

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL- UERGS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CAMPUS REGIONAL II - ENCANTADO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA OBTIDA  
A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE SCOBY ADICIONADOS AO  
RESÍDUO DA INDÚSTRIA LÁCTEA: SORO DE LEITE.**

**NATÁLIA MARIA SFÓGLIA**

**ENCANTADO**

**2023**



**uergs**

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

**PPGCTA**

Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**NATÁLIA MARIA SFÓGLIA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA OBTIDA  
A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE SCOPYADICIONADOS AO  
RESÍDUO DA INDÚSTRIA LÁCTEA: SORO DE LEITE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para obtenção do título de *Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian Hickert.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Misturini Rossi

Encantado, 27 de outubro 2023.

NATÁLIA MARIA SFÓGLIA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA OBTIDA  
A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE SCOPYADICIONADOS AO  
RESÍDUO DA INDÚSTRIA LÁCTEA: SORO DE LEITE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para obtenção do título de *Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

Orientadora: Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Lilian Hickert.

Co-orientadora: Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Daniele Misturini Rossi

Banca examinadora

---

Dr. Voltaire Sant'anna

---

Dra. Karla Perez

---

Dra. Fernanda Lopes

Encantado, 27 de outubro 2023.

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

S523d

Sfóglia, Natália Maria

Desenvolvimento e caracterização de bebida fermentada obtida a partir da fermentação de colônias de Scoby adicionados ao resíduo da indústria láctea: soro de leite / Natália Maria Sfóglia. – Encantado: Uergs, 2023.

66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unidade em Encantado, 2023.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Lilian Hickert

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Daniele Misturini Rossi

1. Kombucha. 2. Soro de leite. 3. Scoby. 4. Dissertação. I. Hickert, Lilian. II. Rossi, Daniele Misturini. III. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unidade em Encantado, 2023. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir o Dom da vida. Dedico esta conquista a minha família, meu bem maior. A minha inspiração, que hoje é minha estrelinha, meu querido avó Antônio Vítório (*in memoriam*) que me ensinou muito em poucas palavras. Ao meu maior exemplo, meu PAI, que sempre acreditou em mim e por ter me dado todo suporte para que eu conseguisse estudar e não desistir. Aos meus amores, meu irmão Fernando e meu noivo Eriqui que me entendem e sabem de cada passo, são meu porto seguro! A minha Avó Elvira, minha Mãe Simoni e minha querida Madrinha Neiva. Muito Obrigado! Amo vocês!

Agradeço as minhas Orientadoras Dr<sup>a</sup> Lilian e minha co-orientadora Daniele por toda paciência e experiência compartilhada nesta longa etapa. Ao Dr<sup>o</sup> Voltaire Sant'Ana pelo suporte e dedicação de sempre. Aos amigos e colegas, novos e os de longa jornada que de uma forma ou de outra, me incentivaram ao longo da trajetória. Muito obrigado!

Apesar de todas as dificuldades, foi com muita determinação que posso dizer...

*Consegui!*

*A todos, muito obrigado!*

“Depois da virtude, é o conhecimento o que eleva um homem sobre os demais.”

*Joseph Addison*

## RESUMO

Kombucha é uma bebida fermentada e gaseificada naturalmente desenvolvida a base de chás, geralmente chá verde ou chá preto derivados da *Camellia sinensis*, adoçados e adicionados de uma membrana celulósica denominada Scoby (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), uma associação de bactérias lácticas, acéticas e leveduras simbióticas. A kombucha é caracterizada por um processo complexo de ser controlado e padronizado pois há muitas variáveis como tempo de fermentação, pH, acidez, substrato e quantidade de Scoby adicionados, visto que, a carga microbiológica presente em cada scoby é muito diversificada podendo resultar em produtos com características distintas. O objetivo do presente trabalho foi elaborar e caracterizar uma bebida fermentada com a utilização do scoby em soro de leite, agregando valor à este resíduo da indústria láctea, visando a substituição do chá verde ou chá preto comumente utilizado. Os experimentos foram realizados em temperatura de aproximadamente 25 °C, coletadas ao longo de 07 dias de fermentação (consecutivos) e congeladas para testes laboratoriais, em duplicata. Os ensaios foram elaborados com soro de leite com adição de 7% de sacarose e sem adição de sacarose. Foram realizadas análises físico-químicas (pH, acidez) e glicerol, etanol, ácido acético por HPLC e análises microbiológicas dos scobys no tempo inicial (T0) e no sétimo dia de fermentação (T07) do experimento com soro de leite. Também se estudou a viabilidade do desenvolvimento de uma bebida láctica através de testes com Leite Pasteurizado UHT, avaliando o comportamento dos microrganismos no meio e a velocidade da fermentação. Nesses experimentos foram encontradas majoritariamente o gênero de bactérias *Komagataeibacter* e o gênero fúngico *Zygosaccharomyces*. Ambas as condições de fermentação produziram um teor final de etanol superior a 0,5%, caracterizando uma bebida alcoólica. A acidez volátil, em ambas amostras, ficou acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Neste estudo, foi possível evidenciar que a adição de sacarose nas amostras de soro de leite fermentado não afetou a produção de glicerol, álcool e ácido acético, pois não houve diferença significativa entre as amostras. Porém, observou-se aumento na comunidade microbiana ao longo dos dias de fermentação em ambas as amostras, mostrando que esta bebida pode possivelmente apresentar um potencial probiótico.

**PALAVRAS CHAVE:** Kombucha; Soro de leite; Bebida fermentada probiótica; Scoby.

## ABSTRACT

Kombucha is a fermented and carbonated drink naturally developed based on teas, generally green tea or black tea derived from *Camellia sinensis*, sweetened and added with a cellulosic membrane called scoby (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), an association of lactic and acetic bacteria and symbiotic yeasts. Kombucha is characterized by a complex process to be controlled and standardized as there are many variables, such as fermentation time, pH, acidity, substrate and amount of scoby added, since the microbiological load present in each SCOBY is very diverse and can result in products with distinct characteristics. The objective of the present work was to develop and characterize a fermented whey drink, adding value to this residue from the dairy industry, aiming to replace the commonly used green tea or black tea. The experiments were carried out at a temperature of approximately 25° C, collected over 7 days of fermentation (consecutive) and frozen for laboratory tests, in duplicate. The assays were carried out with whey with the addition of 7% sucrose and without the addition of sucrose. Physicochemical analyzes (pH, acidity, glycerol, ethanol, acetic acid) and microbiological analyzes of the SCOBYs were carried out at the initial time (T0) and on the seventh day of fermentation (T07) of the experiment with whey. The feasibility of developing a lactic beverage was also studied through tests with UHT Pasteurized Milk, evaluating the behavior of microorganisms in the medium and the speed of fermentation. In these experiments, the bacterial genus *Komagataeibacter* and the fungal genus *Zygosaccharomyces* were mostly found. Both fermentation conditions produced a final ethanol content greater than 0.5%, characterizing an alcoholic beverage. The volatile acidity in both samples was outside the limits established by current legislation. In this study, it was possible to demonstrate that the addition of sucrose to fermented whey samples did not affect the production of glycerol, alcohol and acetic acid, as there was no significant difference between the samples. However, an increase in the microbial community was observed over the days of fermentation in both samples, showing that this drink may have probiotic potential.

KEY WORDS: Kombucha, Whey; Probiotic fermented drink, Scoby.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem taxonômica da <i>Camellia sinensis</i> .....	4
Figura 2. Classificação dos chás obtidos da <i>Camellia sinensis</i> .....	5
Figura 3. Etapas do processamento do chá verde e chá preto. ....	5
Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides.....	6
Figura 5. Estrutura das principais catequinas do chá verde. ....	8
Figura 6. Oxidação do etanol e ácido acético.....	11
Figura 7. Fluxograma processo de elaboração da Kombucha tradicional de 1ª fermentação. ...	16
Figura 8. Coleta e identificação de amostras de soro de leite em pó.....	23
Figura 9. Amostras de soro de leite em pó e leite UHT .....	23
Figura 10. Ensaio e testes preliminares com soro líquido. ....	24
Figura 11. Composição das amostras de soro de leite em pó.....	25
Figura 12. Resultados microbiológicos de amostras de soro de leite em pó com adição de açúcares e sem adição de açúcares.....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Perfil microbiológico do SCOBY da amostra elaborada com Soro de Leite + SCOBY, sem adição de açúcares. Os números equivalem a quantidade média de micro-organismos encontrados ( <i>reads</i> ).....	37
Gráfico 2. Perfil microbiológico do SCOBY da amostra elaborada com Soro de Leite + SCOBY + açúcar. Os números equivalem a quantidade média de micro-organismos encontrados ( <i>reads</i> ). .....	38
Gráfico 3. Perfil microbiológico no último dia de fermentação (Dia 07), nas diferentes amostras de Soro de leite em pó- sem adição de açúcar e com adição de açúcar. Os números equivalem a quantidade média de micro-organismos encontrados ( <i>reads</i> ). .....	39

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição química do chá verde e do chá preto .....	7
Quadro 2. Parâmetros físico químicos para Bebida Láctea Fermentada.....	15
Quadro 3. Parâmetros microbiológicos para Bebida Láctea Fermentada .....	15
Quadro 4. Composição dos diferentes tipos de soro de leite.....	20
Quadro 5. Média dos parâmetros analisados ao longo da fermentação nas amostras de soro de leite em pó.....	29

## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1. Diversidade microbiológica do SCOBY nas amostras de soro de leite em pó com adição e sem adição de açúcar no tempo inicial e final de fermentação.....	41
Tabela 2. Perfil de Leveduras Reino Fungi ao longo da fermentação (Dia 0 e Dia 07), nas amostras de Soro de leite em pó- sem adição de açúcar e com adição de açúcar. ....	42

## **ABREVIACOES E SIGLAS**

*C. sinensis: Camellia sinensis*

IN: Instrução Normativa

a.c: Antes de Cristo

d.c: Depois de Cristo

SCOBY: Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

BAL: Bactérias Acido Lácticas

AM: Amostra

Av. : Avenida

n° : Número

%: Porcentagem

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UERGS: Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

ICTA: Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

T: Temperatura

PIB: Produto Interno Bruto

pH: potencial hidrogeniônico

mEq/L: miliequivalentes por litro

v/v: volume de soluto por volume de solução

°C: Graus Célsius

DBO: Demanda Bioquímica de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	4
3.1 CHÁ: UMA BEBIDA MILENAR .....	4
3.2 <i>Camellia sinensis</i> .....	4
3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CHÁ VERDE .....	6
3.4 KOMBUCHA: A ORIGEM .....	8
3.5 FERMENTAÇÃO E PROCESSOS METABÓLICOS DA KOMBUCHA .....	9
3.6 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DA KOMBUCHA E POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS .....	11
3.7 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA KOMBUCHA .....	13
3.8 COMPOSIÇÃO E METABÓLITOS ENCONTRADOS NA KOMBUCHA .....	14
3.9 EMBASAMENTO LEGAL E PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA .....	14
3.10 PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA TRADICIONAL .....	16
3.11 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO E MANIPULAÇÃO DA KOMBUCHA .....	17
3.12 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS .....	19
3.13 SORO DE LEITE .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 SUBSTRATOS UTILIZADOS .....	22
4.2 DESCRIÇÃO DOS PROCESSOS .....	24
<b>4.2.1 Viabilidade do experimento com soro fresco (líquido)</b> .....	24
<b>4.2.2 Elaboração de amostras com soro em pó</b> .....	25
4.3 DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	26
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	26
<b>4.4.1 Descrição método detecção de acidez total</b> .....	26
<b>4.4.2 Descrição método detecção pH</b> .....	26
4.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	27
4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO SCOBY - ANÁLISE METAGENÔMICA .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	29
5.1 RESULTADOS FÍSICO QUÍMICOS .....	29
<b>5.1.1 pH e acidez</b> .....	30
5.2 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS .....	37
<b>5.2.1 Bactérias</b> .....	37
<b>5.2.2 Leveduras</b> .....	41

<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>44</b>
<b>8 REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O consumidor tem buscado escolhas mais saudáveis, visando o bem-estar aliado a um alto valor nutricional e com isso, o mercado vem aumentando a oferta de alimentos menos processados que remetam a sua forma *in natura* e com redução de aditivos. Com isso o hábito de tomar chás tem crescido. No Brasil, o costume de consumir chás está inserido em inúmeras culturas, já sendo um hábito muito difundido em algumas refeições do dia-a-dia de muitas famílias. Diversas plantas são utilizadas para confecções de chás, sendo que as mais procuradas são aquelas ricas em aromas e com capacidade de prevenir e tratar doenças.

O chá verde é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo depois da água, rica em substâncias químicas chamadas flavonoides, benéficas à saúde de quem os consome. Estes compostos agem na proteção do organismo, auxiliando no combate aos radicais livres, que são responsáveis pelo envelhecimento celular precoce (MATSUBARA E RODRIGUEZ 2006). Neste contexto, o consumo de chás e alimentos funcionais vem se destacando como métodos naturais que visam diminuir a quantidade de fármacos aplicados para tratar e prevenir algumas doenças (VILLARREAL SOTO et al., 2018; SOUSA 2016).

Alimentos fermentados também têm despertado grande interesse por parte de consumidores associados a saúde e a qualidade de vida por possuírem elevado potencial de funcionalidades no organismo humano. Conforme Villarreal – Soto et al., (2018), o processo de fermentação é um dos métodos mais antigos para preservação e conservação de alimentos, essencial para garantir a vida e a segurança dos alimentos. Indústrias alimentícias vêm trabalhando incansavelmente no desenvolvimento de pesquisas e inovação para o desenvolvimento de alimentos e bebidas que tragam apelo funcional (VILLARREAL-SOTO et al., 2019). Dentre os alimentos considerados funcionais podemos citar os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos (BOGSAN, NERO & TODOROV 2015). Dentre as bebidas funcionais e terapêuticas, a kombucha vem ganhando cada vez mais espaço, caracterizando uma tendência atual de mercado.

A kombucha é uma bebida produzida a partir da fermentação de chás, geralmente os chás preto ou verde, provenientes das folhas da *Camellia sinensis*, através da adição de uma membrana celulósica denominada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* ou, *Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras*). Essa cultura é capaz de realizar diversas reações químicas no processo de fermentação, como a produção de ácidos orgânicos, etanol, dióxido de carbono, dentre outros componentes. Para que se inicie o processo de fermentação é necessário a adição de um substrato, geralmente a sacarose (JAYABALAN et al., 2014; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

A kombucha se apresenta como uma bebida simbiótica gaseificada naturalmente, semelhante a um espumante. Suas propriedades antioxidantes e detoxificantes benéficas a saúde humana são princípios ativos doado do chá base utilizado, ricos em compostos bioativos, como



fenólicos e antioxidantes, que permanecem na matriz da bebida (CHAKRAVORTY et al., 2016; FILIPPIS et al., 2018).

Além da preocupação em consumir alimentos que de alguma forma venham a contribuir nutricionalmente trazendo benefícios a saúde do consumidor, também se tem buscado cada vez mais alimentos que sejam ambientalmente amigáveis, ou seja, que representem baixo impacto ambiental, ou utilização completa do alimento. A indústria tem papel muito importante no desenvolvimento da economia brasileira, sendo responsável por cerca de 5,9% do Produto Interno Bruto (PIB) e participando da transformação, beneficiamento e processamento de matérias primas, o que contribui para a inclusão de pequenos produtores no ramo do agronegócio (EMBRAPA, 2020).

Neste contexto, a cadeia produtiva do leite juntamente com o processamento e de seus derivados são atividades de suma importância econômica para o Brasil, evidenciando a oportunidade para o desenvolvimento de novos produtos como uma alternativa estratégica no mercado de lácteos. Todo processamento gera resíduos, a indústria beneficiadora do leite através da fabricação de queijos tem como resíduo principal a grande quantidade de soro de leite que, se descartado inadequadamente, podem ocasionar danos ao solo e a água.

O soro do leite é um coproduto lácteo extraído do processo de coagulação do leite no processo fabril de queijos (BRASIL, 2013). Marquardt et al., (2012), evidencia que cerca de 40% do soro de leite produzido no Brasil é descartado de forma inadequada, principalmente pelas pequenas e médias empresas. Desta forma, Moreira et al., (2010) e Paula et al., (2011), destacam que este coproduto muitas vezes, transforma-se em rejeito industrial nocivo à natureza podendo ocasionar prejuízos à fauna e flora, pois sua Decomposição Bioquímica de Oxigênio (DBO) é de dez a 100 vezes maior que a do esgoto doméstico.

