

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Natália Paludo

**Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato  
de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**

Porto Alegre

2017

Natália Paludo

**Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Hickmann Flôres  
Marco Antônio Zachia Ayub

Porto Alegre

2017

Natália Paludo

**Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia de Alimentos.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Hickmann Flôres - Orientadora  
Doutora em Engenharia de Alimentos UNICAMP

---

Rafael Costa Rodrigues – Membro da banca  
Doutor em Engenharia Química - UFRGS

---

Diandra de Andrades – Membro da banca  
Mestre em Biologia - UNIOESTE

## RESUMO

Kombucha é uma bebida resultante da fermentação de chá verde e/ou chá preto adoçados e adicionados de uma cultura contendo um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras. Por possuir compostos bioativos similares ao chá verde e ter grande importância socioeconômica no Sul do Brasil, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) pode ser uma alternativa mais viável na produção de kombucha. Assim, o presente trabalho teve por objetivo a produção de kombucha utilizando a erva-mate como substrato alternativo em escala artesanal e laboratorial, comparando seus compostos e comportamento ao longo da fermentação à kombucha tradicional de chá verde. As kombuchas foram reproduzidas em escala artesanal, à temperatura ambiente, e em escala laboratorial, utilizando um biorreator com controle dos seguintes parâmetros: temperatura em 28 °C, agitação 50 rpm e aeração de 0,42 vvm para as kombuchas de chá verde e erva-mate durante 7 dias de fermentação. As análises realizadas nas kombuchas de ambos os substratos foram: pH, fenólicos totais, atividade antioxidante e conteúdo de ácidos e açúcares, e somente para a kombucha de erva-mate foi realizada também análise sensorial. As kombuchas desenvolvidas obtiveram resultados satisfatórios com relação aos seus compostos bioativos, cujas versões laboratoriais apresentaram valores superiores tanto para fenólicos totais como para atividade antioxidante, demonstrando uma melhor extração destes compostos nas condições utilizadas no biorreator. Nas análises de pH e conteúdo de ácidos e açúcares, as kombuchas de erva-mate demonstraram menor conversão da sacarose em seus subprodutos da fermentação, e conseqüentemente, menor diminuição do pH quando comparadas às kombuchas de chá verde, possivelmente pela microbiota presente ainda não estar adaptada ao substrato e este não ser tão efetivo nessas condições. A análise sensorial da kombucha artesanal resultou em 68,25% de aprovação global enquanto a kombucha laboratorial obteve 63,17% de aprovação. A aceitação moderada da kombucha provavelmente ocorreu pelo desconhecimento da bebida pela maioria dos provadores, além do fato de ter sido oferecida sem saborização e carbonatação, como são apresentadas as versões comerciais. A kombucha está em crescimento no mercado nacional e este trabalho auxilia em uma melhor avaliação desse produto, possibilitando futuros estudos que possam ajudar na caracterização da kombucha para uma possível padronização de sua produção em escala industrial.

**Palavras-chave:** kombucha, fermentação, biorreator, mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), chá verde

## ABSTRACT

Kombucha is a beverage resulting from the fermentation of sweetened green or black tea by a microbial culture composed of a symbiotic association of bacteria and yeasts. Because of its composition containing bioactive compounds, similar to green tea, and its great socio-economic importance in the South of Brazil, leaves of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) can be a viable alternative in the production of kombucha. Therefore, this work aimed at producing kombucha using mate as an alternative substrate in both artisanal and laboratory scale, and comparing its composition throughout the fermentation to the traditional kombucha of green tea. The kombuchas were produced in artisanal scale at room temperature and in laboratory scale using a bioreactor with control of the following parameters: temperature at 28 °C, agitation at 50 rpm, and aeration of 0.42 vvm for the green tea and mate for 7 days of fermentation. The kombucha analyses of both substrates were: pH, total phenolics, antioxidant activity, and content of acids and sugars, and only for the mate kombucha, a sensory analysis was also performed. The developed kombuchas obtained satisfactory results regarding their content of bioactive compounds, the laboratory-produced showing higher values for both total phenolics and antioxidant activities, demonstrating a better extraction of these compounds under the conditions used in the bioreactor. Regarding the analyzes of pH and content of acids and sugars, the kombuchas of mate showed a lower conversion of sucrose in to its by-products of the fermentation, and a lower pH decrease when compared to the kombucha of green tea, possibly because the original microbial community was not adapted to that substrate. Sensory analysis of the artisanal kombucha resulted in 68.25% of global approval, whereas laboratory kombucha obtained 63.17% of approval. Moderate acceptance of kombucha was probably due to the lack of knowledge of this beverage among most the tasters, as well as the fact that it was offered without flavoring and carbonation, as the commercial versions are presented. Kombucha is growing in the national market and this work helps in a better evaluation of this product, allowing future studies that could help the characterization of kombucha for a possible standardization of its production on an industrial scale.

