



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE QUÍMICA DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS EM KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)  
SABORIZADA COM ABÓBORA (*Cucurbita moschata*)

CARLA ELIÁRIA ALVES DE MENDONÇA

Recife/PE

2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

CARLA ELIÁRIA ALVES DE MENDONÇA

DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE QUÍMICA DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS EM KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)  
SABORIZADA COM ABÓBORA (*Cucurbita moschata*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Dra. EMMANUELA PRADO DE PAIVA AZEVEDO.

CO-ORIENTADORA: Dra. ANA CAROLINA DOS SANTOS COSTA.

Recife/PE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE QUÍMICA DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS EM KOMBUCHA DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)  
SABORIZADA COM ABÓBORA (*Cucurbita moschata*)

Por Carla Eliária Alves de Mendonça

Esta Dissertação será avaliada no exame para obtenção do título de Mestre em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos no dia 09/08/2023 pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Emmanuela Prado De Paiva Azevedo  
Presidente da banca

---

Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros - membro interno  
PGCTA/Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dra. Camila Souza Porto – Membro externo  
Universidade Federal de Alagoas / Penedo

*Com o coração radiante, dedico  
este trabalho ao meu Senhor  
Jesus que tudo proveu e a  
minha família que não soltou a  
minha mão.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço ao Meu Deus, que me mostrou que era possível realizar sonhos e no tempo d'Ele tudo é muito mais belo do que pedimos na nossa imaginação. Ele mostrou que queria me ver lutar, e não me abandonou nem por um segundo.

A São Tomaz de Aquino, que nos momentos de trevas na minha inteligência, com sua intercessão, derramou um raio de claridade me ajudando na escrita, em meio a tantas tribulações, porque a vida não para, e mesmo precisando imergir no mundo da escrita a vida acontece, e aqui aconteceu com muita intensidade.

Agradeço a minha família, por segurar a minha mão enquanto eu lutava contra o câncer de mama e vivia o sonho de conquistar o mestrado. Meus pais, que foram fortaleza e muitas vezes, seguraram as pontas nos bastidores. Em especial, a minha filha Aysha, que suportou muitas vezes a distância, os dias de cansaço e me deu muita força com sua doçura, através de abraços, beijos inesperados confortando o meu coração. Aos meus irmãos, Catarine, Carlos e Clara que em muitos dias sem saber me deram conforto, em especial a minha irmã Carol, que através da sua luta pela vida, me fortaleceu e me fez respirar fundo, erguer a cabeça e permanecer. Aos meus sobrinhos, Miguel, João e Théo, que muitas vezes interromperam a escrita com um abraço acolhedor.

Agradeço aos professores do programa, que contribuíram com a formação acadêmica, especialmente, as minhas orientadoras Prof<sup>ª</sup> Emmanuela e Prof<sup>ª</sup> Ana Carolina, carinhosamente chamadas por Manu e Carol, que tantas vezes foram o apoio mais que acadêmico, que sempre expressaram o cuidado com a formação científica, mas sobretudo o conforto nos dias difíceis, sempre com um café e abraço acolhedor. Obrigado por ser mais que professoras, foi uma orientação para a vida.

Agradeço aos amigos que se fizeram presentes de alguma forma contribuindo para que eu chegasse até aqui, inclusive a minha turma de mestrado, que me ajudaram tanto. Em especial, as minhas amigas Úrsula e Diana que sempre vibraram a cada conquista, sempre rezando por mim, intercedendo nos momentos desafiadores, segurando a minha mão. A minha amiga Vaninha, que em oração me fortaleceu, motivando diariamente para que eu não desistisse. A minha amiga Poliana, que trouxe o equilíbrio e o foco nos momentos de cansaço.

Agradeço aos colegas de laboratório, em especial ao técnico José e a Natalia que com tanta paciência me passaram seus conhecimentos técnicos, com zelo pela ciência.

Por fim, agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e a CAPES que possibilitaram toda estrutura necessário para a pesquisa fosse desenvolvida, contribuindo com a ciência e com a sociedade.

Finalizo aqui agradecendo por cada desafio vivido que me possibilitou crescer como pessoa e profissional, e acima de tudo por realizar um sonho que era viver essa experiência incrível que foi o mestrado. Encerro com a frase que descobri no final dessa caminhada “A vida é mais que uma dissertação”. Obrigado, Senhor!

“Criador Inefável,  
Vós que sois a fonte verdadeira da luz e da ciência,  
derramai sobre as trevas da minha inteligência um raio da vossa claridade.

Dai-me inteligência para compreender,  
memória para reter,  
facilidade para aprender,  
sutileza para interpretar  
e graça abundante para falar.

Meu Deus, semeai em mim a semente da vossa bondade.

Fazei-me pobre sem ser miserável,  
humilde sem fingimento,  
alegre sem superficialidade,  
sincero sem hipocrisia;  
que faça o bem sem presunção,  
que corrija o próximo sem arrogância,  
que admita a sua correção sem soberba;  
que a minha palavra e a minha vida sejam coerentes.

Concedei-me, Verdade das verdades,  
inteligência para conhecer-Vos,  
diligência para Vos procurar,  
sabedoria para Vos encontrar,  
uma boa conduta para Vos agradar,  
confiança para esperar em Vós,  
constância para fazer a Vossa vontade.

Orientai, meu Deus, a minha vida;  
concedei-me saber o que me pedis  
e ajudai-me a realizá-lo  
para o meu próprio bem  
e de todos os meus irmãos.

Amém.”

**Oração de São Tomaz de Aquino pedindo graças da luz nos estudos.**

## RESUMO

A Kombucha é uma bebida de origem asiática à base de chá das folhas de *Camellia sinensis* adicionado a uma cultura *starter*, contendo um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras. Reconhecida por seus benefícios a saúde, atingiu um crescimento considerável, com diversas opções de consumo, sobretudo com variedades de sabores e nutrientes. Considerando o papel funcional da bebida e a Instrução Normativa 41/2019 (MAPA) que regulamenta o padrão de identidade e qualidade da kombucha, e autoriza a adição de frutas e vegetais que podem enriquecer, ainda mais, a bebida. O presente elaborou e estudou uma kombucha de chá verde (*Camellia Sinensis*) com adição de abóbora (*Cucurbita moschata*), avaliando a estabilidade química dos compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides saborizada com abóbora durante o armazenamento. Na execução da pesquisa foi realizado um desenho experimental para otimização da formulação, através do planejamento fatorial  $2^3$  com as seguintes variáveis: percentual de chá verde (*Camellia sinensis*), purê de abóbora e açúcar. Em seguida, foram selecionadas 03 condições do planejamento fatorial: C0 (Kombucha sem adição de abóbora), C4 (Kombucha com adição de 15% de abóbora) e C8 (Kombucha com adição de 15% de abóbora e 5g de açúcar). As amostras foram armazenadas por 60 dias sob refrigeração e realizado o estudo de estabilidade dos compostos bioativos, no qual foram analisados no tempo 0 e repetida a cada 10 dias. Dessa forma, a kombucha sem adição de abóbora (C0) apresentou a melhor concentração para compostos fenólicos ( $2,02 \pm 0,06$  mgEAG/ml) e flavonoides ( $48,79 \pm 0,97$  mgEC/ml). Enquanto que a kombucha com adição de abóbora (C4) foi a condição com maior concentração de carotenoides ( $28,9 \pm 1,73$   $\mu$ g /100 ml). Vale ressaltar, que as melhores concentrações de carotenoides foram encontradas no 20º dia (T20) e de atividade antioxidante foram obtidas no 30º dia do armazenamento (T30). As análises estatísticas demonstraram que não houveram diferenças significativas entre os tempos analisados para os compostos bioativos. Com isso, as amostras foram consideradas estáveis quando mantidos sob refrigeração durante os 60 dias. Dessa forma, conclui-se que a abóbora é um ingrediente promissor na saborização de kombuchas, garantindo uma bebida com quantidades significativas de compostos bioativos e, principalmente carotenoides.

Palavras-chave: Carotenoides, Kombucha, *Shelf life*, Compostos bioativos.

## ABSTRACT

Kombucha is a drink of Asian origin made from *Camellia sinensis* leaf tea added to a starter culture, containing a symbiotic consortium of bacteria and yeast. Recognized for its health benefits, it has achieved specific growth, with diverse consumption options, mainly with varieties of flavors and nutrients. Considering the functional role of the drink and Normative Instruction 41/2019 (MAPA) which regulates the identity and quality standard of kombucha, and authorizes the addition of fruits and vegetables that can further enrich a drink. The present created and studied a green tea kombucha (*Camellia Sinensis*) with the addition of pumpkin (*Cucurbita moschata*), evaluating the chemical stability of phenolic compounds, flavonoids, carotenoids flavored with pumpkin during storage. During the research, an experimental design was carried out to optimize the formulation, using a  $2^3$  factorial design with the following variables: percentage of green tea (*Camellia sinensis*), pumpkin puree and sugar. Then, 03 factorial planning conditions were selected: C0 (Kombucha without the addition of pumpkin), C4 (Kombucha with the addition of 15% pumpkin) and C8 (Kombucha with the addition of 15% pumpkin and 5g of sugar). The samples were stored for 60 days under refrigeration and a stability study of the bioactive compounds was carried out, in which they were analyzed at time 0 and repeated every 10 days. Thus, kombucha without added pumpkin (C0) presented the best concentration for phenolic compounds ( $2.02 \pm 0.06$  mgEAG/ml) and flavonoids ( $48.79 \pm 0.97$  mgEC/ml). While kombucha with pumpkin addition (C4) was the condition with the highest concentration of carotenoids ( $28.9 \pm 1.73$   $\mu$ g /100 ml). It is worth mentioning that the best concentrations of carotenoids were found on the 20th day (T20) and the antioxidant activity was found on the 30th day of storage (T30). Statistical analyzes revealed that there were no significant differences between the times analyzed for the bioactive compounds. Therefore, the samples were considered relevant when they were left under refrigeration for 60 days. Therefore, it is concluded that pumpkin is a promising ingredient in the flavoring of kombuchas, guaranteeing a drink with specific details of bioactive compounds and, mainly, carotenoids.

Keywords: Carotenoids, Kombucha, Shelf life, Bioactive compounds.

## **LISTA DE SIGLAS**

AAB – Bactérias ácido acéticas

ABKOM – Associação Brasileira de Kombucha

KBI - *Kombucha Brewers Association*

SCOBY – Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras

pH – Potencial Hidrogeniônico

g / L – Grama por Litro

ABV – Álcool por Volume

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PIQ – Padrão de Identidade e Qualidade

μL – Microlitro

mM – Milimolar

KCl – Cloreto de Potássio

HCl – Ácido clorídrico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Método de preparo da kombucha.....	20
<b>Figura 2.</b> Matriz de matérias-primas aplicadas no preparo de bebidas à base de kombucha.....	23
<b>Figura 3.</b> Processo de elaboração da kombucha saborizada com abóbora.....	36
<b>Figura 4.</b> Pesagem de ingredientes para a 1ª fermentação da kombucha.....	37
<b>Figura 5.</b> Ingredientes homogeneizados prontos para a 1º fermentação.....	38
<b>Figura 6.</b> Superfície de contorno obtida a partir da análise do teor alcoólico para a otimização da produção e saborização da kombucha.....	39
<b>Figura 7.</b> Superfície de contorno obtida a partir da análise da acidez total para a otimização da produção e saborização da kombucha.....	43
<b>Figura 8.</b> Gráfico da análise do teor de compostos fenólicos de diferentes preparações de kombucha durante 60 dias.....	48
<b>Figura 9.</b> Gráfico da análise de Flavonóides totais de diferentes preparações de kombucha durante 60 dias.....	48
<b>Figura 10.</b> Gráfico da análise de Carotenoides de diferentes preparações de kombucha sem adição de abóbora (C0), kombucha com adição de abóbora (C4) e kombucha com adição de abóbora e açúcar (C8) durante 60 dias.....	51
<b>Figura 11.</b> Gráfico da análise de ABTS de diferentes preparações de kombucha durante 60 dias.....	53

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Níveis decodificados das variáveis independentes.....	37
<b>Tabela 2.</b> Compostos bioativos da kombucha sem adição de abóbora (C0) durante 60 dias de fermentação.....	46
<b>Tabela 3.</b> Compostos bioativos da kombucha com adição de abóbora (C4) durante 60 dias de fermentação.....	47
<b>Tabela 4.</b> Compostos bioativos da kombucha com adição de abóbora e açúcar (C8) durante 60 dias de fermentação.....	47
<b>Tabela 5.</b> Caracterização das amostras de Kombuchas comercializadas em Pernambuco.....	56
<b>Tabela 6.</b> Recomendações de temperatura de armazenamento dos rótulos de kombuchas comercializados em Recife - PE.....	59
<b>Tabela 7.</b> Análise de rótulos de kombuchas segundo as legislações vigentes.....	59
<b>Quadro 1.</b> Parâmetros físico-químicos da kombucha conforme IN 1/2019.....	30
<b>Quadro 2.</b> Parâmetros físico-químicos da kombucha conforme Código de Práticas de Kombucha (KBI) .....	31
<b>Quadro 3.</b> Parâmetros microbiológicos da kombucha conforme Código de Práticas de Kombucha (KBI) .....	31
<b>Quadro 4.</b> Parâmetros de Conformidade de Etanol por País.....	32

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. PROBLEMA DA PESQUISA E HIPÓTESE.....	17
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4.1 Kombucha e sua história.....	18
4.2 Métodos de preparo e microbiota da bebida fermentada.....	18
4.3 Composição Química.....	26
4.4 Marco Regulatório.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1 Amostras.....	35
5.2 Preparo da kombucha para fermentação.....	36
5.3 Saborização da kombucha.....	36
5.4 Desenho experimental para otimização da formulação com adição de abóbora .....	37
5.5 Estudo de estabilidade.....	37
5.6 Métodos de análises.....	38
5.6.1 Espectrofotometria.....	38
5.6.2 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	38
5.6.3 Determinação de flavonoides totais.....	38
5.6.4 Determinação de carotenoides totais.....	39
5.6.5 Atividade antioxidante total por ABTS.....	39
5.7 Caracterização Físico-química.....	40
5.8 Análises estatísticas.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
6.1 Planejamento Fatorial.....	41
6.2 Kombucha e IN 41/2019.....	44
6.3 Estudo de Estabilidade.....	45
6.3.1 Fenólicos e Flavonoides.....	45
6.3.2 Carotenoides.....	51
6.3.3 ABTS.....	53
6.4 Avaliação de rótulos das kombuchas.....	55
7. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida milenar, à base de chá das folhas de *Camellia sinensis* adicionado a uma cultura *starter*, contendo um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras (SCOBY) (COELHO *et al.*, 2020). Nesta fermentação, usa-se comumente o chá verde ou preto como meio de cultura, açúcar como fonte de carbono e tem-se como produto e subprodutos da fermentação: álcool, ácido acético, alguns compostos nutricionais e bioativos e gás carbônico (LIU *et al.*, 2020).

E ainda, de acordo com IN 41/2019 (MAPA) a kombucha é uma bebida fermentada que pode ser considerada alcoólica quando houver acima de 0,5% de álcool na bebida. Pode ser aromatizada, se houver a adição de ingredientes, como por exemplo, as frutas e gaseificadas, quando é acrescentado gás carbônico na bebida.

As principais ações biológicas descritas na literatura da kombucha incluem as atividades antioxidante, antimicrobiana, anticarcinogênica e antidiabética (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016). Tais benefícios estão associados à presença de microrganismos probióticos, compostos fenólicos, ácidos glucônico, glucurônico e lático, todos provenientes do processo fermentativo (JAYABALAN *et al.*, 2007), flavonoides com alta biodisponibilidade (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016) e vitaminas C, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub> (MOHAMMADSSHIRAZI *et al.* 2016) e, mais recentemente, a vitamina B<sub>9</sub> (KHAN, 2020).

Outras Propriedades terapêuticas relacionadas ao consumo da kombucha também foram descritas. Como a diminuição da progressão de esclerose múltipla (MARZBAN *et al.*, 2015), efeitos hipercolesterolêmicos em ratos (BELLASSOUED *et al.*, 2015), assim como, a inibição do crescimento *in vitro* das bactérias patogênicas incluindo *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Agrobacterium tumefaciens* (STEINKRAUS *et al.*, 1996).

A saborização da bebida é a segunda etapa na fabricação da kombucha, após o processo fermentativo inicial. Em geral, são utilizadas frutas cítricas, contudo, considerando o potencial funcional da bebida, é possível acrescentar alimentos com reconhecido valor nutricional, a exemplo da abóbora. A abóbora da família Cucurbitácea possui importância nutricional, principalmente na disponibilidade de carotenoides pró-vitâmicos, que pode servir como fonte de vitamina A para populações, considerando os aspectos nutricionais, econômicos e sociais (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

A abóbora tem sido usada como saborizante em estudos com kefir de água (KOH *et al.*, 2018), leite de búfala (PATEL *et al.*, 2020), bebida láctea a base de abóbora (DHIMAN *et al.*, 2017), e suco fermentado de abóbora (NOVELINA *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2015), demonstrando ser uma alternativa interessante para a formulação de bebidas e com boa aceitação sensorial (DHIMAN *et al.*, 2017; KOH *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2020). Entre os benefícios do processo fermentativo na presença deste fruto está em beneficiar a multiplicação de microrganismos do gênero *Lactobacillus* (ESCALADA-PLA *et al.*, 2019).

Com a popularização do consumo de kombucha nas últimas décadas, muitos cultivos artesanais passaram a ser desenvolvidos, porém nem sempre elaborados em condições controladas e adequadas. Essa elevada demanda de mercado impulsionou a padronização do processo de produção por meio da Instrução Normativa N° 41 de 2019 (MAPA, 2019). Contudo, pouco se sabe sobre a estabilidade dos compostos bioativos ao longo da vida de prateleira do produto, por isso a importância de investigar o comportamento dos mesmos.

## **2. OBJETIVOS**

### **Geral**

Investigar a estabilidade química de compostos bioativos em kombucha de chá verde (*Camellia Sinensis*) saborizada com abóbora (*Cucurbita moschata*) durante o armazenamento.