Em busca de agregar valor à um resíduo industrial, o soro de leite, este trabalho teve como objetivo a elaboração de uma bebida láctea fermentada com Scoby utilizando o soro de queijo proveniente do processo de fabricação de queijo como base.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar uma bebida láctea fermentada pelo SCOBY da kombucha a partir de soro de leite e avaliar suas características microbiológicas e físico-químicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o processamento térmico do soro do leite.
- Analisar físico-quimicamente as amostras de soro de leite em pó fermentado pelo SCOBY através de medidas de pH e acidez.
- Avaliar o consumo de açúcares, produção de glicerol e etanol com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Realizar o estudo microbiológico através de análise metagenômica de bactérias e leveduras presentes no SCOBY no tempo inicial (Dia 0) e no final da fermentação (Dia 7).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CHÁ: UMA BEBIDA MILENAR

De acordo com Schmitz et al. (2005), as plantas são utilizadas desde o início dos tempos como produtos terapêuticos utilizados de diversas formas: infusão, macerado filtrado, em pomadas, xaropes, in natura, dentre outras formas. Entre estes, a infusão é a forma mais popular de se utilizar o chá verde. O hábito de bebê-lo caracteriza um dos métodos mais remotos para tratamento, devido às propriedades medicinais remanescentes na infusão, como compostos biologicamente ativos que contribuem na diminuição do risco do desenvolvimento de diversas doenças e comorbidades (SANTOS, 2019).

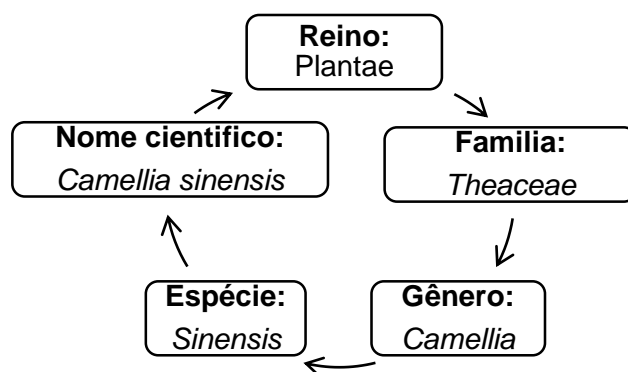
Esteves (2021) destacou em um estudo publicado pela *Euromonitor* que o consumo de chá no Brasil cresceu 25% entre 2013 e 2018, correspondendo a uma média quase duas vezes maior que o índice mundial. No ano de 2019, o segmento movimentou R\$ 2,2 bilhões no mercado brasileiro.

#### 3.2 *Camellia sinensis*

Os autores Paganini Costa e Da Silva (2011), relatam que as primeiras sementes de *Camellia sinensis* adentraram no Brasil pelo estado do Rio de Janeiro, quando um pequeno comerciante e agricultor de Portugal chamado Luiz de Abreu, obteve as sementes e ofereceu a D. João V., que passou a cultivar o chá verde em suas propriedades e com o tempo expandiu por todas as regiões do país.

A espécie já vem sendo cultivada em mais de trinta países pelo mundo (BLANCO, 2020). A caracterização taxonômica da *Camellia sinensis* está evidenciada na figura 1.

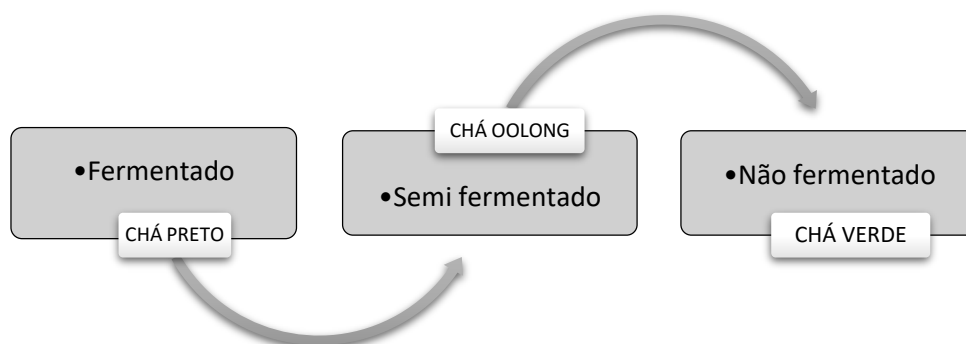
**Figura 1.** Origem taxonômica da *Camellia sinensis*.



**Fonte:** Autor (2023).

Os chás da *C. sinensis* são classificados em três grupos (Figura 2), diferenciando-se pelo seu beneficiamento/processamento das folhas, já que os chás são obtidos da mesma planta.

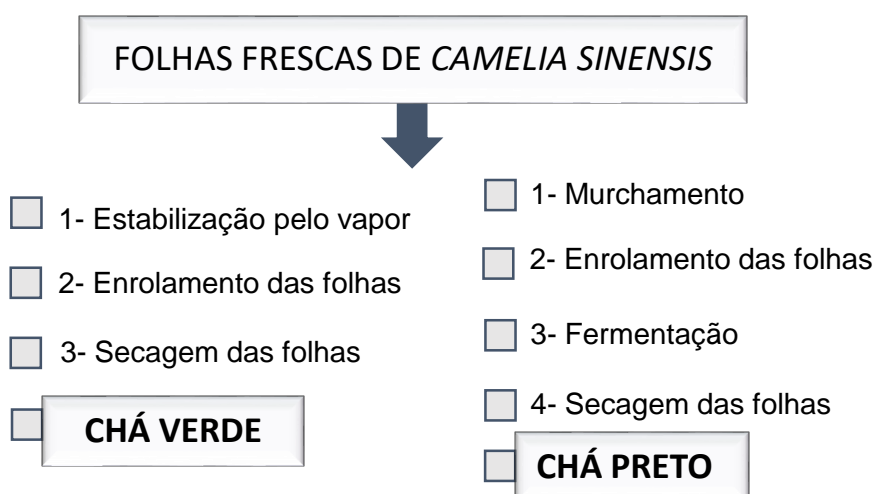
**Figura 2.** Classificação dos chás obtidos da *Camellia sinensis*.



**Fonte:** Autor, 2022.

A figura 3 evidencia as etapas de processamento para elaboração dos dois principais tipos de chás originados da *Camellia sinensis*, o chá verde e o chá preto.

**Figura 3.** Etapas do processamento do chá verde e chá preto.



**Fonte:** Adaptado de Hilal e Engelhardt (2007).

A diferença entre os chás originados da *C. sinensis* está no modo de preparação de suas folhas. O chá verde passa por um processo com emprego de vaporização e secagem, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas que os demais, prevenindo a fermentação e, conseqüentemente, mantendo originalmente a cor clara (HILAL E ENGELHARDT, 2007).

Na elaboração do chá preto as folhas são secas, diminuindo o teor de umidade. Logo após são trituradas, dando início à oxidação e dimerização das catequinas no processo de fermentação,

etapa importante para o desenvolvimento da cor e sabor característicos do chá preto (GRAHAM, 1992; CRESPIY; WILLIAMSON, 2004; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006a).

O chá *oolong* é intermediário entre o chá verde e o chá preto, pois passa por um processo de fermentação mais brando, sendo considerado parcialmente oxidado. Este processo dá origem ao sabor e aroma menos acentuado quando comparado ao do chá preto. Dos chás originados da *C. sinensis* o chá verde é classificado como o mais rico em compostos com atividades funcional (CHENG, 2006).

Dentre os chás obtidos da *C. sinensis*, o chá verde possui a maior quantidade de compostos funcionais, devido ao seu processo de obtenção, onde as folhas da planta são cozidas a vapor imediatamente após a colheita, evitando a fermentação que elimina a maior parte de suas propriedades terapêuticas (MIYAZAKI, 2008).

### 3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CHÁ VERDE

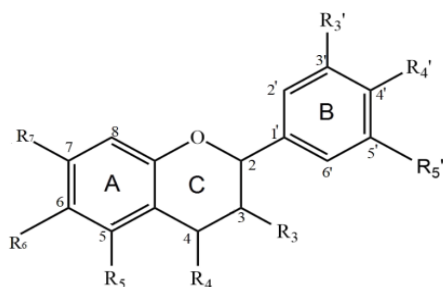
De acordo com Camargo (2011), a composição do chá verde é bem diversificada e a composição das folhas é influenciada por diversos fatores como clima, estação, processo utilizado, idade da planta dentre outros. Sendo que os principais benefícios estão relacionados ao teor de compostos fenólicos.

Os polifenóis são componentes biologicamente ativos, apresentando assim, propriedades funcionais relacionadas à qualidade sensorial de alimentos de origem vegetal, como coloração, amargor e adstringência (DUBOC, 2015).

Os compostos fenólicos são encontrados no reino vegetal com mais de 8 mil estruturas identificadas, apresentando pelo menos um grupo fenol (uma hidroxila ligada ao anel aromático). Por serem constituídos de estruturas heterogêneas com moléculas simples até moléculas mais compostas altamente polimerizadas podem ser classificadas de diferentes maneiras (GIADA, 2013).

Dentre os compostos fenólicos temos os flavonoides, com estrutura geral de três anéis (A, B, C), caracterizados de acordo com padrão de numeração definido pelo IUPAC, evidenciado na figura 4.

**Figura 4.** Estrutura geral dos flavonoides.



**Fonte:** URZEDO, 2020.

Os flavonoides são responsáveis pela pigmentação das flores, frutos, folhas, sementes, além de atuarem nos organismos vegetais desempenhando funções importantes na fertilidade de algumas espécies. Agem como agentes antimicrobianos e também protegem as plantas contra a radiação ultravioleta, protegendo os tecidos contra danos fotossintéticos (HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; SIMÕES et al., 2017).

As folhas da *C. sinensis* se destacam no teor de teobrominas e teaflavinas além de hídricos, protéicos, glicídicos, cafeínas, sais minerais, vitaminas, e derivados polifenólicos. Ainda apresentam elevada quantidade de flavonoides como as catequinas por exemplo (Urzedo, 2020). O quadro 1, evidencia a composição química do chá verde e do chá preto.

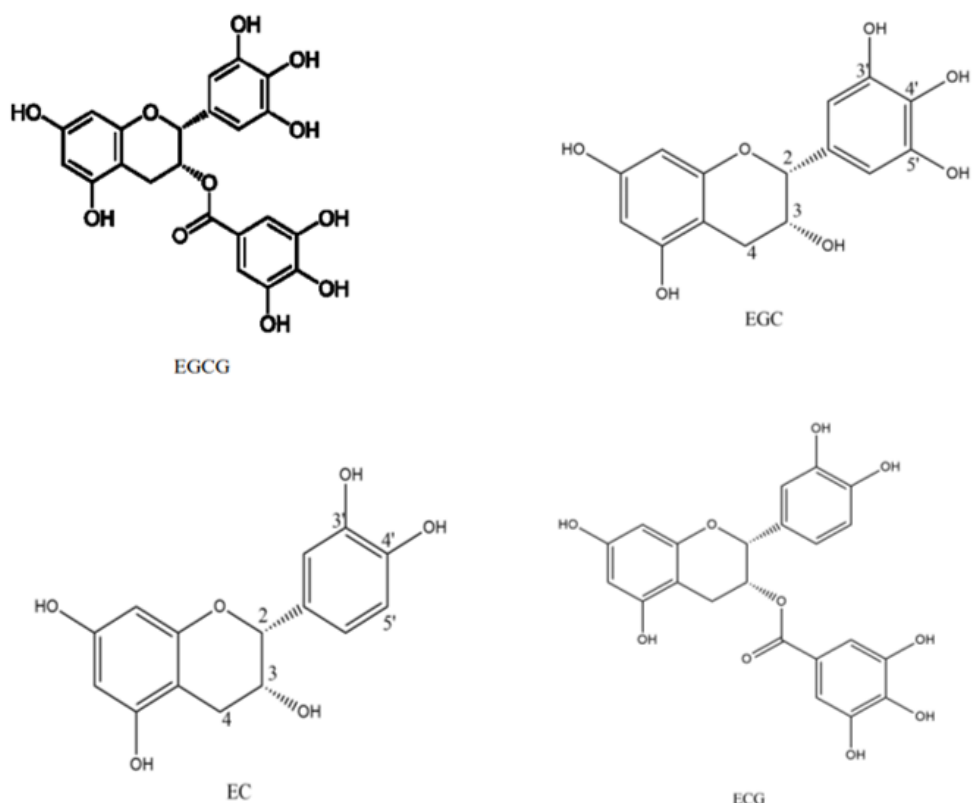
**Quadro 1.** Composição química do chá verde e do chá preto

<b>Componentes (%)</b>	<b>Chá verde</b>	<b>Chá preto</b>
Proteínas	15	15
Aminoácidos	4	4
Fibras	26	26
Outros carboidratos	7	7
Lipídeos	7	7
Pigmentos	2	2
Minerais	4	4
<b>Compostos fenólicos</b>	<b>30</b>	<b>5</b>
<b>Compostos fenólicos oxidados</b>	<b>0</b>	<b>25</b>

**Fonte:** Adaptado de DUBOC (2015).

No extrato bruto do chá verde encontram-se 30% de catequinas, as principais são: a epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e a Epigalocatequina (EGCG), sendo esta última encontrada em maiores quantidades (OLIVEIRA, 2012) e absorvida mais rapidamente no organismo (SCHMITZ et al., 2005).

**Figura 5.** Estrutura das principais catequinas do chá verde.



**Fonte:** UZEDO (2020).

Dentre as principais catequinas encontradas no chá verde, a EGCG é absorvida no organismo mais rapidamente (SCHMITZ et al., 2005). As catequinas são eficazes na prevenção e tratamento de doenças associadas à obesidade, cardiovasculares e diabetes. Além disso, atuam na diminuição do triacilglicerol, colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidada e absorção da glicose. Outra característica das catequinas é a atividade quimioprotetora, que impede o crescimento de células cancerígenas no organismo (SILVA, NAVARRO, 2007; SAIGG, SILVA, 2009).

### 3.4 KOMBUCHA: A ORIGEM

A origem da kombucha é incerta, os maiores indicativos são que a bebida surgiu por volta de 220 a.C. no nordeste da China, conhecida como o chá da imortalidade. Em 414 d.C ocorreu a disseminação para o Japão como medicamento, e posteriormente, através de rotas comerciais, para a Rússia e para a Europa Oriental. O nome kombucha é originado de uma crença oriental, pois acreditavam que a colônia simbiótica de microrganismos (SCOBLY) era uma alga marinha

denominada “kombu” e o sufixo “chá” foi usado devido aos chás oriundos da *Camellia sinensis* na Índia (GREENWALT et al., 2000; JAYABALAN et al., 2014). A kombucha pode ser preparada com outros tipos de chás, exceto aqueles que tenham atividade antibacteriana e antimicrobiana (FILIPPIS et al., 2018).

Nessa bebida, o chá é fermentado por uma colônia constituída de bactérias acéticas, bactérias lácticas e leveduras em simbiose que impedem o crescimento de outros microrganismos (VITAS et al., 2013). A cultura *starter* se apresenta na forma de um biofilme flutuante ou camada celulósica que se apresenta na interface líquido-ar, muitas vezes chamado de alga, cogumelo, mãe da Kombucha ou scoby (JAYABALAN et al., 2014).

Os autores Chen e Liu (2000) caracterizam a kombucha como uma bebida adoçada e adicionada de uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras denominada scoby (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). O resultado da kombucha é uma bebida gaseificada naturalmente, pouco doce e ligeiramente ácida. O processo fermentativo da kombucha é realizado através da adição de scoby. As bactérias são aeróbicas e ficam na superfície do líquido, utilizam o açúcar como substrato para se desenvolver ocasionando a formação de um novo biofilme. Esse biofilme pode gerar um novo biofilme (nova colônia), ou ainda agregar-se a uma colônia já existente.

### 3.5 FERMENTAÇÃO E PROCESSOS METABÓLICOS DA KOMBUCHA

De acordo com BOURDICHON et al., (2012), a palavra fermentação tem origem do latim que deriva da palavra *fervere* (fervura), definida por *Louis Pasteur* como “*La vie sans l'air*” (vida sem ar). Do ponto de vista bioquímico a fermentação caracteriza um processo metabólico de derivação de energia proveniente de compostos orgânicos sem adição de agentes oxidantes.

De acordo com Marsh et al., (2014), a fermentação é influenciada por fatores intrínsecos como pH, natureza e composição do meio juntamente com fatores extrínsecos como temperatura, sistema operacional, taxa de cisalhamento no fermentador, oxigênio e gás carbônico dissolvido. Alteração nesses fatores modificam as características sensoriais e nutricionais da kombucha.

Três processos fermentativos caracterizam a fermentação da kombucha dentre eles a Fermentação alcoólica, láctica e acética (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO et al., 2018; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; KUMAR; JOSHI, 2016; MARTÍNEZ LEAL et al., 2018b). Segundo CHU E CHEN (2006), evidenciam que as atividades antioxidantes aumentaram quando o tempo de fermentação é maior. Por outro lado, quantidades de ácido glicurônico e de Vitamina C foram encontradas em maiores quantidades quando o tempo de fermentação e a temperatura eram mais longos e elevadas (LONĂR et al., 2006). Porém, a *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda a fermentação de 10 dias evitando que uma fermentação longa possa trazer consequências negativas como acidificação excessiva, ocasionando redução das propriedades



benéficas devido ao acúmulo de ácidos orgânicos (CHU; CHEN, 2006; WATAWANA et al., 2015).

