda de bebidas funcionais. No Brasil bebidas como a kombucha ganham a atenção dos consumidores de forma lenta e estão mais presentes de forma artesanal, onde indivíduos produzem essas bebidas em casa. No mercado, essas bebidas ainda não estão muito presentes, existindo mais em lojas especializadas do que em supermercados. Como a kombucha é ainda um produto pouco conhecido no Brasil, trabalhos como esse são importantes na divulgação dessa bebida probiótica.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção dos SCOBYs de kombucha e das bebidas fermentadas

As três amostras (SCOBYs de kombucha) foram doadas por pessoas que mantêm culturas artesanais em casa. Para a produção da kombucha, os SCOBYs foram inoculados em chá verde açucarado e as bebidas foram fermentadas em temperatura ambiente por 7 dias (Figura 3). Depois os SCOBYs foram retirados das bebidas e estas foram analisadas em relação a composição físico-química e microbiológica.

**Figura 3** – Processo de produção da bebida kombucha



### 5.2. Caracterização físico-química do chá verde e das bebidas fermentadas

A determinação do pH foi realizada com auxílio de pHmetro digital calibrado Gehaka modelo PG 1800 (AOAC, 2006). Para a determinação de acidez total as amostras foram tituladas com NaOH 0,1 N. O teor de sólidos solúveis (grau Brix) foi medido através de um refratômetro de bancada a 20°C (IAL, 2008). A determinação da sacarose foi realizada pelo método do ADNS ou ácido 3-5 dinitrossalicílico

(MILLER, 1959), com adaptações. Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN e DENIS, 1912). Determinou-se o grau alcoólico utilizando um alcoômetro de Gay-Lussac (°GL) colocado diretamente em volume de 250 mL de destilado a 20°C (IAL, 2008). As análises foram realizadas em triplicata ou duplicata e os resultados foram expressos através dos valores da média e desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado e quando as médias foram significativamente diferentes a  $p < 0,05$ , o teste de Tukey foi usado para comparação das médias. Os dados foram analisados com uso do software STATISTICA®, versão 10.0.

### **5.3. Caracterização microbiológica das bebidas fermentadas**

Foram utilizados meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias lácticas, leveduras e bactérias acéticas. O meio de cultivo ágar APT (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,75%, cloreto de sódio 0,5%, fosfato de sódio 0,5%, citrato de potássio 0,5%, glicose 1%, sulfato de magnésio 0,08%, cloreto de manganês 0,014%, sulfato ferroso 0,004%, carbonato de sódio 0,125% e ágar 2%, pH 6,7) foi usado para o isolamento de bactérias lácticas em geral. O meio de cultivo ágar Hestrin-Schamm (HS) (glicose 2%, ágar 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, ácido cítrico 0,115%, fosfato de sódio dibásico anidro 0,27%, pH 5,0) foi utilizado para o isolamento de bactérias acéticas em geral. E o meio de cultivo ágar extrato de malte (extrato de malte 3%, peptona 0,5% e ágar 2%, pH 5,6) foi usado para o isolamento de leveduras. Os meios inoculados foram incubados a 27°C por 5-7 dias. Após incubação, foi realizada a contagem de microrganismos totais nesses meios.

### **5.4. Estudo da atividade antimicrobiana da kombucha**

A atividade antimicrobiana da kombucha foi estudada através do teste de antagonismo contra as cepas de bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, seguindo metodologia CLSI (2015) com adaptações. As cepas foram preparadas através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em

espectrofotômetro. Por fim, foram realizadas diluições na ordem de 1:150 em caldo LB dessas culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Então, adicionou-se em tubos estéreis 1,0 mL do inóculo na concentração  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL das amostras de kombucha, resultando em uma concentração final de bactérias de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Os tubos foram incubados a 36°C por 2 dias. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL de kombucha e 1,0 mL de caldo LB. Os testes foram realizados em duplicata. Após incubação foi inoculado 0,1 mL das amostras em placas de meios seletivos (Ágar Sal Manitol para *S. aureus* e Ágar Mac Conkey para *E. coli*), para verificar a ação antimicrobiana das amostras de kombucha sobre as bactérias ATCC. Os meios seletivos impediram o crescimento da microbiota natural da kombucha, de forma que no Ágar Sal Manitol somente seria verificado o crescimento de *S. aureus* e no Ágar Mac Conkey somente seria verificado o crescimento de *E. coli*.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização físico-química do chá verde e das amostras de kombucha

