



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

SHEILA DA ROCHA COUTO CRUZ

ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE KOMBUCHA FERMENTADA EM TRÊS TIPOS
DE AÇÚCARES (CRISTAL, DEMERARA E MASCAVO)

BRASÍLIA, 2023

SHEILA DA ROCHA COUTO CRUZ

ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE KOMBUCHA FERMENTADA EM TRÊS TIPOS
DE AÇÚCARES (CRISTAL, DEMERARA E MASCAVO)

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

ORIENTADORA: FARMACÊUTICA ESPECIALISTA CARLA AZEVEDO BILAC

COORIENTADORA: PROFA. DRA. DANIELA CASTILHO ORSI

BRASÍLIA, 2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Rocha Couto Cruz, Sheila
dCruz, ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE KOMBUCHA FERMENTADA EM TRÊS
Sheila TIPOS DE AÇÚCARES (CRISTAL, DEMERARA E MASCAVO) / Sheila da
C957e Rocha Couto Cruz; orientador Carla Azevedo Bilac; co
orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2023.
41 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Açúcar mascavo. 2. Chá verde. 3. Compostos Fenólicos. 4.
Atividade Antioxidante. I. Bilac, Carla, orient.
II. Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.

SHEILA DA ROCHA COUTO CRUZ

ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE KOMBUCHA FERMENTADA EM TRÊS TIPOS
DE AÇÚCARES (CRISTAL, DEMERARA E MASCAVO)

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Farmacêutica Especialista Carla Azevedo Bilac
(FCE/ Universidade De Brasília)

Farmacêutica Mestre Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade De Brasília)

Farmacêutica Especialista Karolina Oliveira Gomes
(FCE/ Universidade De Brasília)

Farmacêutica Especialista Marta Oliveira De Araújo
(FCE/ Universidade De Brasília)

BRASÍLIA, 2023

AGRADECIMENTOS

Ao Deus altíssimo toda honra e adoração, a quem sou grata pela minha existência e por minha salvação, e por todas as coisas que Ele por sua infinita misericórdia tornou possível na minha vida.

À minha mãe querida que me concedeu todo o suporte para que galgasse tão alto sonho.

À minha orientadora e coorientadora, que gentilmente e pacientemente me orientaram com toda competência que lhes é intrínseca.

Às minhas avaliadoras que de igual forma se mostraram tão prestativas em estarem me avaliando, e me fazendo crescer como profissional.

E a todos os demais amigos e colegas que de alguma forma se fizeram presentes nessa jornada, me apoiando nos momentos mais difíceis. Fica aqui minha eterna gratidão.

RESUMO

O presente trabalho avaliou os aspectos físicos e químicos da bebida kombucha utilizando três diferentes açúcares (cristal, demerara e mascavo) como substrato de fermentação. A acidez titulável, o pH, concentração de sacarose, atividade antioxidante, fenólicos, DPPH e ABTS foram métodos importantes utilizados. O pH das amostras de kombucha (2,65-3,49 no 7º dia de fermentação e 2,50-2,92 no 14º dia de fermentação) estavam de acordo com a legislação brasileira que estabelece um valor entre 2,5 e 4,2. Observou-se uma redução da sacarose das amostras de kombucha de 6,2-6,8% em 7 dias para 3,5-6,2% em 14 dias de fermentação. No que se refere ao teor de sólidos solúveis, as amostras de kombucha tiveram um declínio dos valores de 10,0°Brix no chá verde adoçado antes da fermentação para 7,7-7,9°Brix em 7 dias e 6,0-6,3°Brix em 14 dias de fermentação. A fermentação da kombucha é produto de uma simbiose de bactérias e leveduras presentes na bebida que transformam os açúcares em ácidos orgânicos como acético, glucônico, láctico, málico, cítrico e tartárico. O chá verde apresentou valores de compostos fenólicos de 26,8 mg GAE/100 mL e atividade antioxidante de 214,6 mM TE/100 mL no teste de ABTS. O açúcar mascavo à 10% (p/v) apresentou teor de compostos fenólicos de 131 mg GAE/100 mL e atividade antioxidante de 320,1 mM TE/100 mL no teste de ABTS, enquanto os açúcares demerara e cristal não apresentaram compostos fenólicos e atividade antioxidante. Por consequência, a kombucha de açúcar mascavo apresentou os maiores valores de compostos fenólicos (67,0 mg GAE/100 mL) e atividade antioxidante (135,2 mM TE/100 mL pelo método de ABTS) após 14 dias de fermentação, em relação as bebidas elaboradas com açúcares demerara e cristal. A capacidade antioxidante do açúcar mascavo está fortemente relacionada aos compostos fenólicos naturais presentes na cana-de-açúcar, enquanto o processo de refinamento dos açúcares demerara e cristal não preserva esses compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são considerados importantes constituintes bioativos dos alimentos, tornando o açúcar mascavo uma alternativa mais saudável em relação aos açúcares demerara e cristal para ser usado na produção de kombucha tanto em casa quanto na indústria.

ABSTRACT

The present work evaluated the physical and chemical aspects of the kombucha beverage using three different sugars (white, demerara and brown) as a fermentation substrate. Titratable acidity, pH, sucrose concentration, antioxidant activity, phenolics, DPPH and ABTS were important methods used. The pH of the kombucha samples (2.65-3.49 on the 7th day of fermentation and 2.50-2.92 on the 14th day of fermentation) were in accordance with Brazilian legislation that establishes a value between 2.5 and 4.2. There was a reduction of sucrose in kombucha samples from 6.2-6.8% in 7 days to 3.5-6.2% in 14 days of fermentation. Regarding the soluble solids content, the kombucha samples had a decline from values of 10.0°Brix in sweetened green tea before fermentation to 7.7-7.9°Brix in 7 days of fermentation and 6.0- 6.3°Brix in 14 days of fermentation. Tea fermentation is the product of a symbiosis of bacteria and yeast present in the beverage that transform sugars into organic acids such as acetic, gluconic, lactic, malic, citric, and tartaric. The green tea showed values of phenolic compounds of 26.8 mg GAE/100 mL and antioxidant activity of 214.6 mM TE/100 mL in the ABTS test. Brown sugar at 10% (w/v) had a phenolic compound content of 131 mg GAE/100 mL and antioxidant activity of 320.1 mM TE/100 mL in the ABTS test, while demerara and white sugars did not show phenolic compounds and antioxidant activity. Brown sugar kombucha showed 67.0 mg GAE/100 mL of phenolic compounds and 135.2 mM TE/100 mL of antioxidant capacity by the ABTS method after 14 days of fermentation. The antioxidant capacity of brown sugar is strongly related to the natural phenolic compounds present in sugarcane, while the refining process of demerara and white sugars does not preserve these phenolic compounds. Phenolic compounds are considered important bioactive food constituents, making brown sugar a healthier alternative to demerara and white sugars to be used in kombucha production both at home and in industry.

Key words: brown sugar, green tea, phenolic compounds, antioxidant activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	MICROBIOTA DA KOMBUCHA	12
2.2	ATIVIDADE METABÓLICA DOS MICRORGANISMOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA.....	13
2.3	COMPOSIÇÃO DA KOMBUCHA	15
2.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA KOMBUCHA	16
2.5	EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DA KOMBUCHA	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	JUSTIFICATIVA	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1	BEBIDAS FERMENTADAS	21
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BEBIDAS FERMENTADAS.....	21
5.2.1	Acidez Total	21
5.2.2	pH	21
5.2.3	Concentração de Sacarose	21
5.2.4	Sólidos Solúveis Totais (SST)	22
5.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
5.3.1	Compostos Fenólicos	22
5.3.2	Atividade antioxidante - DPPH	23
5.3.3	Atividade antioxidante - ABTS	24
5.4	ESTATÍSTICA.....	24
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
	ANEXO 1	38
	ANEXO 2	39
	ANEXO 3	
	ANEXO 4	41

1 INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada de origem asiática, que ganhou popularidade no Ocidente devido aos seus efeitos terapêuticos, como antimicrobiano, antioxidante e anticancerígeno (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

A bebida tradicional é feita a partir da fermentação, tradicionalmente, de chá verde (*Camellia sinensis*) adoçado. As proporções de chá e açúcar e o tempo e temperatura de fermentação utilizados na produção do kombucha podem variar de acordo com cada região ou preferências do consumidor (DE FILIPPIS *et al.*, 2018; JAYABALAN *et al.*, 2016).