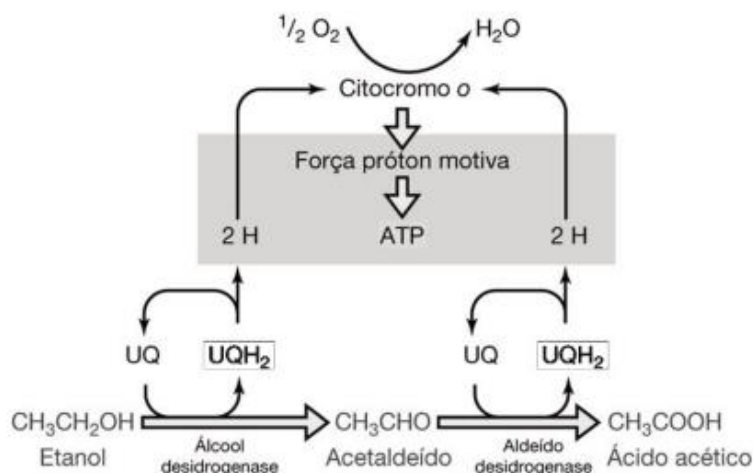
As mudanças no processo de fermentação podem alterar significativamente as propriedades da bebida, como características organolépticas, valor nutricional e propriedades físico-químicas. Por esses motivos é de suma importância que as condições de fermentação devem ser controladas e padronizadas para que todas as propriedades mantenham-se no produto final. Dentre as mudanças que podem ocorrer pode-se citar as alterações de temperatura, oscilações no pH, oxigênio, CO<sub>2</sub> dissolvido, natureza Scoby e tempo de fermentação (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO et al., 2018; MOJTABA MOUSAVI et al., 2020b; SILVA et al., 2021b). CHAKRAVORTY e colaboradores (2016), evidenciam que as propriedades da bebida mudam com o decorrer da fermentação destacando que a capacidade de eliminação de radicais livres aumenta significativamente no 7º dia de fermentação.

Diversas reações bioquímicas ocorrem durante a fermentação da kombucha. As leveduras presentes no scoby atuam na hidrólise da sacarose através da ação de enzimas invertases, resultando em moléculas de glicose e frutose. As bactérias acéticas convertem a glicose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético. Que são convertidos em etanol e dióxido de carbono através de fermentação alcoólica por ação das leveduras. O etanol e o dióxido de carbono resultantes do processo de fermentação, apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, evidenciando assim um ambiente com capacidade de inibir o desenvolvimento de microorganismos prejudiciais. Dentre a formação dos principais ácidos orgânicos na kombucha o ácido glucônico, ácido acético, ácido glucurônico são os mais importantes, resultado da atividade das bactérias acéticas sendo a *Acetobacter xylinum* a principal produtora desses ácidos. Além disso, as bactérias lácticas podem estar metabolicamente ativas e produzir ácidos orgânicos, como o ácido lático (REISS, 1994; TEOH et al., 2004; JAYABALAN et al., 2014).

A fermentação acética consiste na oxidação parcial aeróbica do álcool etílico, resultando na produção de ácido acético e dióxido de carbono e resultando conseqüentemente na liberação de energia conforme equação e figura 6 abaixo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004):



**Figura 6.** Oxidação do etanol e ácido acético



**Fonte:** MADIGAN; MARTINKO; PARKER (2004):

Este processo é realizado por Acetobactérias, que apresentam forma de bastonetes elipsoidais, onde a faixa ideal de pH varia entre 3,0 e 4,0, também conhecidas como bactérias ácido láticas (BAL). As BAL são divididas em homofermentativas que fazem fermentação láctica e tem como produto o ácido láctico e as heterofermentativas que também fazem fermentação láctica mas produzem além do ácido láctico, o dióxido de carbono, o ácido acético e etanol.

A fermentação láctica é o processo de oxidação anaeróbica parcial de carboidratos resultando em ácido láctico e outras substâncias orgânicas. O grupo das BAL possuem (12) gêneros, são bactérias Gram positivas, sendo as mais utilizadas *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera* e o tempo de fermentação é de aproximadamente 5 a 10 dias para processos não controlados (referencia).

### 3.6 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DA KOMBUCHA E POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS

Medeiros & Cechinel-Zanchett (2019) relatam o aumento mundial no consumo de produtos que contenham micro-organismos vivos, como leveduras e bactérias, e como exemplo cita a kombucha. Segundo Hills *et al.* (2014) e Marsh *et al.*, (2014), os alimentos considerados probióticos apresentam micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, trazem benefícios a saúde. Raizel *et al.*, (2011) evidenciam que alimentos prebióticos são substratos utilizados de forma seletiva pelos micro-organismos do hospedeiro, também causando benefícios a saúde de quem os consome. Já o simbiótico é aquele que apresenta os dois de forma combinada.

Os autores Jayabalan et al., (2014) e Nguyen et al., (2015), evidenciam que em preparações a base de chá verde, o ácido láctico se apresenta em maiores quantidades. Ainda evidenciam a importância do ácido glicorônico, sendo um dos mais importantes para a saúde (resultado da oxidação da glicose). Este ácido é produzido pelo fígado no corpo humano, e apresenta efeitos desintoxicantes, pois tem a capacidade de se ligar a xenobióticos, e fenóis facilitando que essas substâncias sejam excretadas pelos rins de forma mais eficaz, além de ser precursor na biossíntese de vitamina C.

Os compostos fenólicos são substâncias bioativas essenciais à vida, pois fornecem benefícios à saúde fornecendo defesas antioxidantes, inflamatórias e mutagênicas. Podem ser encontrados em fontes de produtos de origem animal (ácido graxo, como ômega 3), origem vegetal (carotenoides, compostos fenólicos, fitosteróis) ou ainda a partir do metabolismo de micro-organismos (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). Os micro-organismos presentes também mantem um equilíbrio na microbiota intestinal ajudando a melhorar a digestão.

A kombucha é uma bebida fermentada consumida pelos asiáticos há mais de dois milênios conhecida como agente terapêutico para hiperglicemia e dislipidemia (ZUBAIDAH, 2019). Estudos relatam que a kombucha pode ajudar a reduzir o risco de doenças crônicas, possuindo várias propriedades benéficas para a saúde humana, como antimicrobianas, antioxidantes, anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipêmicos (CHAKRAVORTY et al., 2016; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; MO; ZHU; CHEN, 2008; YANG et al., 2009). Também vem se destacando em virtude dos seus benefícios, ajudando no estímulo dos sistemas glandulares, na proteção contra o diabetes facilitando a excreção de toxinas e auxiliando na prevenção de infecções (JAYABALAN et al., 2014). Estudos indicam que a kombucha pode agir também como bebida probiótica/simbiótica, equilibrando a microbiota intestinal, auxiliando no bom funcionamento do intestino (WATAWANA et al., 2015).

Essa bebida possui propriedades contra bactérias patogênicas no organismo, em função da presença de ácidos orgânicos, como o ácido acético, ácido glucônico, ácido glicurônico, bacteriocinas, proteínas, enzimas e polifenóis do chá, que são produzidos durante o processo de fermentação (BHATTACHARYA et al., 2016). No entanto, ainda são necessários mais estudos, pois ainda não existem comprovações científicas de seus reais benefícios, mas é possível evidenciar que a bebida apresenta grande potencial biotecnológico.

Sendo que o ácido glucônico, pode inibir infecções causadas por leveduras e fungos, como *Candida albicans* em humanos (JAYABALAN et al., 2014). Outro composto que tem uma função desintoxicante, uma vez que se liga aos compostos tóxicos presentes no fígado e permite que as substâncias sejam excretadas pelo rim, é o ácido glicurônico, que também é um precursor de vitamina C (NGUYEN et al., 2015).

Para JAYABALAN et al., (2014), é importante ressaltar que apesar de muitos estudos representarem resultados positivos referentes aos seus benefícios, não há nenhuma evidência suficiente para comprovar a aplicação da kombucha em patologias humanas.

Em relação a possíveis efeitos colaterais os autores Greenwalt, Steinkraus e Ledford (2000), evidenciam poder haver efeitos prejudiciais nos indivíduos suscetíveis e ou imunossuprimidos. Existem possibilidades da kombucha causar efeitos tóxicos quando consumidas em grandes quantidades. Dois casos foram relatados nos Estados Unidos em 1995, sendo um deles fatal devido a perfurações no trato intestinal e acidose metabólica grave. Esse fato ocorreu devido ao aumento excessivo do consumo da kombucha em três vezes de 12 oz (1.152 mL) por dia. Em outro incidente, a vítima sobreviveu e relatou que aumentou o tempo de 7 para 14 dias. Mas, foram constatadas que as vítimas apresentavam condições preexistentes que os tornaram suscetíveis à acidose. Contudo, concluiu-se que a kombucha não é prejudicial em cerca de 4 oz (128 mL) por dia após a primeira fermentação. Devido essas informações fica evidente os riscos potenciais associados ao consumo excessivo ou consumo por indivíduos com doenças preexistentes. Desta forma, é recomendado que indivíduos portadores de comprometimento imunológico como aqueles em uso de imunossupressores e/ou transplantados por exemplo, não façam o consumo da bebida. Sendo de suma importância respeitar os aspectos de segurança no preparo e uso da bebida, tornando a kombucha um valioso ingrediente a ser incorporado no desenvolvimento de alimentos e bebidas com apelo funcional (NUMMER, 2013).

### 3.7 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA KOMBUCHA

De acordo com Jayabalan et al., (2014), a composição microbiana da kombucha depende de uma série de fatores, dentre eles a origem e da disponibilidade de bactérias do meio.

As espécies procarióticas mais abundantes no consórcio da kombucha são as produtoras de ácido acético e ácido glucônico. Sendo o gênero da bactéria *Acetobacter xylinum* a mais abundante, responsável por produzir ácido acético, ácido glucônico e também a celulose a partir do carbono do etanol e da glicose (ADAMNSA, 1985.).

Estudos evidenciam uma gama de micro-organismos isolados em kombuchas dentre elas as leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Koleckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospira* e *Zygosaccharomyces* são as mais encontradas. (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

As bactérias aeróbicas e aquelas encarregadas da formação do filme de celulose permanecem na parte superior do scoby à medida em que as leveduras permanecem na parte inferior do biofilme. Sendo que o scoby formado diminui a quantidade de oxigênio para que as leveduras iniciem a fermentação anaeróbia que resulta na formação do etanol e compostos

aromáticos característicos da kombucha (ALEJANDRA VILLARREAL-SOTO et al., 2018; COELHO et al., 2020).

### 3.8 COMPOSIÇÃO E METABÓLITOS ENCONTRADOS NA KOMBUCHA

A composição da kombucha e a concentração de cada metabólito são variadas, podendo distinguir-se quantitativa e qualitativamente de acordo com sua origem, substrato e condições em que a bebida é exposta (JAYABALAN et al., 2014). Dentre os principais metabólitos encontrados na kombucha estão o ácido acético, láctico, glucônico, glicurônico, málico, cítrico, tartárico, fólico, malônico, oxálico, etanol, glicerol, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis e aminoácidos como lisina e teanina (BLANC, 1996; COELHO et al., 2020; JAYABALAN et al., 2014; KUMAR; JOSHI, 2016). Podendo ser encontrados também diferentes elementos metálicos como Ferro, Manganês, Níquel, Cobre e Zinco BAUER-PETROVSKA; PETRUSHEVSKA-TOZI, 2000). Sendo o composto químico responsável pelo aroma e sabor ácido de vinagre da kombucha o ácido acético (MARTÍNEZ LEAL et al., 2018c).

### 3.9 EMBASAMENTO LEGAL E PARAMETROS FÍSICO QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA

De acordo com a Instrução Normativa Nº 16 de 23 de agosto de 2005, estabelece parâmetros de identidade e qualidade de bebidas lácteas, e define:

“Bebida Láctea Fermentada: é o produto descrito no item 2.1.1 fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10<sup>6</sup> UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade.”

De acordo com a IN Nº 22/2003, apenas fica estabelecido como parâmetro físico químico o teor de proteínas para bebida láctea fermentada, descrito no quadro 2 abaixo:

**Quadro 2.** Parâmetros físico químicos para Bebida Láctea Fermentada.

<b>Definição</b>	<b>Teor de proteínas de origem láctea g/100g</b>
Bebida láctea fermentada sem adições ou Bebida láctea fermentada sem produto(s) ou substância(s) alimentícia(s)	1,7

Fonte: Adaptado de IN N° 22/2003.

A Instrução Normativa N° 30 de 13 de setembro de 2018, estabelece métodos de análises para os parâmetros microbiológicos nos diferentes tipos de bebidas lácteas de acordo com a classificação do processamento térmico aplicado, sendo que para bebida láctea fermentada não poderá haver emprego de processamento térmico após a fermentação, sendo destacados os parâmetros microbiológicos no quadro 3 a seguir:

**Quadro 2.** Parâmetros microbiológicos para Bebida Láctea Fermentada

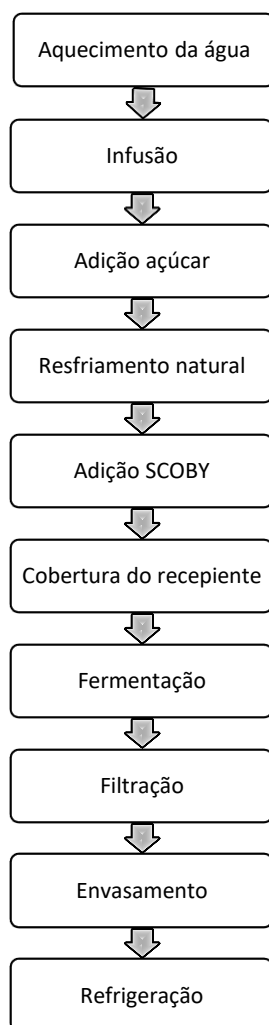
<b>Micro-organismos</b>	<b>Critério de Aceitação</b>
Coliformes/mL ou /g (30/35°C)	n=5 c=2 m=10 M=100
Coliformes/mL ou /g (45°C)	n=5 c=2 m<3 M=10

Fonte: Adaptado de IN N° 16/2005.

### 3.10 PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA TRADICIONAL

A seguir serão descritas as etapas para elaboração de uma kombucha tradicional (1ª fermentação) conforme figura 6.

**Figura 7.** Fluxograma processo de elaboração da Kombucha tradicional de 1ª fermentação.



**Fonte:** Autor, 2023.

Para elaboração da kombucha é necessário o preparo de um chá/infusão derivado da *Camellia sinensis*, onde geralmente é utilizado o chá preto e/ou chá verde adicionados de açúcar, que servirá de substrato para o processo fermentativo. As proporções de chá e açúcar variam de acordo com a literatura. O teor recomendado de açúcar varia de 5 a 20% do volume, enquanto o teor de erva/chá varia conforme a intensidade do sabor que se deseja obter. Pure e Pure (2016) utilizaram 20 g/L de sacarose e 10 g/L de ervas secas na infusão, enquanto Kallel et al., (2012) utilizaram 100 g de açúcar e 12 g/L de chá seco na preparação de seu substrato. O tempo de

infusão do chá varia de acordo com cada tipo de chá e do produtor, podendo variar de 2 a 10 minutos (PALUDO, 2017).

Após a preparação da nova infusão adicionada do substrato, é necessário que a infusão esfrie em temperatura ambiente para ser adicionado o Scoby juntamente com o “líquido” previamente fermentado da kombucha anteriormente (volume de 10 a 20%), no qual servirá para ativar a fermentação da nova infusão. O recipiente em que será preparada a kombucha deve ser de bocal largo para que haja troca de ar com o ambiente, pois é na superfície que se formarão novas películas de Scoby (acima da antiga), e a cobertura deve permitir a passagem de ar além de ser importante para evitar contaminações de esporos ou insetos (PALUDO, 2017).

Segundo Jayabalan et al., (2014), o sabor vai sendo alterado ao decorrer da fermentação e vai mudando de moderadamente doce e frutado para “avinagrado”, devido à formação de ácidos orgânicos. O tempo de incubação e a temperatura estão diretamente relacionados com o sabor final que se deseja alcançar.

Lončar et al., (2006) analisaram a cinética da sacarose e verificaram que a faixa ideal de temperatura para a fermentação é de 22 a 30 °C e o tempo mais adequado de fermentação como sendo de 3,5 a 5 dias. Após esta 1ª etapa de fermentação a kombucha está pronta e pode ser filtrada, envasada e refrigerada sem mais processos. Ainda é possível realizar a 2ª fermentação, processo onde podem ser adicionadas frutas, especiarias, ervas ou sucos que irão saborizar a bebida. Esse processo de 2ª fermentação (opcional) pode variar de 2 a 3 dias, em recipiente fechado para que ocorra o aumento da carbonatação, em temperatura ambiente. Destacando que a quantidade de açúcar adicionado nesta segunda fermentação influenciará diretamente no teor de carbonatação. Após a segunda etapa de fermentação (opcional) é recomendado que a kombucha seja mantida sob refrigeração, melhorando seu aspecto sensorial auxiliando na redução da velocidade da fermentação e conseqüentemente da formação de gases e outros compostos.

### 3.11 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO E MANIPULAÇÃO DA KOMBUCHA

De acordo com Martínez Leal et al., (2018), na elaboração da Kombucha são necessários alguns cuidados básicos de higiene, inclusive o uso de material não poroso e com risco de contaminar com metais pesados sendo indicado o uso de vidrarias e material em inox. As boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos são um conjunto de práticas a serem adotadas na elaboração dos alimentos para garantir a inocuidade dos mesmos. Hábitos higiênicos dos manipuladores, limpeza, organização do local, composição dos materiais e utensílios a serem utilizados fazem parte do contexto, garantindo um alimento seguro.