A Tabela 2 apresenta os resultados de caracterização físico-química do chá verde e das amostras de kombucha após 7 dias de fermentação

**Tabela 2** - Caracterização físico-química do chá verde e das amostras de kombucha após 7 dias de fermentação

Análises	Chá verde	Amostras de kombucha		
		1	2	3
<b>Acidez (g/100 mL) *</b>	0,36±0,01 <sup>a</sup>	2,40±0,01 <sup>b</sup>	1,26±0,01 <sup>c</sup>	2,10±0,01 <sup>b</sup>
<b>Acidez (meq/L)</b>	6,00±0,01 <sup>a</sup>	40,00±0,01 <sup>b</sup>	21,00±0,01 <sup>c</sup>	35,00±0,01 <sup>b</sup>
<b>pH</b>	5,90±0,00 <sup>a</sup>	3,38±0,00 <sup>b</sup>	3,58 ±0,00 <sup>c</sup>	3,36±0,00 <sup>b</sup>
<b>Sólidos solúveis (°Brix)</b>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	7,50±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	7,50±0,00 <sup>b</sup>
<b>Sacarose (%)</b>	7,74±0,89 <sup>a</sup>	3,60±0,55 <sup>b</sup>	7,12±0,82 <sup>a</sup>	4,66±0,43 <sup>b</sup>
<b>Compostos fenólicos (mg/100mL)</b>	95,00±7,07 <sup>a</sup>	62,50±3,53 <sup>b</sup>	95,00±7,07 <sup>a</sup>	71,50±4,94 <sup>a,b</sup>
<b>Teor de álcool (%)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições, \*acidez expressa em gramas de ácido acético por 100 mL. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

A partir dos dados da Tabela 2, pode-se observar que o pH do chá verde foi de 5,90 e o pH das amostras de kombucha variaram de 3,36-3,58. Os resultados obtidos foram semelhantes ao estudo de Sari (2014), que obteve o pH de 3,52 para a kombucha após 7 dias de fermentação. Já na pesquisa de Paludo (2017), o pH da kombucha fermentada durante 7 dias foi de 2,81. De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2019), o pH da kombucha deve variar entre 2,5 e 4,2. Sendo assim, observou-se todas as amostras estavam dentro dos parâmetros da legislação para kombucha.

O ácido acético foi quantificado nas amostras após 7 dias de fermentação. As amostras de kombucha 1 e 3 tiveram valores próximos de acidez (2,10-2,40 g/L) e na amostra 2, notou-se uma quantidade menor de ácido acético (1,26 g/L). No estudo de

Santos *et al.* (2019) a amostra de kombucha fermentada por 7 dias apresentou 2,07 g/L de ácido acético e no estudo de Neffe-Skocińska *et al.* (2017), a concentração de ácido acético após 7 dias de fermentação da kombucha foi de 1,26 g/L, sendo o mesmo valor encontrado na amostra 2. O nível de ácido acético varia entre as kombuchas dependendo da concentração e da atividade das bactérias acéticas residentes (KALLEL *et al.*, 2012). Na legislação brasileira (BRASIL, 2019) o valor permitido para acidez na kombucha é expresso em meq/L, sendo assim os resultados obtidos no nosso estudo também foram apresentados dessa forma. Segundo a legislação brasileira, a acidez da kombucha deve ser de 30-130 meq/L, e, portanto, as amostras 1 e 3 do nosso estudo estavam dentro do padrão (35-40 meq/L) e a amostra 2 estava com acidez (21 meq/L) abaixo do permitido.

Os sólidos solúveis totais (SST) medidos no alimento são o total de todos os sólidos dissolvidos na água, como açúcares, sais, proteínas, ácidos etc (MORAES, 2006). Nas análises foram encontrados os valores de 7,5°Brix para as amostras 1 e 3 e de 9,0°Brix para a amostra 2. A variação de conteúdo de SST entre as amostras está associada a velocidade de consumo dos açúcares pelos microrganismos, visto que os SCOBYs eram diferentes. Na análise de Santos *et al.* (2019) o valor de SST da kombucha após 7 dias de fermentação foi de 13,3°Brix, sendo superior aos valores encontrados no nosso estudo. Na legislação brasileira (BRASIL, 2019) não há padrões estabelecidos para SST na kombucha.