A fermentação do chá é produto de uma simbiose de bactérias e leveduras instaladas em um filme de celulose. Este filme de celulose é chamado de SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), (Santos, 2016).

Enquanto as leveduras osmofílicas fermentam o açúcar no chá e produzem etanol, as bactérias oxidam o álcool e produzem ácido acético. Outros ácidos orgânicos são formados além do ácido acético, como glucônico, láctico, málico, cítrico e tartárico, que possuem atividade antibacteriana e previnem a contaminação do kombucha por bactérias patogênicas (LEAL *et al.*, 2018; NEFFE-SKOCINSKA *et al.*, 2017).

Os efeitos benéficos da kombucha são atribuídos à presença de microrganismos probióticos (bactérias acéticas e lácticas), aminoácidos, polifenóis do chá, vitaminas solúveis em água e uma variedade de micronutrientes produzidos durante fermentação (FU *et al.*, 2014).

O processo de fermentação age como um importante aliado na conservação dos alimentos, onde há formação de vários produtos de ação antimicrobiana, como ácidos orgânicos, álcool e bacteriocinas (MARSHCO *et al.*, 2017).

Muitos dos efeitos benéficos atribuídos a kombucha, como prevenir o câncer e aumentar a imunidade, estão relacionados com a atividade antioxidante da bebida (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Em relação ao sabor, segundo (LEAL *et al.*, 2018), a kombucha é agridoce e carbonatada. Pode ser um substituto para refrigerantes devido ao seu alto grau de carbonatação, sendo uma alternativa mais saudável. Para carbonatar a kombucha

realiza-se uma segunda fermentação, e este processo pode ser realizado adicionando uma fonte de açúcar ou suco de frutas para a bebida já fermentada.

Após a bebida estar pronta, é recomendado acondicionar em ambiente refrigerado, melhorando seu aspecto sensorial e reduzindo a velocidade da fermentação com a redução da temperatura (KIM and ADHIKARI, 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROBIOTA DA KOMBUCHA

Kombucha é uma bebida fermentada refrescante produzida por uma associação simbiótica de bactérias do ácido acético, bactérias do ácido láctico e leveduras. Leveduras e bactérias do ácido acético estão presentes durante a fermentação do kombucha em torno de 10^6 - 10^8 UFC/mL (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2020). Embora as bactérias do ácido láctico possam se desenvolver, essas não parecem ser uma parte essencial do ecossistema microbiano do kombucha, pois nem sempre são encontradas (MURPHY *et al.*, 2018).

As bactérias do ácido acético (BAA) são os microrganismos mais característicos das fermentações de kombucha. As BAA encontradas no kombucha pertencem aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. As BAA não são consideradas patogênicas para humanos e não produzem compostos tóxicos ou aminas biogênicas (LAUREYS *et al.*, 2020; MAMLOUK e GULLO, 2013).

As leveduras são parte integrante da kombucha, pois estão sempre presentes durante o processo de fermentação. Uma grande diversidade já foi recuperada, compreendendo espécies do gênero *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera/Brettanomyces*, GAGGIA *et al.*, 2019. ,VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2020).

As leveduras são microrganismos eucarióticos pertencentes à classe dos fungos. São imóveis, com cerca de 8 mm de diâmetro, com células esféricas ou ovais. Elas são facultativamente anaeróbicas, o crescimento ideal é em torno de 20-30°C e pH 4,5-7,0, mas muitas leveduras ainda podem crescer em pH 2,5 (KURTZMAN *et al.*, 2011).

A presença de bactérias do ácido láctico (BAL) no kombucha é inconsistente (MURPHY *et al.*, 2018). Usualmente, elas não estão presentes (GAGGIA *et al.*, 2019; NEFFE-SKOCINSKA *et al.*, 2017) ou presentes em baixa quantidade (MARSH *et al.*, 2014). No estudo de COTON *et al.* (2017), as BAL recuperadas foram principalmente *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus nagelii*, ambas conhecidas por serem bastante tolerantes a ácidos.

Dentre os principais gêneros do grupo das bactérias lácticas estão *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. As BAL são bactérias Gram-positivas, não são móveis, são em forma de bastonete (*Lactobacillus*) ou esféricas (*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oenococcus*), e não esporulam. São anaeróbias facultativas, mas não usam oxigênio para o seu metabolismo. Seu crescimento ideal está entre 25-40°C e pH 4,0-6,0. Elas são consideradas seguras para uso em alimentos, e muitas BAL são tidas como probióticas (QUINTO *et al.*, 2014).

MARSH *et al.*, (2014) relataram a análise de várias amostras de kombucha, a fim de fornecer um estudo mais aprofundado da microflora e observar as mudanças ocorridas na população microbiana durante a produção da kombucha. Extraíram o DNA de películas celulósicas de amostras diferentes em dois tempos de fermentação. Diferentes perfis foram detectados entre as amostras, no entanto, os principais gêneros de bactérias que estavam presentes foram: *Gluconacetobacter* (>85%) e *Lactobacillus* (até 30%). O gênero *Zygosaccharomyces* foi a levedura encontrada em >95% dos chás fermentados.

2.2 ATIVIDADE METABÓLICA DOS MICRORGANISMOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA

O processo de fermentação do kombucha normalmente dura 8-14 dias à temperatura ambiente, período no qual as propriedades do chá adoçado mudam intensamente. Dentro do ecossistema microbiano da kombucha, várias relações simbióticas podem ser encontradas (GAGGIA *et al.*, 2019; MAMLOUK e GULLO, 2013, MAY *et al.*, 2019).

O substrato para a fermentação do kombucha é geralmente a sacarose. Espécies de *Gluconobacter* também podem usar diretamente a sacarose, mas *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* são espécies dependentes das leveduras para a hidrólise da sacarose em glicose e frutose (GAGGIA *et al.*, 2019; MAMLOUK e GULLO, 2013, MAY *et al.*, 2019).

A glicose e a frutose são fermentadas por leveduras em etanol, dióxido de carbono e glicerol. O etanol produzido por leveduras é utilizado pelas BAA para a produção de ácido acético. Além disso, a presença de baixas concentrações de

etanol (cerca de 1% v/v) estimula a produção de celulose por BAA. Espécies de *Gluconobacter* convertem glicose em ácido glucônico e ácido glucurônico. O dióxido de carbono escapará (pelo menos parcialmente). Além disso, a autólise de células de levedura pode estimular o crescimento de BAA através da liberação de nutrientes (LAUREYS *et al.*, 2020).

Os principais substratos residuais do kombucha são a frutose, glicose e sacarose; e os principais metabólitos são etanol, glicerol, ácido acético, ácido glucônico, ácido glucurônico, ácido D-sacárico 1,4-lactona e, às vezes, ácido láctico. No entanto, ácido quínico, ácido oxálico, ácido málico e ácido cítrico também foram relatados. A concentração de etanol declina devido à sua conversão em acético ácido e/ou celulose. As concentrações finais foram relatadas como sendo cerca de 10 g/L de etanol, 3 g/L de ácido acético e 1 g/L de glicerol (LEAL *et al.*, 2018; NEFFE-SKOCINSKA *et al.*, 2017).