Ainda, Watawana et al., (2015) ressaltam que também existem alternativas de segurança como métodos térmicos de pasteurização, refrigeração, aditivos químicos (conservantes) utilizados pela indústria para controlar e/ou inibir o crescimento de micro-organismos



remanescentes na matriz da kombucha fermentada. Estas técnicas podem ser utilizadas para evitar que leveduras e bactérias remanescentes da superprodução de quaisquer componentes como ácidos, álcool, dióxido de carbono possam permanecer após o processo de envase da kombucha.

Nummer (2013), evidencia que a maioria dos micro-organismos deteriorantes não conseguem crescer em pH abaixo de 4,0. Enquanto os fungos micotoxigênicos podem crescer nestas condições de pH e fermentação, produzindo metabólitos secundários com efeitos tóxicos e carcinogênicos. Porém, é importante ressaltar que esta bebida é considerada segura em relação à maioria dos micro-organismos patogênicos quando preparada em condições sanitárias de higiene e temperatura controlada de fermentação.

Sadjadi et al., (1998), relatam a presença de *Bacillus anthrax*, *Penicillium* e *Aspergillus* em kombuchas fermentadas, fato que pode ser explicado devido as más condições de higiene. Segundo o Protocolo da FDA (NUMMER, 2013), algumas medidas preventivas devem ser tomadas para preparar a kombucha garantindo uma bebida segura, como:

- a) Utilizar água com temperaturas superiores a 75 °C, para que se tenha a eliminação de patógenos;
- b) Utilizar utensílios sempre limpos e higienizados, e de preferência o vidro que é mais fácil de ser esterilizado;
- c) Utilizar a cultura de kombucha adquirida comercialmente no primeiro uso e só reutilizá-la na ausência de sinais de mofo ou contaminações incomuns;
- d) Quando o pH estiver abaixo de 2,5 não consumir a bebida. Pode-se corrigi-la adicionando um chá fresco para que o pH aumente até no máximo 4,2;
- e) Não reutilizar kombucha que apresente mofo como novo inóculo. Descartá-la imediatamente;
- f) Não consumir mais do que 128 mL ao dia;
- g) Pessoas com comprometimento imunológico não devem fazer o uso; e
- h) Quando a mesma for industrializada, não deve conter informações alegando o efeito benéfico à saúde

Ainda, Roussin testou cerca de 900 amostras de kombucha e relata não ter encontrado a presença do patógeno humano *Candida albicans*. Porém foi encontrado bolores indesejáveis como *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* e *Mucor* que estavam visivelmente presentes em algumas das amostras estudadas. Ressalta ainda que o uso de equipamentos e utensílios higienizados e estéreis, junto com práticas de higiene e resfriando do chá imediatamente caracteriza uma etapa benéfica diminuindo relativamente rápido o pH pela adição da cultura *starter* pode reduzir o risco de contaminação no meio.

### 3.12 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS

De acordo com Giordani Junior et al., (2014), devido ao crescimento da população e da preocupação com o meio ambiente, indústrias e comércios vêm desenvolvendo ações para minimizar os impactos gerados, através do reaproveitamento e transformação desses resíduos em novos produtos e/ou ingredientes.

Dados da Embrapa (2020) evidenciam que a agroindústria é responsável por cerca de 5,9% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, transformando produtos através do beneficiamento e do processamento de matérias primas provenientes da agropecuária. A partir de pesquisas é possível melhorar a qualidade dos produtos, e analisar formas de reaproveitamento e biotransformação.

Os resíduos industriais alimentícios podem ser gasosos, líquidos ou sólidos. Além de gerar perdas econômicas, podem causar poluição de corpos hídricos e acúmulo inadequado, resultando em ambientes que servem de criadouros para pragas e vetores (MATOS 2005).

Dados da Embrapa (2019), colocam o Brasil como sendo o terceiro País com maior produtividade de leite no mundo. Para Cruz et al., (2015) evidencia que o leite é constituído por várias substâncias e componentes dentre eles: água, lipídeos, carboidratos, proteínas e nutrientes sendo considerado alimento básico na alimentação humana. Podendo ser utilizado na produção de vários derivados como queijos, soro em pó, bebida láctea, ricota, leite em pó, manteiga, creme de leite, requeijão, iogurte, doce de leite dentre outros produtos.

Almeida et al., (2014) evidencia o crescimento de ingredientes lácteos sendo que a principal utilização está voltada para alimentos com apelo funcional.

Dados do MAPA (2017), demonstram que o Brasil tem importado um número significativo de soro em pó, por não encontrar disponível no mercado interno, além de leite em pó integral; Leite em pó desnatado, iogurtes, manteiga e queijo. Evidenciando que o soro de leite produzido como resíduo da produção de queijos não tem sido processado em volumes suficientes para atender a demanda de mercado.

O soro oriundo do processamento do queijo utilizado na preparação de subprodutos muitas vezes não acaba sendo reutilizado em sua totalidade, gerando desperdícios nutricionais, econômicos e impactos ambientais. Caracterizando um cenário preocupante na aplicabilidade do soro de queijo na geração subprodutos do processamento de derivados lácteos em novos alimentos.

### 3.13 SORO DE LEITE

O Decreto nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996, trata sobre o regulamento técnico de produtos de origem animal, em seu Art. 694 classifica: “Soro de leite” sendo:

“O líquido residual obtido a partir da coagulação do leite, destinado a fabricação de queijos e caseína (BRASIL, 1996)”.

O soro de leite possui propriedades nutricionais nobres remanescentes do processo de elaboração de queijos. Sendo a lactose o nutriente mais abundante, seguido de proteínas solúveis, lipídios e sais minerais, podendo também apresentar outros nutrientes de acordo com o método de fabricação do queijo. Apresenta-se com variáveis instáveis de acordo com o procedimento empregado na precipitação da caseína, podendo ser caracterizado como: soro doce e soro ácido.

**Quadro 3.** Composição dos diferentes tipos de soro de leite

Componentes	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
<b>Água</b>	93 -94	94 – 95
<b>Gordura</b>	0,3 – 0,5	0,3 – 0,6
<b>Proteína</b>	0,8 -2,0	0,8 – 1,0
<b>Lactose</b>	4,5 – 5,0	3,8 – 4,2
<b>Minerais</b>	0,5 – 0,7	0,7 – 0,8
<b>Ácido láctico</b>	0,1	0,1 – 0,8

**Fonte:** Madrid et al., 1995.

Devido a rica composição nutricional do soro de leite, vem sendo estudada a aplicação do mesmo na área de ciência e tecnologia de alimentos sendo transformado em subprodutos, como na obtenção de enzimas como lactose, ácidos orgânicos, e geração de biogás dentre outros produtos (RECH E AYUB, 2006; ANTONOPOULOU et al., 2008; PANESAR et al., 2007).

Bebidas fermentadas através de consórcios de kombuchas vêm sendo estudadas, dentre elas, Malbasa et al., 2017, realizaram pesquisas sobre as características físico químicas e texturais de leite fermentado a partir de inóculos de kombucha, onde investigaram a viabilidade do experimento utilizando leite com 1,6 % de gordura e 10% (v /v) de inóculos de kombucha nos extratos de hortelã, pimenta e urtiga. A fermentação foi conduzida em temperaturas de 37, 40 e 43°C, sendo interrompida quando o valor de pH 4,5 foi atingido. Os resultados foram satisfatórios e evidenciaram características físicas e texturais típicas dos produtos probióticos do tipo iogurte e kefir.

Em outro estudo Zhiwen et al., 2021, propôs a produção e caracterização de uma nova bebida a partir de seda de milho por fermentação com consórcios de kombucha, onde a seda de milho foi fervida, resfriada e fermentada pelo consórcio de bactérias do scoby. Os testes seguiram com quantidade de inoculação de kombucha de 12, 16 e 20 %, teor inicial de açúcar de 16,18 e 20 % e temperaturas de fermentação de 26,30 e 34 °C. As condições ideais de fermentação obtidas

foram com quantidade de inoculação de kombucha de 17%, teor inicial de açúcares 18%, temperatura de fermentação ideal de 30 °C por 05 dias e teor de ácido da bebida kombucha de 4,65 g/dL. Os resultados obtidos foram satisfatórios para o experimento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente foi adquirido a cultura *starter* (scoby), em loja online da plataforma Mercado Livre cujo vendedor/produzidor é autorizado e proveniente da região de São Paulo, sendo a primeira fermentação realizada de acordo com as instruções do fornecedor.

A cultura adquirida foi replicada para formar novas culturas a partir da cultura inicial e submetidas sob condições ideais e idênticas em relação ao tempo de fermentação, concentração de chá e substrato a fim de gerar outras culturas com o mesmo perfil microbiológico. Após a fermentação foram geradas novas colônias e as mesmas foram utilizadas para os primeiros testes com soro de leite oriundo da fabricação de queijo no Laticínio Dom Miro. Neste primeiro teste preliminar, os scoby's foram apenas cortados/pesados e adicionados no soro resfriado.

Posteriormente, nos testes oficiais em função da grande demanda de scoby para realização dos testes com soro de leite em pó e de leite UHT, foram necessários obter novas colônias via doação de terceiros, em função do tempo em que levariam para ser cultivadas pela autora. Onde foram utilizados scobys de duas fontes diferentes: criação própria + doação. Importante ressaltar que os scoby obtidos através de doação encontravam-se bem formados, caracterizando colônias de celulose espessas e de coloração escura, onde neste experimento foram trituradas e homogeneizadas com as colônias cultivadas pela autora em liquidificador industrial no laboratório da UERGS, para garantir a padronização das colônias em todos os experimentos.

### 4.1 SUBSTRATOS UTILIZADOS

A sacarose (Açúcar União) foi adquirida em mercado local. O soro de leite líquido oriundo do processo fabril de queijos foi doação do Laticínio Dom Miro, Doutor Ricardo/RS, Brasil. O soro de leite em pó foi oriundo de doação mediante professor Dr<sup>o</sup> Voltaire Sant'Anna cuja ficha técnica se encontra no anexo I. Os testes preliminares com soro de leite fresco líquido foram realizados em escala laboratorial no laboratório do Laticínio Dom Miro pela autora.

Os testes com amostras de soro de leite em pó (A) e leite UHT pasteurizado (B) evidenciados na figura 10, foram realizados no laboratório da Universidade Estadual do Rio Grande Do Sul UERGS. As análises de HPLC, glicerol, etanol e ácidos foram realizadas no laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Figura 8.** Coleta e identificação de amostras de soro de leite em pó.



**Fonte:** Autora, 2023.

As amostras foram coletadas e identificadas diariamente conforme figura 9, sendo as análises realizadas em duplicata.

**Figura 9.** Amostras de soro de leite em pó e leite UHT



Figura A) Amostras de soro de leite em pó e SCOBY; Figura B) Amostras teste de fermentação leite UHT e SCOBY.

**Fonte:** Autor, 2023.

## 4.2 DESCRIÇÃO DOS PROCESSOS

### 4.2.1 Viabilidade do experimento com soro fresco (líquido).

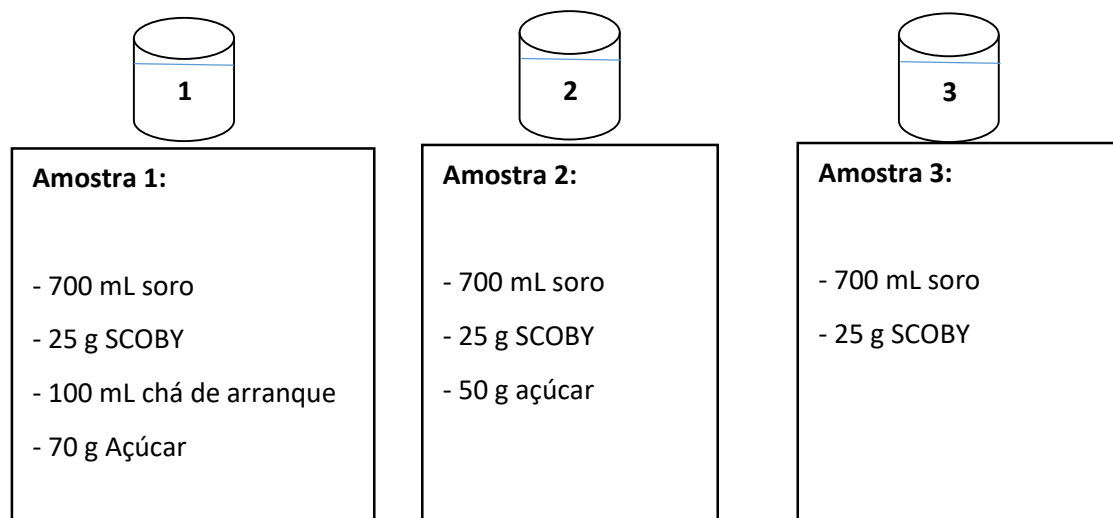
Primeiramente foram realizados testes em laboratório interno da Indústria de Laticínios Dom Miro com a utilização do soro fresco proveniente da produção de queijos com intuito de avaliar a viabilidade do experimento.

O soro fresco foi coletado em recipiente de vidro higienizado e sanitizado com álcool 70%. A coleta foi realizada diretamente nas ricoteiras do laticínio, onde atualmente o soro é utilizado para a produção de ricota fresca e ricota light.

O soro fresco foi coletado e imediatamente submetido a tratamento térmico sob banho maria por aproximadamente 15 min a temperatura de 70 a 80°C para inativação de parte da carga microbiana presente no meio. O soro foi removido do banho maria e ficou em temperatura ambiente aproximadamente 25 °C até o dia seguinte.

No dia seguinte, foram preparadas as amostras conforme descrito na figura 11 abaixo:

**Figura 10.** Ensaio e testes preliminares com soro líquido.



**Fonte:** Autor, 2023.

Os primeiros testes foram realizados no laboratório interno do Laticínio Dom Miro, Drº Ricardo/RS, pela autora. Foi realizado o acompanhamento diário observando os aspectos visuais e olfativos aromáticos característicos da fermentação, juntamente com a medição de pH e acidez ao longo de 05 dias de fermentação. Após esse processo, notou-se que haveria dificuldades de padronização no uso do soro de leite fresco, como alterações de pH e acidez portanto optou-se por utilizar o soro de leite em pó.

#### 4.2.2 Elaboração de amostras com soro em pó

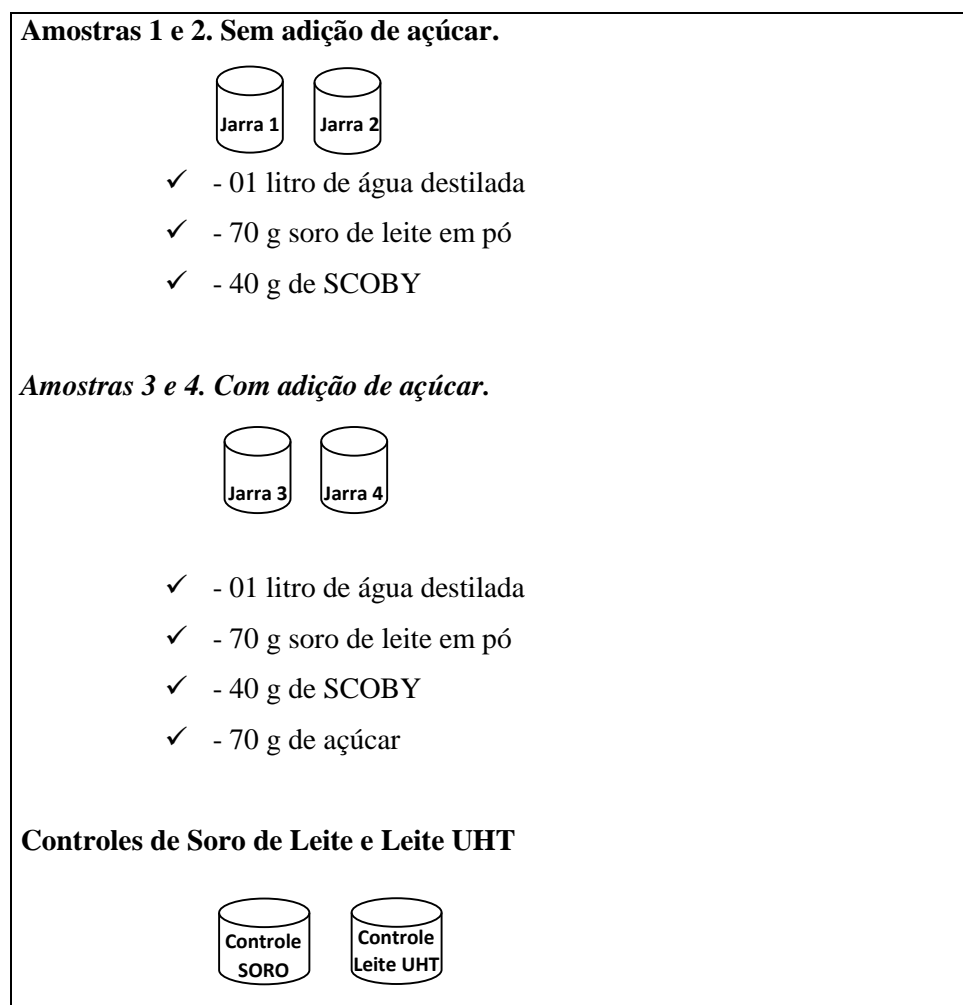
Primeiramente o soro em pó (70g/L) foi adicionado e homogeneizado com água destilada e açúcar e posteriormente foi submetido a tratamento térmico (esterelização em autoclave).