### **Específicos**

- Avaliar os parâmetros analíticos para kombucha de acordo com a Instrução Normativa nº 41/2019 do MAPA;
- Desenvolver uma kombucha saborizada com abóbora (*Cucurbita moschata*);
- Determinar o *shelf life* da kombucha saborizada com abóbora (*Cucurbita moschata*);
- Determinar a estabilidade química dos compostos bioativos;
- Relatar a vida de prateleira e recomendações de armazenamento encontradas nos rótulos de kombuchas comercializadas em Recife - PE.

### **3. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE**

#### **Problema de Pesquisa**

A kombucha saborizada com abóbora apresenta os parâmetros analíticos de acordo com a Instrução Normativa nº 41/2019 do MAPA? Ao final do processo fermentativo terá quantidade significativa de carotenoides, fenólicos, flavonoides em sua composição? Estes compostos serão preservados no produto durante a vida de prateleira de 60 dias?

#### **Hipótese**

Considerando o processo de elaboração, é possível afirmar que o produto atenderá aos requisitos da legislação vigente. Tendo em vista, que a abóbora é um alimento rico em carotenoides e que já foi identificado carotenoides na kombucha sem adição de abóbora, supõe-se que adição de abóbora contribuirá com o um aumento no quantitativo de carotenoides e que terá folatos também na sua composição. Embora os compostos bioativos sejam sensíveis ao processo fermentativo, acredita-se que carotenoides sofrerão reduções pequenas durante o estudo de estabilidade, por ser mantido em refrigeração por até 60 dias.

## **4. REVISÃO DA LITERATURA**

### **4.1. Kombucha e sua história**

Estudos relatam que o consumo do chá teve origem na China, aproximadamente 200 anos antes de Cristo, era uma bebida muito valorizada pela realeza daquela época deixando de ser apenas uma mistura medicinal amarga para tornar-se uma bebida estimulante e saudável. Após este marco, sabe-se que a cultura do consumo dessa bebida, foi passada de uma dinastia para outra, entre elas: Zhou, Qin, Tang, Song e Ming. Foi ganhando espaço na cultura chinesa (CHEIN,2002; DUFRESNE & FARNWORTH, 2000; HEISS & HEISS,2007).

Um fato importante em meados de 414 d.C, é quando um médico chamado Dr. Kombucha teria tratado os problemas digestivos do imperador japonês através da ingestão de um chá fermentado, que recebeu o nome de kombucha em sua homenagem. Além disso, a expansão de rotas comerciais, contribuiu com a popularidade da bebida (DUFRESNE & FARNWORTH, 2000; KAUFMANN,2013).

No início do século XX, a bebida foi exportada para países como Mongólia, Rússia e Polônia, com o passar dos anos, em períodos da primeira e segunda guerra mundial já era conhecida em países como: Alemanha, Itália, Espanha, França e África. Em 1960, pesquisadores suíços relataram que a kombucha era tão benéfica quanto o iogurte, aumentando mais sua popularidade (JAYABALAN *et al*,2014; KAUFMANN, 2013).

Ao longo do tempo, a bebida foi sendo aprimorada e adaptada por outras culturas, com a descoberta dos seus benefícios tornou-se, ainda mais, popular. Hoje é possível encontrá-la com variações de cores e sabores para alcançar mais consumidores.

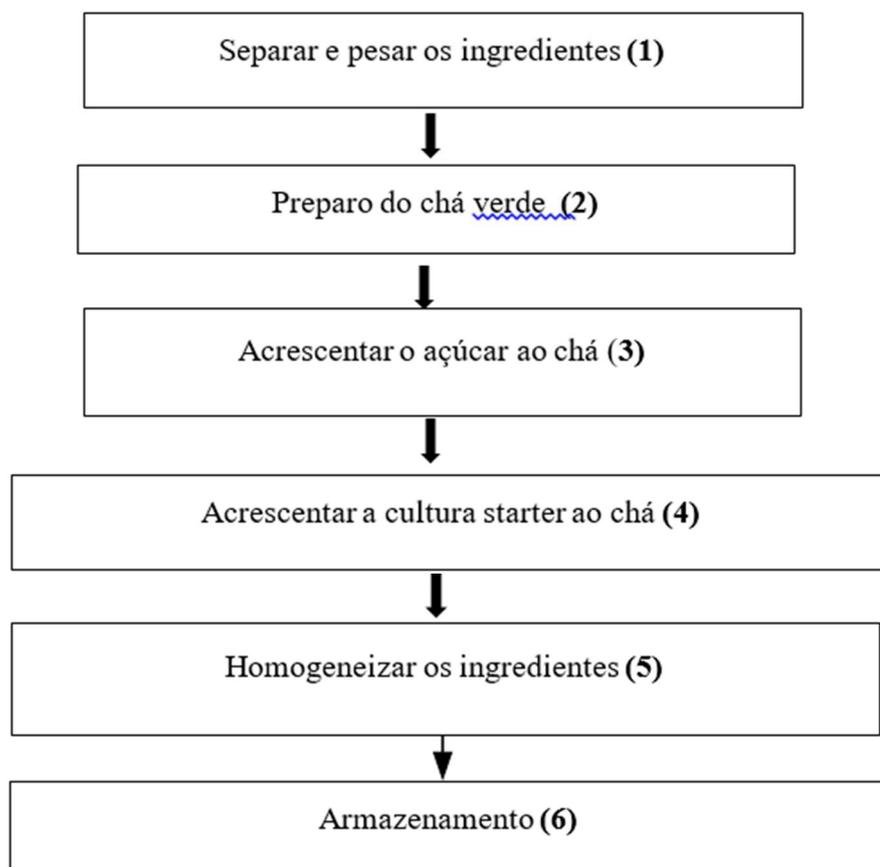
### **4.2 Métodos de preparo e microbiota da bebida fermentada**

A kombucha é uma bebida obtida, tradicionalmente, da fermentação do chá de *Camellia sinensis* (verde ou preto) adoçado, e adicionado a uma cultura simbiótica, com duração média de 7 a 12 dias, em temperatura ambiente (28°C - 30°C), protegida de luz solar. Em seguida, é armazenada sob refrigeração para consumo. A bebida pode sofrer variações nas proporções de chá e açúcar, de acordo com as preferências do consumidor, em relação ao tempo e temperatura. Embora apresente variações no preparo da bebida, de uma forma geral, é utilizado em média 1-5% de chá (p/v), 5 - 15% de açúcar (p/v) e 10 - 20% da cultura starter, que é uma porção de chá fermentado

com parte da película de celulose (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016; SANTOS, 2016; COELHO,2020).

No preparo, a água é aquecida até atingir 90° C, em seguida é adicionado o chá, onde ocorre a infusão por 20 minutos, deixa-se o chá esfriar até atingir a temperatura ambiente (25° C - 28° C), dissolvendo o açúcar, por fim acrescenta-se a cultura starter. A solução deve ser incubada em recipiente fermentador, coberto com tecido/papel que permita a entrada de ar, armazenado em ambiente sem agitação na temperatura entre 20°C - 30°C para favorecer o processo fermentativo, finalizada a fermentação (7-12 dias) a bebida deve ser filtrada e conservada sob refrigeração em recipiente fechado. O processo de preparo requer cuidados especiais, com o objetivo de assegurar a segurança do produto final, evitando contaminação cruzada do início ao fim da preparação. Dentre os cuidados, está a higiene dos utensílios e ambiente e origem dos ingredientes utilizados (COELHO *et al.*, 2020; KHAN, 2020; SANTOS, 2016; SUHRE, 2020).

**Figura 1.** Método de preparo da kombucha.



Fonte: KHAN e colaboradores, 2020.

A cultura *starter* da kombucha é composta por um líquido e um disco de celulose. O disco, por sua vez, contém bactérias e leveduras, que são responsáveis por realizar a fermentação da bebida. Esses microrganismos possuem ação simbiótica com capacidade de reduzir a ação de bactérias contaminantes. A composição desta cultura é variável, pois depende da sua origem e condições aplicadas no processamento da mesma (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014; SANTOS, 2016)

No processo fermentativo, cada um desses microrganismos tem um papel específico. Dessa forma, as leveduras atuam na hidrólise da sacarose, através de ação da enzima invertase, produzindo ao final etanol e CO<sub>2</sub>. De uma forma geral, *Saccharomyces spp.* usam glicose e produzem etanol via glicólise, enquanto *Zygosaccharomyces spp.* produzem EtOH de forma mais eficiente a partir da frutose. Em contrapartida, este etanol produzido é utilizado pelas bactérias (acéticas) no seu crescimento, bem como, na produção de mais ácido acético. No metabolismo das

bactérias a glicose é convertida em ácido glucorônico e frutose em ácido acético e os compostos gerados nesta atividade possuem ação antimicrobiana (ANTOLAK, PIECHOTA E KUCHARSKA, 2021; SANTOS, 2016)

Embora exista uma diversidade de microrganismos presentes na bebida, alguns estudos já relataram as principais bactérias e leveduras presentes na kombucha. Dentre as leveduras estão *Zygosaccharomyces spp*, *Candida spp*, *Kloeckera spp*, *Hanseniaspora spp*, *Torulaspora spp*, *Pichia spp*, *Brettanomyces spp*, *Dekkera spp*, *Saccharomyces spp*, *Lachancea spp*, *Saccharomycoides spp*, *Schizosaccharomyces spp* e *Kluyveromyces spp*. No que diz respeito à composição bacteriana, os gêneros mais encontrados são as bactérias do ácido acético. Espécies como *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* já foram reportadas e cepas do gênero *Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp* e *Bifidobacterium spp* (COTON *et al.*, 2017; FILIPPIS *et al.*, 2018; JAYABALAN *et al.*, 2014; MARSH *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2016).

Um estudo que analisou 34 discos de celulose de diferentes origens, isolou leveduras do gênero *Brettanomyces*, nomeadamente *B. lambicus* em 56% das amostras, e dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* em 29% e 26%, respectivamente. Alguns destes discos continham leveduras dos gêneros *Kloeckera* e *Hanseniaspora* e leveduras formadoras de películas como *Candida krusei* e *Issatchenkia occidentalis/orientalis*. Com isto, é possível perceber a presença significativa de um pequeno grupo de levedura atuando na formação do disco. Além disso, estudos relatam que a bactéria mais presente neste processo é a *Gluconacetobacter xylinus* (MAYSER, LEITZMANN E GRÜNDER;1995; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Marsh e colaboradores (2014), analisaram amostras de 5 regiões diferentes, em dois tempos (0 e 10 dias) e identificaram, que em todas as amostras a bactéria *Gluconacetobacter*, aumentando a quantidade, com a evolução da fermentação, inclusive no disco. Além disso, foi reportada a presença de pequenas quantidades de *Lactobacillus* e *Acetobacter*, na maioria das amostras. Pequenas quantidades de bactérias como: *Leuconostoc*, *Allobaculum*, *Ruminococcaceae Incertae Sedis*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Thermus*. Mas essas foram associadas a possíveis falhas de higiene no processamento da bebida.

Sabe-se que essa variação de perfil na microbiota da kombucha é influenciada por vários fatores. Neste sentido, Filippis *et al.* (2018) pesquisaram sobre influência

da temperatura no perfil microbiológico da bebida, comparando a microbiota de kombuchas fermentadas a 20 e 30 °C, foi observado que a mudança de temperatura não interferiu na quantidade de bactérias ácido acéticas (AAB), como também a presença de *Gluconacetobacter* e *Acetobacter*, que permanecem presentes até o 7º dia de fermentação, após esse período *Gluconacetobacter* torna-se mais predominante, e percebe-se diferenças significativas dessa espécie.

Ou seja, em kombuchas fermentadas a 20 °C foi encontrado maior quantidade de *Gluconacetobacter xylinus* e a 30 °C predominância de *Gluconacetobacter saccharivorans*. Esse aumento da temperatura também promoveu crescimento de bactérias como: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium* (FILIPPIS *et al.*, 2018).

Em contrapartida, uma pesquisa que avaliou 15 marcas comerciais, eles reportam que as amostras não apresentavam um padrão predominante, no entanto, elas apresentavam sempre duas a três bactérias predominantes em cada bebida avaliada. Observou-se a predominância de espécies como: *Lactobacillus*, *Komagataeibacter*, *Bacillus* e *Zymomonas*. A pesquisa também enfatizou que bebidas à base de chá verde apresentam a maior quantidade de bactérias ácido lácticas, enquanto que o chá preto vai conter mais bactérias ácido acéticas. Quanto as leveduras, todas pertenciam à ordem *Saccharomycetales*, principalmente ao gênero *Dekkera/Brettanomyces*, no qual a maioria das amostras apresentaram predominância de *Dekkera anomala* e *Dekkera bruxellensis*. O estudo ainda reforça sobre a diversidade encontradas nas bebidas e a dificuldade de uma padronização, ainda que sejam amostras diferentes do mesmo fabricante (ANDRESON *et al.*, 2020).

Sabe-se que a kombucha possui uma grande variação no perfil microbiológico presente na cultura simbiótica que pode variar de acordo com a temperatura, os insumos, forma de preparo e armazenamento. O pH é um indicador importante, pois pH ácido impede o crescimento de microrganismos patogênicos, garantindo a segurança do produto final (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COTON *et al.*, 2017; SUHRE, 2020).

Diante dos achados, conclui-se que a kombucha apresenta um perfil microbiológico variado, mas com predominância de algumas bactérias e leveduras. É possível afirmar que, essa microbiota é influenciada por diversos fatores e que essa variação interfere diretamente nas características sensoriais e na sua composição

química. Portanto, conhecer os microrganismos presentes e a maneira como ajustá-los é importante para que seja possível chegar mais próximo de padrões industriais.

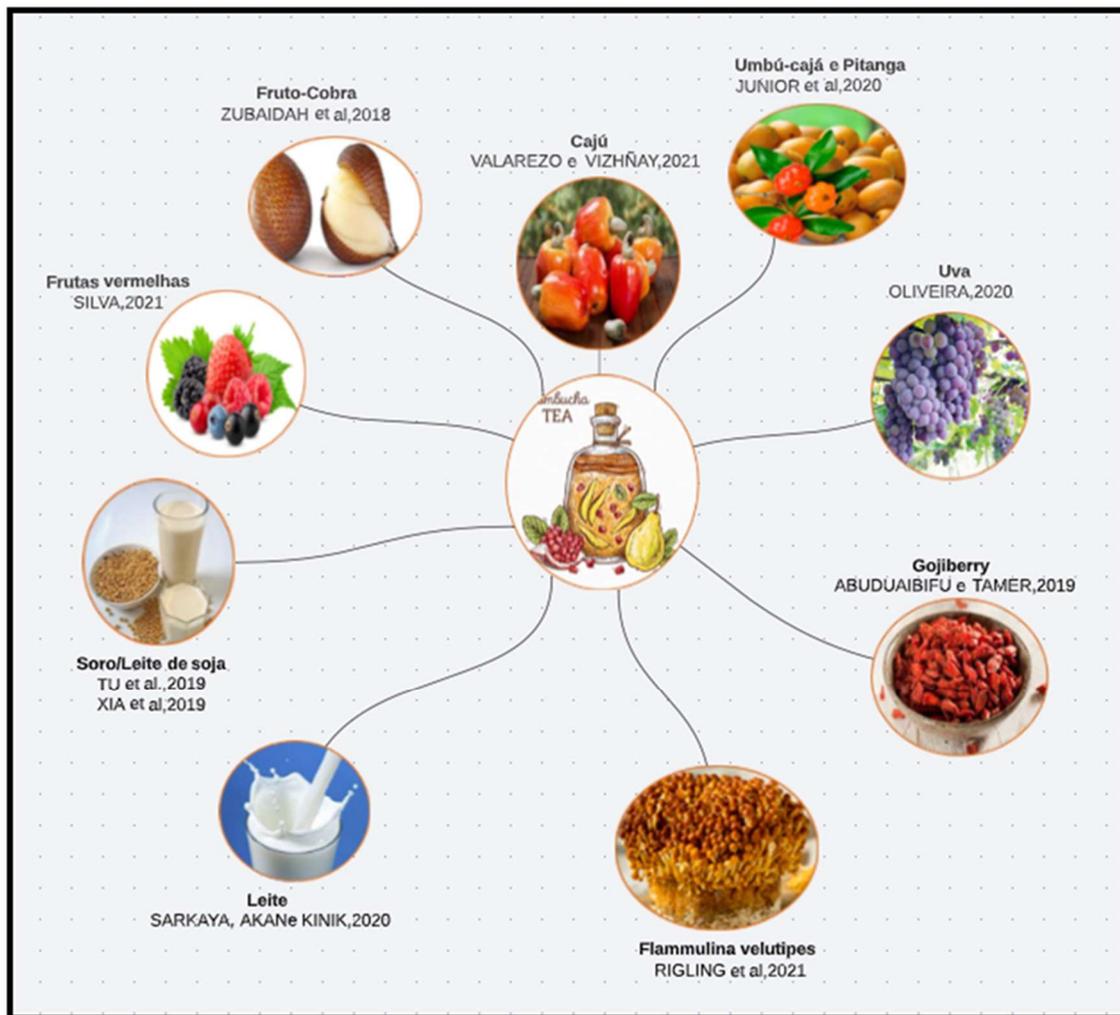
No processo de fermentação ocorre a mudança de características sensoriais. Na kombucha essa alteração acarreta um sabor doce e levemente ácido. Com o objetivo de melhorar o sabor e ampliar o consumo da bebida, muitos estudos vem apresentando estratégias de ajustes no sabor e melhora na composição nutricional. Nesta etapa, ocorre uma segunda fermentação, com o objetivo de melhorar as características sensoriais, provocando a carbonatação, ajustando o sabor através da adição de sucos, frutas, vegetais, especiarias e açúcar, se for da preferência (SANTOS,2016; SUHRE, 2020).

Nesse caso, após a adição do ingrediente escolhido a kombucha da primeira fermentação, a bebida deve ser envasada em garrafa de plástico ou vidro, bem higienizada e vedada, sendo armazenada em temperatura ambiente por 1 a 3 dias, dependendo do ingrediente utilizado, sendo refrigerada ao término desse processo. Os ingredientes adicionados nesta etapa, além de contribuir no sabor e valor nutricional, aceleram a carbonatação, conferindo a bebida maior refrescância e gás, apresentando uma característica próxima do refrigerante. (JUNIOR *et al*, 2020; ABUDUAIBIFU & TAMER;2019; RIGLING, 2021).

As frutas estão entre os principais saborizantes utilizados na kombucha devido ao sabor, potencial de fermentação, e pela presença de compostos bioativos importantes para a saúde. Junior e colaboradores (2020) desenvolveu formulações com umbu-cajá e pitanga, o produto apresentou melhoras nas suas características químicas e bioativas, além do sabor mais doce, apresentando opções para esta tendência de bebidas.