Uma das pressões seletivas mais importantes durante a fermentação do kombucha é o estresse ácido devido à produção de ácidos orgânicos pelas BAA (ácido acético, ácido glucônico, ácido glucurônico) e às vezes pelas BAL (ácido láctico e ácido acético). O pH do chá de kombucha começa em 5,0-7,0, cai para 2,0-4,0 após 7 dias de incubação, e pode diminuir para menos de 2,0 após incubação prolongada (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; NEFFE-SKOCINSKA *et al.*, 2017).

Outra importante pressão seletiva que orienta a comunidade microbiana é a disponibilidade limitada de nutrientes como vitaminas e compostos nitrogenados. As únicas fontes de nutrientes são as folhas de chá e o açúcar usados na receita. As baixas concentrações de nutrientes explicam a prevalência das espécies *Dekkera/Brettanomyces* no kombucha, pois essas leveduras foram consideradas mais competitivas em um ambiente pobre em nutrientes (LAUREYS *et al.*, 2018).

Os parâmetros de fermentação do kombucha exercem um impacto significativo na composição microbiana e, portanto, na composição dos metabólitos do kombucha. Por exemplo, as dimensões do recipiente de fermentação e a razão da área de superfície para o volume pode influenciar o nível de oxigenação durante a fermentação. A baixa oxigenação e, portanto, baixa produção de ácido por BAA podem resultar em um pH acima de 4, o que pode estimular o crescimento BAL e, ocasionando maior produção de ácido láctico (DE FILIPPIS *et al.*, 2018).

O tempo de fermentação também tem um impacto substancial no estresse ácido para o ecossistema microbiano e, portanto, para a composição química do produto. Temperaturas de fermentação mais altas parecem beneficiar as BAL, o que é consistente com suas temperaturas de crescimento ideais mais altas em comparação com leveduras e BAA (DE FILIPPIS *et al.*, 2018).

2.3 COMPOSIÇÃO DA KOMBUCHA

A kombucha apresenta propriedades físico-químicas onde podemos notar açúcares, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, além de sua atividade antioxidante e seu pH ácido característico. E entre os ácidos presentes na bebida, os principais são os ácidos acético, glucônico, glicurônico, com o ácido acético em maior concentração (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019).

Entre os parâmetros físico-químicos estabelecidos pela legislação brasileira, o pH da kombucha deve estar entre 2,5 e 4,2. Segundo a instrução normativa nº 41, em sua composição pode ser adicionado polpa de fruta, vegetais, extratos, especiarias, mel, entre outros aditivos permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019).

O ácido acético é geralmente um dos ácidos predominantes no kombucha. No entanto, este ácido tem um sabor bastante pungente, o que pode não ser desejável em grandes quantidades no kombucha. O ácido glucônico também é frequentemente encontrado no kombucha e sua acidez é descrita como suave e refrescante. (SHAHBAZI *et al.*, 2018; VUKMANOVIC *et al.*, 2022).

A glicose também pode ser oxidada na kombucha por BAA em ácido glucurônico, que se acredita possuir efeitos promotores da saúde. Além disso, o ácido D-sacárico 1,4-lactona, também é um composto que se acredita possuir propriedades promotoras da saúde, e é produzido durante a fermentação da kombucha. O ácido D-sacárico 1,4-lactona é um inibidor competitivo da β -glicuronidase, uma enzima que hidrolisa glicuronídeos conjugados em compostos aglicônicos cancerígenos no intestino (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2014).

O ácido láctico nem sempre é encontrado na kombucha, pois as BAL não estão sempre presentes. Este ácido possui uma leve acidez, então a presença de BAL no kombucha pode parecer mais desejável do que a presença de BAA. No entanto, as BAL podem representar outros desafios à medida que continuam a produzir ácido após o engarrafamento anaeróbico da bebida, enquanto a atividade metabólica das bactérias do ácido acético cessa após o engarrafamento em condições anaeróbicas.

O chá utilizado para a fabricação do kombucha também impacta no processo de fermentação e na avaliação sensorial da bebida resultante. Os compostos mais característicos do chá são as catequinas, e essas concentrações diminuem ao longo do curso do processo de fermentação do kombucha, assim como, o teor de cafeína também reduz (GAGGIA *et al.*, 2019).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA KOMBUCHA

A atividade antimicrobiana da kombucha contra agentes patogênicos é atribuída principalmente ao ácido acético, ácidos orgânicos e outros metabólitos gerados na fermentação. Esses metabólitos são associados aos polifenóis do chá, principalmente as catequinas, que juntos inibem significativamente um amplo espectro de bactérias gram-positivas e negativas (KHALEIL *et al.*, 2020).

Vários estudos descrevem experimentos *in vitro* comprovando a atividade antimicrobiana do kombucha (KHALEIL *et al.*, 2020; SHAHBAZI *et al.*, 2018; VUKMANOVIC *et al.*, 2022).

VUKMANOVIC *et al.*, (2022) produziram a bebida kombucha a partir do efluente da clarificação do mosto de uva. O substrato para fermentação foi preparado diluindo o efluente esterilizado da vinícola em 70, 50 e 30 g/L de açúcares totais. A fermentação durou nove dias à 20, 25 e 30°C. A bebida kombucha foi produzida com sucesso em todos as três temperaturas e níveis de açúcar testados. Observou-se que todas as bebidas de kombucha apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028) testadas. As amostras controle

(efluente da clarificação do mosto de uva e chá preto não inoculados e kombucha neutralizado à pH 7,0) não apresentaram efeito antimicrobiano. Não houve atividade antimicrobiana contra a levedura testada (*Candida albicans* ATCC 10231). A análise de correlação mostrou um aspecto positivo entre o teor ácido acético e a atividade antimicrobiana.

Al-MOHAMMADI *et al.*, (2021) testaram quatro tipos de preparações (kombucha fermentado, kombucha neutralizado, kombucha tratado termicamente e chá não fermentado) em relação à atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 4957, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) e fúngicas (*Aspergillus flavus* ATCC 16872 e *Aspergillus niger* ATCC 20611), usando o ensaio de difusão em poço de ágar. A kombucha fermentada exerceu efeito antimicrobiano mais forte quando comparado com as bebidas de kombucha neutralizadas e tratadas termicamente. Zonas de inibição significativa de todas as cepas bacterianas e fúngicas testadas foram obtidas com a kombucha fermentada, em comparação com outras preparações de kombucha. O chá não fermentado não apresentou atividade antimicrobiana. Entre as cepas bacterianas testadas, *S. aureus* e *E. coli* foram os organismos mais sensíveis, registrando 19 e 18 mm de diâmetros da zona de inibição, respectivamente, ao empregar a preparação de kombucha fermentado e 12 mm diâmetro da zona de inibição de ambas as cepas ao empregar a preparação de kombucha tratado termicamente.

2.5 EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DA KOMBUCHA

A bebida kombucha é fonte de componentes bioativos, como polifenóis e ácido glucurônico. Os resultados benéficos do consumo de kombucha são atribuídos ao efeito sinérgico desses componentes, tornando-se uma bebida com potenciais propriedades benéficas para a saúde. É evidente que seu consumo pode proteger contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente devido ao

seu teor de polifenóis que inibe oxidação do LDL(Low Density Lipoprotein) regula o metabolismo do colesterol e previne a pressão arterial elevada (LEAL *et al.*, 2018).