O chá verde apresentou 7,74% de sacarose e nas amostras de kombucha 1 e 3 a porcentagem de sacarose foi menor (3,60-4,66%) em relação a amostra 2 (7,12%), devido a maior ação das bactérias e leveduras, que transformam a sacarose em glicose e frutose, e posteriormente hidrolisam esses açúcares para a formação do etanol e de ácido acético. A amostra 2, sofreu uma mínima redução de sacarose durante o processo de fermentação, visto que o SCOBY utilizado estava com atividade reduzida e, portanto, para essa amostra seria necessário um tempo maior de fermentação de 10-14 dias para diminuição dos valores de sacarose. No estudo de Paludo (2017) a kombucha ao final de 7 dias de fermentação apresentou 3,62% de sacarose. Santos *et al.* (2019) obtiveram o valor de 4,64% de sacarose na kombucha com processo de fermentação de 7 dias.

A kombucha é conhecida por ter propriedades antioxidantes pelo fato de ter presença de compostos fenólicos em sua composição. Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas

alimentícias, sendo conhecidos, principalmente, pela sua capacidade antioxidante (VÁZQUEZ-CABRAL et al., 2015). Paludo (2017) obteve a kombucha através da fermentação da infusão de erva-mate verde por um período de 7 dias e obteve 60,59 mg/mL de compostos fenólicos, valor próximo ao encontrado na amostra 1 que foi de 62,50 mg/mL. Fernandes (2017) obteve a kombucha a partir da fermentação de uma infusão de hibisco e obteve 36,20 mg/mL de compostos fenólicos, valor inferior aos dados apresentados nesse estudo (62,5-95,0 mg/mL). A composição química do chá ou infusão (verde, mate, hibisco) usado na elaboração da kombucha influencia diretamente o teor de compostos fenólicos da bebida.

As amostras de kombucha deste estudo não apresentaram teor alcoólico. As leveduras, principalmente, são responsáveis pela conversão de sacarose em glicose e frutose, e estes monossacarídeos são utilizados como substrato para as fermentações alcóolica e acética, onde é formado o CO<sub>2</sub>, que é responsável pela gaseificação da bebida. O etanol, permanece no produto em poucas concentrações, já que é quase todo convertido em ácido acético por bactérias acéticas (JAYABALAN et al., 2014). No estudo de BRUINI et al. (2019) foi obtido o valor de 0,1% de etanol na kombucha. A legislação brasileira (BRASIL, 2019) limita o valor máximo de 5% de etanol no produto.

## **6.2. Caracterização microbiológica das bebidas fermentadas**

A tabela 3 apresenta os resultados da contagem de bactérias acéticas, bactérias lácticas e leveduras das amostras de kombucha após 7 dias de fermentação. Os resultados deste estudo mostraram para as amostras 1 e 3 uma predominância de bactérias acéticas ( $4,8-5,8 \times 10^6$  UFC/mL), seguida de leveduras ( $1,3 \times 10^5-4,3 \times 10^6$  UFC/mL) e de bactérias lácticas ( $2,6-4,5 \times 10^4$  UFC/mL). Santos, Barbosa e Lacerda (2017), relataram resultados similares ao nosso estudo, onde a amostra de kombucha obtida a partir da fermentação do chá verde apresentou  $8,0 \times 10^6$  UFC/mL de bactérias acéticas,  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL de leveduras e  $9,0 \times 10^2$  UFC/mL de bactérias lácticas.