A expansão na produção de novas bebidas à base de kombucha é veloz, sendo uma inovação importante que contribui no aumento do consumo pela população. É possível encontrar produtos com uma composição nutricional rica e com os mais diversos sabores, sendo a sua maioria doce, azedo e frutado (JUNIOR *et al*,2020; RIGLING *et al*, 2021), conforme apresentado na figura 2.

**Figura 2.** Matriz de matérias-primas aplicadas no preparo de bebidas à base de kombucha.



Fonte: o autor.

Além das frutas, matérias-primas como o leite tem sido utilizada por ser reconhecidamente um meio de cultura rico para fermentação. Diante desse potencial, foram desenvolvidas 03 (três) formulações combinando leite e kombucha, numa proporção de 60:40, adicionando chá verde, sálvia ou amora. O produto final apresentou características sensoriais satisfatórias, a formulação com amora obteve maior aceitabilidade, porém o estudo alertou que o tempo de prateleira prolongado pode alterar o sabor de forma negativa, recomendando reduzir a proporção de leite, neste caso. (SARKAYA, AKANE e KINIK, 2020).

Com o objetivo de eliminar o sabor de chá verde na bebida, foi realizado um estudo (RIGLING *et al*, 2021) com uma variedade de fungos. Das 29 espécies utilizadas a *Flammulina Velutipes* (enokitake) foi considerada como a espécie ideal devido ao seu sabor atraente de nozes e chocolate, além de fermentar rapidamente. A saborização tem sido muito utilizada para ampliar o consumo da kombucha. Porém, as

matérias-primas alternativas para este processo ainda são pouco exploradas, apesar de haver muitas pesquisas recentes, testando novas formulações (FREITAS, SOUSA e WURLITZER, 2022).

Considerando o papel funcional da bebida, é possível acrescentar alimentos com reconhecido valor nutricional, a exemplo da abóbora. A família *Cucurbitácea* possui importância nutricional, principalmente na disponibilidade de carotenoides pró-vitamínicos, que pode servir como fonte de vitamina A para populações e abrangendo os aspectos nutricionais, econômicos e sociais (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

A abóbora está entre as cinco hortaliças que são mais produzidas no Brasil, totalizando uma produção de mais de 550 mil toneladas/ano. O seu cultivo é feito em todos os Estados brasileiros, destacando-se os estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Maranhão, Pernambuco e Rio Grande do Sul. No qual Pernambuco contribuiu com mais de 6 mil toneladas. Em sua composição, possui carboidratos em forma de fibras em torno (1,16%) que contribui no processo fermentativo de bebidas. (AMARO *et al.*, 2021; NOVELINA; FIANA e YANI, 2020).

Diante desse volume de produção, as principais espécies: *Cucurbita moschata* e *Cucurbita maxima*, produzidas em sua maioria por pequenos agricultores, considerado um produto de baixo custo de produção e com aspectos nutricionais relevantes, ainda é um produto que possui pouca variedade de produtos para consumo. A abóbora pode ser um ingrediente adicional de produtos como: bebidas, bolos, doces, biscoitos, entre outros. Um dos formatos que pode facilitar esta incorporação na industrial é o purê de abóbora, obtido por meio de esterilização comercial da polpa de abóbora, por ser considerado produto com valor agregado (PROVESI, 2011; MOURA, 2015).

Diante desse cenário, é importante destacar que o Brasil, ainda possui um número elevado de deficiência de vitamina A, sendo assim considerado um problema de saúde pública, principalmente na Região Nordeste e algumas cidades do Sudeste e Norte. Na Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (2006) no qual foi desenhado o perfil de crianças menores de cinco anos e da população feminina em idade fértil no Brasil, foram observados níveis baixos de vitamina A nesses dois grupos. Sendo a maior prevalência em crianças da região Nordeste (19,0%) e Sudeste (21,6%) do país (BRASIL, 2009).

Belfort e colaboradores (2022) estudaram a prevalência de deficiência de vitamina A em crianças e adolescentes avaliando a existência de cegueira noturna e o consumo alimentar pelo registro alimentar de três dias. Identificaram a tendência de associação da deficiência de vitamina A com o menor consumo alimentar de vitamina A e associada a deterioração pulmonar. Além disso, os resultados mostram que os suplementos calóricos-proteicos, contribuíram, em média, com 39% da ingestão alimentar de vitamina A e o suplemento medicamentoso contribuiu, em média, com 74% na ingestão total diária de vitamina A. Ou seja, o consumo dessa vitamina através dos alimentos é considerado baixo.

A abóbora tem sido aplicada como saborizante em estudos com kefir de água (KOH *et al.*, 2018), leite de búfala (PATEL *et al.*, 2020), bebida pronta para servir a base de abóbora (DHIMAN *et al.*, 2017), e suco fermentado de abóbora (NOVELINA *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2015), demonstrando ser uma alternativa interessante para a formulação de bebidas e com boa aceitação sensorial (DHIMAN *et al.*, 2017; KOH *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2020). Entre os benefícios do processo fermentativo na presença deste fruto está em beneficiar a multiplicação de microrganismos do gênero *Lactobacillus* (ESCALADA-PLA *et al.*, 2019).

Considerando a necessidade da população de baixa renda brasileira em ter acesso a alimentos de baixo custo com conteúdo de micronutrientes biodisponíveis significativos, contribuindo no seu estado nutricional, é necessário o desenvolvimento de novos produtos que contemplem elevados teores de carotenoides totais ( $\beta$ -caroteno, principalmente), ofertando a população uma diversidade de produtos que atendam a sua necessidade, bem como colaborando com a segurança alimentar e nutricional.

### **4.3 Composição Química**

Estudos mostram que o consumo da Kombucha apresenta benefícios à saúde, e isso está relacionado com os compostos que são produzidos no processo fermentativo, entre eles: ácidos orgânicos, vitaminas e polifenóis. Essa composição pode variar de acordo com o perfil do disco de celulose, insumos utilizados na fermentação, tempo e temperatura aplicada na infusão (KAPP; SUMNER, 2019; JAYABALAN *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2019).

Parte dos compostos bioativos presentes na kombucha, são obtidos através da composição do substrato. Neste sentido, a bebida pode ser obtida utilizando chá preto ou chá verde, em sua maioria. No qual são utilizadas as folhas da planta da espécie

*Camelia sinensis*, submetidas a processamentos que modificam também a composição da folha. (CARDOSO *et al.*, 2020).

Deste modo, no processamento do chá verde são utilizadas folhas frescas da planta, com isso, é preservado o teor de polifenóis, ou seja, apresentam maior concentração de catequinas e outros compostos, em comparação com outros chás. Em contra partida o chá preto é obtido a partir de folhas, que passaram por fermentação, sofrem um tipo de oxidação, no qual as catequinas serão transformadas em teaflavinas e tearubiginas, os principais compostos polifenólicos presente no chá preto (CARDOSO *et al.*, 2020).

Nessa perspectiva, foi avaliado a influência de vários parâmetros que podem influenciar o potencial antioxidante, pH, bem como o teor de ácido acético, álcool ou açúcar em kombuchas produzidas a partir dos chás preto, branco, verde e vermelho. A pesquisa afirma que o chá verde pode ser considerado uma fonte de antioxidantes, contendo polifenóis, incluindo flavonoides. Reforça que a mudança desse substrato, altera a composição química do produto final, como também o processo fermentativo e perfil microbiológico, que exercem papel importante no aumento das propriedades antioxidantes. Vale salientar que os polifenóis do chá estão presentes na forma de flavonóis, são eles: catequinas entre as quais (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-galato, (-)-epigallocatequina, (-)-epigallocatequina-3-galato e (-)-galocatequina ou seja, as principais catequinas. (JAKUBCZYK *et al.*, 2020; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

Sendo o chá rico em diversos nutrientes, durante o processamento da kombucha, parte desses compostos estarão disponíveis também, na bebida. Miranda e colaboradores (2021) relataram que na composição geral de kombuchas, já foram encontrados compostos como: vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e C), minerais (cobre, ferro, manganês, níquel e zinco), ácidos (acético, glucônico, glucurônico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico e pirúvico) etanol e polifenóis. Ele reforça sobre a importância do conhecimento da composição química da bebida, de modo que as etapas de processamento e armazenamento sejam pensadas e controladas proporcionando um produto final com sua composição preservada, contribuindo também para melhorias contínuas no processo de obtenção da bebida.

Para entender sobre o impacto da temperatura tanto na composição microbiológica e, seu reflexo na composição química. Filippis *et al.* (2018) atribuíram a alteração da quantidade de polifenóis aos microrganismos presentes em fermentações com temperaturas diferentes. Ou seja, a concentração foi maior na bebida obtida com

chá preto fermentado a 20 °C e nas condições a 30 °C esta concentração reduziu em 15 dias. Além disso, foi observado que o ácido glucônico estava em maior quantidade, em comparação com o ácido glucurônico. Curiosamente, ambos ácidos apresentaram maiores concentrações nas amostras fermentadas a 30 °C.

Modulações do tempo de fermentação e armazenamento, também têm sido monitorados, pois pesquisas que avaliaram a estabilidade de polifenóis, ácidos orgânicos e vitaminas em kombuchas, revelam que durante a fermentação, essas substâncias sofrem alterações significativas, devido aos picos de atividade metabólica dos microrganismos e no armazenamento prolongado, mesmo que em temperatura controlada, existe uma tendência de redução dos compostos. Assim sendo, pode-se dizer que a composição química da bebida é instável. (JAKUBCZYK *et al.*, 2020; JUNIOR *et al.*, 2021; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016)

Visando uma bebida mais robusta, algumas pesquisas têm inserido componentes que enriquecem o teor nutritivo das kombuchas. Seguindo esse conceito, foi avaliada kombuchas adicionadas de umbu-cajá e pitanga, no qual foi observado que a presença de terpenos, que por sua vez, contribuiu para o aumento de terpenoides no produto final. Além disso, aumentou a atividade antioxidante, tendo como principais fenólicos o galato de epigallocatequina (63%), e mais os mais bioacessíveis foram ácidos caftárico, catequina e hesperidina. Por serem compostos que apresentam papel significativo tanto nas características sensoriais como em benefícios a saúde. É interessante mantê-los presentes no produto final. Mas, a pesquisa mostrou que o tempo de fermentação favoreceu a redução na concentração desses compostos. Ou seja, reforçam instabilidade dessas substâncias. (JUNIOR *et al.*, 2021)

As etapas de processamento e armazenamento de uma kombucha requer bastante atenção, devido a sua sensibilidade. Com isso, vários parâmetros interferem na composição final do produto, como citado anteriormente. No qual, o tempo e temperatura podem influenciar no conteúdo de compostos bioativos e potencial antioxidante, de modo que, a temperatura empregada no aquecimento da bebida interfere, por exemplo, na extração de catequinas. Já que o tempo de infusão é crucial na extração dos compostos bioativos. (ZHAO *et al.*, 2019; PEREZ-BURILLO *et al.*, 2018; ZENG *et al.*, 2017)

Analisando a composição química de marcas de kombuchas comerciais foram encontradas composições bem diferentes, até mesmo em produtos de mesma marca, observou-se que as amostras analisadas continham alta concentração de etanol e ácido

acético, vale salientar que este ácido é fundamental no início da fermentação, para inibir o crescimento de bactérias patogênicas. Também foi relatado que o alto teor de etanol, pode estar relacionado ao armazenamento do produto. O artigo cita que essas mudanças na composição causaram impacto nas características sensoriais das bebidas. (ANDRESON *et al*, 2022).

O etanol é um composto produzido a partir da fermentação, e na obtenção da kombucha, é um parâmetro importante para classificar a kombucha em alcóolica ou não-alcóolica. As pesquisas que avaliam o teor de etanol em kombuchas, revelam que o teor de etanol, também apresenta instabilidade nas concentrações, relacionando essa diferença ao tempo de armazenamento, temperatura, quantidade de açúcares, tipo de levedura e tipo de embalagem. (SILVA *et al*, 2021; SANTOS, 2016; SUHRE,2020)

Corroborando essa informação, Talebi e colaboradores (2017) avaliaram o teor de etanol em kombuchas, e relata que o armazenamento refrigerado reduz gradualmente a concentração deste composto, pois a fermentação é contínua. Já Ihsani e colaboradores (2021) relataram que a formação de etanol na kombucha altera com o tempo de incubação e mostraram que o pico de concentração de etanol ocorreu entre os 5º ao 7º dia de fermentação, reduzindo após esse pico.

Khan (2020) acompanhou o valor nutritivo de kombucha produzida com chá verde e identificou presença de folatos (5-metiltetrahidrofolatos), carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos. Foi observado que estes compostos apresentam uma concentração máxima na bebida entre o 7º e 14º dia de fermentação. Ou seja, após esse período a composição química da bebida altera com a redução dos compostos, conforme vai avançando os dias de armazenamento em temperatura ambiente.

Atualmente a kombucha é reconhecida como uma bebida rica em compostos bioativos, principalmente, por seus compostos fenólicos. Percebe-se que há uma instabilidade acerca da manutenção dessas substâncias na bebida. Essas concentrações quando mantidas em quantidades significativas, proporcionam benefícios a saúde quando associadas a consumo frequente.

Embora a bebida tenha muitos benefícios, existem alguns relatos sobre possíveis ocorrências de casos envolvendo tonturas, náuseas, reações alérgicas, icterícia e vômitos, após o consumo de kombucha. Porém, como foram casos isolados, não é possível confirmar que poderiam estar relacionados com uma toxicidade associada ao consumo da bebida. Com o caso de um paciente soropositivo que sofreu uma insuficiência renal com acidose láctica e hipertermia após consumo de kombucha,

é recomendado monitorar o pH e interromper a fermentação caso alcance um pH de 4,2 (JAYABALAN *et al.*, 2014; SRINIVASAN *et al.*, 1997; SUNGHEE KOLE *et al.*, 2009; KOVACEVIC *et al.*, 2014)

Quanto a presença de minerais, é válido a atenção com traços de chumbo, uma vez que já foi identificado em uma amostra analisada, mesmo não sendo em quantidades que tenham potencial de toxicidade, não é recomendado o consumo regular por crianças. Como a bebida também pode apresentar níveis de etanol elevado, também não é recomendado o consumo frequente por grávidas, pacientes imunocomprometidos e crianças (LEAL *et al.*, 2018; SANTOS, 2016).

#### **4.4 Marco Regulatório**

*Kombucha Brewers International* (KBI) é uma associação mundial que surgiu com o objetivo de oferecer suporte para os produtores de kombucha. Criada em 2014, a associação além do suporte técnico, criou a KOMBUCHACUP que ocorreu em março/2022 e tem o propósito de realizar um prêmio de qualidade entre os produtores, valorizando as melhores práticas. No intuito de conscientizar a população sobre os benefícios e consumo de kombucha, a KBI criou o Dia Mundial da Kombucha que é comemorado em 21 de fevereiro, desde 2020 (KBI, 2020).

No Brasil, a Associação Brasileira de Kombucha (ABKOM) fundada em 2018, com o objetivo de fortalecer e proteger os produtores de kombucha do Brasil, além de atuar fortemente na estruturação do regulamento técnico da kombucha, atuam com proporcionando encontros com os produtores para qualificar a categoria. Visando o crescimento da indústria no Brasil, ABKOM e KBI firmaram parceria em março/2023 (ABKOM,2023).

A kombucha é uma bebida que segue num crescente, devido aos seus benefícios variados a saúde. Em 2015, a produção da bebida contribuiu US\$ 600 milhões, e alcançando perto do US \$ 1,8 bilhões até 2020, empregando mais de 5 mil trabalhadores nesta produção nos EUA. No Brasil, embora seja um mercado recente, no ano de 2018 já havia mais de 45 produtores cadastrados na ABKOM, produzindo em torno de 500 mil litros por mês com faturamentos na faixa dos R\$11 milhões. Em 2023, são produzidos mais 1,5 milhões de litros com faturamento acima de R\$ 18 milhões. (KBI, 2018; ABKOM,2023). Com o aumento elevado da produção de kombucha, além da diversidade de produtos e processamento artesanal que implica em riscos para os consumidores, foi necessário à elaboração de normas visando

estabelecer os padrões de identidade e qualidade do produto e normas de processamento, além da obrigatoriedade de registro e rotulagem do produto (SUHRE,2020).

Em 2019, entrou em vigor a Instrução Normativa 41 (MAPA) que regulamenta os padrões de identidade e qualidade das kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil. O documento apresenta além dos parâmetros analítico, os aditivos que podem ser adicionados, informações relevantes para a rotulagem e autoriza o uso de alguns processos tecnológicos, como pasteurização, ultracentrifugação, adição de CO<sub>2</sub>. Com isso, o Brasil, passou a ser o primeiro país a regulamentar a produção e comercialização da Kombucha (BRASIL, 2019).

De acordo com a legislação, a kombucha pode ser classificada em alcoólica ou não alcoólica, conforme apresentado no Quadro 1.

**Quadro 1.** Parâmetros físico-químicos da kombucha conforme IN 41/2019.

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

Fonte: IN nº 41/2019.

No âmbito internacional, a regulamentação da kombucha conta com o Código de Práticas de Kombucha elaborado pela KIB, o documento apresenta regras de Boas Práticas de Fabricação, Padrão de Identidade e Qualidade, parâmetros físico-químicos, microbiológicos e regras para rotulagem do produto. As informações contidas tanto na legislação brasileira quanto no Código de Práticas de Kombucha, apresentam os mesmos parâmetros físico-químicos, apenas concentrações variáveis (KBI, 2022). Vale salientar que para os requisitos de Boas Práticas o documento usa como base a *Food Safety Modernization Act* (EUA,2011). Os parâmetros físico-químicos da kombucha podem ser vistos no quadro 2 e parâmetros microbiológicos no quadro 3 logo a abaixo.

**Quadro 2.** Parâmetros físico-químicos da kombucha conforme Código de Práticas de Kombucha (KBI).

Substância	Fonte	Concentração	Faixa	Comentários
Álcool (ETOH)	Produto final	Em conformidade com os regulamentos locais. Consulte o quadro 4 abaixo para obter detalhes adicionais por país e região.	0,00-3,2% ABV	O etanol no kombucha varia naturalmente de 0-3% ABV.
Acidez Titulável Ácido acético	Produto final	Máximo 2,0%	0,27-2,03%	
pH	Produto final	Máx. 3,8	2,2-3,8	Deve ser inferior a 4,6 para segurança alimentar.