A kombucha atrai muitos consumidores preocupados com a saúde que tendem a preferir um produto não filtrado e não pasteurizado, pois acreditam que certos microrganismos da kombucha possuem propriedades probióticas. No entanto, o potencial probiótico da kombucha parece ser bastante limitado, pois o consumo de leveduras vivas ou BAA não é comumente associada com benefícios para a saúde. Por outro lado, a presença de BAL pode conferir um benefício de saúde ao kombucha, o que torna sua presença desejável (LAUREYS *et al.*, 2020).

Por outro lado, vários estudos provaram que a kombucha com alta acidez exerce atividade antibacteriana contra uma ampla gama de bactérias. As propriedades antimicrobianas da kombucha são supostamente atribuídas aos ácidos orgânicos sintetizados. Confirma-se que os ácidos orgânicos fracos como o ácido acético possuem atividade inibitória em pH baixo, porque favorecem o estado não carregado e não dissociado da molécula, que é livremente permeável através da membrana plasmática e, portanto, entra na célula. A inibição do crescimento de bactérias patogênicas por ácidos fracos foi proposta como: (1) ruptura da membrana; (2) inibição de reações metabólicas essenciais; (3) estresse no pH intracelular e quebra da homeostase; (4) acúmulo de ânions tóxicos. Muito provavelmente bacteriocinas também são produzidas por bactérias e leveduras durante a fermentação do kombucha (VYNA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos físico-químicos de kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aferir o pH e acidez total;
- Quantificar a sacarose e os sólidos solúveis totais (°Brix) nas amostras de kombucha de diferentes açúcares;
- Determinar a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS e quantificar os compostos fenólicos.

4 JUSTIFICATIVA

Nos tempos atuais há uma procura cada vez maior por alimentos que visem o bem-estar geral do organismo. Em relação a isso, a bebida kombucha parece ter vindo de encontro as necessidades de uma população mais instruída, que começa a entender o valor de alimentos considerados funcionais. A kombucha ainda tem um amplo espaço para se consolidar em um mercado promissor e em expansão. No Brasil essa bebida vem se popularizando ainda de forma tímida, com produções artesanais e caseiras, enquanto lojas especializadas nesse tipo de produto não são muito populares por enquanto. Assim, trabalhos acadêmicos que divulguem mais informações sobre kombucha se tornam importantes propagadores dessa bebida probiótica já bem conhecida em países asiáticos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 BEBIDAS FERMENTADAS

A amostra de kombucha foi comprada de um fornecedor local do DF. Para o processo de fermentação foram utilizados açúcar mascavo orgânico, açúcar demerara orgânico e açúcar cristal orgânico na concentração de 10% (p/v), chá verde (*Camellia sinensis*) 4% (p/v) e água filtrada. A fermentação ocorreu por 7 e 14 dias em temperatura ambiente.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BEBIDAS FERMENTADAS

5.2.1 Acidez Total

A determinação da concentração de acidez total foi por meio da acidez titulável (IAL, 2008), foram utilizados 10 mL de cada amostra e transferidos para um béquer de 2500 mL. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de água destilada e 3 gotas da solução de fenolftaleína. A titulação foi iniciada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando bureta de 25 mL. A virada é indicada pelo aparecimento da coloração rosa. O cálculo foi feito de acordo com a equação:

$$\text{Ácido acético (\%)} = \frac{\text{Volume NaOH gasto} \times \text{Peso molecular HCl (60)}}{\text{Volume da amostra} \times 10}$$

5.2.2 pH

A aferição do pH foi analisado com auxílio de um pHmetro digital calibrado Gehaka modelo PG 1800 (AOAC, 2006). O pH inicial foi de 6,5 para os xaropes preparados com açúcar mascavo, demerara e cristal, respectivamente.

5.2.3 Concentração de Sacarose.

O teor sacarose foi determinado pelo método ADNS (3,5-dinitrosalicílicoácido) (MILLER, 1959). Para a hidrólise, foram pipetados 400 uL das amostras em tubos de

ensaio e adicionados 200 uL de Ácido Clorídrico Puro (P.A.). A mistura foi incubada à 60 °C com agitação para obtenção de uma solução límpida. Após 10 minutos os tubos de ensaio foram retirados do banho, neutralizados com 400 uL de NaOH 6N e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada. Em tubos de ensaio foram transferidos 500 uL das amostras hidrolisadas, 1700 uL de água destilada e 2000 uL do reagente DNS foram adicionados. As misturas foram incubadas em água fervente por 5 min e resfriadas à temperatura ambiente. Os valores de absorvância foram então registrados a 540 nm no espectrofotômetro UV-Vis. Uma curva de calibração (ANEXO 1) foi preparada com glicose na concentração de 0,2 a 0,8 g.L⁻¹. Os valores foram expressos em g (gramas) de sacarose por L (litros) de amostra (g.L⁻¹).

5.2.4 Sólidos Solúveis Totais (SST)

A concentração dos sólidos solúveis totais foi medida por meio do refratômetro. A concentração inicial de açúcar foi ajustada para 10 °Brix em todas as amostras de kombucha. As medições foram aferidas após a fermentação de 7 e 14 dias. A análise foi realizada em triplicata e os valores expressos em índice refratométrico (°Brix).

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados conforme protocolo de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912). Essa metodologia identifica a concentração de fenólicos na amostra. Inicialmente foi preparado uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3), adicionando 25 g de carbonato de sódio anidro em 100 mL de água destilada, dissolvido à 70°C e armazenado em temperatura ambiente por 24 horas. Para a análise, foram pipetadas em tubos de ensaio 200 µL da amostra, 8300 µL de água, 1000 µL da solução de carbonato de sódio e 500 µL do reagente de Folin-Denis. As amostras foram solubilizadas e repousaram por 30 minutos em

temperatura ambiente. A leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Vis foi realizada à 760 nm, usou-se água destilada para a absorbância zero. Uma curva de calibração (ANEXO 2) foi preparada com ácido gálico na concentração de 0,02 a 0,10 mg.L⁻¹, obtidos a partir da solução estoque (100 mg.L⁻¹). A análise das amostras foi realizada em triplicata e os valores expressos média ± desvio padrão em miligramas (mg) de ácido gálico equivalente (GAE) por 100 mililitros (mL)de amostra (mg GAE.100 mL⁻¹).

5.3.2 Atividade antioxidante - DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) com modificações (SILVEIRA, 2018). O DPPH é uma radical que na presença de amostras antioxidante, captura o hidrogênio (próton) estabilizando o radical. Dessa forma, observa-se a mudança da cor roxa para branca. Para a análise, uma solução estoque foi preparada na concentração de 0,8mM. Pesou-se 16 mg de DPPH, completou um balão volumétrico de 500 mL com álcool etílico absoluto e após homogeneizar a solução, foi transferida para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração. No dia da análise a solução de DPPH foi dissolvida em etanol até a leitura da absorbância entre 0,900 e 1,100 à 517nm no espectrofotômetro UV-Vis. Em tubos de ensaio as amostras foram diluídas no dia (0) zero: chá verde, xarope de açúcar mascavo (10% p/v), xarope de açúcar demerara (10% p/v) e xarope de açúcar cristal (10%), na proporção de 1:1, 2:3, 1:1 e 1:1, respectivamente. Nos dias 7 e 14 as bebidas de kombucha de açúcar mascavo, demerara e cristal foram diluídos na proporção de 1:2, 1:1 e 1:1, respectivamente. Após a diluição, amostras de 100 uL foram adicionadas à 3900 uL da solução de DPPH e armazenadas na ausência de luz por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada à 517 nm no espectrofotômetro. Uma curva de calibração (ANEXO 3) foi preparada com TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) na concentração de 0,05 a 1,00 mM, obtidos a partir da solução estoque de TROLOX (2mM). As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos pela média ± desvio padrão e expressos em milimolar (mM) de TROLOX equivalente por 100 mililitros (mL) de amostra (mM TE.100 mL⁻¹).