**Tabela 3** - Caracterização microbiológica das amostras de kombucha após 7 dias de fermentação

Grupo de bactérias	Amostras de kombucha		
	1	2	3
<b>Bactérias lácticas</b>	4,5x10 <sup>4</sup>	ND	2,6x10 <sup>4</sup>
<b>Bactérias acéticas</b>	5,8x10 <sup>6</sup>	5,1x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>6</sup>
<b>Leveduras</b>	1,3x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>	4,3x10 <sup>6</sup>

Os resultados foram expressos como médias de UFC/mL; ND = não detectado

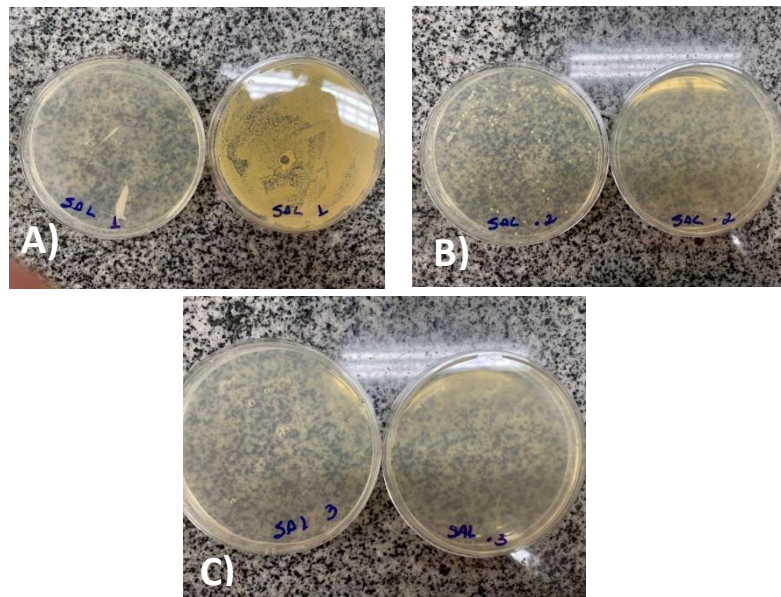
Na bebida kombucha há a presença de bactérias e leveduras que tem propriedades benéficas para a microbiota intestinal humana, sendo a kombucha uma bebida probiótica (WATAWANA et al., 2015). Estudos indicam que a microbiota que compõe o SCOBY e a kombucha varia de acordo com a origem do inóculo, com seu manuseio e com a temperatura em que ocorre a fermentação (JAYABALAN et al., 2014; CHAKRAVORTY et al., 2016).

### 6.3. Estudo da atividade antimicrobiana das amostras de kombucha

A atividade antimicrobiana das amostras de kombucha foi estudada através do teste de antagonismo contra as cepas de bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 (Figuras 4 e 5). Os testes foram realizados em duplicata. Para o teste do antagonismo contra *E. coli*, os resultados revelaram que a microbiota de todas as amostras da kombucha inibiram completamente o crescimento de *E. coli*. No teste do antagonismo contra *S. aureus*, as amostras 2 e 3 de kombucha inibiram o crescimento de *S. aureus*. Numa das placas da amostra 2 houve contaminação, pois, as colônias que cresceram não eram de *S. aureus*. E na amostra de kombucha 1, uma placa ficou vazia e outra placa teve crescimento de *S. aureus* e esse teste teria que ser repetido para comprovar se essa amostra de kombucha inibe parcial ou completamente o crescimento de *S. aureus*., no entanto este teste não foi feito.