O soro de leite apresentou alterações nas suas características iniciais como aspecto turvo de coloração marrom o que evidencia a degradação dos açúcares na presença das proteínas, resultando na formação de melanoidinas, alterando significativamente as condições visuais.

Para solucionar esses fatores não desejados optou-se pela fervura de água destilada a 100°C, adição do soro em pó (70g/L), e açúcar refinado (apenas em duas amostras) e homogeneização com material esterilizado em autoclave. O resfriamento ocorreu em temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, até o dia seguinte. As amostras foram realizadas em duplicata.

A figura 11 a seguir, evidencia a composição das amostras de soro de leite em pó analisadas.

**Figura 11.** Composição das amostras de soro de leite em pó.



Fonte: Autor, 2023.



As amostras controles de Soro de Leite e Leite Pasteurizado UHT não possuem adição de ingrediente adicionais.

#### 4.3 DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Com as amostras prontas os testes iniciaram-se em fevereiro de 2023, e seguiram ao longo de uma semana (07 dias), com acompanhamento diário e coleta de amostras pela autora, finalizadas no dia 05 de março de 2023.

Diariamente coletou-se 5 mL em duplicata de cada jarra de amostra, sendo 32 amostras para análises físico-químicas e 32 amostras para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE).

Posteriormente as amostras foram identificadas e congeladas para realização das análises ao término da fermentação do experimento.

#### 4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises de acidez e pH descritas foram realizadas segundo metodologia descrita pelo IAL (2008).

##### **4.4.1 Descrição método detecção de acidez total**

A acidez total foi determinada de acordo com o método 235/IV do Instituto Adolf Lutz (2008), onde foram pipetadas 10 mL da amostra e transferidos para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, diluídas com aproximadamente 50 mL de água, por 30 minutos. Após foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M para a titulação até a coloração rósea persistente por 30 segundos.

##### **4.4.2 Descrição método detecção pH**

Foram pesados 10 g da amostra (pipetados 10 mL) em um béquer e diluídos com auxílio de 100 mL de água. Após foi realizada a agitação do conteúdo para sua completa homogeneização (IAL – 105). O pH foi determinado, com o aparelho previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

Os resultados de acidez e pH foram analisados pela autora no laboratório da UERGS-Encantado/RS e aplicados na formula abaixo:

n. f. N. 1000 / V
-------------------

Legenda:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

m = massa da amostra, em gramas.

#### 4.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Sendo transportadas em temperatura de congelamento até o (ICTA).

As concentrações de ácido acético, glicerol e etanol foram monitoradas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corp., Japão) equipado com um detector de índice refrativo RID-10 e uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, BioRad, Estados Unidos). As análises foram realizadas utilizando-se fase móvel de ácido sulfúrico 0,005 mol/L, com uma vazão de 0,6 mL/min, a 45 °C. As concentrações de sacarose, glicose e frutose foram monitoradas no mesmo equipamento descrito acima, mudando somente as condições de vazão e temperatura, para vazão de 0,6 mL/min, a 85 °C.

O volume de dosagem da amostra foi de 20 µL. As amostras primeiramente foram centrifugadas a 3000 g, durante 15 minutos, a 4 °C; e após filtradas por membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Sartorius, Alemanha). Os reagentes utilizados para desenvolver as curvas padrão no HPLC foram de pureza acima de 99,5%. As curvas foram realizadas com as seguintes concentrações em g/L: 0,2; 0,8; 1,5; 2,5; 3,5; e 5,0. As soluções dos padrões foram filtradas com membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha).

#### 4.6 ANALISES MICROBIOLÓGICAS DO SCOPY - ANÁLISE METAGENÔMICA

Foram coletadas amostras de SCOPY (biofilme celulósico) do início da fermentação dia 0 e do final da fermentação dia 7 para extração total de DNA. Cem (100) g de SCOPY foram triturados com nitrogênio líquido e adicionados 500 µL de celulase (Sigma-Aldrich) e incubados a 40 °C por 60 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão enzimática com 400 U de zimolase a 30 °C por 45 min (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). A extração de DNA foi realizada utilizando o kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi determinada utilizando Qubit® 3.0 (Invitrogen, EUA). A identificação das bactérias foi realizada por sequenciamento de alto rendimento das regiões v3/v4 do gene 16S rRNA. As bibliotecas foram preparadas de acordo com

protocolo da Neoprosecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil) e a amplificação foi realizada com primers para a região v3-v4 do gene 16S rDNA, 341f (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806r (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). As bibliotecas foram sequenciadas usando o Sistema de Sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) e as sequências foram analisadas usando o pipeline Sentinel. A identificação das leveduras foi realizada através da amplificação da região da Sequência Interna Transcrita (ITS) do gene 18S rRNA fúngico, utilizando os primers ITS1 e ITS2 com adaptadores identificados da plataforma Illumina. Os amplicons gerados a partir de reações de PCR foram purificados usando esferas Agencourt AMPure XP, seguindo as instruções do fabricante. Os índices foram adicionados às bibliotecas de DNA seguindo as instruções do fabricante (Illumina Inc., EUA). O sequenciamento foi conduzido em um sistema Illumina MiSeq com um kit v2 de 500 ciclos. As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ utilizando 88 como referência um banco de dados da empresa Neoprosecta. Para identificar espécies microbianas nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados contendo outras sequências de DNA de espécies já caracterizadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 RESULTADOS FÍSICO QUÍMICOS

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da bebida fermentada estão apresentados no quadro 5, representados pelas médias das amostras do soro e soro mais açúcar.

**Quadro 4.** Média dos parâmetros analisados ao longo da fermentação nas amostras de soro de leite em pó.

Médias Soro de Leite Fresco - Sem adição de açúcar.								
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
pH	6,06	5,75	5,01	4,73	4,61	4,55	4,53	4,50
Acidez	342,10	435,40	679,01	777,50	1026,30	1275,10	1430,60	1617,20
Ácido acético	0	0,03	0,03	0,07	0,12	0,11	0,39	0,45
Álcool	0,12	0,16	0,37	0,63	1,07	1,22	1,53	1,82
Glicerol	0,01	0,30	0,47	0,57	0,59	0,44	0,28	0,21
Médias Soro de Leite Fresco - Com adição de 70g/L de açúcar								
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
pH	6,03	5,79	5,11	4,74	4,40	4,23	3,97	3,73
Acidez	279,90	466,50	808,60	870,80	1150,70	1492,80	1617,20	3358,80
Ácido acético	0	0,04	0,03	0,04	0,11	0,22	0,39	1,71
Álcool	0,09	0,15	0,40	0,68	0,92	1,47	2,06	1,91
Glicerol	0,01	0,45	0,55	0,62	0,65	0,18	0,19	0,18
<b>Legenda:</b>								
<b>VERMELHO:</b> Não atende os parâmetros analíticos estabelecidos pela legislação IN 41/2019;								
<b>VERDE:</b> Atende os parâmetros estabelecidos pela Legislação IN 41/2019;								
<b>AMARELO:</b> NÃO POSSUI TEOR ALCOOLICO (máximo 0,5% v/v);								
<b>LARANJA:</b> POSSUI TEOR ALCOOLICO (0,6 a 8,0 % v/v) ;								

**Fonte:** Autora, 2023.

Não há legislação para comparar os resultados de pH e acidez encontrados para bebida láctea, entretanto estes são semelhantes aos encontrados na literatura, onde variam de 3,96 a 4,21 para pH (RUFINO et al., 2015; RECCHIA, 2014; COSTA et al., 2013) e 0,5 a 0,7% de acidez em ácido láctico (OLIVEIRA et al., 2006; ANDRADE, 2010; MENEZES, 2011).

### 5.1.1 pH e acidez

É possível observar que ambas as amostras apresentaram aumento de acidez constante, mas, as amostras de *soro + açúcar* apresentaram acidez mais elevada em relação a amostra de *soro sem açúcar*. O que evidencia que a fermentação ocorre mais rapidamente com a amostra *soro + açúcar*.

Em relação ao pH, foi possível observar que a partir do 5º dia de fermentação para amostras de *soro + açúcar*, os parâmetros se encontraram dentro do estabelecido pela legislação MAPA (4,23). Para acidez, as médias encontradas no experimento não se enquadram para as estabelecidas conforme evidenciado no quadro 6, caracterizando amostras extremamente ácidas, para o desenvolvimento de uma bebida fermentada com características sensoriais agradáveis.

Ivanišová et al., (2019) avaliaram a produção de kombucha com infusão de folhas de chá preto adicionando 30 g de açúcar branco, a 22°C e 7 dias. Os autores encontraram valores de acidez total da bebida de 2,5 g/L e pH de 3,2, os quais foram divergentes ao do presente estudo.

Segundo Spedding (2015), o ácido acético é o composto responsável pelo sabor/cheiro ácido em bebidas do tipo kombucha. Produzido pela conversão de sacarose em etanol e glicose e frutose. Para Jayabalan et al., (2007), o valor do ácido acético encontrado na bebida de kombucha de chá preto no 3º dia de fermentação foi de 0,22 e no 15º dia de fermentação de 9,51 g/L. Ainda segundo o autor, aumentando a concentração de açúcar para 50 g/L, os valores de pH diminuíram de 3,75 a 2,42, resultado da produção de ácidos acético e glucurônico, resultados que corroboram com o presente trabalho onde foi verificado o abaixamento do pH e aumento da produção de ácido Acético. Resultados que corroboram com o estudo de Jayabalan et al., (2014), onde evidencia que o pH da kombucha decresce ao longo do processo fermentativo devido à formação de ácidos orgânicos. Ainda destaca que a cor do líquido vai ficando mais clara, devido às alterações dos compostos fenólicos e ação de enzimas sobre os polifenóis.

Através da interpretação do gráfico 1, é possível analisar que as amostras na qual foi adicionado açúcar inicial o pH diminui mais rapidamente já no 1º dia de fermentação, quando comparada com as amostras sem adição de açúcar inicial. Isso se deve possivelmente pela ação das bactérias presentes no meio e suas interações metabólicas.

Hur et al., (2014), relata que o pH influencia diretamente na taxa de crescimento dos microrganismos durante a fermentação causando alterações estruturais que podem impactar na atividade antioxidante. Ainda evidencia que o pH da bebida não deve cair para menos de 3, valor este, encontrado no trato gastrointestinal. Conforme Loncar et al. (2006), quando o pH cai para valores inferiores a 3, torna-se inviável de ser consumido. Desta forma, é aconselhado que se interrompa o processo de fermentação quando a acidez titulável, atingir uma concentração ótima (4 a 5 g/L). Villarreal-Soto et al. (2018), relata que o tempo necessário para atingir estes

níveis ideais de Acidez podem variar de acordo com a cultura *starter* e nos parâmetros de fermentação utilizados no meio.

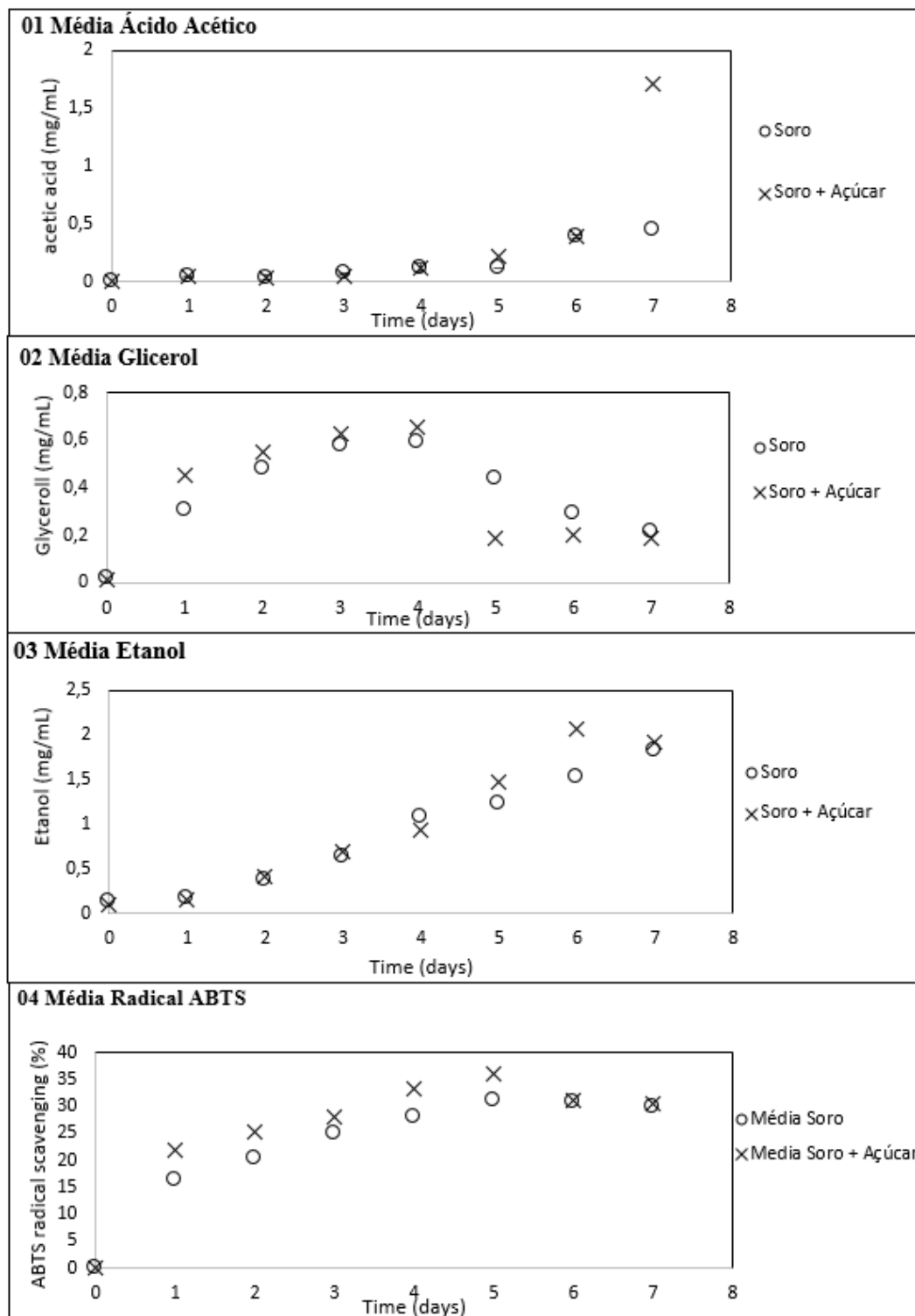
De acordo com Hur et al., (2014), para que o processo de fermentação ocorra é necessário manter a temperatura ideal constante ao longo do processo para atingir a concentração adequada de colônias de microrganismos. Para Watawana et al., (2015) a temperatura controlada é de suma relevância para o processo de fermentação, devendo estar no mínimo a 20°C, para que a fermentação inicial ocorra, sendo considerado que as temperaturas ideais de fermentação para o kombucha são de 22°C a 30°C. Vitas e colaboradores (2013), relatam que, à medida em que a temperatura aumenta são produzidos maiores teores de ácidos, metabólitos e vitamina C. Crum et al., (2016) destacaram que se a temperatura de fermentação for muito elevada, serão produzidas concentrações elevadas de etanol e ácido acético, resultando em um produto impróprio para o consumo.

Neste trabalho a acidez máxima foi atingida no 7º dia de fermentação nas amostras com adição de 70 g/L de açúcar, na temperatura de 25 °C. Isso pode significar que a produção de ácido acético foi estimulada ao longo dos dias de fermentação na amostra com adição de açúcar (Jarra 3 e 4).

### **5.1.2 Ácido acético, glicerol, etanol, radical ABTS**

A figura 12 evidencia os resultados expressos em gráficos, referente as concentrações de ácido acético, glicerol, etanol e radical ABTS, nas amostras de: soro em pó + scoby (sem adição de açúcares) e nas amostras de: soro em pó + scoby + açúcares.

**Figura 12.** Resultados microbiológicos de amostras de soro de leite em pó com adição de açúcares e sem adição de açúcares.



**Fonte:** Autor, 2023.

Através dos resultados evidenciados no gráfico 01- Média Ácido Acético, foi possível observar que o valor aumenta em relação aos dias de fermentação. Ainda foi possível observar que na amostra com adição de açúcar a quantidade de ácido acético aumentou drasticamente do

dia 06 para o dia 07, atingindo o pico máximo de 1,71 g/L de ácido acético. Sendo encontrado níveis finais de até 0,5 g/L de ácido acético nas amostras sem adição de açúcar. Sendo considerados níveis relativamente baixos em relação aos níveis de ácido acéticos encontrados na literatura.