5.3.3 Atividade antioxidante - ABTS

A capacidade antioxidante da bebida de kombucha foi analisada pelo método ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-asulfonic acid) (RUFINO, 2007) com adaptações. O radical ABTS tem a capacidade de capturar prótons na presentes da solução, demonstrando o potencial antioxidantes presentes nas amostras analisadas. Após a captura, o radical fica estável, representado pela mudança na coloração de verde-escura para verde-clara. Para a preparação da solução estoque adicionou-se 0,192 g de ABTS em um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada. Para a preparação do radical ABTS, adicionou-se 0,88 mL da solução de persulfato de potássio em 50 mL da solução estoque de ABTS, em seguida a solução foi armazenada em um vidro âmbar sob refrigeração por 16 horas. Para a análise a solução de ABTS foi dissolvida em etanol até a leitura da absorbância entre 0,700 à 734 nm no espectrofotômetro UV-Vis As amostras com açúcar mascavo foram diluídas na proporção de 1:5 em zero (0) dia e 1:4 em 7 e 14 dias. As amostras de açúcar demerara e açúcar cristal, foram diluídas na proporção de 1:2, nos 3 (três) tempos. Em tubos de ensaio, alíquotas de 30 uL das diluições em 3000 uL do radical de ABTS, homogeneizadas e armazenadas sob a ausência de luminosidade por 6 minutos. A leitura da absorbância foi realizada à 734 nm no espectrofotômetro. Uma curva de calibração (ANEXO 4) foi preparada com TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) na concentração de 100 a 2000 uM, obtidos a partir da solução estoque de TROLOX (2000 uM). As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos média \pm desvio padrão de atividade antioxidante expressos em milimolar (mM) de TROLOX equivalente por 100 mililitros (mL) de amostra ($\text{mM TE} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$).

5.4 ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos através dos valores da média e desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado e quando as médias foram significativamente

diferentes a $p < 0,05$, o teste de Tukey foi usado para comparação das médias. Os dados foram analisados com uso do software STATISTICA[®], versão 10.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados de acidez total e pH da kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo). Houve um elevado valor de acidez total nas amostras, sendo que a kombucha de açúcar mascavo teve o maior valor de acidez, variando de 7,7% no 7º dia para 29,9% no 14º dia de fermentação.

Tabela 1. Determinação da acidez total e do pH da kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo)

Análises	Amostras					
	KAM		KAD		KAC	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Acidez Total						
(% de Ácido Acético)	7,7±0,20 ^a	29,9±0,10 ^b	4,3±0,50 ^c	13,2±0,40 ^d	5,4±0,50 ^e	13,0±0,10 ^d
pH	3,49±0,01 ^a	2,92±0,01 ^a	2,83±0,02 ^a	2,54±0,01 ^b	2,65±0,01 ^b	2,49±0,00 ^b

Fonte: elaboração própria. Valores descritos em média de análises em triplicata ± desvio padrão. KAM = Kombucha de Açúcar Mascavo; KAD = Kombucha de Açúcar Demerara; KAC = Kombucha de Açúcar Cristal. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Outros estudos reportaram valores menores de acidez nas amostras de kombucha. KAEWKOD *et al.* (2019) obtiveram acidez de 1,2% para kombucha de chá verde fermentada por 15 dias. JAKUBCZYK *et al.* (2020) reportaram que a kombucha produzida com chá verde apresentou acidez de 0,9% em 14 dias de fermentação. SANTOS (2021) reportou acidez de 1,3-2,4% para amostras de kombucha de chá verde fermentadas por 7 dias.

A acidez elevada pode ser explicada pela produção de vários ácidos orgânicos durante o processo fermentativo, sendo os principais o acético e o glucônico (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2019), o pH da kombucha pode variar entre 2,5 e 4,2. Sendo assim, observou-se as amostras deste estudo estavam dentro dos parâmetros da legislação para kombucha (2,65-3,49 no 7º dia de fermentação e 2,50-2,92 no 14º dia de fermentação).

Em relação ao pH da kombucha, outros autores observaram resultados similares aos obtidos nesse estudo. SILVA JÚNIOR *et al.* (2021) relataram pH de 2,56 no 7º dia de fermentação e JAFARI *et al.* (2020) encontraram um pH de 3,17 no 14º dia de fermentação.

A Tabela 2 mostra os resultados de sacarose e sólidos solúveis totais da kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo).

Tabela 2. Determinação de sacarose e sólidos solúveis totais (SST) da kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo)

Análises	Amostras					
	KAM		KAD		KAC	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Sacarose (%)	6,2±0,00 ^a	3,5±0,00 ^b	6,2±0,00 ^a	5,3±0,00 ^c	6,8±0,00 ^d	6,2±0,00 ^a
SST (°Brix)	7,9±0,00 ^a	6,0±0,00 ^b	7,8±0,00 ^a	6,3±0,00 ^b	7,7±0,00 ^a	6,2±0,00 ^b

Fonte: elaboração própria. Valores descritos em média de análises em triplicata ± desvio padrão. KAM = Kombucha de Açúcar Mascavo; KAD = Kombucha de Açúcar Demerara; KAC = Kombucha de Açúcar Cristal. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Observou-se que houve redução da sacarose de 6,2-6,8% em 7 dias para 3,5-6,2% em 14 dias de fermentação. Resultados similares foram reportados por BARBOSA *et al.* (2021), onde a kombucha de chá verde apresentou valores de açúcares superiores a 4% ao fim do 15º dia de fermentação da kombucha. SANTOS (2021) reportou valores de 3,6 a 7,1% de sacarose em amostras de kombucha de chá verde fermentadas por 7 dias.

No que se refere ao teor de sólidos solúveis, as amostras de kombucha deste estudo tiveram um declínio dos valores de 10,0°Brix no chá verde adoçado antes da fermentação para 7,7-7,9°Brix em 7 dias de fermentação e 6,0-6,3°Brix em 14 dias de fermentação. JAKUBCZYK *et al.* (2020) encontraram valores de 10,7°Brix no chá adoçado antes da fermentação e 8,7°Brix no 14º dia de fermentação. MUHIALDIN *et al.* (2019) obtiveram valores de 10,7°Brix no chá adoçado antes da fermentação e 7,0°Brix no 14º dia de fermentação. ULUSOY e TAMER (2019) encontraram um valor de 6,5°Brix no chá adoçado antes da fermentação e menos de 6°Brix em 2 dias de fermentação.

A redução dos sólidos solúveis na kombucha é algo previsível onde a sacarose e os outros tipos de açúcares presentes no líquido são consumidos pelas

bactérias e leveduras do SCOBY para seu desenvolvimento servindo de energia para funções metabólicas importantes (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019).

A Tabela 3 mostra os resultados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das matérias primas usadas na produção da kombucha (chá verde, açúcar mascavo, açúcar demerara e açúcar cristal).