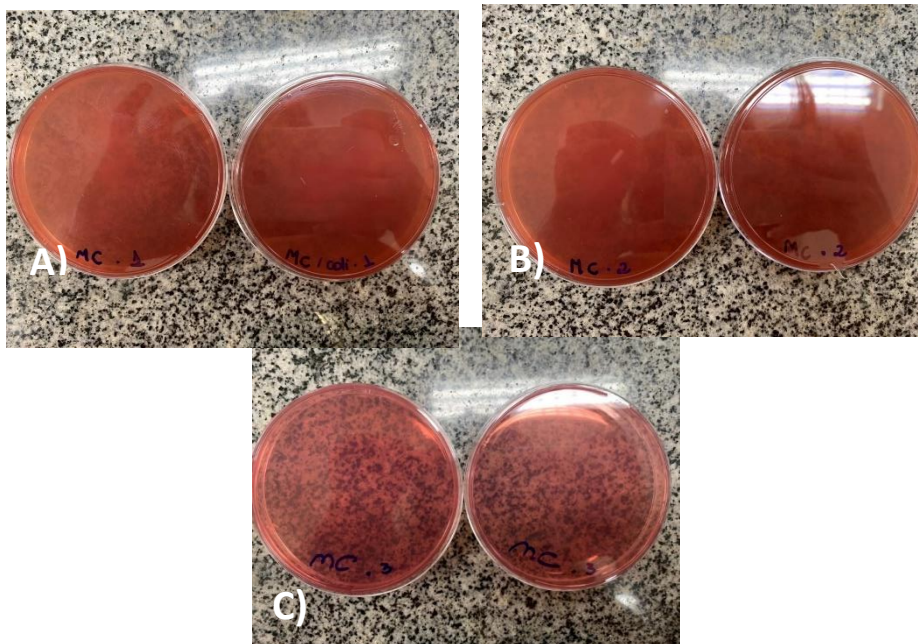


**Figura 4** – Resultados do teste de antagonismo das amostras de kombucha contra *S. aureus*



A) kombucha 1, B) kombucha 2 e C) kombucha 3

**Figura 5** - Resultados do teste de antagonismo das amostras de kombucha contra *E. coli*



A) kombucha 1, B) kombucha 2 e C) kombucha 3

No estudo de Silva e Paulo (2021) o teste de antagonismo apresentou efeito inibitório para *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* sp. Com esses resultados, pode-se afirmar que a kombucha tem propriedades antimicrobianas e impossibilita o crescimento de bactérias patogênicas. De acordo com Franco et al. (2008) as bactérias enteropatogênicas como *E. coli* não possuem a capacidade de sobreviver em pH menor que 4. Os ácidos orgânicos, como láctico e acético, que favorecem a queda do pH, contribuem com a ação antimicrobiana da kombucha, como a desestabilização de membranas, lise celular, inibição de síntese proteica e degradação de ácidos nucleicos (DIAS et al., 2018). Além da atividade antibacteriana, pode ser destacado o potencial antifúngico atribuído à produção do ácido acético nessa bebida (WATAWANA et al., 2015).

## 7. CONCLUSÃO

Esse trabalho analisou as características físico-químicas e microbiológicas de três amostras de kombucha. Os resultados das análises físico-químicas das bebidas estavam de acordo com os valores estabelecidos na legislação brasileira e nas análises de composição da microbiota não há especificações na legislação brasileira, contudo, notou-se semelhança entre os resultados desse estudo e outros estudos da literatura. Foi utilizada uma metodologia de produção da kombucha, no entanto, foi notada a existência de diversas formulações da bebida na literatura, o que dificulta a padronização e reprodução da kombucha. Embora exista tal dificuldade, é possível ter o controle das condições de produção, como tempo de fermentação, substratos utilizados, e por meio desses fatores é possível obter um produto com características sensoriais, composição química e microbiológica desejadas. Na literatura são encontrados inúmeros benefícios da kombucha, como o efeito antimicrobiano da bebida sobre bactérias potencialmente patogênicas. No presente estudo, as amostras de kombucha apresentaram ação inibitória contra *S. aureus* e *E. coli*, comprovando a funcionalidade do produto. Os dados obtidos nesse trabalho mostraram que é possível produzir a kombucha de maneira artesanal, e corresponder aos parâmetros estabelecidos na legislação, no entanto, com o aumento da procura pela bebida que vem conquistando espaço no mercado brasileiro, torna-se importante o estudo e padronização desse tipo de produto para a garantia da qualidade e segurança do consumidor.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659–665, 2018.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists, **Official methods of analysis**. 18rd ed. Gaithersburg: AOAC; 2006

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **Produção de Kombucha se multiplica no Brasil**. São Paulo: CITRUS, 23 out. 2018. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312621>. Acesso em: 16 de agosto 2020

BALLUS, C.A. et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p.85-96, 2010.

BARJA, F. et al. Physiology of *Acetobacter* and *Komagataeibacter* spp.: acetic acid resistance mechanism in acetic acid fermentation. **Acetic Acid Bacteria**, [S.L.], p. 223-234, 2016. Springer Japan. [http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7\\_10](http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_10).

BRASIL, ANVISA, Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 03 mai. 1999.

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.