**Keywords:** kombucha, fermentation, bioreactor, mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), green tea.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Recipiente para fermentação de kombucha com proteção na sua superfície .....	16
<b>Figura 2</b> – Fluxograma de preparação da kombucha artesanal e laboratorial.....	21
<b>Figura 3</b> – Recipiente utilizado no método artesanal das kombuchas .....	22
<b>Figura 4</b> – Biorreator utilizado na produção de kombucha em escala laboratorial .....	23
<b>Figura 5</b> – Ficha da análise sensorial de kombucha .....	26
<b>Figura 6</b> – Disposição das amostras de kombucha de erva-mate e ficha da análise sensorial.....	27
<b>Figura 7</b> – Análise de componentes principais das kombuchas: erva-mate artesanal (CM art), erva-mate laboratorial (CM bio), chá verde artesanal (CV art), chá verde laboratorial (CV bio) e chá verde comercial (CV com) e em plano fatorial “B”. .....	28
<b>Figura 8</b> – Quantidades de fenólicos totais presentes nas kombuchas após 7 dias de fermentação .....	30
<b>Figura 9</b> – Cinética do pH durante o processo de fermentação da kombucha .....	31
<b>Figura 10</b> – Cinética do consumo de sacarose (■) e seus subprodutos formados: ácido acético (▲), etanol (◇) e glicerol (●).....	33
<b>Figura 11</b> – Cinética do consumo de sacarose (■) e da glicose (○) e frutose (△) formados nas kombuchas preparadas .....	36
<b>Figura 12</b> – Valores médios dos atributos da análise sensorial de aceitação global de uma kombucha de erva-mate artesanal e outra laboratorial.....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Atividade antioxidante quantificada em percentual de inibição e equivalente em trolox nas respectivas kombuchas .....	31
<b>Tabela 2</b> – Notas e índices de aceitação referentes aos atributos avaliados na análise sensorial das kombuchas de erva-mate .....	39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 Objetivo geral .....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
3.1 Kombucha .....	11
3.1.1 Ingredientes .....	12
3.1.1.1 Chá <i>Camellia Sinenses</i> .....	12
3.1.1.2 Erva-mate .....	13
3.1.1.3 Açúcar .....	13
3.1.2 Microrganismos .....	14
3.1.3 Preparação de kombucha artesanal .....	15
3.1.4 Composição química da kombucha .....	17
3.1.5 Propriedades .....	17
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Preparação do substrato .....	20
4.2 Método artesanal .....	21
4.3 Método laboratorial .....	22
4.4 Métodos analíticos .....	23
4.4.1 Análise de compostos fenólicos .....	23
4.4.2 Análise de atividade antioxidante .....	24
4.4.3 Análise de pH .....	24
4.4.4 Análise cromatográfica .....	25
4.4.4.1 Análise do conteúdo de compostos orgânicos .....	25
4.4.4.2 Análise do conteúdo de açúcares .....	25
4.4.5 Análise sensorial .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1 Análise de compostos fenólicos .....	29
5.2 Análise de atividade antioxidante .....	30
5.3 Análise de pH .....	32
5.4 Análises cromatográficas .....	33
5.4.1 Análise do conteúdo de compostos orgânicos .....	33
5.4.2 Análise do conteúdo de açúcares .....	36
5.5 Análise sensorial .....	37
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A crescente busca por um estilo de vida mais saudável vem mostrando que o consumidor atual não está mais apenas priorizando a sensorialidade de um produto, mas também busca os benefícios e funcionalidades que ele pode acrescentar à sua dieta e dia a dia. Segundo a publicação do Brasil Food Trends 2020, a tendência denominada “saudabilidade e bem-estar” vem desencadeando diversos segmentos de consumo, entre os quais é possível destacar a procura de alimentos funcionais, que têm como diferencial trazer benefícios ao desempenho físico e mental, saúde cardiovascular, saúde intestinal, entre outros.