Tabela 3 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das matérias primas usadas na produção da kombucha (chá verde, açúcar mascavo, açúcar demerara e açúcar cristal)

Análises	Amostras			
	CV	AM 10%	AD 10%	AC 10%
Fenólicos (mg GAE/100mL)	26,8±0,51 ^a	131,0±1,40 ^b	N/A	N/A
DPPH (mM TE/100 mL)	55,0±1,17 ^a	106,2±2,94 ^b	N/A	N/A
ABTS (mM TE/100 mL)	214,6 ± 4,68 ^a	320,1 ± 2,34 ^b	N/A	N/A

Fonte: elaboração própria. Valores descritos em média de análises em triplicata ± desvio padrão. CV = Chá verde; AM 10% = Açúcar Mascavo 10%; AD 10% = Açúcar Demerara 10%; AC 10% = Açúcar Cristal 10%; N/A = não houve compostos fenólicos e atividade antioxidante. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Neste estudo, o chá verde apresentou teor de compostos fenólicos de 26,8 mg GAE/100 mL. KODAMA *et al.* (2010) reportaram que as infusões preparadas a partir de sachês de chá verde tiveram conteúdos de compostos fenólicos de 48 a 100 GAE/100 mL. AGUIAR *et al.* (2013) reportaram valor de 72,3 mg GAE/100 mL de compostos fenólicos na bebida pronta de chá verde. SANTOS (2021) reportou valor de 95,0 mg GAE/100 mL de compostos fenólicos no chá verde que foi usado na produção da kombucha. Os valores de compostos fenólicos do chá verde sofrem variação nos estudos da literatura, pois há variação na quantidade de folhas usadas no preparo da bebida, além de variações relacionadas aos processos de produção das folhas do chá (localização e época de plantio e colheita, processo de secagem e moagem das folhas).

O chá verde (*Camellia sinensis*) deste estudo apresentou valores de atividade antioxidante de 55 mM TE/100 mL no teste de DPPH e 214,6 mM TE/100 mL no teste de ABTS. KODAMA *et al.* (2010) reportaram que as infusões preparadas a partir de sachês de chá verde tiveram valores de 22-65,5 mM TE/100 mL no teste de DPPH. OLIVEIRA *et al.* (2022) reportaram valores de capacidade

antioxidante para ABTS de 183-189 mM TE/100 mL em bebidas de chá branco (*Camellia sinensis*) prontas para o consumo.

Os compostos bioativos mais comuns do chá verde incluem compostos fenólicos como as catequinas, proantocianidinas e flavonoides, sendo relacionados com as suas propriedades biológicas, incluindo as atividades anticarcinogênica, anti-inflamatória, imunomoduladora, antimicrobiana e hipocolesterolêmica (KHAN & MUKHTAR, 2019).

O xarope de açúcar mascavo à 10% (p/v) apresentou expressivo teor de compostos fenólicos (131 mg GAE/100 mL), enquanto os xaropes de açúcar demerara e açúcar cristal não apresentaram compostos fenólicos. Outros estudos na literatura reportaram o teor de compostos fenólicos do açúcar mascavo e derivados da cana de açúcar.

PAYET *et al.* (2005) reportaram que o teor de fenólicos totais dos açúcares mascavos variou de 10,8 a 41,8 mg GAE/100 mL. Segundo os autores os açúcares mais coloridos apresentaram maior teor de compostos fenólicos devido à maior presença de produtos da reação de Maillard, como as melanoidinas. FAGUNDES (2010) encontrou em média 295,8 mg GAE/100 mL de polifenóis totais em 13 amostras de melado. ASIKIN *et al.* (2016) reportaram valores de compostos fenólicos de 210,5 a 264,2 mg GAE/100 mL em amostras de açúcar mascavo.

BARRERA *et al.* (2020) reportaram valor de 58,7 mg GAE/100 mL de polifenóis totais em açúcar mascavo. Foram identificados compostos fenólicos como ácidos hidroxicinâmicos (clorogênico, cafeico, cumárico, ferúlico) e flavonas (apigenina, tricina, luteolina) no açúcar mascavo.

O xarope de açúcar mascavo a 10% (p/v) apresentou valores de atividade antioxidante de 106,2 mM TE/100 mL no teste de DPPH e 320,1 mM TE/100 mL no teste de ABTS. ASIKIN *et al.* (2016) reportaram valores de atividade antioxidante entre 149,5 e 169,8 mM TE/100 mL no teste de DPPH para amostras de açúcar mascavo.

A Tabela 4 apresenta os resultados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo). Notou-se que a kombucha de açúcar mascavo apresentou os maiores valores de compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação as

bebidas elaboradas com açúcar demerara e açúcar cristal, comprovando que ambas as matérias primas (chá verde e açúcar mascavo) usadas na produção da kombucha contribuíram para o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da bebida.

Tabela 4. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da kombucha fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo)

Análises	Amostras					
	KAM		KAD		KAC	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Fenólicos (mg GAE/100mL)	121,3±7,37 ^a	67,0±3,60 ^b	25,8±1,58 ^c	20,7±1,40 ^d	22,3±0,75 ^d	18,4±0,20 ^d
DPPH (mM TE/100 mL)	109,0±2,96 ^a	98,4±0,66 ^b	58,6±0,92 ^c	49,3±0,25 ^d	68,5±1,17 ^e	57,5±0,57 ^c
ABTS (mM TE/100 mL)	273,4±3,61 ^a	135,2±3,35 ^b	104,5±1,40 ^c	51,1±4,16 ^d	80,7±0,54 ^e	22,3±0,36 ^f

Fonte: elaboração própria. Valores descritos em média de análises em triplicata ± desvio padrão. KAM = Kombucha de Açúcar Mascavo; KAD = Kombucha de Açúcar Demerara; KAC = Kombucha de Açúcar Cristal. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

A kombucha de açúcar mascavo deste estudo apresentou 67,0 mg GAE/100 mL de compostos fenólicos após 14 dias de fermentação. SHAHBAZI *et al.* (2018) reportaram valor de compostos fenólicos de 56,5 mg GAE/100 mL da kombucha de chá verde em 16 dias de fermentação. Já CARDOSO *et al.* (2020) encontraram 70 mg GAE/100 mL de compostos fenólicos em kombucha de chá verde fermentada por 10 dias, o que pode ter relação com a maior quantidade de folhas de chá verde utilizada, ou seja, 12 g/L.

A kombucha de açúcar mascavo deste estudo apresentou 135,2 mM TE/100 mL de capacidade antioxidante pelo método de ABTS após 14 dias de fermentação. ZOU *et al.* (2021) verificaram que a atividade antioxidante de kombucha de chá verde foi de 100 mM TE/100mL em 14 dias de fermentação pelo teste de ABTS. MIZUTA *et al.* (2020) encontraram em kombucha de chá verde uma atividade antioxidante de 115,1 mM TE/100mL em 14 dias de fermentação pelo teste de ABTS. URRUTIA *et al.* (2021) reportaram atividade antioxidante de 50,1 mM TE/100mL pelo teste de ABTS da kombucha de chá verde fermentada por 15 dias.

Independente do tipo de açúcar utilizado na produção das bebidas, observou-se um declínio dos valores de compostos fenólicos e atividade antioxidante ao longo do tempo de fermentação, sendo assim, os valores foram maiores em 7 dias de fermentação e menores em 14 dias de fermentação. Outros estudos da literatura reportaram resultados similares ao nosso estudo. OLIVEIRA (2021) reportou que no início do armazenamento das amostras de kombucha, os valores da capacidade antioxidante foram de 165-172 mM TE/100 mL no teste de ABTS e que esses valores diminuíram em 14 dias para 134-145 mM TE/100 mL.

KIM *et al.* (2011) investigaram a capacidade antioxidante de infusões de chá verde por 12 semanas de armazenamento e a capacidade antioxidante diminuiu em 18 a 30% ao longo do período de armazenamento. NEKVAPIL *et al.* (2012) relataram que o armazenamento refrigerado a 4 °C de bebidas de chá branco, preto e verde garante uma diminuição mais lenta da capacidade antioxidante em comparação com temperatura ambiente (22 °C).