Em estudos de Kallel et al., (2012), relataram que, dependendo do conteúdo/substrato, e da quantidade de bactérias ácido acéticas o nível de ácido acético pode variar significativamente entre as amostras. Os resultados obtidos na kombucha de chá verde, no 7º dia de fermentação foi de 3,15 g/L de ácido acético, chegando a 9,5 g/L de ácido acético em kombucha de chá verde no 15º de fermentação e de 6,2 g/L na kombucha de chá preto no final da fermentação também com 15 dias de fermentação. Já estudos de Jayabalan et al., (2008), que analisaram a quantidade de ácido acético em kombucha de chá verde, os autores encontraram valores de ácido acético sendo 1,64 g/L no 6º dia de fermentação e no 9º dia a concentração de ácido acético foi de 3 g/L.

Uma série de ácidos podem estar presentes na kombucha dentre eles o ácido oxálico, málico, fórmico, láctico, tartárico e glucurônico IVANISOVA et al., (2020).

Na rota metabólica da fermentação algumas bactérias utilizam a glicose como substrato para produzir o ácido acético, composto responsável pelo sabor e aroma avinagrado. De acordo com estudos de Bishop et al., (2022) a concentração do ácido na kombucha pode variar de acordo com as características em que a bebida é exposta, podendo atingir 11 g/L, aos 30 dias de fermentação, diminuindo para 8g /L aos 60 dias de fermentação. Ocorrendo devido aos microrganismos da kombucha que utilizam ácido acético como fonte de carbono após esgotarem todo o açúcar e etanol no período de fermentação. O etanol e o ácido acético encontrados na kombucha são de grande relevância para geração de propriedades anti-sépticas, inibindo o crescimento de patógenos no meio. Sendo possível encontrar também ácido láctico e ácido glucurônico gerado a partir da oxidação da glicose a fermentação (Bishop et al., 2022).

Kovacevic et al., (2014), discorre sobre a relevância de controlar a produção de ácidos orgânicos no processo de fermentação da kombucha indicando manter o pH em torno de 4,2, para que não ocorra superprodução de ácido acético.

De acordo com Bispo et al., (2022), as bactérias do Gênero *Acetobacteracea* podem gerar altas concentrações de ácido acético no meio. Como a presença desse gênero *Acetobacteracea* não cresceu bem na amostra de soro de leite sem adição de açúcares pode explicar os níveis baixos de ácido acético na amostra.

Durante a fermentação alcoólica, parte dos açúcares presentes são utilizados para a produção de glicerol. Nas amostras analisadas no gráfico 02- Média Glicerol é possível observar que os níveis de glicerol aumentaram até o 4º dia de fermentação. As amostras de soro + açúcar apresentaram diminuição drástica quando comparada a amostra de apenas soro de leite. É possível observar que a média de glicerol em ambas as amostras é de 0,3 g/L.



De acordo com REMIZE et al., (1999), o glicerol em vinhos contribui nas propriedades aromáticas e de viscosidade, tornando-o mais denso e encorpado. Segundo PALUDO (2017), a concentração de glicerol em kombuchas de chá verde variou de 1,85 g/L para 2,39 g/L, e de 1,81 g/L até 2,1 g/L na kombucha de erva-mate.

O glicerol é produzido quando as leveduras estão sob alta pressão osmótica e ácido acético será produzido durante a fermentação do álcool, resultando em uma queda de pH do ambiente de fermentação (Aguilar et al., 2003).

O etanol é produzido pelas bactérias e leveduras na conversão da sacarose, sendo possível observar que a concentração de etanol aumenta ao longo dos dias de fermentação conforme evidenciado no gráfico 03- Média Etanol.

Os maiores valores de etanol foram encontrados no 6º dia (2,6 % V/V) nas amostras de soro + açúcar. Sabe-se que o teor de açúcar está diretamente ligado a concentração de etanol na bebida final, quanto maior a quantidade de sacarose inicial e tempo de fermentação os níveis vão aumentando (BLANC, 1996; CHEN; LIU, 2000; LONČAR et al., 2006; NEFFE-SKOCIŃSKA et al, 2017). De acordo com os resultados obtidos é possível observar que a partir do 6º dia as quantidades disponíveis de substratos já estavam se esgotando, pois, os níveis de etanol acabaram diminuindo.

Outro estudo mostrou a concentração de etanol de 0,78 % no 7º dia com o valor máximo de 1,10 % no 10º dia de fermentação (Neffe-Skocińska et al. 2017). Maiores valores de etanol foram alcançados devido à adição de sacarose como ingrediente inicial. A quantidade de sacarose de 100 g/L foi utilizada para o preparo da bebida kombucha (Chen e Liu 2000; Neffe-Skocińska et al., 2017).

Conforme Chen e Liu (2000), o etanol é subproduto da fermentação da kombucha, sendo que a concentração de etanol seguirá aumentando à medida que a fermentação acontece. Podendo atingir níveis máximos de 5,5 g/L no dia 20º da fermentação, seguido por uma diminuição lenta. O mesmo ocorre neste estudo, o teor de etanol aumenta a medida em que a fermentação acontece, sendo que nas amostras com adição de 70 g/L de sacarose, acontece o pico máximo no 6º dia de fermentação (2,06 % v/v) apresentando conseqüentemente diminuição nos valores para esta amostra a medida em que a sacarose vai sendo consumida.

Bispo e colaadores (2022), destacam que as características químicas dos açúcares, dióxido de carbono, ácidos orgânicos desempenham papel fundamental no kombucha final destacando sabor e aroma característicos da bebida, desta forma, é de extrema importância controlar os parâmetros de fermentação para obter as características desejadas no produto final.

É provável que a temperatura tenha exercido importante influência na produção de etanol e ácidos orgânicos contribuindo para que em ambas as amostras tenham desenvolvido altos teores de acidez titulável caracterizando o desenvolvimento de concentrações elevadas de ácidos orgânicos como ácido acético. Além do teor alcoólico que em ambas as amostras de soro + açúcar

atingiram níveis de etanol característicos para bebida alcoólica já no 3<sup>o</sup> dia de fermentação, processo que aumenta em relação aos dias de fermentação. Importante ressaltar que o período escolhido para realização dos testes foi de muito calor (verão), e que o local onde foram realizados os ensaios (laboratório) possui grande circulação de pessoas havendo variações de temperatura pelo fato de haver abertura de portas caracterizando possíveis alterações na temperatura ambiente em que se encontravam as amostras estudadas.

O glicerol é produzido quando as leveduras estão sob alta pressão osmótica e ácido acético produzido durante a fermentação do álcool, resultando em uma queda de pH do ambiente de fermentação (Aguilar et al., 2003), fato este que elucida a queda do pH e aumento da acidez em nosso estudo.

Diante dos resultados obtidos neste estudo é possível identificar a relação direta entre os compostos químicos pH, acidez, ácido acético, glicerol e etanol gerados no processo da fermentação e que os as condições de temperatura, concentração de substrato e cultura adicionada exercem papel extremamente importante no resultado final da bebida fermentada.

De acordo com JAYABALAN et al., (2014), a atividade antioxidante está relacionada com o bem-estar e qualidade de vida aliado a prevenção de cânceres no estômago, aumento da imunidade, alívio de inflamações e artrite. Sendo evidenciado que a kombucha apresenta maior atividade quando comparado ao chá não fermentado. Fato que ocorre devido a quantidade de polifenóis e ácido ascórbico da bebida fermentada. Sendo que as propriedades antioxidantes da kombucha dependem de vários aspectos como tempo de fermentação, tipo de chá utilizado e dos microrganismos presentes no meio de cultura. Malbasa e colaboradores (2011), avaliaram influência combinações de bactérias acéticas e *Zygosaccharomyces sp.*, combinação de bactérias acéticas e *Saccharomyces cerevisiae*, e uma cultura de kombucha local, quanto as propriedades antioxidantes de kombucha de chá preto e verde contra radicais hidroxila e DPPH. Os autores verificaram que a kombucha de chá preto produzida com a mistura contendo *Zygosaccharomyces sp.*, e a de chá verde produzida com a cultura local demonstraram maior atividade antioxidante.

De acordo com Chu e Chen (2006), verificaram que as kombuchas apresentavam atividade sequestradora de DPPH ( *$\alpha, \alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil*) e do radical ABTS (*ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]*) cerca de 1,7 e 1,4 vezes maior ao do chá não fermentado. Além disso, foi estudado a taxa de inibição da peroxidação do ácido linoleico, em que as kombuchas apresentaram valores cerca de 1.4 vezes maiores aos comparados com amostra controle. As propriedades antioxidantes observadas nas amostras de kombucha aumentaram com o tempo de fermentação. Contudo, importante ressaltar que a fermentação prolongada não é recomenda devido à formação excessiva de ácidos orgânicos fracos. Sendo observadas variações na atividade antioxidante nas diferentes amostras, o que poderá estar relacionado as diferentes origens das culturas de kombucha estudadas pelos autores.

Jayabalan et al. (2008), estudaram as propriedades de kombucha preparada com chá preto, verde, e com resíduos provenientes do processamento de chá (*tea waste material*), verificando igualmente que todas as amostras apresentaram um aumento da capacidade sequestradora de DPPH, sendo a amostra de kombucha de chá verde a que demonstrou maior atividade. Sendo observado resultados iguais em relação à inibição da peroxidação do ácido linoleico. Destacando que todos os tipos de kombucha apresentaram aumento da atividade sequestradora de ânions superóxido em relação em que a fermentação ocorria, contudo, o inverso foi analisado para radicais hidroxila.

Foi observado aumento da ação antioxidante de acordo com o período de fermentação, chegando no pico máximo em ambas as amostras no 5º dia de fermentação, após nota-se uma diminuição nos valores conforme evidenciado na Figura 12, gráfico 04.

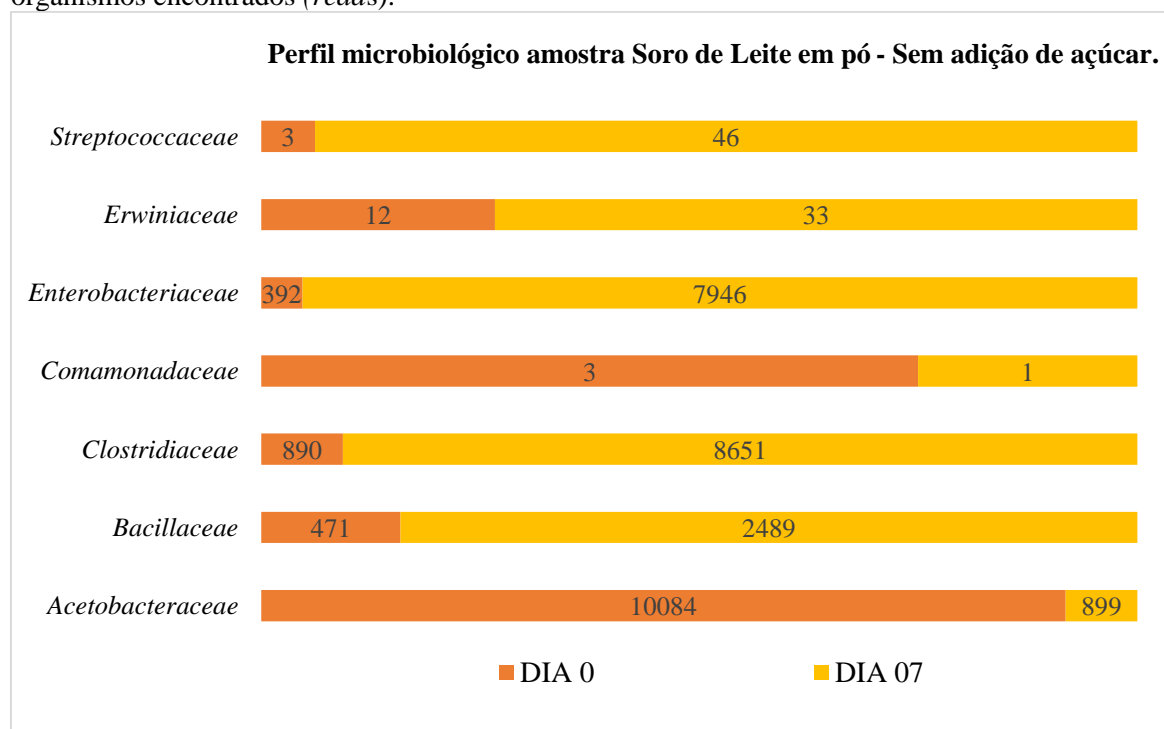
## 5.2 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

### 5.2.1 Bactérias

Os micro-organismos encontram-se dispersos no líquido e no SCOBY sendo que a composição microbiológica pode variar entre fermentações e regiões demográficas (CHAKRAVORTY et al., 2016). Segundo VILLARREAL-SOTO et al., 2018, os gêneros das bactérias predominantes na kombucha são *Acetobacter*, *Komagataeibacter* e *Gluconacetobacter*, os quais possuem a capacidade de produzir celulose, que dará origem ao SCOBY.

O gráfico 1 evidencia a diversidade da microbiota presente no SCOBY utilizado neste trabalho, no início da fermentação (Dia 0), em comparação com o tempo final (Dia 07) na amostra de soro de leite em pó sem adição de açúcar.

**Gráfico 1.** Perfil microbiológico do SCOBY da amostra elaborada com Soro de Leite + SCOBY, sem adição de açúcares. Os números equivalem a quantidade média de micro-organismos encontrados (*reads*).



**Fonte:** Autor, 2023.

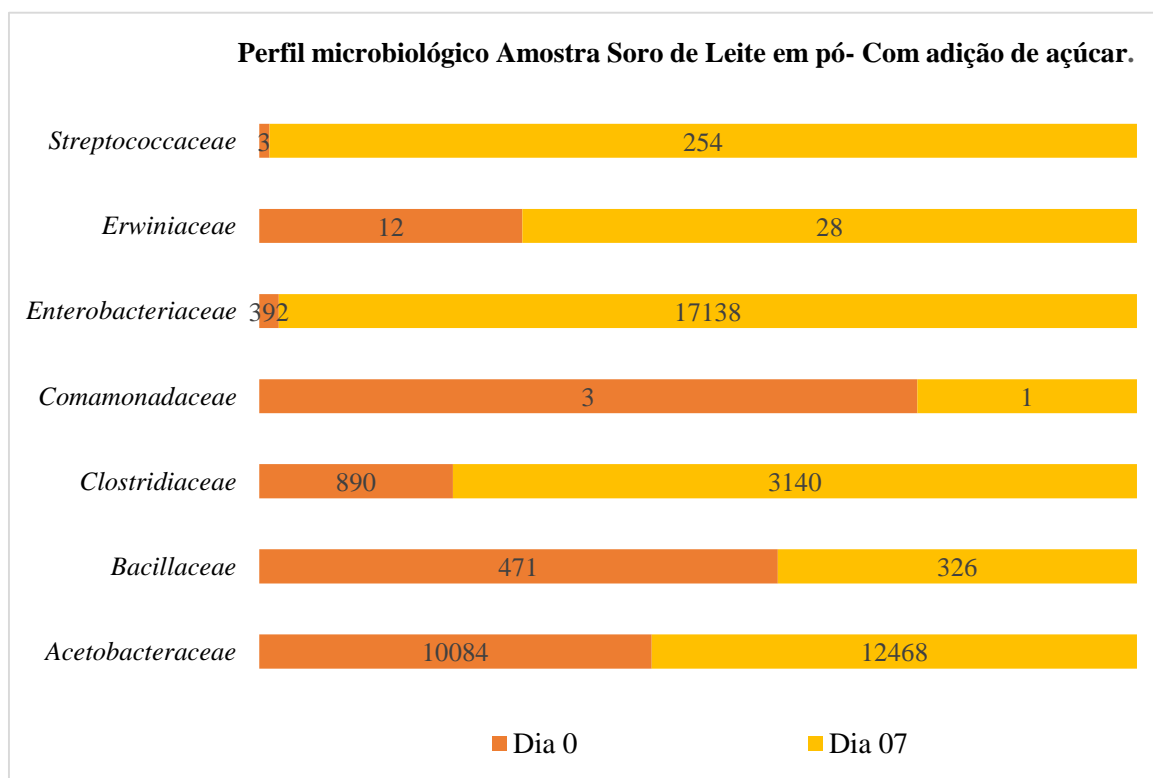
É possível observar que inicialmente (Dia 0) as bactérias do gênero *Acetobacter* estavam presentes em maior número (10.084 *reads*) no SCOBY, e no último dia de fermentação (dia 07) diminuíram significativamente (899 *reads*).

Swings *et al.*, (2008), relatam que o gênero de bactérias *Acetobacter* não possui a capacidade de utilizar alguns açúcares como trealose e lactose. Dessa forma, podemos entender

melhor porque esse gênero de bactérias não conseguiu se multiplicar. O mesmo ocorreu com o gênero *Comamonadaceae* que inicialmente (dia 0) encontrava-se em (3 reads) e no final da fermentação (dia 07) diminuiu para (1 reads).

Já o gráfico 2. evidencia o perfil microbiológico ao longo da fermentação da amostra de soro de leite com adição de açúcar.

**Gráfico 2.** Perfil microbiológico do SCOBY da amostra elaborada com Soro de Leite + SCOBY + açúcar. Os números equivalem a quantidade média de micro-organismos encontrados (*reads*).