Um alimento que vem se popularizando no Brasil e que está dentro das tendências atuais de mercado é a kombucha, uma bebida doce fermentada de origem asiática, à base de chá verde e/ou chá preto. Ela é resultado da fermentação de uma associação simbiótica de bactérias (primordialmente por bactérias acéticas) e leveduras, onde se forma uma película chamada SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), que realizam várias reações bioquímicas durante sua fermentação. (CHEN; LIU, 2000).

O chá verde ou preto, que é usado como substrato para a produção de kombucha, é cultivado e consumido há anos pelas suas características de aroma e propriedades medicinais em muitos países; seus efeitos e constituintes principais são pesquisados e já foram obtidas informações que indicam inúmeros benefícios para a saúde. Muitas propriedades dos produtos vegetais estão associadas à presença de compostos fenólicos, que são inerentes ao desenvolvimento das plantas e, quando presentes em uma dieta regular, podem ser benéficos à saúde humana, reduzindo o risco de câncer e de doenças cardiovasculares (NISHINO, 2005; RASMUSSEN et al., 2000).

Entre os substratos alternativos para a produção de kombucha pode-se citar a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), que tem sua origem na América do Sul e se desenvolve naturalmente no Brasil, na Argentina e no Paraguai. Contudo, cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, sendo a região Sul a maior produtora, desempenhando um importante papel socioeconômico e ambiental, principalmente nas propriedades agrícolas de pequeno porte (ESMELINDRO et al., 2002; RODIGHIERI; SCHLOSSNACHER NETO; CICHACZEWSKI, 1995). A infusão do chá de erva-mate foi empregada no tratamento de diferentes patologias em tribos indígenas. Nos últimos anos, várias dessas atividades farmacológicas foram documentadas em artigos científicos, os quais demonstraram que o consumo do chá de erva-mate foi capaz de reduzir a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (KLEIN et al., 2011). Também, que

a ingestão da erva-mate independente da intervenção dietética aumentou a capacidade antioxidante e atividade sérica da enzima antioxidante paroxonase-1 em indivíduos dislipidêmicos (BOAVENTURA et al., 2012) além de ter a capacidade de reduzir valores de LDL-colesterol (mau colesterol) e aumentar valores de HDL-colesterol (bom colesterol) por meio do seu consumo (DE MORAIS et al., 2009).

Apesar da variabilidade de uso da erva-mate (chimarrão, tererê e chá-mate), ela ainda é pouco aproveitada em outros segmentos. Por se tratar de uma planta com benefícios comprovados em sua infusão, podem-se vislumbrar outras aplicações potenciais que viriam a ampliar o seu consumo e, conseqüentemente, o seu mercado (VALDUGA, 1994).

Aliando o aspecto funcional e possivelmente probiótico da kombucha, que vem ganhando espaço no mercado brasileiro com as propriedades benéficas da infusão do extrato de erva-mate, uma opção para explorar esse nicho de mercado é a utilização da erva-mate como matéria-prima em sua produção, avaliando sua produção artesanal e em condições de processo controladas com uma kombucha padrão feita de chá verde. Devido ao reconhecimento e crescimento do mercado de kombucha, é de suma importância para a indústria que se desenvolva uma metodologia com parâmetros controlados para uma produção em escala e com padronização do produto desejado.

Além de valorizar a produção regional e já tradicional da erva-mate no Rio Grande do Sul, o custo do produto pode ser reduzido com a substituição, visto que o chá verde possui um valor de mercado, superior ao da erva-mate. Além disso, a bebida tem alta concentração de compostos bioativos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolvimento artesanal e em escala laboratorial de kombuchas de erva-mate e chá verde e caracterizá-las em relação aos compostos orgânicos formados, compostos fenólicos e atividade antioxidante.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver kombuchas artesanais de chá verde e erva-mate.
- Produzir kombuchas de chá verde e erva-mate em um biorreator com controle de temperatura, pH, agitação e aeração.
- Analisar os compostos fenólicos, atividade antioxidante, açúcares e compostos orgânicos das kombuchas desenvolvidas.
- Comparar a atividade antioxidante e compostos fenólicos com uma kombucha comercial.
- Análise sensorial das kombuchas de erva-mate.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Kombucha

A kombucha é uma bebida fermentada tradicional originada no Oriente, cujo início ainda é desconhecido, e que hoje já está bastante difundida no Ocidente (TEOH; HEARD; COX, 2004). Ela é obtida a partir da infusão de folhas de chá pela fermentação de uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, resultando em uma bebida um pouco doce, ligeiramente ácida e consumida em todo o mundo (CHEN; LIU, 2000).