Fonte: KBI, 2022.

**Quadro 3.** Parâmetros microbiológicos da kombucha conforme Código de Práticas de Kombucha (KBI).

Microflora	Fonte	Faixa
Bactérias: Bactérias do Ácido Acético (AAB) <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acetobacter spp</i></li> <li>• <i>Gluconacetobacter spp</i></li> <li>• <i>Komagataeibacter spp</i></li> </ul>	SCOBY	AAB dominante (mais de 50%), também pode conter algumas bactérias lácticas (BAL) em quantidades menos significativas.
Levedura: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Brettanomyces bruxellensis</i></li> <li>• <i>Saccharomyces spp</i></li> <li>• <i>Starmerella spp</i></li> <li>• <i>Zygosaccharomyces spp</i></li> </ul> Pode variar por região	SCOBY	As leveduras variam de acordo com a região e contribuem para o sabor e teor de etanol.

Fonte: KBI, 2022.

O teor de etanol é um parâmetro importante na classificação da bebida, e nesse quesito existe uma variação de acordo com as normas de cada país, visando definir se a bebida é alcoólica ou não, tanto para fins de consumo como para fins de tributação. Na tabela de conformidade de Etanol por país, está descrito o parâmetro aplicado em alguns países, sendo a Colômbia e o México os países que apresentam os maiores percentuais alcóolicos permitidos ficando em torno de 2% (KBI,2022).

Quanto a tributação, os Estados Unidos têm uma lei em processo de aprovação, a Kombucha ACT, que isenta pagamento de imposto sob a produção de kombucha que

apresente teor alcoólico abaixo de 1,25% (%v/v), por se tratar de uma bebida que possui benefícios a saúde (EUA,2020).

**Quadro 4.** Parâmetros de Conformidade de Etanol por País.

<b>País</b>	<b>Nível de etanol para todas as idades</b>	<b>Nível de etanol para rotulagem</b>	<b>Nível de etanol para tributação</b>	<b>Comentários</b>
Estados Unidos	<0,5%	<0,5%	>0,5%	A Lei KOMBUCHA, quando aprovada, mudaria o limite de tributação para 1,25% ABV
Austrália – Nova Gales do Sul, Victoria, Queensland	<0,5%		>0,5%	
Austrália – Austrália Ocidental, Austrália Meridional, Tasmânia	<1,15%		>1,15%	
Canadá – Alberta, British Columbia, Manitoba,	<1,1%	<1,1%	>1,1%	,
Canadá – Nova Escócia, Ontário, PEI, Quebec, Saskatchewan	<0,5%	<0,5%	>0,5%	
Europa – Bélgica	<0,5%			
Europa – Dinamarca,	<1,2%	<1,2%	>1,2%	

Lituânia, Luxemburgo, Eslovênia, Espanha				
Europa – Finlândia	< 1,2%	< 1,2%	>2,8%	1,2-2,8% pagam impostos pelo álcool, mas ainda são consideradas bebidas “não alcoólicas” – nenhum marketing é permitido para bebidas alcoólicas, a menos que abaixo de 2,8%
Europa – Eslováquia	<0,75%			
México	<2,0%			
Nova Zelândia	<1,2%			
América do Sul – Colômbia	<2,5%			

Fonte: KBI, 2022.

Devido a importância de controle do teor de Etanol, a KBI, considerou importante a validação de uma metodologia de teste de Etanol junto a AOAC, sendo aprovada em 2019 a Microextração em fase sólida em *headspace* e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa, como análise padrão para esta avaliação (KBI,2020).

Embora seja uma bebida milenar, os anos 2000 trouxe a importância da bebida para a saúde, apresentando estratégias para aumentar o consumo. Esse crescimento foi acompanhado da necessidade de regulamentar o produto, fortalecendo as práticas de

produção, passando mais segurança ao consumidor, que dispõe de um produto rotulado.

Considerando o histórico da bebida, sua importância para a saúde e o potencial tecnológico a ser explorado, percebe-se a necessidade de ampliar ainda mais as pesquisas para entender se o perfil de produto encontrado no mercado atende às exigências da legislação vigente, buscando soluções para ajustar esses produtos aos padrões regulamentados. Além disso, é importante conhecer a composição química da bebida e como esses compostos reagem durante o tempo de armazenamento e sua influência na qualidade do produto final, tanto no aspecto sensorial quanto na composição nutricional.

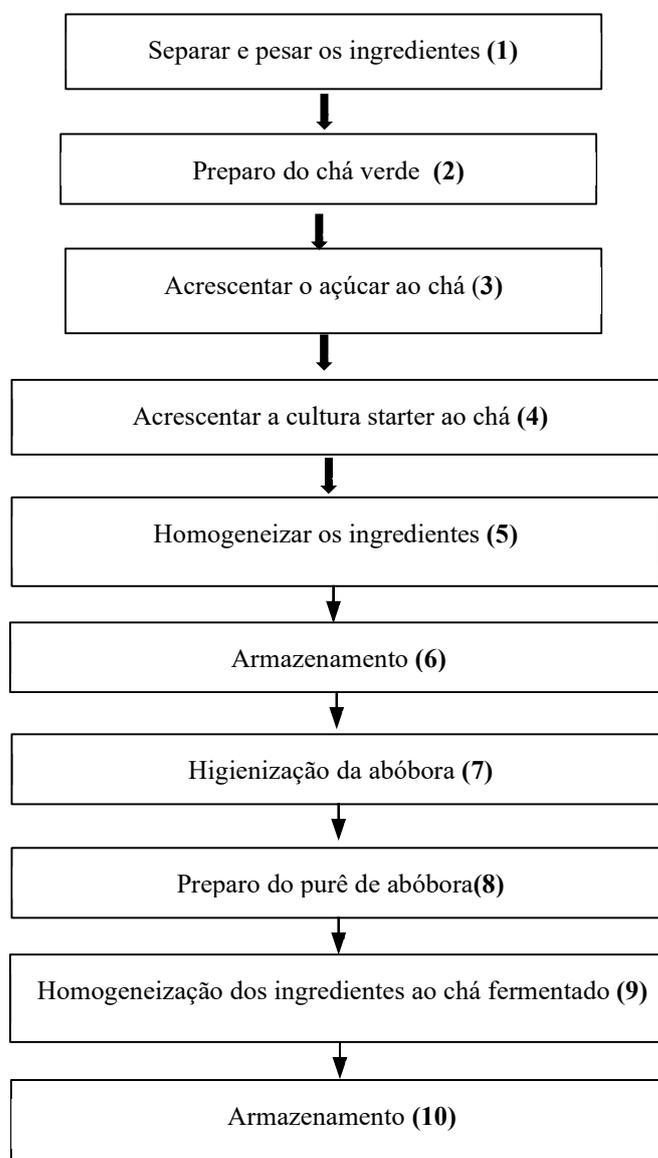
Dessa forma, se faz necessário desenvolver estratégias que contribuam para aumentar ainda mais o consumo da bebida, sobretudo ofertando opções que possam suprir necessidades específicas, como é o caso da vitamina A e dos antioxidantes. Enfatizando, o consumo de produtos regionais, visando à contribuição nutritiva para o produto como também a valorização da agricultura local.

## 5.MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção e Manutenção da Kombucha (SCOBY)

As culturas iniciadoras de kombucha foram obtidas a partir de produtores locais, e utilizadas no cultivo da kombucha experimental, esta etapa foi realizada no Laboratório de Técnica e Dietética do Departamento de Ciências do Consumo da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Sede, sob condições controladas de tempo (12 dias) em temperatura ambiente (25 °C) O fluxograma de processamento da kombucha está apresentado na figura 3.

**Figura 3.** Processo de elaboração da kombucha saborizada com abóbora.



Fonte: o autor

## 5.2 Preparo da primeira fermentação

Para o preparo do chá fermentado foram aquecidos 1 L de água filtrada até atingir a temperatura de 90 °C. Em seguida, adicionados 10g (1%) do chá verde (*Camellia sinensis*) folhas desidratadas da (marca Leão®), para realização da infusão durante 20 minutos. Em seguida o chá foi filtrado e adicionado 80 g (8%) de açúcar cristal, como fonte de carbono e mantido em temperatura ambiente, aproximadamente 25 ±1 °C. No chá foi adicionado 20% de cultura starter (200ml de líquido e 2cm<sup>3</sup> de scoby) de kombucha artesanal (líquido com película de celulose cortada em pedaços), e, após homogeneização, cobertos com tecido TNT previamente higienizado, mantidos em laboratório à temperatura ambiente de 22 a 25 °C por 12 dias, mantido protegido de incidência direta de luz e vento. Todo processamento foi realizado em condições assépticas. (cultura *starter* – dados não publicados).

**Figura 4.** Pesagem de ingredientes para a 1ª fermentação da kombucha.



Fonte: o autor.

**Figura 5.** Ingredientes homogeneizados prontos para a 1º fermentação.



Fonte: o autor.

### 5.3 Segunda fermentação/saborização

Para o processo da segunda fermentação que consiste em saborização e gaseificação da Kombucha, foi utilizado o a Kombucha com 12 dias de fermentação (F1), conforme descrito no item acima. Foi utilizado um planejamento fatorial para otimização do processo de saborização da Kombucha com abóbora (TABELA 1). Para esta etapa, foi utilizada a abóbora (*Cucurbita moschata*) adquirida no comércio local do Recife - PE. Os frutos de abóbora foram higienizados, as sementes retiradas, cortada em pedaços e cozidos no vapor por 12 min, e, em seguida, amassado em textura de purê (KOH *et al.*, 2017). O purê (5,10 e 15%) e açúcar cristal (5g e 10g - marca Petribu) foram adicionados ao chá fermentado, conforme planejamento fatorial, para realizar a etapa da saborização. Os produtos finais foram acondicionados em garrafas pet, previamente higienizadas, e mantidos em temperatura ambiente (25 °C) por 72hs, protegidas de luz direta e vento. Depois dessa etapa, a kombucha foi armazenada sob refrigeração (5 °C) por 60 dias.

### 5.4 Desenho experimental para otimização da formulação com adição de abóbora

O experimento foi realizado utilizando um planejamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup> com as seguintes variáveis independentes: abóbora (%), chá fermentado (%) e açúcar (g). Foram realizados 8 ensaios com 3 repetições no ponto central totalizando 11 ensaios, como descrito na tabela 1. As variáveis respostas foram os parâmetros da instrução normativa 41 (2019) que são: pH, acidez e teor alcóolico.

**Tabela 1.** Níveis decodificados das variáveis independentes

Variáveis	Níveis		
	inferior (-1)	Central	superior (+1)
Abóbora (%)	5	10	15
Chá fermentado(%)	85	90	95
Açúcar (g)	0	5	10

## 5.5 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi realizado utilizando a melhor condição estabelecida no planejamento fatorial. A kombucha saborizada foi avaliada durante o armazenamento sob refrigeração (5 °C) por 60 dias, em intervalos de dez dias, e intervalos de 30 dias, para avaliar a estabilidade química e compostos bioativos.

## 5.6 Métodos de análises

### 5.6.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados seguindo o método descrito por Wettasinghe e Shaidi (1999) com modificações 0,5mL do extrato da kombucha saborizada (diluição 1:10 de kombucha e água destilada) após centrifugação, conforme descrito acima. Foram misturados com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% em tubos (23 °C) na ausência de luz, após 3 minutos, foi adicionado 1mL da solução de carbonato de sódio a 7,5%, após agitar no vortex deixar em repouso por uma hora, no escuro. Após, a absorbância medida a 725 nm utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics, Brasil). Uma solução com a ausência da kombucha e do extrato do disco de celulose foi usada para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por ml de líquido de kombucha.

### **5.6.2 Determinação de flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo o método descrito por Dewanto e colaboradores (2002), em um balão de 50mL, foram adicionados 0,5 mL de kombucha centrifugada, conforme descrito acima, 10 mL de água destilada, 1,5 mL de nitrito de sódio a 5%. Depois de 6 min, foi adicionado 3mL de cloreto de alumínio a 10%. Após 5 min, foram inseridos 10 mL de hidróxido de sódio a 1 M, em seguida, o balão foi completado 50 mL com água destilada. A absorbância das amostras foi medida a 510 nm. Uma solução com ausência dos extratos foi preparada e usada como controle.

O teor de flavonoides totais foi determinado por curva padrão de catequina em 280 nm e os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por ml de líquido de kombucha (mg EC/ml).

### **5.6.3 Determinação de carotenoides totais**

Para determinação de carotenoides totais, foi utilizada a metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001) com modificações. Uma alíquota de 5 mL da kombucha foi adicionada em um becker de 100mL com 2g de celite, acrescentado 10 mL de acetona, em cada maceração com bastão de vidro, até completar um total de 50 mL de acetona. Posteriormente, foi filtrado 2 vezes, utilizando papel filtro qualitativo (40 Whatman®, 125mm). Na segunda filtração, a amostra foi transferida em balão de 50mL, e o volume completado com acetona até 50mL. Após essa etapa de extração, a amostra foi transferida para 2 tubos falcon, e centrifugada por 10 min a 4000 rpm em temperatura de 5°C, com o objetivo de deixar a amostra mais translúcida. Em seguida, a amostra foi lida em espectrofotômetro (BEL Photonics) nos comprimentos de onda de 470 nm, 645 nm e 662 nm, contra o branco constituído de acetona. Os valores de carotenoides totais foram calculados utilizando as fórmulas abaixo e expressos em µg/100 mL de kombucha..

$$Ca (\mu\text{g/ mL}) = 11,24A_{662} - 2,04A_{645} \cdot 49$$

$$Cb (\mu\text{g/ mL}) = 20,13A_{645} - 4,19A_{662}$$

$$C (\mu\text{g/ mL}) = (1000A_{470} - 1,90Ca - 63,14Cb) \cdot 214$$

### **5.6.4 Atividade antioxidante total por ABTS**

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio ABTS segundo a metodologia de Surveswaran e colaboradores (2007) com modificações. O reagente

ABTS (7 mM) foi misturado com persulfato de potássio (140 mM) e incubado a temperatura de 25 °C, no escuro por 16 horas para formação do radical livre. Após, o radical foi diluído 1,0 mL da solução acima citada, em etOH até obter a absorvância de 0,702 nm. Posteriormente, no tubo de ensaio adicionar 100 µL da kombucha centrifugada, conforme diluições baseadas nos resultados de fenólicos. Em seguida, foram adicionados a 10 mL do radical ABTS. Após isso, os tubos de ensaio foram mantidos na ausência de luz por 6 minutos, e a leitura foi realizada a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics, Brasil). Foi feita uma solução “controle” com uma alíquota de 100 µL do solvente extrator dos extratos adicionada de 500 µL do radical ABTS. O solvente extrator foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. Como referência, foram utilizados o Trolox e os resultados expressos em µM trolox/mL de kombucha.

### **5.7 Caracterização Físico-química**

Na caracterização das amostras, foram contempladas as análises determinadas pela Instrução Normativa 41/2019 (MAPA), desta forma, foi realizado a determinação do teor alcoólico, análise de pH, sólidos solúveis totais (°Brix), acidez total e volátil foram realizadas conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) utilizando, respectivamente, Ebuliômetro (MYLABOR, modelo VT0700, São Paulo - SP, Brasil), pHmetro (GEHAKA, modelo PG1800, São Paulo - SP, Brasil), Aqualab (DECAGON, modelo AQUALAB 4TE, USA), refratômetro portátil (LORBEN, São Paulo - SP, Brasil) e titulação com hidróxido de sódio.

### **5.8 Análises estatísticas**

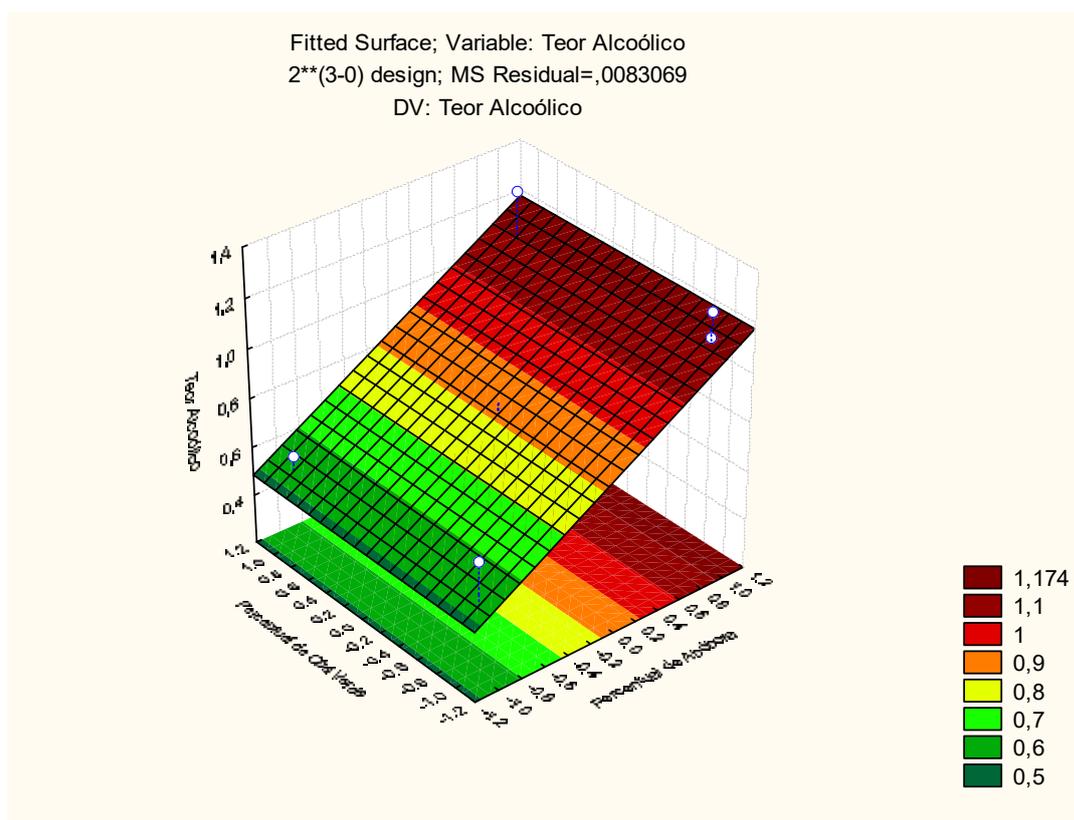
Além do ensaio fatorial desenhado para o desenvolvimento da formulação, foi realizada a avaliação das diferenças entre os tratamentos utilizando ANOVA após teste homocedasticidade (Teste *Bartlett*). Foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, quando as variâncias foram heterocedásticas, análises foram feitas utilizando o programa R (R Core Team).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Planejamento Fatorial

Ao término da 2ª fermentação a kombucha foi analisada conforme parâmetros da instrução normativa 41 (2019). A figura 6 apresenta a influência das variáveis chá fermentado e teor de abóbora em relação ao teor alcoólico. Após análise, pode-se observar que os tratamentos apresentaram teor alcoólico com valores entre 0,3% a 1,3%, aumentando linearmente com o aumento do percentual de abóbora. No qual, as melhores condições foram obtidas com o tratamento C4, onde foi adicionado 15% do purê de abóbora obtendo 1,3% de teor alcoólico e o tratamento C8 que foi adicionado 15% do purê de abóbora e 10g de açúcar.