A concentração e composição de diversos compostos químicos que se fazem presentes na kombucha estão diretamente ligados ao tipo de açúcar utilizado, bem como sua quantidade (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019; KOCADAĞLI; ÖZDEMİR; GÖKMEN, 2013). O tipo de chá utilizado e a quantidade, também influenciam as características físico-químicas e sensoriais da kombucha (SILVA *et al.*, 2021).

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou os aspectos físicos e químicos da bebida kombucha utilizando três diferentes açúcares (cristal, demerara e mascavo) como substrato de fermentação. A concentração e composição de diversos compostos químicos que se fazem presentes na kombucha estão diretamente ligados ao tipo de açúcar utilizado, bem como sua quantidade.

A kombucha de açúcar mascavo apresentou os maiores valores de compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação as bebidas elaboradas com açúcar demerara e açúcar cristal. A capacidade antioxidante do açúcar mascavo está fortemente relacionada aos compostos fenólicos naturais presentes na cana-de-açúcar, enquanto o processo de refinamento dos açúcares demerara e cristal não preserva esses compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são considerados importantes constituintes bioativos dos alimentos, tornando o açúcar mascavo uma alternativa mais saudável em relação aos açúcares demerara e cristal para ser usado na produção de kombucha tanto em casa quanto na indústria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, V. *et al.* **Teor de compostos fenólicos em chás derivados de *Camelia sinensis***. In: Anais do Simpósio Latino-Americano de Ciências de Alimentos, Campinas, Galoá, 2013. Disponível em: <https://proceedings.science/salca/slaca-2013/papers/teor-de-compostos-fenolicos-em-chas-derivados-de-camelia-sinensis?lang=pt-br>. Acesso em: 16 jan.2023.

AL-MOHAMMADI, A. R. *et al.* Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. **Molecules**, v. 26, n.16, p. 5026, 2021.

ASIKIN, Y. *et al.* Effects of different drying–solidification processes on physical properties, volatile fraction, and antioxidant activity of non-centrifugal cane brown sugar. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 340–347, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. v. 2, ed. 15, Washington, 1990.

BARBOSA, Cosme Damião *et al.* Microbial–physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. **LWT- Food Science and Technology**, v. 148, 2021.

BARRERA, C. *et al.* Phenolic profile of cane sugar derivatives exhibiting antioxidant and antibacterial properties. **Sugar Technology**, 2020.

BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Seção. In: Brasília, D.F. Resolve: Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu anexo. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019.

CARDOSO, Rodrigo Rezende *et al.* 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.

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

CHAKRAVORTY, Somnath *et al.* **Kombucha: A promising functional beverage prepared from tea**. In: **Non-alcoholic beverages**. Woodhead Publishing, 2019. p. 285-327

COTON, M. *et al.* Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, p.1–16., 2017.

DA SILVA JÚNIOR *et al.* Traditional and flavored kombuchas with pitanga and umbu-
cajá pulps: Chemical properties, antioxidants, and bioactive compounds, **Food
Bioscience**, v. 44, p.101380, 2021.

DE FILIPPIS, F.; TROISE, A.D.; VITAGLIONE, P.; ERCOLINI, D. Different
temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic
acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v.17, p.
11–16, 2018.

FAGUNDES, A. R. **Características nutricionais com ênfase no ferro e
capacidade antioxidante de melados produzidos em Santa Catarina.** Tese de
mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

GAGGIA, F. *et al.* Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a
comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity.
Nutrients, v. 11, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Métodos físico-químicos para análise de
alimentos. ed. 4, São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, p. 1020, 2008.

JAFARI, REYHANEH *et al.* Kombucha microbial starter with enhanced production of
antioxidant compounds and invertase. **Biocatalysis And Agricultural
Biotechnology**, v. 29, p. 101789, 2020.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R.; LONCAR, E.; VITAS, J.; SATHISHKUMAR, M.,
Review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects,
toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food
Safety**, v. 13, n. 4, p. 538–550, 2014.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. **Elsevier:
Reference Module in Food Science**, 2016.

JAKUBCZYK, K. *et al.* Evaluation of Fluoride and Selected Chemical Parameters in
Kombucha Derived from White, Green, Black and Red Tea. **Biological Trace
Element Research**, v. 199, n. 9, p. 3547–3552, 2021.

KAEWKOD, Thida; BOVONSOMBUT, Sakunnee; TRAGOOLPUA, Yingmanee.
Efficacy of kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of
pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line.
Microorganisms, v. 7, n. 12, p. 1–18, 2019.

KHALEIL, M. M. *et al.* A bioprocess development study of polyphenol profile,
antioxidant and antimicrobial activities of kombucha enriched with *Psidium guajava* L.
Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, v. 9, n. 6, p. 1204-
1210, 2020.

KHAN, N., & MUKHTAR, H. Tea polyphenols in promotion of human health.
Nutrients, v. 11, n. 39, 2019.

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current trends in kombucha: marketing perspectives and the need for improved sensory research. **Beverages**, v. 6, n. 15, p. 2-19, 2020.

KIM, Y. *et al.* The impact of packaging materials on the antioxidant phytochemical stability of aqueous infusions of green tea (*Camellia sinensis*) and yaupon holly (*Ilex vomitoria*) during cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4676-4683, 2011.

KOCADAĞLI, Tolgahan; ÖZDEMİR, Kübra Sultan; GÖKMEN, Vural. Effects of infusion conditions and decaffeination on free amino acid profiles of green and black tea. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 720–725, 2013.

KODAMA, D. H. *et al.* Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, 2010.

KURTZMAN, C. *et al.* **The Yeasts: A Taxonomic Study**. London, UK: Elsevier, 2011.

LAUREYS, S. J. B. *et al.* Kombucha tea fermentation: a review, **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 3, p. 165-174, 2020.

LAUREYS, D. *et al.* Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. **Food Microbiology**, v. 73, p. 351–361, 2018.

LEAL, M.; SUAREZ, V.; JAYABALAN, R.; OROS, H.; ESCARLANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.

MAMLOUK, D.; GULLO, M. Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 377–384, 2013.

MARSHCO, M.L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C.J.; COTTER, P.D.; FOLIGNÉ, B.; GÄNZLE, M.; KORT, R.; PASIN, G.; PIHLANTO, A.; SMID, E.J.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2017.

MARSH, A. J. *et al.* Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178, 2014.

MAY, A. *et al.* Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 7, p. e7565-e7565, 2019.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry Washington**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIZUTA, Amanda Gouveia *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. **LWT- Food Science and Technology**, v. 130, p. 109641, 2020.

MUHIALDIN, B. J. *et al.* Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 481–487, 2019.

MURPHY, T. E. *et al.* Safety aspects and guidance for consumers on the safe preparation, handling and storage of kombucha: a fermented tea beverage. **International Association for Food Protection**, v. 38, p. 329–337, 2018.

NEFFE-SKOCINSKA, K.; SIONEK, B.; SCIBISZ, I.; KOLOZYN-KRAJEWSKA, D. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **CyTA – Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2017.

NEKVAPIL, T. *et al.* Decrease in the antioxidant capacity in beverages containing tea extracts during storage. **The Scientific World Journal**, 2012.

OLIVEIRA, Jordan Teixeira *et al.* Green Tea and Kombucha characterization: phenolic composition, antioxidant capacity and enzymatic inhibition potential. **Food Chemistry**, p. 135206, 2022.

OLIVEIRA, A. *et al.* Efeito do tempo e da luz nos compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante de bebidas de chá mate e branco prontas para o consumo. **Scientia Plena**, v. 18, n. 3, 2022.

OLIVEIRA, A. A. Desenvolvimento e estabilidade de chás verde e preto prontos para consumo. Trabalho de Conclusão de Curso. Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, 2021.