Há muitos relatos mostrando que ela pode ajudar na redução do risco de doenças crônicas e tem propriedades benéficas para a saúde humana, como antimicrobianos, antioxidantes, anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipêmicos (CHAKRAVORTY et al., 2016; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; MO; ZHU; CHEN, 2008; YANG et al., 2009).

A produção de kombucha ocorre a partir da infusão de chá verde ou preto e é adoçada com açúcar que é substrato da reação de fermentação. Ao chá adoçado é adicionado um volume de kombucha já pronta e um SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), que serão responsáveis pelo processo de fermentação. O SCOBY, segundo Jayabalan et al. (2010), é constituído majoritariamente por proteína e fibras. Sempre formado um SCOBY na superfície do recipiente a cada nova fermentação, o qual deve ser guardado uma parte para a próxima e assim sucessivamente. Durante o processo de fermentação, o chá começa a liberar um aroma fermentado e há formação de bolhas de gás, resultado do ácido carbônico produzido na reação (JAYABALAN et al., 2014). As características da kombucha, tanto sensoriais quanto de composição química, variam muito, pois estão atreladas a diversos fatores, como o tipo de chá e açúcar utilizados como base, os microrganismos presentes no SCOBY e o tempo de fermentação. O tempo ideal é de 7 a 12 dias e a temperatura de 22 a 30 °C. Ao longo de sua fermentação, ela vai ficando com o sabor mais ácido, originado do ácido acético produzido, diminuindo sua aceitação sensorial. O valor do pH decresce ao longo da fermentação devido à produção de ácidos orgânicos (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Ao final do processo, consome-se a kombucha refrigerada, podendo ser servida como um substituto não alcoólico do espumante devido ao seu alto grau de carbonatação ou também do refrigerante, sendo uma alternativa mais saudável.

### 3.1.1 Ingredientes

#### 3.1.1.1 Chá *Camellia Sinenses*

O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia Sinenses* (*C. Sinenses*) é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo. O chá é utilizado na China há aproximadamente três mil anos e é considerado pelos orientais uma bebida saudável, tendo sua maior produção no Sudeste asiático, incluindo China, Índia, Japão, Tailândia, Sri Lanka e Indonésia (RIETVELD; WISEMAN, 2003; TANAKA; KOUNO, 2003).

Os chás de *Camellia Sinenses* são classificados em três tipos básicos: preto, verde e oolong, sendo diferenciados pelo beneficiamento das suas folhas. O chá preto é derivado de folhas envelhecidas pela oxidação aeróbica das catequinas, ocorrendo uma fermentação. O chá verde é produzido a partir de folhas frescas da planta, as quais são apenas esquentadas e fervidas, ocorrendo uma rápida inativação da enzima polifenol oxidase, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas e compostos com atividades funcionais. Por sua vez, o chá oolong é considerado intermediário ou “parcialmente oxidado”, pois é obtido por meio de um processo de fermentação mais brando, em que as folhas ficam em repouso de duas a quatro horas, sendo, depois, aquecidas para que o processo oxidativo seja interrompido, tendo, assim, um aroma menos acentuado que o chá preto. No Ocidente, ao contrário dos países orientais, o chá mais consumido ainda é o preto, embora o consumo de chá verde venha crescendo principalmente devido ao reconhecimento e divulgação de suas propriedades funcionais (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006; CHENG, 2006; TANAKA; KOUNO, 2003). Em consequência de seus compostos diferenciais e de seu sabor menos intenso, relacionado ao seu menor teor de inativação enzimática, o chá verde será utilizado como substrato da produção de kombucha neste trabalho. A composição química do chá verde inclui diversas classes de compostos fenólicos ou flavonoides, entre eles os principais presentes são os monômeros de catequinas, além de flavonóis e ácidos fenólicos. Também possui cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e micronutrientes como vitaminas B, E e C, e minerais como cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro (YANAGIMOTO et al., 2003).

A atividade antioxidante é uma das propriedades mais conhecidas do chá verde e está relacionada à estrutura química das catequinas, sendo apontada como o principal fator contribuinte na prevenção do risco de diversas doenças crônico-degenerativas, incluindo

câncer, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997; RIETVELD; WISEMAN, 2003).