**Figura 6.** Superfície de contorno obtida a partir da análise do teor alcoólico para a otimização da produção e saborização da kombucha.



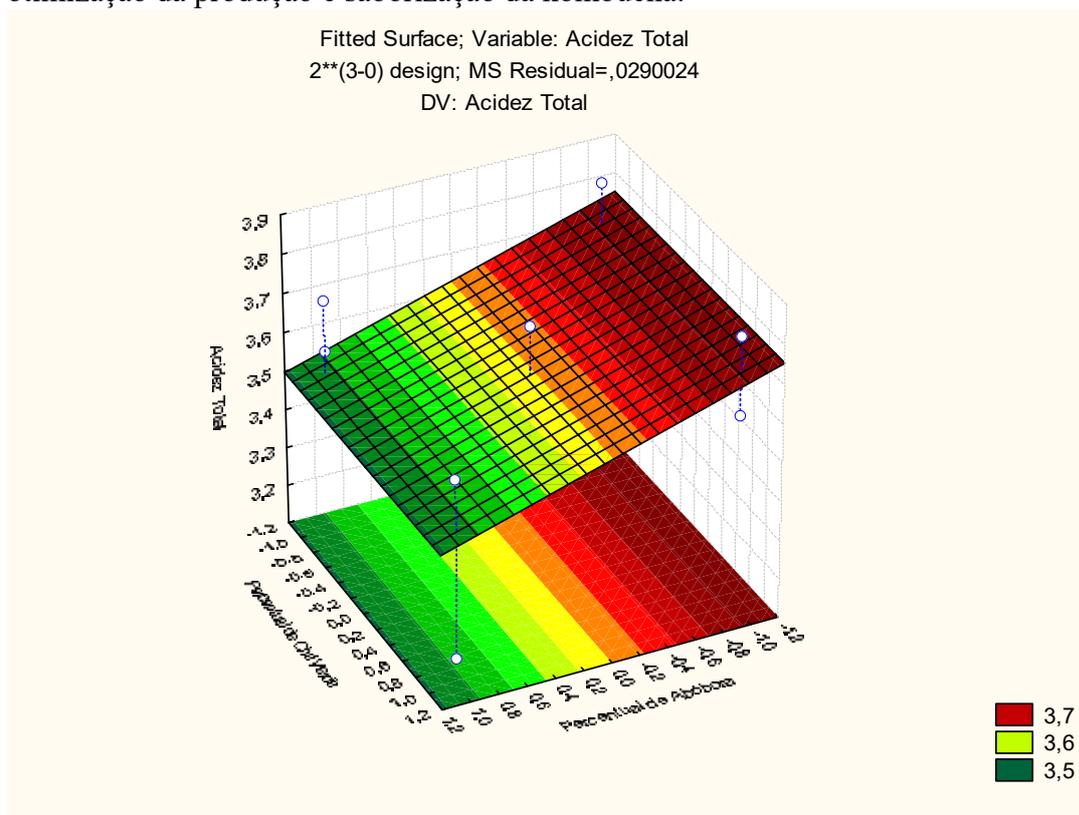
No estudo que avaliaram a influência da adição de abóbora e açúcar mascavo e as variações de temperatura na bebida à base de kefir de água, foi observado que o maior teor alcoólico foi encontrado no produto que foi submetido a temperatura mais elevada (32° C) com a adição da maior concentração de açúcar mascavo (9,07%). Foi

verificado um aumento lento e linear do teor alcoólico quando aumenta a concentração de açúcar e abóbora. (WEE YIN *et al*, 2017).

No presente estudo, quando comparado à influência do aumento da concentração de abóbora e açúcar sobre o teor alcoólico, foi observado que o tratamento C4 (kombucha com adição de abóbora sem adição de açúcar) apresentou aumento do teor alcoólico (1,3%), esse resultado classifica a kombucha como alcoólica. A diferença do teor alcoólico encontrado pode estar relacionada com a temperatura aplicada durante a fermentação, pois na pesquisa anterior (kefir) obteve a um teor alcoólico maior com a temperatura a 32°C e utilizou açúcar mascavo, enquanto que nesta pesquisa (kombucha) foi aplicada a temperatura de 22°C a 25°C, e foi utilizado o açúcar cristal.

Na figura 7 pode-se observar a influência das variáveis percentual de abóbora e a combinação de percentual de chá e açúcar sobre a acidez total. Os valores de acidez total variaram entre 3,17 a 3,83g/L. Foi observado que acidez sofreu influência significativa da variação da concentração de abóbora e da relação de percentual de chá e açúcar. Neste caso, a amostra com maior acidez foi a C5 (chá fermentado -85%, abóbora -0% açúcar -10g), enquanto que a menor acidez foi encontrada na amostra C8, que é a kombucha com maior concentração de abóbora (15%), maior concentração de chá (95%) e maior concentração de açúcar (10g). Dessa forma, os resultados mostram que o aumento da concentração da abóbora e combinado a maior concentração de chá e quantidade de açúcar estarão contribuindo para uma bebida com menor acidez total.

**Figura 7.** Superfície de contorno obtida a partir da análise da acidez total para a otimização da produção e saborização da kombucha.



Complementando a caracterização das kombuchas, analisadas nesta etapa, as amostras obtiveram pH com variação entre 3,64 a 3,88. No qual a kombucha pura (C0) apresentou o menor valor, enquanto a kombucha com adição de purê de abóbora e adição de açúcar (C8) apresentou o maior valor.

Essas alterações são esperadas e ocorrem devido as variáveis independentes do planejamento, ao processo fermentativo da bebida, já que a mesma apresenta uma cultura diversa, logo a interação entre os microrganismos e seu metabolismo podem resultar nesse resultado.

No estudo que avaliou 16 kombuchas de 6 marcas de diferentes, encontraram uma variação nos valores de acidez total entre amostras (0,9 a 6,0). Quanto ao pH das bebidas analisadas todas estavam abaixo de 4. Os autores enfatizam sobre a grande variação da acidez total nas marcas avaliadas, sobretudo em produtos de mesmo fabricante, eles também reportam que os resultados sobre a importância de manter o pH na faixa entre 2,5 e 4, já que essa é faixa que garante a segurança microbiológica da bebida. Outro dado relevante é que para obter uma bebida sensorialmente agradável o ideal é finalizar a fermentação quando a acidez total atingir o valor ideal de 4 a 5 g/L. Além disso, este é um dos parâmetros físico-químicos exigidos para garantir o

padrão de identidade e qualidade da kombucha. (ANDRESON et al, 2022; VELICANSKI et al, 2014)

Dessa forma, para o estudo de estabilidade foram selecionadas as amostras C0 (kombucha pura) escolhida para ser a amostra controle, contribuindo para comparação das bebidas com e sem adição de abóbora, C4 (maior percentual de abóbora e sem açúcar) representando a bebida com o maior teor alcoólico e C8 (maior percentual de abóbora e de açúcar) considerada a bebida com a menor acidez volátil. Dessa forma, as amostras C4 e C8 foram selecionadas porque auxiliaram na comparação da estabilidade, considerando comportamento do açúcar na bebida.

## 6.2 Kombucha e IN 41/2019

Considerando as análises para caracterização da kombucha, as amostras apresentaram valores de pH entre 3,0 e 3,7, sendo as amostras com adição de abóbora com valores mais altos (3,6 /3,7), todos dentro da faixa recomendada pela legislação (2,5 a 4,2). No que se refere ao pH, as kombuchas obtiveram estabilidade durante os 60 dias de armazenamento a 4°C. A bebida foi classificada como alcoólica, pois foi encontrado teor alcoólico com valores entre 0,3% e 1,3%. De acordo com a IN MAPA (2019), a kombucha pode ser definida como alcóolica quando apresentar teor alcóolico acima 0,6% (v/v) para este parâmetro o produto desenvolvido foi classificado como kombucha alcóolica, pois todas as formulações apresentaram acima de 0,5% (v/v) de álcool. Os valores de acidez total variaram entre 3,17 a 3,83g/L, atendendo a recomendação. Os resultados encontrados demonstram que as bebidas elaboradas nesta pesquisa atendem ao Padrão de Identidade e Qualidade para kombuchas.

Pesquisas realizadas para quantificar o teor alcóolico em kombuchas comerciais, no Brasil (0,58 - 3,02 % (v/v)) e nos EUA (1,12- 2,00% (v / v)), obtiveram amostras classificadas bebida alcóolica. Os autores relatam que durante o armazenamento há uma queda do teor alcoólico após 30 dias, e após 60 dias o percentual aumenta. (TALEBI *et al*, 2017; SUHRE, 2020)

A análise de teor alcoólico realizada por Andreson e colaboradores (2022) com 16 amostras de 6 marcas de kombucha armazenadas a 4°C, identificou grande variação de teor alcoólico com valores entre 2.66 e 14.77 g/L, os autores alertam para as bebidas que obtiveram os valores mais altos, reforçando a importância da padronização da identidade e qualidade das kombuchas.

A avaliação físico-químicas de 6 (seis) marcas de kombuchas por 60 dias armazenadas a 4°C, observou que as amostras demonstraram estabilidade quando comparados os períodos de cada marca e as marcas entre si, com valores de pH apresentando variação mínima de 2,5 e máxima de 3,5 e teor alcoólico com valores entre 0,58 - 3,02 % (v/v). A autora reforça sobre a importância de padronização dos processos de produção, armazenamento, sobretudo sobre a necessidade de rotulagem, para garantir o acompanhamento desse tipo de produto (SUHRE, 2020).

Os valores elevados do teor de etanol na bebida podem ser explicados pela dinâmica que ocorre durante o processo fermentativo, pois a mudança de temperatura na fermentação (25° C) para o armazenamento (4° C) e a limitação de oxigênio, provoca a diminuição da velocidade da atividade metabólica dos microrganismos presentes na bebida, sendo assim, as reações químicas tendem a se estabilizar durante o armazenamento em baixa temperatura. Vale salientar, que mesmo com essa redução das transformações químicas, o armazenamento prolongado, pode provocar alterações no teor alcoólico da bebida (NORONHA, 2021; SHARIFUDIN *et al*, 2021; SUHRE, 2020).

Considerando os resultados apresentados acima, as bebidas elaboradas neste estudo, atendem aos padrões de identidade e qualidade para kombucha, sendo classificadas como alcóolicas. O monitoramento das bebidas por 60 dias, esclareceu que as kombuchas armazenadas a 4°C mantiveram o pH estável, dentro da faixa de recomendada (2,5 a 4,2), conforme exigido pela instrução normativa 41/2019, e, portanto, considerado um produto seguro ao consumo durante o período avaliado.

## **6.3 Estudo de Estabilidade**

### **6.3.1 Fenólicos e Flavonoides**

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos e flavonoides da kombucha sem adição de abóbora (C0) do tempo 0 até o 60, estão disponíveis na tabela 2. Como pode ser visto, os compostos fenólicos variaram com médias entre 1,72 a 2,02 mgEAG/ml, no qual a concentração mínima foi obtida no dia 50 (T50) do armazenamento e a máxima no tempo 40 (T40), e os flavonoides 43,63 a 48,79 mgEC/ml, obtendo a concentração mínima no tempo 40 (T40) e a concentração máxima no tempo 20 (T20) do armazenamento. Os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os tempos analisado, sugerindo que a concentração

foi estável ao longo do tempo, com produção e degradação equivalentes para fenólicos e flavonoides.

**Tabela 2.** Compostos bioativos da kombucha sem adição de abóbora (C0) durante 60 dias de fermentação.

	<b>Fenólicos</b> mgEAG/ml	<b>Flavonoides</b> mgEC/ml	<b>Carotenoides</b> µg /100 ML
<b>T0</b>	1,90± 0,01	48,27± 1,04	2,77± 0,21
<b>T10</b>	1,96± 0,02	45,17± 5,34	2,93± 0,68
<b>T20</b>	1,88± 0,02	48,79± 0,97	2,60±0,17
<b>T30</b>	1,93± 0,05	44,94± 2,85	2,30± 0,10
<b>T40</b>	2,02± 0,06	43,89± 1,28	2,17± 0,29
<b>T50</b>	1,72± 0,02	43,63± 1,58	2,43± 0,21
<b>T60</b>	1,81± 0,02	44,08± 4,42	2,73± 0,38

Legenda: letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  teste bartlet

Ao avaliar a kombucha com adição de abóbora (C4), com os dados apresentados na tabela 3, foi observado que, para esta amostra, as médias das concentrações dos fenólicos variaram entre 1,34 a 1,61 mgEAG/ml, obtendo a concentração mínima no tempo 50 (T50) e a máxima no tempo 40 (T40) do armazenamento, e os flavonoides 27,2 a 39,9 mgEC/ml, com a concentração mínima no tempo 10 (T10) e a máxima no tempo 0 (T0). No intervalo de tempo analisado, os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os tempos analisado, com isso é possível afirmar que a concentração foi estável ao longo do tempo, com produção e degradação equivalentes para fenólicos e flavonoides.

**Tabela 3.** Compostos bioativos da kombucha com adição de abóbora (C4) durante 60 dias de fermentação.

	<b>Fenólicos</b> mgEAG/ml	<b>Flavonoides</b> mgEC/ml	<b>Carotenoides</b> µg /100 ML
<b>T0</b>	1,57 ± 0,02	39,9 ± 1,36	21,2 ± 1,78
<b>T10</b>	1,60 ± 0,00	27,2 ± 8,37	17,4 ± 5,03
<b>T20</b>	1,54 ± 0,04	38,1 ± 0,92	28,9 ± 1,73
<b>T30</b>	1,50 ± 0,02	37,2 ± 1,22	13,5 ± 4,21
<b>T40</b>	1,61 ± 0,01	37,2 ± 1,47	14,7 ± 6,48
<b>T50</b>	1,34 ± 0,01	35,1 ± 1,00	14,4 ± 2,90
<b>T60</b>	1,49 ± 0,03	35,7 ± 3,15	12,7 ± 1,90

Legenda: letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  teste bartlet

Analisando a kombucha com adição de abóbora e açúcar durante 60 dias, com os resultados apresentados na tabela 4. Foram observadas que as médias variaram entre 1,38 a 1,60 mgEAG/ml para os fenólicos, verificando que a concentração mínima foi atingida no tempo 50 (T50) e máxima no tempo 0 (T0) e para os flavonoides a variação foi entre 34,5 a 40,2 mgEC/ml, no qual a menor concentração ocorreu no tempo 0 (T0) e a maior no tempo 20 (T20). Dentro do intervalo de tempo estudado é possível afirmar que as concentrações desses compostos são estáveis, com produção e degradação equivalentes.

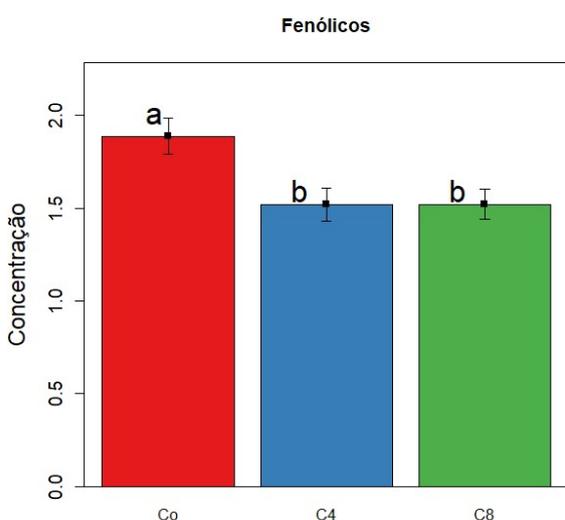
**Tabela 4.** Compostos bioativos da kombucha com adição de abóbora e açúcar (C8) durante 60 dias de fermentação.

	<b>Fenólicos</b> mgEAG/ml	<b>Flavonoides</b> mgEC/ml	<b>Carotenoides</b> µg /100 ML
<b>T0</b>	1,60 ± 0,02	40,2 ± 1,57	12,3 ± 3,42
<b>T10</b>	1,58 ± 0,02	34,5 ± 6,29	11,1 ± 3,33
<b>T20</b>	1,58 ± 0,02	40,2 ± 1,19	15,2 ± 6,68
<b>T30</b>	1,46 ± 0,00	36,3 ± 4,06	11,1 ± 1,61
<b>T40</b>	1,57 ± 0,01	34,7 ± 2,34	7,37 ± 1,48
<b>T50</b>	1,38 ± 0,01	34,7 ± 1,67	13,1 ± 0,40
<b>T60</b>	1,48 ± 0,03	35,2 ± 3,01	7,63 ± 1,62

Legenda: letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  teste bartlet

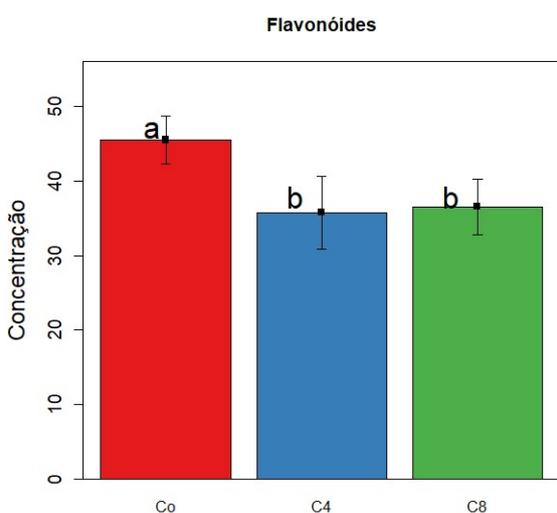
Os compostos fenólicos e flavonoides, foram apresentados, respectivamente, nas figuras 8 e 9, a seguir, apresentam. Comparando os três tratamentos (C0, C4 e C8), foi evidenciado que o produto com a melhor concentração desses compostos foi a kombucha sem adição de abóbora (C0), apresentando valores significativamente maiores de compostos fenólicos e flavonoides, confirmando que houve diferença significativa entre os tratamentos.