BRUINI, B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos no processo de fabricação da kombucha. **Revista Engenho**, v. 11, n. 1, p. 48-67, 2019.

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

DANIELIAN, L. T. Kombucha (Kombucha) and its biological features. **Meditina**, Moscow, 2005.

CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de micro-organismos isolados de grãos de kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 0, 2018.

FERNANDES, K. C. L. **Produção e caracterização de kombucha à base de chá de hibisco**. TCC (Graduação em Engenharia de Alimentos), Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2017. 35f.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 239-243, 1912.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FU, C.; YAN, FEN, C.; ZELI, X.; FANYING, L. J. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 123-126, 2014.

IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1. ed. digital São Paulo: IMESP, 2008.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R. V.; LONCAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMA, M. A Review on kombucha tea-microbiology composition fermentation, beneficial, effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 538-550, 2014.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

KIM, D-O; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

KOZYROVSKA, N. O.; REVA, O. M.; GOGINYAN, V. B.; VERA, J. P. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, v. 28, n. 2, p. 103–113, 2012.

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

MAHMOUDI, E., SAEIDI, M., MARASHI, M., MOAFI, A., MAHMOUDI, V., ZEINOLABEDINI ZAMANI, M. In vitro activity of kombucha tea ethyl acetate fraction against *Malassezia* species isolated from seborrheic dermatitis. **Current Medical Mycology**, v. 2, n. 4, p. 30-36, 2016.

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

MATEI, B.; SALZAT, J.; DIGUTA, C. F.; CORNEA, C. P.; LUTĂ, G.; UTOIU, E. R.; FLORENTINA, M. Lactic acid bacteria strains isolated from kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 3, 2018.

Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A., 2016. Acetic acid bacteria: Ecology and physiology, Springer, Tokyo. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 4, p. 426, 1959.

MOHAMMADSHIRAZ, A.; KALHOR, E. Energy and cost analyses of kombucha beverage production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 668-673, 2016.

MORAES, R. R. Refratometria. Disponível em <http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>. Acesso em 27 Mar 2006.

MOURA, A. B. **Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá mate**, Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

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.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; Le, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149-1155, 2015.

OKAMOTO-KAINUMA, A. et al. Physiology of *Acetobacter* spp.: involvement of molecular chaperones during acetic acid fermentation. **Acetic Acid Bacteria**, [S.L.], p. 179-199, 2016. Springer Japan. [http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_8).

PALUDO, N. **Desenvolvimento e caracterização de Kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**. 2017. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2017.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation de colorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

ROOS, J. D., & VUYST, L. D. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, 49, 115–119, 2018.

SANTOS, Y. M. A. et al. Avaliação da composição de kombucha a base de diferentes chás (verde e preto). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal, v. 03, n. 12, p. 01-06, 2019.

SANTOS, M. J. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2016.

SANTOS, R. B; BARBOSA, L. P. J. L; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 26-38, 2011.

SANTOS, W. C. R. ; BARBOSA, C.D; LACERDA, I. A. C. CARACTERIZAÇÃO DE KOMBUCHA DE CHÁ PRETO. 69ª Reunião Anual da SBPC - 16 a 22 de julho de 2017 - UFMG - Belo Horizonte/MG 5.07.01 - **Ciência e Tecnologia de Alimentos / Ciência de Alimentos**, 2017.

SARI, N. Comparison of the antioxidant activity of kombucha green tea (*Camelia sinensis*) with tea mango leaves (*Mangifera indica*) influenced fermentation. Tese de Mestrado, Universitas Muhammadiyah Surakarta, 2014.



SILVA, S. B.; PAULO, E. M. **Teste de antagonismo da microbiota do soro de queijo comerciais e coalhadas produzidos de forma artesanais**. 2018. 4 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

SUHRE, T. **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana**. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2020.

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

VÁZQUEZ-CABRAL, B. D. et al. Mexican oaks as a potential non-timber resource for kombucha beverages. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 22, n.1, 73-86, 2015.

VINA, L. et al. Current evidence on physiological activity and expected health effects of Kombucha fermented beverage. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 2, p. 179-188, 2014.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, p. 1-11, 2015.

YANG, Z. W. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 1, p. 150- 156, 2009.

Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T., 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61 (8), 1244–1251. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1244>.