#### 3.1.1.2 Erva-mate

A planta de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), espécie nativa da América do Sul, é comum na vegetação nativa de uma extensa área que abrange o Brasil, a Argentina e o Paraguai. Na região Sul do Brasil, a cultura desempenha um importante papel socioeconômico e ambiental, principalmente nas pequenas propriedades agrícolas (RODIGHERI; SCHLOSSNACHER NETO; CICHACZEWSKI, 1995).

A erva-mate pode ser ingerida como chá ou chimarrão, tradicionalmente consumida na região Sul do Brasil, e não possui somente uma propriedade agradável e estimulante, mas pode-se considerar sua infusão uma importante fonte de minerais essenciais e de vitaminas (STAGG; MILLIN, 1975).

Sua composição foi parcialmente caracterizada na literatura. Inclui uma variedade de fitoquímicos ativos, cujos compostos mais altos são os polifenóis (ácido clorogênico) e xantinas (cafeína e teobromina), seguidos por alcalóides de purina (ácido cafeico, ácido 3,4-dicico-quinílico e 3, ácido 5-dicaffeoylquinico), flavonóides (quercetina, kaempferol e rutina), aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2). Estes são os constituintes principais relevantes para a capacidade antioxidante da erva-mate (BASTOS et al., 2007a; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; FILIP et al., 2001).

A erva-mate é conhecida por ter efeitos estimulantes, anticonvulsivos e neuroprotetores no sistema nervoso central e isso é principalmente atribuído ao seu alto teor de cafeína e fenólicos (BASTOS et al., 2007b). Outras propriedades funcionais, incluindo efeitos diuréticos e antifúngicos, associadas aos compostos bioativos presentes na erva-mate também foram relatadas (FILIP; DAVICINO; ANESINI, 2010; KIM et al., 2015; PANG; CHOI; PARK, 2008). Estudos *in vitro*, *ex vivo* e modelo animal demonstraram efeitos benéficos da erva-mate no metabolismo de lipídios, glicose e antioxidantes intrínsecos (BRACESCO et al., 2011).

#### 3.1.1.3 Açúcar

O açúcar é essencial na produção da kombucha, visto que é o substrato para a simbiose de bactérias e leveduras que o transformarão nas substâncias que a caracterizam. De acordo

com a RDC nº 271 de 22 de setembro de 2005, o açúcar é definido como a sacarose obtida do caldo de cana de açúcar ou de beterraba (BRASIL, 2005).

O açúcar branco é considerado o melhor substrato na fermentação da Kombucha (REISS, 1994).

### 3.1.2 *Microrganismos*

Todos os microrganismos presentes na kombucha encontram-se tanto no líquido quanto na “mãe kombucha”, também conhecida como SCOBY. O SCOBY é a película gelatinosa que se forma na superfície do líquido e, a cada fermentação, são formadas novas camadas de película na parte superior que está em contato com o ar, sendo sempre essa a mais recente (JARRELL; CAL; BENNETT, 2000).

Assim como outras associações de microrganismos, como o kefir, derivado do leite, a definição exata da kombucha não está bem definida, pois ela varia de acordo com sua origem, substratos e condições de produção (JAYABALAN et al., 2014).

As bactérias acéticas são predominantes na kombucha, cujas principais são: *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*. *Acetobacter xylinum*, a bactéria mais recorrente, tem a capacidade de sintetizar uma rede de celulose flutuante (SCOBY) que melhora a associação formada entre bactérias e fungos (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997). Em uma combinação simbiótica com as bactérias, há diversos tipos de leveduras presentes na kombucha, e as mais recorrentes são: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii* e *Candida stellate*. Leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* produzem compostos aromáticos frutados, apresentando grande importância no desenvolvimento do aroma da kombucha. Já as leveduras apiculadas (*Kloeckera* e *Hanseniaspora*) sintetizam ésteres voláteis e ácidos que conferem ao substrato um aroma semelhante à sidra (BATTIKH; BAKHROUF; AMMAR, 2012; MAYSER et al., 1995).

O pH da kombucha decresce ao longo do processo fermentativo devido à produção de ácidos orgânicos. A cor do líquido vai ficando mais clara, em relação à cor original do chá, devido às alterações que ocorrem na conformação dos complexos fenólicos resultantes da ação de enzimas microbianas sobre os polifenóis (LIU et al., 1996).