**Figura 8.** Gráfico da análise do teor de compostos fenólicos de diferentes preparações de kombucha durante 60 dias.



Legenda: C0 - kombucha sem adição de abóbora / C4 - kombucha com adição de abóbora / C8 - kombucha com adição de abóbora e açúcar

**Figura 9.** Gráfico da análise de Flavonóides totais de diferentes preparações de kombucha durante 60 dias.



Legenda: C0 - kombucha sem adição de abóbora / C4 - kombucha com adição de abóbora / C8 - kombucha com adição de abóbora e açúcar

Diante dos resultados apresentados, fica destacado que a kombucha sem adição de abóbora é o produto com a melhor concentração dos compostos fenólicos e flavonoides, apresentando estabilidade desses compostos durante os 60 dias de armazenamento sob refrigeração (4° C).

La Torre e colaboradores (2021), que avaliaram a estabilidade dos compostos bioativos entre o chá preto puro e uma kombucha produzida com chá preto armazenados por 9 meses sob refrigeração (4°C), observou-se que os fenólicos sofreram um aumento quando comparado chá preto puro ( $137,5 \pm 10,7 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$ ) e kombucha de chá preto ( $234,1 \pm 1,4 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$ ) enfatizando que o processo fermentativo impulsionou até 1,7 vezes a concentração de fenólico na kombucha e nos meses seguintes (do segundo ao quarto mês), os fenólicos diminuíram lentamente de  $234,1 \pm 1,4$  a  $223,5 \pm 0,7 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$  sem diferença estatística significativa, mantendo-se estável até 4 meses. Nos resultados dos flavonoides a amostra de chá preto apresentou uma concentração maior ( $2.3 \pm 0.2 \text{ QE mL}^{-1}$ ) e amostra de kombucha de chá preto apresentou ( $1,1 \pm 0,3 \mu\text{g QE mL}^{-1}$ ), com verificou-se que o processo fermentativo resultou em redução de 50% a concentração dos flavonoides, mas permaneceu constante ao longo do tempo (LA TORRE *et al*, 2021).

O estudo de estabilidade da kombucha de chá preto citada no estudo acima corrobora com o presente estudo quando comparado os produtos fermentados. Pois em ambos foi observado que os produtos mantiveram a estabilidade dos fenólicos e flavonoides, sem diferenças significativas ao longo do armazenamento sob refrigeração (4°C).

Na comparação entre os diferentes tratamentos estudados nesta pesquisa, foi constatado que a kombucha sem adição de abóbora apresentou o melhor resultado para fenólicos e flavonoides, isso pode ser explicado pela composição do chá verde, que é considerado uma excelente fonte de compostos bioativos, principalmente os polifenóis e catequinas, logo esses compostos serão liberados durante a fermentação para a bebida, elevando o teor desses compostos no produto final. (GREEWALT *et al*, 2000; JAKUBCZYK *et al*, 2020; WATAWANA *et al.*, 2015; MALBASA *et al.*, 2011).

Esta composição do chá verde tem relação com o processamento rápido das folhas frescas, onde ela não passa por fermentação, pois durante o processamento o principal objetivo é evitar a oxidação da planta. Com isso a composição do chá verde (*Camellia sinensis*) contém cerca de 40% (base seca) de polifenóis em folhas frescas

sendo galato de epicatequina, epigalocatequina e galocatequina, os principais tipos. (URZEDO,2020)

Quando foi avaliado as amostras com adição de abóbora e adição de abóbora mais açúcar, foi observado uma concentração menor dos fenólicos e flavonoides quando comparadas a amostra sem adição de abóbora, divergindo do estudo que avaliou o perfil de kombucha com adição de umbu-cajá e pitanga durante sendo armazenada por 7 dias a 5°C. Demonstrou que adição dessas frutas, contribuíram com o aumento de atividade antioxidante, sendo o galato de epigalocatequina em maior quantidade e foi identificado que os fenólicos apresentaram maior bioacessibilidade. Ou seja, as frutas favoreceram a composição bioativa da bebida. Ele também relata que a composição da fruta varia conforme o tipo e o teor de açúcares diferentes, logo, isso é um fator que pode influenciar na composição da bebida, além de outros fatores, como: a sacarose utilizada, microrganismos presentes, tempo e temperatura aplicados no processo fermentativo. (JUNIOR *et al.*, 2021)

No estudo de Sarkaya e colaboradores (2021) foi desenvolvido uma bebida láctea utilizando kombucha e outras bebidas saborizadas que utilizaram chá verde, sálvia, amora, e leite, mantidas por 30 dias a 4°C, foi evidenciado que houve redução das concentrações de fenólicos e flavonoides nas amostras saborizadas corroborando com o resultado do presente estudo, nos fenólicos e flavonoides. Autores explicam que essa redução pode ter sido provocada pela atividade de fermentação da kombucha (JAYABALAN *et al.*, 2016).

Conforme relatado na pesquisa de Ananingsih e colaboradores (2013) a exemplo das catequinas, que podem ser degradadas por vários motivos: devido a composição das soluções, concentração de oxigênio, solução de sacarose e ácido cítrico, a presença de radicais livres e íons metálicos. O autor relata ainda, que podem degradar mais rápido a catequina. Este cenário pode ser encontrado na kombucha dependendo da técnica e insumos utilizados no processamento da bebida.

Essas informações podem justificar as baixas concentrações encontradas aqui nesta pesquisa. Demonstrando que a adição da abóbora e açúcar não foi positiva para os compostos fenólicos e flavonoides, no sentido de aumentar a concentração dos mesmos, mas seria necessária uma análise aprofundada do perfil desses compostos para identificar aqueles que estão presente nessa concentração, verificando a importância de cada um. Outro ponto a ser analisado, no sentido de melhorar essa

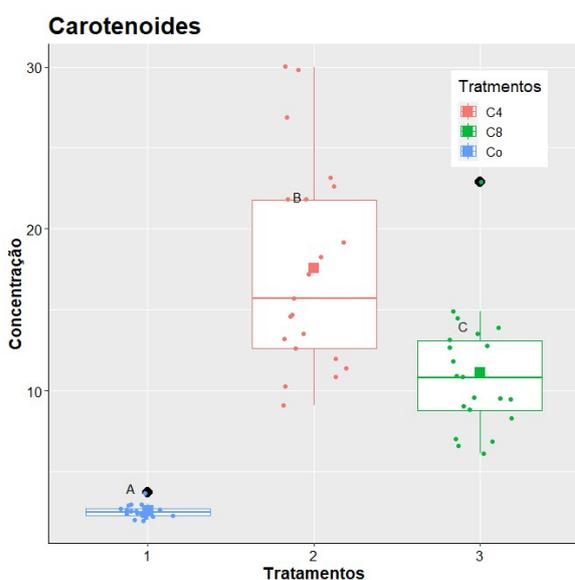
composição, seria comparar técnicas que ajudem a manter a estabilidade das catequinas do chá.

### 6.3.2 Carotenoides

Os resultados das análises dos carotenoides em relação ao estabilidade das bebidas podem ser vistos nas tabelas 2 (kombucha sem adição de abóbora – C0) que apresentou concentração mínima de  $2,17 \pm 0,29 \mu\text{G} / 100 \text{ ml}$  no tempo 40 (T40) e concentração máxima  $2,93 \pm 0,68 \mu\text{G} / 100 \text{ ml}$  no tempo 10 (T10); já a tabela 3 (kombucha com adição de abóbora – C4) mostrou concentração mínima de  $12,7 \pm 1,90 \mu\text{G} / 100 \text{ ml}$  no tempo 60 (T60) e concentração máxima  $28,9 \pm 1,73 \mu\text{G} / 100 \text{ ml}$  no tempo 20 (T20) e a tabela 4 (kombucha com adição de abóbora e açúcar – C8) demonstrando uma concentração mínima de  $7,37 \pm 1,48 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$  no tempo 40 (T40) e concentração máxima  $15,2 \pm 6,68 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$  no tempo 20 (T20). Foi constatado que em relação ao tempo de armazenamento as bebidas não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados das análises de carotenoides, em relação a cada tratamento, estão apresentados na figura 10. Pode ser observado que todas as bebidas (C0, C4 e C8) apresentaram diferenças significativas. No qual o tratamento C4 (kombucha com adição de abóbora) apresentou a maior concentração desse composto quando comparado aos outros dois tratamentos.

**Figura 10.** Gráfico da análise de Carotenoides de diferentes preparações de kombucha sem adição de abóbora (C0), kombucha com adição de abóbora (C4) e kombucha com adição de abóbora e açúcar (C8) durante 60 dias.



Na pesquisa que avaliou o teor de carotenoides em bebida fermentada com suco de abóbora e leite (NOVELINA *et al.*, 2020). Foi observado que o betacaroteno apresentou uma leve redução após a adição do leite. A autora esclarece que essa redução pode ocorrer devido a sensibilidade dos carotenoides ao oxigênio e meio ácido presente na fermentação. Além disso, relaciona com o processo de autoxidação, no qual o produto vai sofrendo alterações decorrentes das reações químicas do produto e a fotoxidação, que ocorre devido a exposição a luz.

Patel e colaboradores (2020) que avaliaram a estabilidade de carotenoides em bebidas com leite de búfala e abóbora por 180 dias, observaram que o teor de caroteno do produto reduziu significativamente com o período de armazenamento. Ele explica que a perda de caroteno no leite aromatizado pode ter sido ocasionada pelo efeito do calor no momento da pasteurização do produto envasado e pelo período de armazenamento.

O resultado encontrado por Muntean (2005) mostra uma perda de caroteno no suco de abóbora devido ao tratamento térmico e período de armazenamento, que monitorou o suco por 7 meses, identificando redução de 12,45 µg/g no suco in natura, reduzindo para 4,15 µg/100g após a esterilização a 105°C/20 minutos, obtendo um teor de 2,72 µg/100g após o armazenamento. O autor explica que a maioria dos carotenoides possuem baixa estabilidade e logo foram destruídos com o processamento térmico. Dentre os carotenoides, o beta caroteno é o mais estável, por isso ainda foi encontrado uma concentração significativa, e que o após todo processamento o produto pode ser considerado uma fonte nutritiva e que contribui também com a coloração.

Diante das possibilidades de uso da abóbora, sendo crua ou cozida, o presente estudo optou por utilizar o purê de abóbora cozido a vapor a 90°C/15 minutos tentando reduzir perda dos carotenoides. Considerando a concentração de carotenoides das bebidas elaboradas nesta pesquisa, elas apresentaram valores importantes do composto. Apresentando valores maiores e estáveis quando comparado aos resultados encontrados por Muntean (2005).

Moura (2015) que estudou o purê de abóbora fluido pela maceração enzimática sugerindo a elaboração de um néctar, verificou que as etapas de maceração e da formulação do néctar apresentaram uma leve influencia na degradação dos carotenoides totais quando comparados a abóbora in natura. A influência da formulação de néctar corrobora com o resultado da amostra que incluiu a adição de

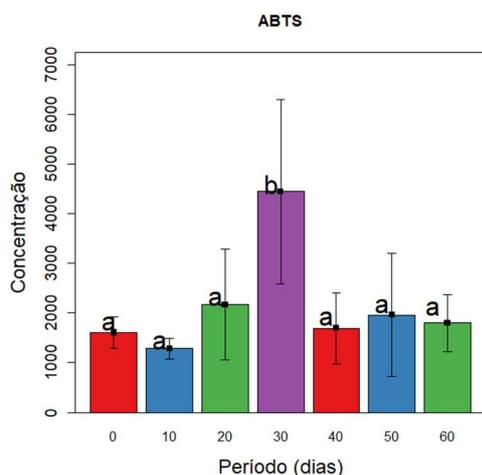
abóbora com açúcar (C8), pois a concentração dos carotenoides nessa amostra (C8) foi menor que a concentração da amostra que continha apenas abóbora (C4)

No contexto geral, a adição da abóbora na kombucha se mostrou positiva, apresentando concentrações importantes, apesar do armazenamento prolongado ter reduzido o teor de carotenoides, a bebida pode ser considerada uma boa opção para melhorar o consumo desse nutriente importante para a alimentação da população brasileira. Quanto a diferença entre os tratamentos, sugere-se mais pesquisas no sentido de avaliar a interação da abóbora e o açúcar como fatores que influenciam os carotenoides.

### 6.3.3 ABTS

Os resultados da capacidade antioxidante das diferentes kombuchas foram expressos milimolar de Trolox por mililitro de amostra, conforme figura 11. Destacando que a concentração de ABTS em relação ao tempo de armazenamento das bebidas, considerando todos os tratamentos, observamos que a média oscilou ao longo dos 60 dias. Apresentando médias entre  $1165,8 \pm 119,16$  e  $4478 \pm 477,95$   $\mu\text{m trolox/ml}$ , nos tempos 10 e 20, respectivamente, para a kombucha sem adição de abóbora (C0);  $1128,7 \pm 302,73$  e  $2333,9 \pm 333,26$   $\mu\text{m trolox/ml}$ , nos tempos 50 e 30, para kombucha com adição de abóbora (C4) e  $1006,63 \pm 102,42$  e  $6529,3 \pm 446,7$   $\mu\text{m trolox/ml}$  nos tempos 40 e 30. Verificou-se que houve diferença significativa entre os períodos analisados, porém não houve diferença significativa quando comparados os três tratamentos.

**Figura 11.** Gráfico da análise de ABTS de diferentes preparações de kombucha



durante 60 dias.

Na avaliação de combinações de kombuchas de chá preto e chá verde com diferentes fontes de açúcares (mel, açúcar branco e mascavo) armazenadas por 60 dias em temperatura ambiente (23°C a 33°C) analisadas nos tempos 7, 14, 28 e 60. Verificou-se que a melhor atividade antioxidante foi da combinação de kombucha de chá verde com açúcar branco no tempo 7, todas as amostras apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si, apresentando redução da atividade antioxidante ao longo do armazenamento. Com isso, pode-se concluir que o tempo de fermentação e as variações do meio têm efeito significativo sobre as propriedades antioxidantes das amostras. (VOHRA *et al*, 2019)

Comparando o resultado da pesquisa citada acima e o presente estudo, é possível afirmar que variações de tempo e temperatura de armazenamento influenciam na atividade antioxidante. Porém, houve divergência em relação a variação do meio, pois nesta pesquisa a atividade antioxidante não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos (C0, C4 e C8).

O comportamento da atividade antioxidante durante o estudo de estabilidade comparando chá preto e kombucha de chá preto por nove meses armazenado a 4°C. Neste caso, a bebida à base de chá preto apresentou os melhores potenciais de atividade antioxidante no primeiro mês, evoluindo a cada 30 dias com reduções gradativas. Observou-se também a presença da quercetina, que possui menor atividade antioxidante. (LA TORRE *et al*, 2021).

Nesta pesquisa foi observado resultado semelhante, todas as amostras também apresentaram a melhor atividade antioxidante no tempo 30 (T30), com os seguintes resultados: kombucha sem adição de abóbora (C0) 4478±477,95 µm trolox/ml, a kombucha com adição de abóbora (C4) 2333,9±333,26 µm trolox/ml e kombucha com adição de abóbora e açúcar (C8) 6529,3 ± 446,7 µm trolox/ml. Após este pico, todas as amostras apresentaram redução. Corroborando com o estudo de La Torre e colaboradores (2021) que obtiveram uma redução gradativa da atividade antioxidante após o quarto mês de armazenamento. Com isso, destacaram que o “prazo de validade” do kombucha de chá preto armazenado na temperatura da refrigeração (4°C) não poderia ser superior a quatro meses, pois somente nesse período a preservação do teor de polifenóis e suas atividades antioxidantes são asseguradas.

Diversos fatores afetam as propriedades antioxidantes e, portanto, promovem perfis diferentes nesses produtos. Com isso, pode ser observado que o tipo de material vegetal, as condições de preparo do chá (tempo, temperatura, tipo de água), uso de

saborizantes (sucos, extratos vegetais), bem como a composição de microrganismos presentes no produto podem alterar naturalmente a composição bioquímica, afetando diretamente a atividade antioxidante. Vale ressaltar que as condições de fermentação (temperatura, tempo, aplicação de processos adicionais) e do armazenamento, principalmente tempo e temperatura, influenciam na composição da bebida, visto que este binômio pode impactar o comportamento da microbiota promovendo a produção de compostos variados. Como exemplo, as bactérias ácidas e leveduras liberam enzimas e degradam polifenol em pequenas moléculas com maior atividade antioxidante. (ANTOLAK; PIECHOTA E KUCHARSKA, 2021)

Diante do exposto, a atividade antioxidante das bebidas Esses compostos são instáveis nas condições oferecidas na fermentação. Corroborando com autores que observaram aumento da atividade antioxidante com a fermentação e com o armazenamento prolongado encontraram uma redução dessa atividade, que pode ser promovida pelos processos naturais da fermentação. (ABUDUIABIFU e TAMER, 2019; BARBOSA *et al*, 2022; NOVALINA *et al*, 2020)

Nas bebidas com adição de abóbora foi possível observar que elas alcançaram um pico da atividade antioxidante aos 30 dias, sugerindo que esse seria o máximo do desenvolvimento do produto, mesmo quando mantido a 4°C. Esse resultado reforça a instabilidade dos compostos, confirmando que as reações promovidas pela fermentação permanecem ocorrendo mesmo em condições estabilizadas. De fato, as bebidas apresentam atividade antioxidante com bons resultados, mas ainda se faz necessário mais pesquisas para elucidar como esses compostos reagem aos processos fermentativos com objetivo de reforçar a abordagem de estabilidade das bebidas fermentadas.