PAYET, B. *et al.* Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p.10074–10079, 2005.

QUINTO, E.J., *et al.* Probiotic lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1765-1775, 2014.

ULUSOY, Abubekir; TAMER, Canan Ece. Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. sativus var. atropurpureus Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus idaeus*) for kombucha beverage production. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1524–1536, 2019.

RUFINO, M. *et al.* Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. Comunicado Técnico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 128, p. 1-4, 2007.

Santos, M. J. Kombucha: Caracterização da Microbiota e Desenvolvimento de Kombucha: Caracterização da Microbiota e Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares Para Uso em Restauração. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Superior de Agronomia, **Universidade de Lisboa**, 2016.

SANTOS, Nicolle Silva **Produção de kombucha, caracterização de sua microbiota e análises físico-químicas**, Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, 2021.

SHAHBAZI, H. *et al.* Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 8, p. 2568–2577, 2018.

SILVA, K.A; *et. al.* Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.34, 2021.

SILVEIRA, A. *et al.* Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. Comunicado Técnico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 421, p. 1-11, 2018

URRUTIA, Marianela Andrea Díaz *et al.* Effects of supplementation with kombucha and green banana flour on Wistar rats fed with a cafeteria diet. **Heliyon**, v. 7, p. e07081, 2021.

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

VYNA, I. *et al.* Current evidence on the physiological activity and expected health effects of Kombucha fermented beverage. **Journal of Medicine**, p. 179-188, 2014.

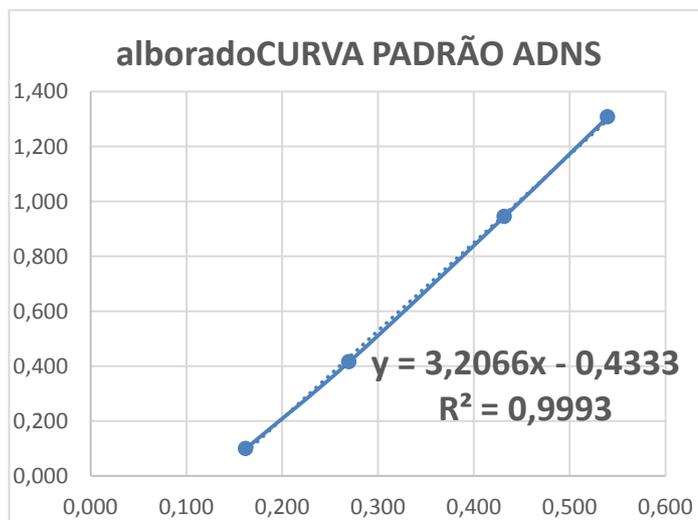
VUKMANOVIC, S. *et al.* Certain production variables and antimicrobial activity of novel winery effluent based kombucha. **Food Science and Technology**, v. 154, p. 112726, 2022.

ZOU, Chun *et al.* Zijuan tea- based kombucha: physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130322, 2021.

WANG, Y. *et al.* Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 94, p. 265–272, 2014.

ANEXO 1
CURVA PADRÃO ADNS

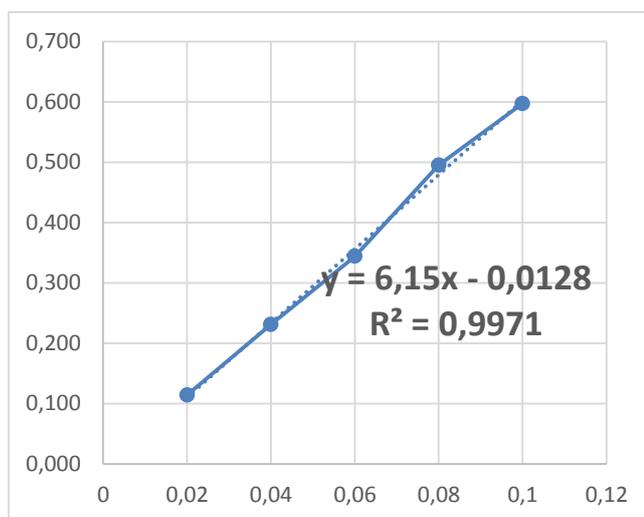
ADNS - 540nm				
H2O	Glico	ADN	Glico	Absorb.
(mL)	(mg)	(mL)	(mg)	(540 nm)
0,8	0,2	2	0,162	0,100
0,6	0,4	2	0,270	0,416
0,4	0,6	2	0,432	0,945
0,2	0,8	2	0,540	1,308



ANEXO 2
CURVA PADRÃO FENÓLICOS

AC. GÁLICO 760nm

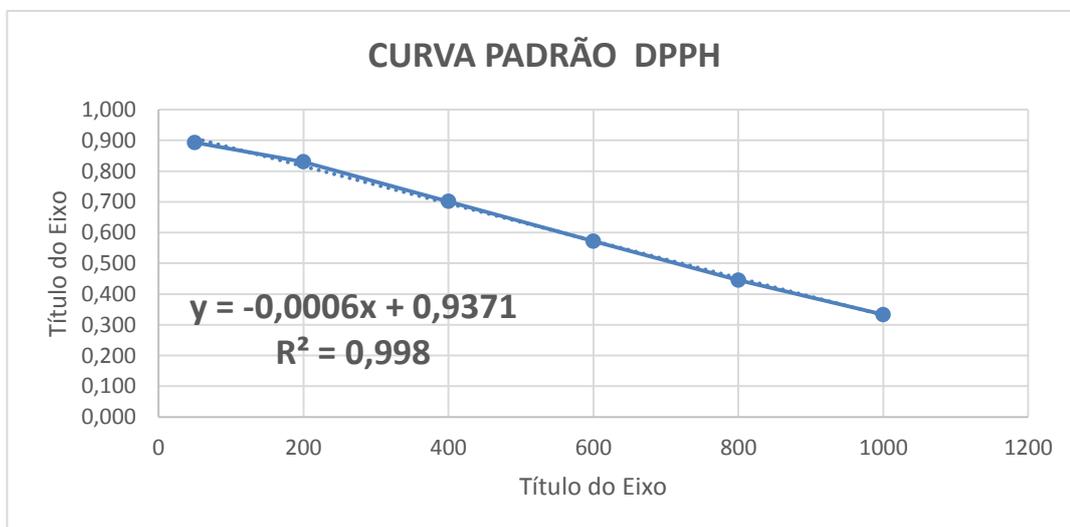
Concentração Final (mg)	Curva Padrão ácido tânico	
	Absorbância (760 nm)	
0,02	0,114	
0,04	0,231	
0,06	0,344	
0,08	0,495	
0,10	0,597	



ANEXO 3
CURVA PADRÃO DPPH

DPPH 517nm - Abs: 1,1 a 0,9

			Trolox (100 µL) + DPPH (3900µL)	
Solução	Álcool	Conc. Final	Absorbância (517 nm)	
Trolox 2mM. (µL)	Etílico (µL)	(µM)		
25,0	975,0	50	50	0,893
100,0	900,0	200	200	0,830
200,0	800,0	400	400	0,701
300,0	700,0	600	600	0,572
400,0	600,0	800	800	0,445
500,0	500,0	1000	1000	0,333



ANEXO 4
CURVA PADRÃO ABTS

ABTS - 734nm - Abs: 0,7

**Trolox (30 µL) +
ABTS (3000µL)**

Solução Trolox 2mM. (mL)	Àlc. Etílico (mL)	Conc. Final (µM)	Absorbância (734 nm)
0,5	9,5	100	0,630
2,5	7,5	500	0,533
5,0	5,0	1000	0,369
7,5	2,5	1500	0,268
10,0	0,0	2000	0,066