### 3.1.3 Preparação de Kombucha artesanal

Chá preto e chá verde são utilizados, tanto a mistura de ambos quanto isoladamente, como substratos na preparação da kombucha e é adicionado açúcar. As proporções de chás e açúcares utilizados na preparação variam de acordo com a literatura. O método utilizado por Pure e Pure (2016) utiliza 20g/L de sacarose e 10g/L de ervas secas na infusão. Para Kallel et al. (2012), a proporção escolhida foi a de 100g/L de sacarose com 12g/L de chá seco na preparação do substrato. Também não há tempo de infusão do chá considerado ideal, depende do tipo de chá e do produtor, mas seus tempos variam de 2 a 10 minutos. Segundo o livro *The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea* (CRUM; LAGORY, 2016), os mais adequados tempos de infusão de chá verde, chá preto e erva-mate são, respectivamente, 2 a 3 minutos, 3 a 6 minutos e 3 a 5 minutos.

Após a preparação do novo substrato (chá e açúcar), espera-se o líquido esfriar e chegar até a temperatura ambiente, então, é adicionado o inóculo composto pela kombucha já fermentada em um volume de 10 a 20% do recipiente no qual ocorrerá a fermentação junto com o SCOBY. O material utilizado para a fermentação não poderá ser afetado por corrosão do meio ácido que resultará a kombucha, que fica com pH final entre 2,7 e 3,1. Já foram relatados casos em que ocorreu toxicidade no consumidor após a migração de compostos tóxicos de recipientes de chumbo e cerâmica para a kombucha durante a fermentação. Os materiais mais indicados são vidro e aço inox (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2017; SRINIVASAN; SMOLINSKE; GREENBAUM, 1997). Além do material, outro fator necessário é um recipiente com bocal largo para que haja troca de ar com o ambiente, pois é nessa superfície que se formará a nova película acima da antiga, e a cobertura com gaze limpa ou pano que haja passagem de ar para evitar contaminações de esporos ou insetos, como mostrado na Figura 1.





Figura 1: Recipiente para fermentação de kombucha com proteção na sua superfície.

Durante a fermentação, o sabor da kombucha muda de agradavelmente doce e frutado para “avinagrado”, devido à produção de altos níveis de ácidos orgânicos (JAYABALAN et al., 2014). O tempo de incubação varia de acordo com o sabor final desejado e a temperatura de fermentação. Neffe-Skocińska et al. (2017) testaram três diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C e 28 °C) em 10 dias de fermentação, avaliando fatores como pH e ácidos orgânicos, e definiu como melhor temperatura a de 25 °C nesse período de tempo. Lončar et al. (2006) analisaram a cinética da sacarose na fermentação da kombucha e concluíram que a melhor faixa de temperatura de fermentação é de 22 a 30 °C e a melhor faixa de duração da fermentação é de 3,5 a 5 dias. Após essa fermentação, pode-se realizar uma segunda fermentação de 2 a 3 dias em recipiente fechado para carbonatar (produção de gás carbônico) a kombucha, adicionando frutas e/ou ervas como saborizantes. Quanto maior a quantidade de açúcar do insumo adicionado, maior será seu teor de carbonatação. Depois de pronta, costuma-se guardá-la em ambiente refrigerado, melhorando seu aspecto sensorial e diminuindo a velocidade de sua fermentação com a redução da temperatura.

### *3.1.4 Composição química da kombucha*

A composição química da kombucha é variável tanto quantitativa quanto qualitativamente, pois depende de diversos fatores, como tempo de fermentação, substratos utilizados no chá inicial, microrganismos presentes no inóculo, entre outros. Porém, alguns componentes, como ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis e aminoácidos, estão comprovadamente presentes na maioria (JAYABALAN et al., 2014; MARSH et al., 2014).

Entre os ácidos orgânicos presentes, os mais importantes produzidos durante a fermentação são glucorônico, glucônico, láctico, málico, cítrico, tartárico, fólico, malônico, oxálico, pirúvico e úsnico. O ácido láctico se mostra mais presente em preparações com base de chá verde se comparado a outros chás, como chá preto. O ácido glucorônico é um dos mais valiosos ácidos para a saúde presente na kombucha e é o resultado de um processo microbiológico de oxidação da glicose. Por ser produzido pelo fígado no corpo humano, exibe efeitos desintoxicantes, pois tem a capacidade de se ligar a xenobióticos, incluindo também fenóis presentes no fígado, permitindo que essas substâncias sejam excretadas pelos rins de forma mais eficiente. Além de, também, ser precursor na biossíntese de vitamina C (JAYABALAN et al., 2014; NGUYEN et al., 2015).