#### **6.4 Avaliação de rótulos das kombuchas**

Após análise dos rótulos de 11 kombuchas comercializadas em supermercados e empórios em Pernambuco, apresentadas na tabela 5, observou-se que as embalagens contêm variações de conteúdo líquido entre 200 ml e 355 ml, das amostras avaliadas, 6 não possuem data de fabricação, o prazo de validade varia entre 4 e 6 meses. 4 amostras informam apenas a data de validade, com isso não é possível identificar o tempo de vida da kombucha. Quanto a informação de teor alcoólico 02 rótulos não continham a informação.

**TABELA 5.** Caracterização das amostras de kombuchas comercializadas em Pernambuco.

Amostra	Sabor	Conteúdo líquido (ml)	Ingredientes	Data de produção	Validade	Teor alcoólico (%)
A	morango, gengibre, hibisco e aroma natural de morango	290	Água filtrada, Cultura Kombucha, <i>Camellia sinensis</i> , morango, gengibre, hibisco e aroma natural de morango	SN	4 meses	até 0,5
B	limão, gengibre e aroma natural de limão	290	Água filtrada, Cultura Kombucha, <i>Camellia sinensis</i> , limão, gengibre e aroma natural de limão	SN	5 meses	até 0,5
C	capim limão, hortelã e spirulina	355	Água mineral, cultura de kombucha (bactérias e leveduras), chá preto ( <i>C. sinensis</i> ), açúcar orgânico, capim limão orgânico, hortelã e spirulina	16.12.21	6 meses	SN
D	hibisco com maracujá	300	água, infusão de chá verde ( <i>C. sinensis</i> ), infusão de hibisco ( <i>H. sabdariffa</i> ), açúcar, aromas naturais, cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Scoby) e taumatina.	SN	SDV	até 0,5
E	limão siciliano, hibisco e gengibre	200	Água mineral, cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Scoby), açúcar, chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> ), infusão de hibisco, limão e gengibre.	SN	SDV	até 0,5
F	uva	350	água, chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> ), cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Scoby), fruta e sacarose.	01.03.22	4 meses	SN
G	tangerina	355	Tangerina, chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> ), água, açúcar orgânico, sedimentos de frutas e kombucha.	01.01.22	4 meses	até 0,5

H	uva e frutas vermelhas	200	água, uva, morango, açúcar, cultura simbiótica de bactérias e leveduras, amora, mirtilo e chá verde.	20.04.22	4 meses	até 0,5
I	capim santo e limão	355	água mineral, chá verde orgânico, ( <i>Camellia sinensis</i> ), infusão de Capim santo, limão e açúcar.	SN	SDV	até 0,5
J	Tropical	275	água filtrada, cultura kombucha, açúcar, suco de manga, chá verde e aroma natural de abacaxi, acerola e manga	SN	SDV	até 0,5

Legenda: SN – Sem informação no rótulo / SDV – Sem período de validade

As informações sobre temperatura de armazenamento dos rótulos de kombucha avaliados estão representadas na tabela. As temperaturas variaram entre 1°C a 9°C e das 11 amostras analisadas 02 não apresentavam esta informação, 01 delas recomendava apenas armazenar em local seco e fresco.

**Tabela 6.** Recomendações de temperatura de armazenamento dos rótulos de kombuchas comercializados em Recife - PE.

Amostra	Temperatura
A	mínimo 1°C e máximo 8°C
B	mínimo 1°C e máximo 8°C
C	sem informação
D	manter em local seco e fresco
E	2°C a 6°C
F	mínimo 1°C e máximo 9°C
G	2°C a 8°C
H	2°C a 8°C
I	2°C a 6°C
J	2°C a 8°C
K	até 5°C

Os dados da análise dos rótulos, conforme a legislação, estão apresentados na tabela 6. Foi observado que 100% dos rótulos analisados não atendem RDC nº243 de 2018, pois não está descrito no rótulo e na lista de ingredientes informações sobre a linhagem ou o nome comercial do microrganismo da cultura utilizada. Quanto a IN 41 de 2019, foi identificado que 18,2% dos rótulos analisados não descrevem que foi utilizada a cultura de kombucha na lista de ingredientes e não atendem ao requisito sobre a denominação de venda do produto, utilizando termos que não correspondem ao tipo de infusão e ingredientes adicionais utilizados. Todos os rótulos avaliados não apresentaram informações sobre o pH da bebida. Vale ressaltar, que foram encontradas embalagens de plástico e vidro, transparente e na cor verde.

**TABELA 7.** Análise de rótulos de kombuchas segundo as legislações vigentes.

<b>Legislação Vigente</b>	<b>Atribuições</b>	<b>C (%)</b>	<b>NC (%)</b>	<b>NA (%)</b>
<b>RDC nº 243, de 26 de julho de 2018</b>	Identificação da linhagem ou nome comercial do micro-organismo	0	100	
	Identificação da espécie de cada linhagem, de acordo com a nomenclatura binomial mais atual, na lista de ingredientes	0	100	
<b>Instrução Normativa 41/2019 (MAPA)</b>	Deve ser produzido a partir de espécies vegetais para infusão em água	100	0	
	Deve ser produzido a partir de consórcio ativo de bactérias e leveduras (scooby) adequadas para fermentação alcoólica e acética, desde que garantida a sua inocuidade a saúde humana	81,8	18,2	
	Deve ser denominada de kombucha de (seguido do nome da espécie vegetal utilizada na infusão), com (seguido do ingrediente adicionado após a fermentação) suco, polpa, especiarias,	81,8	18,2	

extrato vegetal, mel, aroma, ou a combinação destes termos, de acordo com a composição final do produto			
O Kombucha que contiver vitaminas e minerais naturalmente produzidos no processo de fabricação e atenderem ao valor mínimo destes nutrientes, podem utilizar as expressões "Fonte natural de (nome da vitamina ou mineral)" e "naturalmente rico em (nome da vitamina ou mineral)" em sua rotulagem	0	0	100
Apresentar pH entre 2,5 e 3,5	0	100	0

Legenda: C- Conforme / NC – Não conforme / NA – Não se aplica

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo que analisou 24 amostras de rótulos de kombucha de 14 marcas diferentes, observou muitas divergências de informações entre as marcas analisadas, dentre elas ausência de data de validade, condições de armazenamento e teor alcoólico. O rótulo é a ferramenta que faz a comunicação entre a indústria e o consumidor. Ele deve ser descrito de forma clara, com informações corretas facilitando o entendimento da população (ALENCAR *et al.*,2020)

Um estudo que analisou 8 amostras de 4 marcas diferente também identificou falhas semelhantes na rotulagem dos produtos. Observaram a presença de termos que não são permitidos pela legislação pois eles atribuem características de qualidades superlativas e propriedades funcionais. Alguns dos termos utilizados foram: orgânico, produto natural, baixo em calorias, saudável e sem conservantes. Esses dados corroboram com a presente pesquisa que encontrou termos como: 50 calorias, produto 100% natural, bolhas refrescantes, bactérias boas, rica em compostos antioxidantes e bebida energizante (ASSIS *et al.*,2022).

Existem 3 pontos importantes que podem influenciar na qualidade e segurança do produto final, que são: a validade, teor alcoólico e condições de armazenamento. No que se refere ao teor alcoólico, a legislação recomenda que seja descrita a classificação da bebida, pois sendo considerada como alcoólica, a informação deve estar presente no rótulo, acompanhada do alerta, pois deve ser evitada por crianças,

gestantes e lactantes. No entanto, os dois estudos citados acima, identificaram amostras com ausência dessa declaração. (ASSIS *et al.*, 2022; ALENCAR *et al.*, 2020)

Quanto a validade, é importante saber a vida de prateleira do produto, porém foi observado que algumas marcas registram apenas a data de validade, o que impede do consumidor avaliar há quanto tempo a bebida foi produzida. Além disso, foi observado uma variação nos prazos de validade, encontrando produtos com 60 dias até 180 dias (ASSIS *et al.*, 2022; ALENCAR *et al.*, 2020).

No presente estudo, observou-se que os compostos bioativos estáveis por até 30 dias de fermentação. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por La Torre e colaboradores (2021) que observou uma redução dos compostos bioativos em kombucha de chá preto com 30 dias. Essa mudança tem relação com o perfil microbiano da cultura utilizada e condições de fermentação da bebida.

Dessa forma, é possível perceber que há necessidade de melhorias nos rótulos das kombuchas, pois existem falhas na elaboração de rótulos, contendo informações não permitidas e/ou ausência de informações obrigatórias. Outra oportunidade de melhoria, é o estudo da vida de prateleira dessas bebidas, ele precisa considerar a estabilidade dos compostos bioativos. Sendo a kombucha um produto popular por conter substâncias benéficas com potencial antioxidante, essa característica precisa ser considerada na definição do prazo de validade e nas condições de armazenamento para garantir que a bebida terá esses compostos preservados até o final da sua validade.

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, o estudo de estabilidade dos compostos bioativos, possibilitou afirmar que para garantir uma kombucha com potenciais benefícios a saúde, o armazenamento ideal seria a 4°C por 30 dias. Em contrapartida, a avaliação de rótulos comercializados no Estado de Pernambuco, mostrou que as bebidas comercializadas apresentam um prazo de validade de “quatro a seis meses” com recomendação de armazenamento que varia entre “1°C a 9°C”. Dessa forma, sugere-se uma revisão dos parâmetros aplicados aos rótulos, descritos na legislação, visto que a kombucha é uma bebida reconhecida pelo seu potencial benéfico, originado dos compostos bioativos, que são considerados substâncias sensíveis às variações de tempo e temperatura de armazenamento, garantindo uma bebida segura e potencial benéfico a saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS

- ABKOM (2020). Disponível em: <https://www.abkom.org.br/>. Acesso em 27 de junho de 2023.
- ABUDUAIBIFU, Aimidan; TAMER, Canan Ece. Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 43, n. 9, p. e14077, 2019.
- AMARO, G. B., HANASHIRO, M. M., PINHEIRO, J. B., MADEIRA, N. R., & BORGES, R. Recomendações técnicas para o cultivo de abóboras e morangas. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2021.

ANANINGSIH, V. K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food research international*, v. 50, n. 2, p. 469-479, 2013.

ANDRESON, M., KAZANTSEVA, J., KULDJÄRV, R., MALV, E., VAIKMA, H., KALEDA, A., Caracterização dos perfis químico, microbiano e sensorial de kombuchas comerciais. *International Journal of Food Microbiology*, v. 373, p. 109715, 2022.

ANTOLAK, Hubert; PIECHOTA, Dominik; KUCHARSKA, Aleksandra. Chá de Kombucha—Um poder duplo de compostos bioativos do chá e cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). *Antioxidantes*, v. 10, n. 10, pág. 1541, 2021.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 20 ed. Gaithersburg: Maryland, 2016.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), p. 4027-4033, 2007.

BARBOSA, E.L. NETTO, M. C., JUNIOR, L. B., DE MOURA, L. F., BRASIL, G. A., BERTOLAZI, A. A. Kombucha fermentation in blueberry (*Vaccinium myrtillus*) beverage and its in vivo gastroprotective effect: Preliminary study. *Future Foods*, v. 5, p. 100129, 2022.

BELFORT, G. P., DE MIRANDA CHAVES, C. R. M., WERNER, M. L. F., DA COSTA, R. D. S. S., GOMES, M. M., & DA CUNHA, A. L. P. Prevalência da deficiência de vitamina A e características nutricionais de pacientes escolares e adolescentes com fibrose cística. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 3, p. 17230-17246, 2022.

BELASSOUED, K.; GHRAB, F.; MAKNI-AYADI, F.; VAN PELT, J.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(11), p.1699-1709, 2015.

CARDOSO, R. R., NETO, R. O., DOS SANTOS D'ALMEIDA, C. T., DO NASCIMENTO, T. P., PRESSETE, C. G., AZEVEDO, L. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food research international*, v. 128, p. 108782, 2020.

CHANG, M.-Y.; LIN, Y.-Y.; CHANG, Y.-C.; HUANG, W.-Y.; LIN, W.-S.; CHEN, C.-Y.; HUANG, S.-L.; LIN, Y.-S. Effects of infusion and storage on antioxidant activity and total phenolic content of black tea. *Appl. Sci.* 2020, 10, 2685.

- CHEN M.-L. 1. Tea and Health – An Overview *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 1-16, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277. 2002
- CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, p. 63–72, 2016.
- COELHO, R.M.D.; ALMEIDA, A.L.; AMARAL, R.Q.G.; MOTA, R.N.; SOUSA, P.H.M. Kombucha: Review, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, p. 1–12, 2020.
- COTON, M., PAWTOWSKI, A., TAMINIAU, B., BURGAUD, G., DENIEL, F., COULLOUMME-LABARTHE, L., Desvendando a ecologia microbiana de fermentações de Kombucha em escala industrial por metabarcoding e métodos baseados em cultura. *FEMS microbiology ecology*, v. 93, n. 5, pág. 2017.
- DHIMAN, A.K.; BABU, G.N.; SUREKHA, A.; PREETHI, R.. Development and Standardization of ripe pumpkin based squash and its stability during storage. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), p. 821-831, 2017.
- DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33, p. 409–421, 2000.
- ESCALADA-PLA, Marina F. et al. Novas estratégias para suplementar probióticos em bebidas não lácteas. In: *Ingredientes de Valor Agregado e Enriquecimento de Bebidas*. Imprensa Acadêmica, 2019. p. 205-232.
- FILIPPIS, F., TROISE, AD, VITAGLIONE, P., & ERCOLINI, D. Diferentes temperaturas selecionam espécies distintas de bactérias do ácido acético e promovem a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação do chá Kombucha. *Microbiologia de alimentos*, v. 73, p. 11-16, 2018.
- FREITAS, AK; DE SOUSA, PHM; WURLITZER, NJ. Alternative raw materials in kombucha production. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, p. 100594, 2022.
- HEISS M.L., HEISS R.J. *The Story of Tea: A Cultural History and Drinking Guide*. Ten Speed Press, Nova Iorque, EUA. ISBN: 9781607741725. 2007
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ -. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4.ed. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2008. 320 p.
- IHSANI, N.; HERNAHADINI, N.; FAUZI, M. The variation of ethanol concentration and kombucha characterization on several incubation periods. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2021. p. 012008.

JAKUBCZYK, K., KAŁDUŃSKA, J., KOCHMAN, J., & JANDA, K. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, v. 9, n. 5, p. 447, 2020.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R.V.; LONCAR, E.S.; VITAS, J.S.; SATHISHKUMAR, M. A Review on Kombucha tea – Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, Toxicity and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Technology*, 13, p. 538–550, 2014.

JAYABALAN, R; MALINI, K.; SATHISHKUMAR, M. SWAMINATHAN, K.; YUN, E. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Science Biotechnology*, 19, p. 843–847, 2010.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 160, p. 346-356. 2007.

JÚNIOR, JCS, MAFALDO, Í. M., DE LIMA BRITO, I., & DE MAGALHÃES CORDEIRO, AMT. Kombucha: Formulação, composição química e potencialidades terapêuticas. *Current Research in Food Science*, v. 5, p. 360-365, 2022.

KAUFMANN K. Kombucha Rediscovered: The Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea. Books Alive, Tennessee, EUA. ISBN: 9780920470763. 2013.

KAPP, Julie M.; SUMNER, Walton. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of epidemiology*, v. 30, p. 66-70, 2019.

KHAN, S.S. Valor nutritivo, potencial antioxidante e disponibilidade de 5-metil-tetrahidrofolato em kombucha de chá verde (*Camellia sinensis*) avaliadas por CLAE-DAD. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural Pernambuco. Recife, 61 p. 2020.

Kombucha Brewers International. Disponível em: <https://kombuchabrewers.org>  
Acesso em 27 de junho de 2023.

KOH, W.Y.; UTHUMPORN, U; ROSMA, A; YUEN, K.H. Fermented pumpkin-based beverage inhibits key enzymes of carbohydrate digesting and extenuates postprandial hyperglycemia in type-2 diabetic rats. *Acta Alimentaria*, 47. p. 495-503, 2018.

KOVACEVIC, Z.; DAVIDOVIC, G.; VUCKOVIC-FILIPOVIC, J.; JANICIJEVIC-PETROVIC, M. A.; JANICIJEVIC, K.; POPOVIC, A. A Toxic Hepatitis Caused the Kombucha Tea – Case Report. *Journal of Medical Sciences*, v. 2, n. 1, p. 128-131, 2014.

LA TORRE, C., FAZIO, A., CAPUTO, P., PLASTINA, P., CAROLEO, M. C., CANNATARO, R., & CIONE, E.. Effects of long-term storage on radical scavenging properties and phenolic content of Kombucha from black tea. *Molecules*, v. 26, n. 18, p. 5474, 2021.

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, H. J.; ANAYANSI, E. A.; A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *Journal of Food*, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, p. F4.3.1- F4.3.8, 2001.

LIN, D.; LIU, Z.; SHEN, R.; CHEN, S.; YANG, X. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, p. 1007-1019, 2020.

LIU, M.; LI, X.Q.; WEBER, C.; LEE, C.Y.; BROWN, J.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 50, p. 2926–2930, 2002.

LIU, Y.; ZHAO, G.; SHEN, Q.; WU, Q.; ZHUANG, J.; ZHANG, X.; XIA, E.; ZHANG, Z.; QIAN, Y.; GAO, L.; XIA, T. Comparative analysis of phenolic compound metabolism among tea plants in the section *Thea* of the genus *Camellia*. *Food Research International*, 135, p. 1-11, 2020.

MAYSER, P., FROMME, S., LEITZMANN, G., & GRÜNDER, K. The yeast spectrum of the ‘tea fungus Kombucha’ Das Hefespektrum des ‘Teepilzes Kombucha’. *Mycoses*, v. 38, n. 7-8, p. 289-295, 1995.

MAY, A., NARAYANAN, S., ALCOCK, J., VARSANI, A., MALEY, C., & AKTIPIIS, A. A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, v. 7, p. e7565, 2019.

MAPA, Instrução Normativa N° 41, de 17 de Setembro de 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete da Ministra, Ed. 181Seção 1, Pág. 13. 18 de Setembro de 2019.

MARSH, AJ, O'SULLIVAN, O., HILL, C., ROSS, RP E COTTER, PD análise baseada em sequência das composições bacterianas e fúngicas de amostras múltiplas de kombucha (fungo do chá). *Microbiologia de alimentos* , v. 38, p. 171-178, 2014.

MARZBAN, Fatemeh e cols. O chá de Kombucha melhora a encefalomielite autoimune experimental em modelo de camundongo de esclerose múltipla. *Imunologia Alimentar e Agrícola* , v. 26, n. 6, pág. 782-793, 2015.