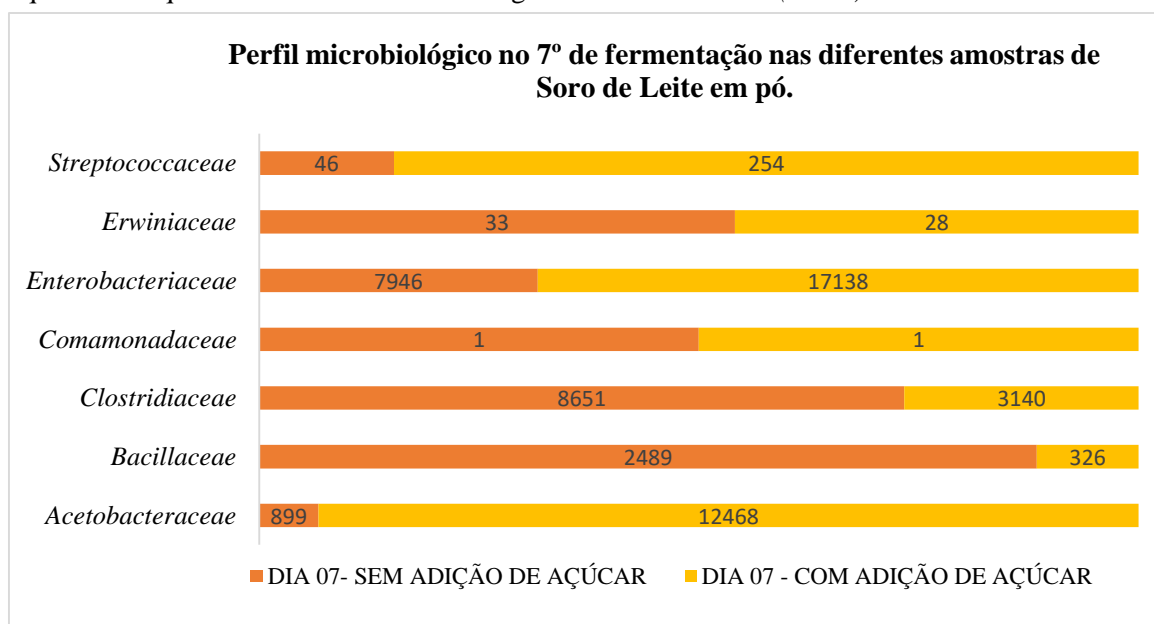


Fonte: Autor, 2023.

De acordo com o gráfico 2, as bactérias do gênero *Entereobacteriaceae* (bactérias patogênicas indesejadas) foram as que apresentaram maior crescimento, seguida das bactérias do gênero *Acetobacteraceae*, que são bactérias acéticas desejadas no meio.

É importante ressaltar que na amostra com adição de açúcar todos os micro-organismos apresentaram crescimento significativo, tanto os benéficos: que produzem ácido acético, ácido lácteos quando os patogênicos. Com exceção do gênero *Comamonadaceae* que em ambas as amostras (sem adição de açúcar e com adição de açúcar) diminuíram na mesma proporção, conforme gráfico 3, a seguir.

**Gráfico 3.** Perfil microbiológico no último dia de fermentação (Dia 07), nas diferentes amostras de Soro de leite em pó- sem adição de açúcar e com adição de açúcar. Os números equivalem a quantidade média de micro-organismos encontrados (*reads*).



Fonte: Autor, 2023.

Percebe-se pelo gráfico 3, que a adição de açúcar na amostra parece trazer diferenças importantes na microbiota do meio.

O crescimento diversificado da microbiota presente neste estudo pode estar relacionado diretamente com as condições de pH do meio. Hur *et al.*, (2014), ressalta que o pH é um parâmetro de grande influência na produção da Kombucha pois, interfere diretamente na atividade biológica. Têm-se risco significativo de um potencial crescimento de patógenos resistentes aos ácidos formados durante a fermentação. Para que isso não ocorra, o pH deve ser continuamente monitorado e registrado para garantir que o pH reduza de forma adequada da faixa inicial de 5 (em kombuchas tradicionais) para 4,2 dentro dos sete dias de fermentação. Se o pH não atingir 4,2 dentro deste prazo após a cultura, e depois ir a ponto final em torno de 2,5 é uma indicação de cultura contaminada ou temperatura de fermentação inferior ao ideal. Os micro-organismos *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* não crescem bem a  $\text{pH} \leq 5$ . Já o *Clostridium botulinum* pode crescer até pH 4,7. A adição de uma cultura de fermentação ativa poderá impedir o crescimento de esporos (NUMMER, 2013).

Resultado similar ao encontrado neste estudo, onde no dia 0 já foi possível observar a presença de *Enterobacteraceae* em grande escala, evidenciando que o experimento já estava contaminado ou foi contaminada no momento da adição na amostra. Também é importante ressaltar que o soro de leite em pó possui parâmetros físico químicos e microbiológicos onde são permitidos limites mínimos/máximos e presença e/ou ausência de contaminantes físicos ou

microbiológicos tolerados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Produto (RTIQ), conforme descritos no anexo I.

A presença de bactérias ácido lácticas (BAL) encontradas no kombucha tem sido inconsistente. Normalmente, não são encontradas ou estão presentes em quantidades muito baixas (Gaggia et al., 2019). Neste trabalho foi detectado o gênero *Lactobacillus*.

Gaggia et al., (2019), relataram o domínio da presença de *Komagataeibacter spp.* e *Acetobacter spp.* e menos de 1% de *Lactobacillus spp.*, entre bactérias; E os gêneros *Zygosaccharomyces spp.* e *Brettanomyces spp.* são as leveduras mais abundantes. Este mesmo autor relata que as *Enterobacteriaceae* foram encontradas em uma das amostras testadas em quantidade inferior a 0,3%. Sendo que no tempo zero a quantidade de *Enterobacteriaceae* foi menor que a quantidade total ao final dos 14º dias de fermentação. Resultado similar ao que encontramos neste trabalho tanto para amostra sem adição de açúcar quanto para amostra com adição de açúcar onde houve crescimento de *Enterobacteriaceae*.

Para Steinkraus e colaboradores (1996), relatam a inibição do crescimento de bactérias patogênicas como *Helicobacter pylori* (bactéria causadora da gastrite), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Agrobacterium tumefaciens*. Os autores Tu e Xia (2018), também relatam o potencial antimicrobiano da kombucha e enfatizam que a atividade antimicrobiana é atribuída ao baixo valor de pH especialmente a presença de ácido acético no meio. Ainda evidenciam que o ácido acético em concentrações de 1 g/L pode inibir bactérias patogênicas e formadoras de esporos.

No último dia de fermentação (Dia 07) para amostra com adição de açúcar, o pH diminuiu para (3,73), a acidez teve seu pico máximo em (3358,80) assim como o teor de ácido acético atingiu (1,71). Diante dessas alterações, podemos comparar por exemplo o caso das bactérias patogênicas do gênero *Clostridiaceae* que houveram maior crescimento na amostra sem adição de açúcar, fato que pode estar relacionado ao baixo teor de ácido acético pois as bactérias do gênero *Acetobacteraceae* (produtoras de ácido acético) diminuíram provavelmente por não conseguir sintetizar a lactose. Deste modo, com pH e acidez propícios e com quantidade baixa de ácidos na amostra sem adição de açúcar (<0,5) o meio ficou propício para o desenvolvimento de patógenos.

Neste trabalho, inicialmente temos um pH relativamente neutro (6,03 / 6,06) em relação ao pH ácido encontrado em kombuchas tradicionais (2,5 / 4,2) além dos resultados demonstrarem dificuldade na diminuição de pH em ambas as amostras, sendo que apenas no 5º dia de fermentação para amostra com adição de açúcar houve diminuição e o pH atingiu níveis recomendados pela legislação (4,2) e começaram a diminuir ao decorrer da fermentação. Os resultados para os valores de ácido acético são relativamente baixos aos encontrados em outros trabalhos. Mas é possível observar que, a medida em que a fermentação vai ocorrendo, os parâmetros analíticos analisados vão se adequando a legislação na amostra com adição de açúcar.

Resultados que evidenciam que o tempo de fermentação deve ser aumentado para uma possível atividade antimicrobiana ocorrer eliminando os micro-organismos patogênicos. Importante ressaltar que outros parâmetros devem ser minuciosamente controlados para verificar as condições sanitárias e físico químicas para tornar-se uma bebida apta a ser consumida.

A higiene e as Boas Práticas de Fabricação são extremamente importantes na prevenção do crescimento de bactérias patogênicas. Embora o pH baixo da kombucha tenha a capacidade de inibir uma série de patógenos, Sadjadi (1998), relatou encontrar *Bacillus anthrax*, *Penicillium* e *Aspergillus* no kombucha devido a condições insalubres de fermentação e contaminação do meio. Chakravorty e colaboradores (2015), destacam que foram identificados na kombucha bactérias como *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Enterobacter*, tanto no biofilme quanto no líquido.

Ainda foram encontradas outras bactérias importantes como evidenciadas na tabela 1. Theo et al., (2004), relata presença de *Rhodotorula mucilaginosa* em todo processo de fermentação, e em números mais elevados nos primeiros dias de fermentação o que evidencia que essa levedura se beneficia de altas concentrações de carboidratos e pH elevado. Assim como a *Candida guilliermondii*. Resultados semelhantes são encontrados neste estudo. Onde encontramos *Rhodospirillales*, *Candida ortopsilose*.

**Tabela 1.** Diversidade microbiológica do SCOBY nas amostras de soro de leite em pó com adição e sem adição de açúcar no tempo inicial e final de fermentação.

	<b>T0</b>	<b>T7</b> (scooby; soro)	<b>T7</b> (scooby; soro + açúcar)
<b>Bactérias</b>			
<i>Bacillales</i>	14%	76%	10%
<i>Burkholderiales</i>	60%	20%	20%
<i>Enterobacterales</i>	2%	31%	67%
<i>Eubacterales</i>	7%	68%	25%
<i>Lactobacillales</i>	1%	15%	84%
<i>Rhodospirillales</i>	43%	4%	53%

**Fonte:** Autor, 2023.

### 5.2.2 Leveduras

Dentre as cepas de levedura predominantes na kombucha podemos destacar: *Kloeckera sp.*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *S. cerevisiae*, *Torulaspora sp.*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Pichia sp.* (Goh et al., 2012b). Segundo Watawana et al. (2015) relataram que *Zygosaccharomyces* é a levedura que se destaca entre as mais encontradas no kombucha caracterizando uma porcentagem de 84,1% seguida por *Dekkera* 6% e *Pichia* em 5%.



A tabela 2. Traz a identificação de leveduras nas diferentes amostras de soro de leite em pó sem adição de açúcar e com adição de açúcar.

**Tabela 2.** Perfil de Leveduras *Reino Fungi* ao longo da fermentação (Dia 0 e Dia 07), nas amostras de Soro de leite em pó- sem adição de açúcar e com adição de açúcar.

	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 07</b> <b>(sem adição açúcar)</b>	<b>Dia 07</b> <b>(Com adição açúcar)</b>
<i>Pichia kudriavevii</i>	69%	0%	13%
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2%	81%	75%
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	1%	18%	12%
<i>Hanseniaspora</i>	23%	0%	0%
<i>Candida ortopsilose</i>	5%	0%	0%

**Fonte:** Autor, 2023.

Observando a tabela 1. é possível observar 04 gêneros principais de leveduras encontradas em ambas amostras de soro de leite em pó sem adição de açúcar e com adição de açúcar, dentre eles estão: *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida* e *Zygosaccharomyces*. O gênero *Pichia* se apresenta em maior concentração no dia 0 (67%), após na amostra sem adição ela desaparece (0%) e no dia 07, na amostra com adição de açúcar o gênero diminui mas, continua no meio (13%).

Também é possível observar que os gêneros *Hanseniaspora* (23%), *Candida* (5%) são inibidas com o tempo de fermentação Dia 07. Já o gênero *Zygosaccharomyces* é único gênero que mais se destacou pois cresce significativamente em ambas as amostras com adição de açúcar e sem adição de açúcar.

Em comparação aos resultados das amostras de soro de leite em pó com adição de açúcar e sem adição de açúcar é possível observar que no 7º dia de fermentação a amostra com adição de açúcares obteve maior crescimento microbiano garantindo leveduras benéficas para o meio.

## 6 CONCLUSÃO

Apesar da kombucha ser uma bebida milenar ainda existem muitas incógnitas sobre seus efeitos. Desta forma, com aumento da visibilidade desta bebida, é de suma importância que mais estudos sejam realizados. A bebida é geralmente consumida em função dos seus potenciais efeitos benéficos.

Neste trabalho foi identificado o perfil microbiológico do SCOBY nas amostras de soro de leite + SCOBY e com adição ou não de açúcar, sendo monitoradas ao longo de sete dias de fermentação. Encontrou-se gêneros de bactérias e leveduras comumente evidenciados na literatura, dentre eles gêneros de bactérias patogênicas.

O objetivo do trabalho foi alcançado evidenciando que na amostra sem adição de açúcar possivelmente a microbiota leva um tempo maior para realizar as trocas metabólicas pois precisa adaptar as bactérias e leveduras do SCOBY no meio visto que, não está em suas condições ideais de fermentação. É possível sugerir que tais resultados se devem a capacidade que alguns microorganismos tem de sintetizar a lactose presente no soro como substrato inicial de fermentação. Durante o período de armazenamento, o valor do pH dos produtos (pH 6,2 / 6,3) tendeu a diminuir em ambas amostras devido as interações metabólicas sofridas. Com as condições propícias de níveis descontrolados de acidez e pH, tornou o meio propício ao desenvolvimento de patógenos e deteriorantes no meio.

O pH e a acidez encontrados nas amostras dificultou as amostras de se tornar uma bebida potencialmente palatável nessas condições desta forma, mais estudos são necessários para garantir uma bebida segura e de qualidade para que seja possível realizar uma análise sensorial por exemplo.

As expectativas preliminares foram atendidas, mesmo havendo crescimento de bactérias patogênicas no meio os resultados obtidos foram compreendidos e assim foi possível garantir uma base de dados sólida para trabalhos futuros, visto que atualmente não existem muitos estudos publicados.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Algumas perspectivas que podem ser estudadas para melhor compreender o funcionamento e aplicabilidade para padronização no desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada com a utilização do resíduo Soro de leite devem ser consideradas:

- Estudar a utilização de diferentes tipos de soro de leite em pó (integral, desnatado...) e avaliar a composição dos mesmos.

- Estudar a adição de chá de arranque nas amostras.

- Estudar alternativas e métodos tecnológicos para diminuir o pH e acidez inicial da bebida como alternativa de diminuir ou inibir o crescimento de patógenos no meio tornando a bebida aceitável sensorialmente e sanitariamente não causando danos à saúde humana tornando-se uma bebida segura para consumo.

- Testar outras concentrações de substratos e tempo de fermentação para obter resultados mais visível para evidenciar a relação das amostras com adição de sacarose e sem adição.

- Analisar os compostos aromáticos, bioativos e antioxidantes específicos presentes inicialmente e ao longo da fermentação da kombucha;

- Estudar a melhor quantidade de SCOBY a ser utilizada.

- Avaliar a segurança de SCOBY's caseiros.

# Especificação Técnica



P2-ET-CQ-001 Revisão: 19  
Data: 15/10/2022 Pág. 2/2

## SORO DE LEITE EM PÓ PARCIALMENTE DESMINERALIZADO

Registro no MAPA nº 001/416 – Sacaria – SAP P200008 e P700008 – NCM 0404.10.00

Registro no MAPA nº 0024/416 – Big Bag – SAP P200009 e P700009

Produto obtido da fabricação do queijo, sem adição de sal, concentrado por meio de membranas de nanofiltração, desnatado, pasteurizado, concentrado a vácuo e seco através do processo tipo spray dryer.

### Aplicações:

- ✓ Alimentos em geral (chocolates, sorvetes, sobremesas, padarias, confeitarias, biscoitos e lácteos).
- ✓ Nutrição Animal.

Este Produto **CONTÉM LACTOSE**, de acordo com a RDC nº 727 de 01/07/2022, que estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos.

### Propriedades:

- ✓ Baixa viscosidade;
- ✓ Alto valor nutritivo;
- ✓ Boa capacidade de emulsificação;
- ✓ Baixo teor de sódio;
- ✓ Presença de Vitamina C, B1, B2, B6.
- ✓ Solúvel em uma ampla faixa de pH.

Este Produto **NÃO CONTÉM GLÚTEN**, de acordo com a Lei 10.674 de 16/05/2003, que obriga a declaração de presença ou ausência de glúten.

### Validade:

Armazenado nas condições recomendadas, 12 meses a partir da data de fabricação. Após abertura da embalagem original, recomenda-se consumir em 30 dias.

### Ingredientes:

Soro de Leite Concentrado Parcialmente Desmineralizado (40%) e Regulador de acidez Hidróxido de potássio (INS 525).

### Embalagem:

(Sacaria) Sacos de papel multifolhados com saco de polietileno interno, contendo 25 kg.

(BigBag) Embalagem polipropileno com sacos de polietileno interno, contendo 1.000 Kg.

Não são utilizados grampos nem fixadores metálicos.