MIRANDA, J. F., RUIZ, L. F., SILVA, C. B., UEKANE, T. M., SILVA, K. A., GONZALEZ, A. G. M. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of food science*, v. 87, n. 2, p. 503-527, 2022.

MOHAMMADSHIRAZI, Ahmad; KALHOR, Elnaz Bagheri. Análises energéticas e de custo da produção da bebida kombucha. *Revisões sobre Energia Renovável e Sustentável* , v. 55, p. 668-673, 2016.

MOURA, CLA. Maceração enzimática do purê de abóbora (cucurbita moschata) para produção de néctar. 2015.

NORONHA, M. C., CARDOSO, R. R., DOS SANTOS D'ALMEIDA, C. T., DO CARMO, M. A. V., AZEVEDO, L., MALTAROLLO, V. G. Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and comprehensive phenolic profile changes during fermentation, and antimalarial activity. *Food Chemistry*, v. 384, p. 132515, 2022.

NOVELINA, N.; FIANA, R.M.; YARNI, D.F. Characteristics of pumpkin (Cucurbita moschata) fermented beverage products with the addition of a powder milk mixture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 515(1), p. 1-8, 2020.

PAIVA, E.P. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de folatos em alimentos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Pernambuco. Recife, 162 p. 2012.

PATEL, A.S.; BARIYA, A.R.; GHODASARA, S.N.; CHAVDA, J.A; PATIL, S.S. Total carotene content and quality characteristics of pumpkin flavoured buffalo milk, *Heliyon*, 6, p. 1-5, 2020.

PÉREZ-BURILLO, S., GIMÉNEZ, R., RUFÍAN-HENARES, JA, & PASTORIZA, S. Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. *Food Chemistry*, v. 248, p. 111-118, 2018.

PROVESI, J. G., DIAS, C. O.; AMANTE, E. R.; Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*; v.128, p.195–202, 2011.

RIGLING, M., YADAV, M., YAGISHITA, M., NEDELE, A. K., SUN, J., & ZHANG, Y. Biosynthesis of pleasant aroma by enokitake (*Flammulina velutipes*) with a potential use in a novel tea drink. *LWT*, v. 140, p. 110646, 2021.

ROMERO RODRÍGUEZ, J.A.; ASCHERI, J.L.R.; SILVA, A.J.L.; Caracterização física de snacks expandidos de grãos de milho e alterações no perfil carotenóide. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76, p.68–75, 2021.

SARKAYA, Pınar; AKAN, Ecem; KINIK, Ozer. Use of kombucha culture in the production of fermented dairy beverages. *LWT*, v. 137, p. 110326, 2021.

SANTOS, Mafalda Jorge dos. Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. 2016. Tese de Doutorado.

SILVA, M.E.S.H.A. Desenvolvimento de uma kombucha alcoólica: protótipo Industrial. 2021.

SHARIFUDIN, S. A., HO, W. Y., YEAP, S. K., ABDULLAH, R., & KOH, S. P. Fermentation and characterisation of potential kombucha cultures on papaya-based substrates. *Lwt*, v. 151, p. 112060, 2021.

STEINKRAUS, K.H.; SHAPIRO, K.B.; HOTCHKISS, J.H.; MORTLOCK, R.P. Examinations on antibiotic activity of tea fungus/Kombucha beverage. *Acta Biotechnology*, v16, p. 199-205, 1996.

SRINIVASAN, R.; SMOLINSKE, S.; GREENBAUM, D; Probable gastrointestinal toxicity of kombucha tea. *Journal of General Internal Medicine*, v. 12, p. 643-644, 1997.

SUNGHEE KOLE, A.; JONES, H. D.; CHRISTENSEN, R.; GLADSTEIN, J. A case of kombucha tea toxicity. *Journal Intensive Care Medicine*, v. 24, n. 3, p. 205- 7, 2009.

SUHRE, Tais. *Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana*. 2020.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, v. 102(3), p. 938-953, 2007.

TALEBI, M., FRINK, L. A., PATIL, R. A., & ARMSTRONG, D. W. Examination of the varied and changing ethanol content of commercial kombucha products. *Food Analytical Methods*, v. 10, p. 4062-4067, 2017.

URZEDO, N. D. R.. *O chá verde e suas propriedades: uma breve revisão bibliográfica abrangendo os anos 2000 a 2020*. 2020.

VOHRA, B. M., FAZRY, S., SAIRI, F., & BABUL-AIRIANAH, O. Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, v. 15, n. 2-1, p. 298-302, 2019.

WATAWANA, MI, JAYAWARDENA, N., GUNAWARDHANA, CB, & WAISUNDARA, VY Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha 'tea fungus'. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 51, n. 2, p. 490-498, 2016.

WEE YIN, K.; UTRA, U.; ROSMA, A., EFFARIZAH, M.E., ROSLI, W.I.W., PARK, Y.H. Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. *Food Science Biotechnology*. 27, p. 525-535, 2017.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food chemistry*, v. 67, n. 4, p. 399-414, 1999.

XIA, X., DAI, Y., WU, H., LIU, X., WANG, Y., YIN, L., & ZHOU, J Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage. *Journal of Functional Foods*, v. 62, p. 103549, 2019.

ZHAO, J.; LIU, W.; CHEN, D.; ZHOU, C.; SONG, Y.; ZHANG, Y., ... LI, Q. Microbiological and physicochemical analysis of pumpkin juice fermentation by the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. *Journal of Food Science*, 80(2), p. C241-C251, 2015.

ZHAO<sup>b</sup>, Z.-J & SUI, Y.-C & WU, HUA-WEI & ZHOU, CAI-BI & HU, X.-C & ZHANG, J. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30. 732-741, 2019.

ZENG, L.; MA, M.; LI, C.; LUO, L. Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures. *Int. J. Food Prop.* 20, 1–18. 2017

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), p. 555–559, 1999.



\* B R 1 0 2 0 2 3 0 2 5 5 1 2 A 2 \*

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023025512-4 A2

(22) Data do Depósito: 05/12/2023

(43) Data da Publicação Nacional:  
17/06/2025

(54) **Título:** PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA

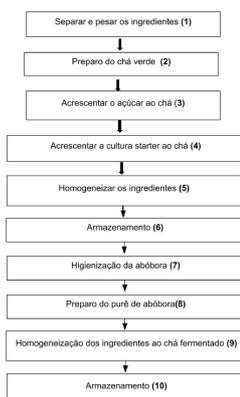
(51) **Int. Cl.:** A23L 2/38; A23L 2/52; A23F 3/16; A23L 33/135; A23L 19/00.

(52) **CPC:** A23L 2/382; A23L 2/52; A23F 3/163; A23L 33/135; A23L 19/09.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** EMMANUELA PRADO DE PAIVA AZEVEDO; CARLA ELIARIA ALVES DE MENDONCA; MARINA FRANCA ELIAS DA SILVA; JULIANA FRAGOSO ACIOLI; JOAO VITOR GOMES DA SILVA; ANA CAROLINA DOS SANTOS COSTA.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA. A presente invenção refere-se ao processo de elaboração de kombucha saborizada com purê de abóbora. O processo, relacionado ao setor técnico de alimentos, possui uma metodologia de baixo custo, requerendo ingredientes de fácil acesso e processamento simples, resultando em um produto de alto valor nutricional conferido pela adição do purê de abóbora, características organolépticas e aspectos sensoriais de textura e sabor similares à kombucha comum. A abóbora é um fruto altamente rico em macronutrientes e micronutrientes como: potássio, magnésio, complexo B, cálcio, ferro e principalmente vitamina A e C e entre outros. Dessa maneira, ao ser inserido o purê de abóbora no processo final da Kombucha, ocasiona aumento dos valores nutricionais da bebida fermentada potencializando funções microbiológicas, sensoriais, e principalmente na disponibilidade de carotenoides pró-vitamínico, que pode servir como fonte de vitamina A para populações, considerando os aspectos, nutricionais, econômicos e sociais. Dessa forma, o processamento do produto envolve técnica e utensílios apropriados para a produção da kombucha com a saborização de purê de abóbora.



## **“PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA”**

### **Campo da invenção**

[001] A kombucha saborizada com purê de abóbora é uma alternativa de uma bebida nutritiva, pois a kombucha é uma bebida fermentada que tem propriedades funcionais, probióticas e tem ações benéficas comprovadas cientificamente, como atividades antioxidantes, antimicrobiana, antidiabética e anticarcinogênica. Esses benefícios estão associados à presença de microrganismos probióticos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Já a abóbora é um alimento rico em nutrientes que, quando adicionada à kombucha, aumenta os valores nutricionais da bebida e também a sua disponibilidade de vitamina A. A produção desta invenção segue o processo regular de uma kombucha, que resulta em aspectos sensoriais similares e organolépticos a uma kombucha comum, porém requer utilização do purê de abóbora na saborização, que resulta em uma bebida com alto valor nutricional. Esta invenção caracteriza-se por ser um processo compreendido pelo setor técnico de alimentos, que possui uma metodologia simples e prática, sem necessidade de utilização de equipamentos específicos ou modernos de cozinha. Resultante em uma kombucha com alto valor de vitaminas, mas que possui características similares ao produto comum, podendo ser uma alternativa de fonte de vitamina A para populações e para quem procura uma bebida refrescante e saudável.

### **Fundamentos da invenção**

[002] As buscas realizadas revelaram a existência de patentes relacionadas a produção da kombucha. A patente KR20210153184A intitulada “Manufacturing Method of Kombucha” é a que mais se aproxima do que está descrito nesta patente, há uma descrição de produção que não inclui a segunda etapa de fermentação.

[003] É importante destacar que não há patentes depositadas com a saborização da kombucha com purê de abóbora.

## Descrição da invenção

[004] A invenção pode ser compreendida através da descrição detalhada abaixo.

[005] A **FIGURA 1** apresenta o fluxograma geral do processo de elaboração da Kombucha.

[006] Para o preparo do chá fermentado, a água filtrada foi aquecida até atingir a temperatura de 90 °C. Em seguida, adicionado o chá verde, para realização da infusão durante 20 minutos. Em seguida o chá foi filtrado e adicionado de açúcar cristal e mantido em temperatura ambiente, aproximadamente 25 ±1 °C. Foi adicionado a cultura starter de kombucha artesanal Canadense ao chá e após homogeneização, coberto com tecido TNT previamente higienizado, mantido à temperatura ambiente de 22 a 25 °C e protegidos de incidência direta de luz e vento. No 12º dia da fermentação da kombucha, retira-se o chá fermentado para realizar a saborização com a abóbora (*Cucurbita moschata*). Os frutos de abóbora foram higienizados, as sementes retiradas, cortada em pedaços e cozidos no vapor por 12 min, e, em seguida, amassado em textura de purê. Adiciona-se 10% açúcar e 15% purê ao chá fermentado. O produto final foi acondicionado em garrafas pet, previamente higienizadas, e mantidos em temperatura ambiente (25 °C) por 72hs, protegidas de luz direta e vento. Depois dessa etapa, a kombucha foi armazenada sob refrigeração (5 °C) por 60 dias.

## REIVINDICAÇÕES

**1. “PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA”** compreende a elaboração de uma *kombucha*, segue o processo regular de produção de uma bebida fermentada tipo kombucha, que resulta em aspectos sensoriais similares e organolépticos a uma kombucha comum, porém requer utilização do purê de abóbora na saborização, que resulta em uma bebida com alto valor nutricional, assim, **caracterizado por** compreender as seguintes fases de:

- A) Separar e pesar os ingredientes
- B) Preparo do chá
- C) Acrescentar o açúcar ao chá
- D) Acrescentar a cultura starter ao chá
- E) Homogeneizar os ingredientes
- F) Armazenamento
- G) Higienização da abóbora
- H) Preparo do purê de abóbora
- I) Homogeneização dos ingredientes ao chá fermentado
- J) Armazenamento

**2. “PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa A, os ingredientes requeridos foram separados e pesados em balança analítica.

**3. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa B, o chá foi preparado aquecendo água filtrada até atingir a temperatura de 90 °C. Em seguida, adicionado o chá verde, para realização da infusão durante 20 minutos.

**4. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa C, o chá foi filtrado e adicionado 10% açúcar cristal e mantido em temperatura ambiente, aproximadamente 25 ±1 °C.

**5. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"**, e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa D, foi adicionado a cultura starter de kombucha artesanal Canadense ao chá.

**6. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"**, e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa E, homogeneização do açúcar e da cultura starter ao chá.

**7. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"**, e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa F, a mistura foi coberta com tecido TNT previamente higienizado, mantido à temperatura ambiente de 22 a 25 °C e protegidos de incidência direta de luz e vento por 12 dias.

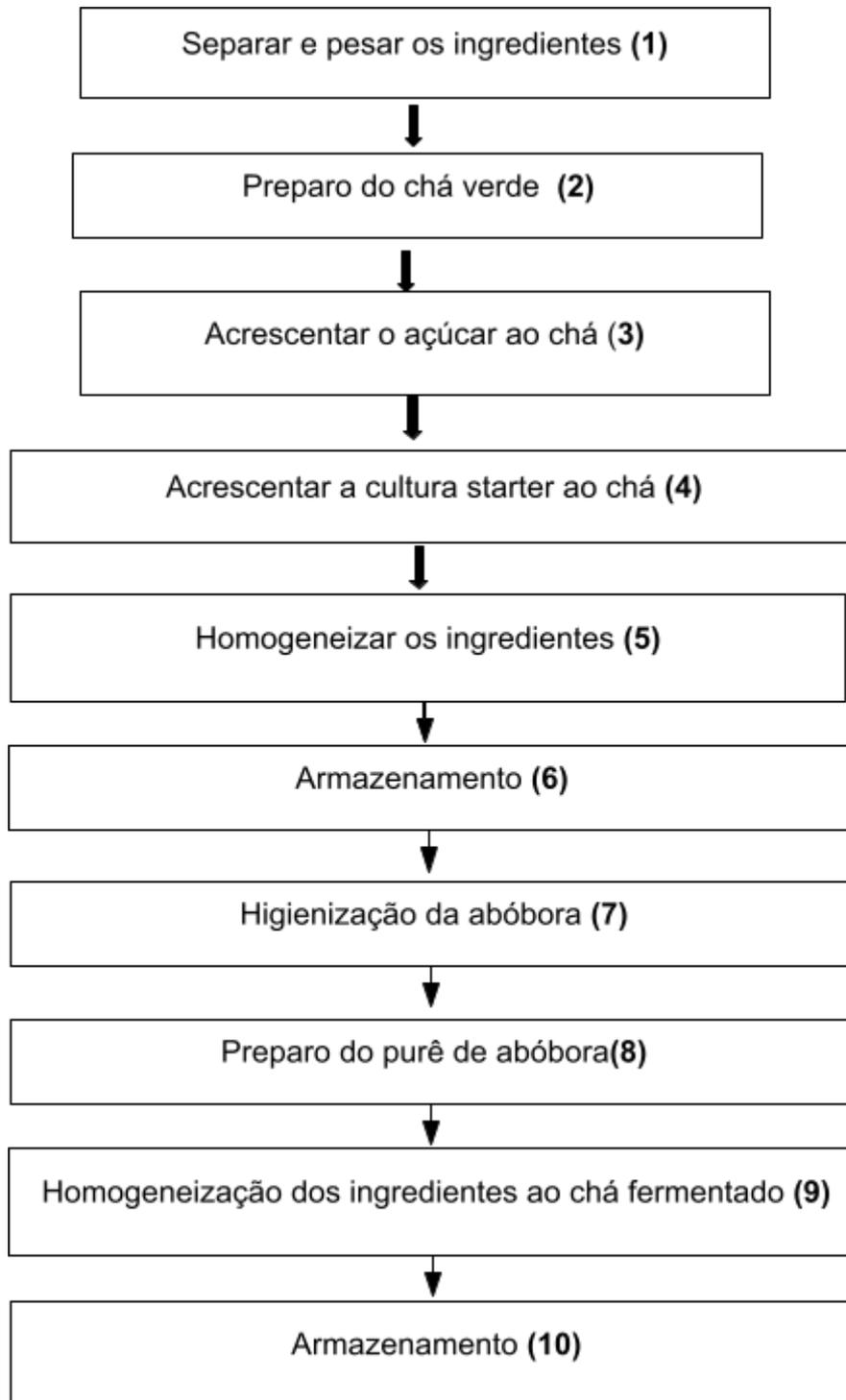
**8. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"** e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa G, higienização da abóbora, as sementes retiradas e cortada em pedaços.

**9. "PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA"** e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa H, os pedaços de abóbora foram cozidos no vapor por 12 min, e, em seguida, amassado em textura de purê.

**10. “PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA”** e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa I, adiciona-se o açúcar e o purê ao chá fermentado e misturar até homogeneizar.

**11. “PROCESSO DA ELABORAÇÃO DE KOMBUCHA SABORIZADA COM PURÊ DE ABÓBORA”** e acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa J, o produto final foi acondicionado em garrafas pet, previamente higienizadas, e mantidos em temperatura ambiente (25 °C) por 72hs, protegidas de luz direta e vento. Depois dessa etapa, a kombucha foi armazenada sob refrigeração (5 °C) por 60 dias.

**DESENHOS**



**FIGURA 1**

**RESUMO****“PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE *KOMBUCHA* SABORIZADA COM  
PURÊ DE ABÓBORA”**

A presente invenção refere-se ao “processo de elaboração de *kombucha* saborizada com purê de abóbora”. O processo, relacionado ao setor técnico de alimentos, possui uma metodologia de baixo custo, requerendo ingredientes de fácil acesso e processamento simples, resultando em um produto de alto valor nutricional conferido pela adição do purê de abóbora, características organolépticas e aspectos sensoriais de textura e sabor similares à *kombucha* comum. A abóbora é um fruto altamente rico em macronutrientes e micronutrientes como: potássio, magnésio, complexo B, cálcio, ferro e principalmente vitamina A e C e entre outros. Dessa maneira, ao ser inserido o purê de abóbora no processo final da *Kombucha*, ocasiona aumento dos valores nutricionais da bebida fermentada potencializando funções microbiológicas, sensoriais, e principalmente na disponibilidade de carotenoides pró-vitamínico, que pode servir como fonte de vitamina A para populações, considerando os aspectos, nutricionais, econômicos e sociais. Dessa forma, o processamento do produto envolve técnica e utensílios apropriados para a produção da *kombucha* com a saborização de purê de abóbora.