### Alergênicos:

**ALÉRGICO: CONTÉM DERIVADO DE LEITE.** O alergênico presente no produto é classificado no Grupo Leites de todas as Espécies de Animais Mamíferos (Proteína e Lactose). (De acordo com a RDC nº 727, 01/07/2022).

	Parâmetros	Metodologia de Referência	Padrões
Químico	✓ Umidade (%)	Gравиметрия por balança – Ohaus MB25 (2016)	Máx. 3,0
	✓ Gordura (%)	FUNKE-GERBER (NMQL40) :2020	Máx. 1,5
	✓ Proteínas (base seca) (%)	Diferença (% Base úmida*100) / (100- %Umidade)	Mín. 11,0
	✓ Proteínas (base úmida) (%)	Kjeldahl – IDF 20.1 (2014)	Mín. 10,0
	✓ Lactose (%)	Colorimetria (HPLC)	Mín. 75,0
	✓ Cinzas (%sais minerais)	Gравиметрия – ISO 5345 - /IDF90 (2008)	Máx. 6,0
Físico	✓ Acidez (g/100g ácido láctico, Rec. 20%)	ISO 11869:2012 /IDF 150	Máx. 0,35
	✓ Densidade Compactada (g/cm³)	ISO 8967 - /IDF 134 (2005)	Mín. 0,500
	✓ Índice de Insolubilidade (mL)	IDF 129 (2005)	Máx. 0,1
	✓ pH (sol. 10%)	Potenciometria – MAPA (2019)	6,0 – 7,0
	✓ Partículas Queimadas	American Dry Products Institute (ADPI) - 1990	Disco A
Microbiológico	✓ Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	Petrifilm – ISO 4833-1 (2013)	Máx. 30.000
	✓ Enterobactérias (UFC/g)	Petrifilm – ISO 21528-2 (2017)	Máx. 10
	✓ Coliformes Totais a 30°- 35°C (UFC/g)	Petrifilm – AOAC N° 986.33	Máx. 10
	✓ Coliformes Termotolerantes a 45°C (UFC/g)	Petrifilm – AOAC N° 986.33	Máx. 3
	✓ Staphylococcus aureus coagulase positiva (UFC/g)	Petrifilm – ISO 6888-2A1 (2004)	Máx. 10
	✓ Bolores e Leveduras (UFC/g)	Petrifilm – AOAC N° 997.02 (1997)	Máx. 50
	✓ Bacillus Cereus (UFC/g)	ISO 7932:2004	Máx. 1.000
	✓ Salmonella spp. (25g)	ISO 6579-1:2017 / Amd 2020	Ausente
	✓ Listeria monocytogenes (25g)	ISO 11290-1:2017	Ausente
	✓ Escherichia coli (1g)	ISO 7251:2005	Ausente
✓ Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	AOAC 2007.06.2016	Ausente	
Sensorial	✓ Cor	JAL (2008), P.279	Branco amarelado
	✓ Sabor	JAL (2008), P.279	Característico lácteos
	✓ Odor	JAL (2008), P.279	Característico lácteos
	✓ Aspecto	JAL (2008), P.279	Homogêneo



+55(54) 3337-3800 [www.sooro.com.br](http://www.sooro.com.br)

Sooro Renner Nutrição S.A. - Rodovia RS 475, km 46 - Bairro Santa Lúcia  
CEP 99930-000 - Estação - Rio Grande do Sul - Brasil



ANEXO I. Ficha Técnica soro em pó.



# Especificação Técnica



P2-ET-CQ-001 Revisão: 19  
Data: 15/10/2022 Pág. 2/2

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL	
	100g
Valor energético (Kcal)	372
Carboidratos (g)	79
Açúcares totais (g)	79
Açúcares adicionados (g)	0
Maltose (g)	0
Lactose (g)	76
Sacarose (g)	0
Frutose (g)	0
Glicose (g)	0,9
Galactose (g)	2,0
Amido (g)	0
Proteínas (g)	12
Ácido Aspártico (g)	1,18
Ácido Glutâmico (g)	1,98
Alanina (g)	0,57
Arginina (g)	0,26
Cistina (g)	0,25
Fenilalanina (g)	0,35
Glicina (g)	0,25
Histidina (g)	0,22
Isoleucina (g)	0,66
Leucina (g)	1,15
Lisina (g)	1,03
Metionina (g)	0,20
Prolina (g)	0,71
Serina (g)	0,58
Tirosina (g)	0,24
Treonina (g)	0,77
Triptofano (g)	0,23
Valina (g)	0,75
Gorduras totais (g)	0,8
Gorduras saturadas (g)	0,4
Gorduras trans (g)	0
Gorduras monoinsaturadas (g)	0,2
Ômega 9 (g)	0,2
Gorduras poli-insaturadas (g)	0
Ômega 6 (g)	0
Ômega 3 (g)	0
Colesterol (mg)	23
Fibras alimentares (g)	ND*
Sódio (mg)	742
Vitamina A (µg)	8
Vitamina D (µg)	0
Vitamina E (mg)	0
Vitamina C (mg)	1
Vitamina B1 (mg)	0,4
Vitamina B2 (mg)	2,39
Vitamina B3 (mg)	0,3
Vitamina B6 (mg)	0,36
Cálcio (mg)	755
Ferro (mg)	0,25
Potássio (mg)	1769
Zinco (mg)	5

\*Análises realizadas de acordo com a RDC 429/2020

ND - Não Detectável - Não é possível quantificar fibras na Mela Sororo de Leite em Pó e derivados com vistas a sua natureza e composição.

## Garantia da Qualidade:

Procedimentos rigorosos de controle de qualidade são aplicados durante a produção. O ambiente de produção também está sujeito a monitoramento e controle regulares.

O produto final é amostrado adequadamente, sendo testado para parâmetros físicos, químicos, sensoriais e microbiológicos através de metodologias reconhecidas. As análises são realizadas em laboratórios de controle de qualidade internos e em laboratórios externos através de análises subcontratadas, de acordo com a *IN n° 94 de 18/08/2020* e *Portaria SDA n° 658 de 21/09/2022*.

Durante o armazenamento e a expedição, são tomadas precauções para garantir a manutenção da qualidade e segurança do produto. Cada embalagem é identificada com seu lote, permitindo rastreabilidade completa.

O monitoramento de contaminantes (Antibióticos, Pesticidas, Metais pesados, Micotoxinas, Dioxinas, Furanos, PCB's, Microrganismos Patogênicos, Materiais Estranhos, entre outros) é realizado de acordo com o Plano de Amostragem Interno e Legislações Vigentes, em Laboratório Acreditados.

## Condições de Transporte e Armazenamento:

Armazenamento à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, em local seco e arejado. O produto pode absorver odores, importante armazenar em um ambiente livre de odores fortes e outros contaminantes.

Transportar protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.

Produto é acondicionado em pallet de madeira descartável tipo PBR (1,00 x 1,20 metros), folha de papelão, peso de 1.000 kg.

Cada pallet fechado de produto configura as quantidades citadas na tabela. A altura do pallet pode variar de 1,50 a 1,80 m de altura.

Peso	Peso	Distribuição	Total
Unidade	Paleta	dos Sacos	Sacos
25 kg	1.000 kg	5 por lastro em 8 camadas	40
1.000 kg	1.000 kg	1 big bag por pallet	-



+55(54) 3337-3800 [www.sooro.com.br](http://www.sooro.com.br)

Sooro Renner Nutrição S.A - Rodovia RS 475, km 46 - Bairro Santa Lúcia  
CEP 99930-000 - Estação - Rio Grande do Sul - Brasil



## REFERENCIAS

AGUILAR USCANGA, M. G., DÉLIA, M. L., & STREHAIANO, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(2), 157–162. doi:10.1007/s00253-002-1197-z

BISHOP, P.; PITTS, E.R.; BUDNER, D.; THOMPSON-WITRICK, K.A. **Chemical Composition of Kombucha**. *Beverages* **2022**, 8, 45.  
<https://doi.org/10.3390/beverages8030045>

BLANCO, A. R.; Os benefícios do chá verde (*Camellia sinensis*). **Disponível em:** <<http://jardimdeflores.com.br/sinergia/S08chaverde.htm>> Acesso em 17 janeiro 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019**. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 54 de 17 de setembro de 2020**. Altera a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº 103 de 20 de setembro de 2018**. Altera a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. Diário Oficial da União, Brasília, 28 set. 2018.

BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA). **Resolução nº 15 de 15 de julho de 1997**. Estabelece o padrão de identidade e qualidade para frutas cristalizadas e glaceadas.

CHAKRAVORTY, S., BHATTACHARYA, S., CHATZINOTAS, A., WRITACHIT, C., BHATTACHARYA, D., GACCHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, v. 220, p. 63–72. Mar 2016. Disponível em: <http://bit.ly/2VZO1H>

CHAKRAVORTY, SOMNATH, SEMANTEE BHATTACHARYA, ANTONIS CHATZINOTAS, WRITACHIT CHAKRABORTY, DEBANJANA BHATTACHARYA, AND RATAN GACHHUI. 2016. "**Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics.**" *International Journal of Food Microbiology* 220:63-72. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015.

CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology, England*, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000. Disponível em: . Acesso em: 20 fev. 2019.

CZAJA, W.; et al. Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, jan. 2006.

DUBOC, P. P. (2015). Determinação de arsênio, cádmio e chumbo nas folhas e na Infusão de chás de camellia sinensis comercializados no Rio de Janeiro, Brasil. **Monografia (Especialista em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/14733/2/Especializacao\\_residencia\\_Priscila\\_Duboc.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/14733/2/Especializacao_residencia_Priscila_Duboc.pdf).

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 409-421, Jul. 2000.

ESTEVEZ, E. (2021). Como o chá e o cafezinho movimentam bilhões no Brasil e no mundo. <https://www.eql.com.br/financas/2021/06/como-o-cha-e-o-cafezinho-movimentam-bilhoes-no-brasil-e-no-mundo/>.

FILIPPIS, F., TROISE, A.D., VITAGLIONE, P., ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, n. 2018, p. 11–16. Ago 2018. Disponível em: <http://bit.ly/3cSZsqd>

FIRMINO, L. A. Avaliação da qualidade de diferentes marcas de chá verde (camelliasinensis) comercializadas em Salvador-Bahia. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia**. Faculdade de Farmácia, 2011.

GAGGIÀ, F., BAFFONI, L., GALIANO, M., NIELSEN, D. S., JAKOBSEN, R. R., CASTRO-MEJÍA, J. L., & DI GIOIA, D. (2019). **Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity**. *Nutrients*, 11(1), 1. <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/1/1>.

GIADA, M. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants*, Rijeka: InTech, cap. 4, p. 87–112, 2013

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 976-981, 2000.

Hilal, Y., Engelhardt, U. (2007). Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, 2(4), 414-421. [https://www.tu-braunschweig.de/fileadmin/Redaktionsgruppen/Institute\\_Fakultaet\\_2/ILC/PDFs/w\\_t.p df](https://www.tu-braunschweig.de/fileadmin/Redaktionsgruppen/Institute_Fakultaet_2/ILC/PDFs/w_t.p df).

HILL, C, GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H. J., SALMINEM, S., CALDER, P. C., &



HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IVANIŠOVÁ, E., MEŇHARTOVÁ, K., TERENTJEVA, M. ET AL. Avaliação das propriedades químicas, antioxidantes, antimicrobianas e sensoriais da bebida de chá de kombuchá. **J Food Sci Technol** **57**, 1840–1846 (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>

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, July 2014.

JAYABALAN R, MARIMUTHU S, SWAMINATHAN K (2007) Changes in content of organics acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. **Food Chem** 102:392–398

JAYABALAN R., MALBAŠA R.V., LONČAR E.S., VITAS J.S., SATHISHKUMAR M. 2014. **A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 538-50.

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

LAMARÃO, R.C., FIALHO, E. (2009). Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, 22, 257-269. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000200008>

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARSH, A.; SULIVAN, O.; HILL, C., ROSS, R., COTTER, P. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, London, v. 38, 171-178.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência Tecnologia Alimentação**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 380-385, 401-407, 2006.

MEDEIROS, S.C.G.; Cechinel- Zanchett, C.C. (2019). Kombucha: efeitos in vitro e in vivo. **Infarma- Ciências Farmaceuticas**, 31(2): 73-79.

MIYAZAKI SF. Utilização do chá verde em cosméticos. **Cadernos de Prospecção**. v. 1, n. 1, p. 10-13, 2008.

MO, H.; ZHU, Y.; CHEN, Z. Microbial fermented tea: a potential source of natural food preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 19, p. 124-130, 2008.

NAGÃO, T., KOMINE, Y., SOGA, S., MEGURO, S., HASE, T., TANAKA, Y. & TOKIMITSU, I. (2005). Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. **The American journal of clinical nutrition**, 81(1), 122-129. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.122>

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**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2017. Disponível em: . Acesso em: 9 dez. 2017.

NGUYEN, K. N. et al.. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic bacteria strain from traditional Kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT – Food Science and Technology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 1149-1155, 2015.

NUMMER, B. A. Special report: Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. **Journal of Environmental Health**, v. 76, n. 4, p. 8-11, nov. 2013.

OLIVEIRA. E.N.A., FEITOSA B. F., SOUZA. R.L.A., Tecnologia e processamento de frutas, doces, geleias e compotas. **Instituto Federal Rio Grande do Norte (IFRN)**, Natal- RN, 2018. p. 210.

OLIVEIRA, R. M. M. De. Quantification of catechins and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) infusions, extract, and ready-to-drink beverages. **Food Science And Technology**, v. 32, n. 1, 2012.

OTA, N., SOGA, S., SHIMOTOYODOME, A., HARAMIZU, S., INABA, M., MURASE, T., ET AL. (2005). Effects of combination of regular exercise and tea catechins intake on energy expenditure in humans. **Journal of Health Science**, 51(2), 233-236. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/51/2/51\\_2\\_233/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/51/2/51_2_233/_article).

PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHODA-SILVA, D. Uma Xícara (chá) de Química. **Revista Virtual Química**, v.3, n.1, p.27-36, 2011.

PURE, A. E.; PURE, M. E. Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. **Applied Food Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 125-130, 2016.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; FILHO, A.D.R. (2011). Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciencia & Saude**, 4(2), 66-74.

REISS, J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 198, p. 258-261, 1994.

SAIGG, N. L.; SILVA, M. C. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 7, n. 1, p. 69-89, 2009.

SANDERS, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8): 506- 514.

SANTANA, M. de F. S. de; SILVA, I. C. Elaboração de Biscoitos com Resíduo da Extração de Suco de Caju. Belém: **EMBRAPA**, 2008

SANTOS, V. S. (2019). A química dos chás: o saber popular no ensino de química. **Monografia (Licenciatura em Química)**. Universidade federal do recôncavo da Bahia. Amargosa. <http://www.repositoriodi. Gital.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/1550/1/tcc%20vers%20c3%83o%20corr gida%20pdf.pdf>

SCHIMITZ, W.; SAITO, A. Y.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, H. O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005

SENNA, C. (2013). Enciclopédia do chá. **In: Revista Casa e Jardim**. <http://revistacasaejardim.globo. Com/Revista/Common/0,EMI164823-18069,00- ENCICLOPEDIA+DO+CHA.html>.

SILVA I. C. O, 2013. **Processamento da polpa de abóbora para fabricação de doce cristalizado**. Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos. Florianópolis- SC, 2013.

SILVA, R. C. L.; FALCÃO FILHO, R. S.; MEDEIROS, I. F. Avaliação qualidade de iogurtes produzidos na usina-escola do IFRN campus currais novos e distribuídos na merenda escolar. **Anais. IX Congresso de Iniciação Científica do IFRN, 2013**. Disponível em: <http://www2.ifrn.edu.br/ocs/index.php/ congc/ix/paper/viewFile/1294/97> Acesso em 01 de outubro de 2016.

SILVA P.S., NAVARRO F. Efeitos da ingestão de chá verde sobre oxidação lipídica no sedentarismo e no exercício. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v.1, n. 3, p. 45-60, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia do produto natural ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p

SOUSA, L. dos S. **Extração e purificação dos compostos fenólicos presentes nas folhas de Camellia sinensis**. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

SRINIVASAN, R.; SMOLINSKE, S.; GREENBAUM, D. Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea: is this beverage healthy or harmful? **Journal of General Internal Medicine, Alexandria**, v. 12, p. 643-644, 1997.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 119-126, 2004.

TORREZAN, R. (Coord.). Curso de processamento de frutas. Rio de Janeiro: Embrapa-CTAA; Brasília, DF: **SEBRAE**, 2000. 135 p.

URZEDO, N. D. R. (2020) **O chá verde e suas propriedades: uma breve revisão bibliográfica abrangendo os anos de 2000 a 2020**. Monografia (Bacharel em Química Industrial). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/30879>.

UCHÔA, A. M. A. **Adição de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais na formulação de biscoitos**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, 2007.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, n. Oct. 2018, p. 0-1, 2019.

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

VITAS, J. S.; et al. The antioxidant activity of Kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 19, n. 1, p. 129-139, 2013.

WATAWANA, M. I., et al. Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with Kombucha 'tea fungus'. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, p. 490-498, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13006> Acesso em: 12 fev. 2018.

YANG, Z. -W. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in highcholesterol fed mice. **J. Sci. Food Agric.**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 150-156, Jan. 2009.

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