O substrato utilizado pelos microrganismos é a sacarose. Provou-se que a simbiose de bactérias e leveduras é responsável pela hidrólise enzimática extracelular de sacarose em glicose e frutose, e transformação de glicose e frutose em etanol e CO<sub>2</sub> pelas leveduras, enquanto as bactérias convertem a glicose em ácido glucônico e frutose em ácido acético como consequência das reações da cadeia metabólica (REISS, 1994).

### *3.1.5 Propriedades*

A kombucha tem sido intensivamente consumida durante muito tempo em todo o mundo por suas propriedades profiláticas e terapêuticas. A maioria das propriedades foi baseada em observações pessoais e depoimentos, e apenas alguns efeitos foram demonstrados cientificamente. Os primeiros relatórios são provenientes da Rússia durante a Primeira Guerra Mundial, os quais afirmavam que o “remédio caseiro secreto russo”, como era nomeada a kombucha, auxiliava em dores de cabeça, doenças gástricas e, especialmente, na regulação das atividades intestinais muitas vezes desequilibradas pelo estilo de vida no exército. Entretanto, nos últimos 15 anos, tem havido maior atenção sobre os possíveis benefícios para a saúde consequentes do consumo de kombucha (VINA et al., 2014).

Um dos benefícios já estudados é a sua atividade antioxidante, correlacionada com aumento da imunidade, alívio de inflamações e artrites. Jayabalan et al. (2008) relataram a potencial habilidade de eliminação de radicais livres pelo chá de kombucha preparado a partir de chá verde e chá preto. Segundo os autores, os compostos fenólicos, a atividade de reação com radical DPPH e o radical superóxido foram aumentados ao longo do tempo de fermentação, enquanto o poder de redução, a capacidade de eliminação de radicais hidroxílicos e a capacidade de peroxidação antilipídica foram reduzidas – os polifenóis (quatro isômeros de epicatequina: epigallocatequinas galato EGCG, epigallocatequinas EGC, epicatequinas galato ECG e picatequinas CE) foram analisados em HPLC por 18 dias desde seu inóculo. O motivo do aumento da concentração de polifenóis no chá em seu 12º dia foi deduzido pela biotransformação de EGCG para EGC e ECG para EC por enzimas excretadas por microrganismos na cultura presente na kombucha junto com a liberação de catequinas sensíveis ao ácido presente. Outra propriedade relacionada à kombucha é a sua capacidade energizante (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). Essa habilidade energética pode ser explicada pela formação de ferro e complexo quelante sintetizado com ácido glucônico, o que aumenta o nível de hemoglobina no sangue, melhora o fornecimento de oxigênio aos tecidos e estimula a síntese de ATP. A absorção do ferro não heme (derivado das plantas) tem o seu efeito aumentado devido aos ácidos orgânicos e à vitamina C sintetizados pela kombucha (ADRIANI, 2011).

Uma das atividades mais relatadas por consumidores de kombucha, porém ainda com pouca informação científica disponível, é o fator antiobesidade. De acordo com Danielian (2005), a bebida tem capacidade de harmonizar e equilibrar o metabolismo em geral e limita a acumulação de gordura. Outro estudo mostrou que houve perda de peso causada pelo consumo de kombucha quando analisado o efeito hipolipidêmico, o qual foi conectado à interação da kombucha com a inibição da lipase e, como resultado, uma restrição na ingestão de calorias (YANG et al., 2009).

Alguns pesquisadores identificaram a presença de algumas bactérias lácticas na composição da kombucha, fato que promoveu a divulgação do seu possível caráter probiótico. Porém como a composição exata do SCOBY ainda não foi identificada não se pode afirmar essa propriedade. Além disso, segundo a Portaria nº 398 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde para atribuir o caráter probiótico é necessário que a kombucha contenha organismos vivos que conferiram benefícios à saúde do indivíduo quando administrado em quantidades adequadas ( $10^8$  -  $10^9$  UFC) e isto ainda não foi comprovado. (KOZYROVSKA et al., 2012). Embora ainda seja considerada um produto novo, os estudos

relacionados aos benefícios trazidos pela ingestão da kombucha estão crescendo, bem como sua gama de propriedades.

A propriedade antimicrobiana também já teve sua atividade estudada. Steinkraus et al. (1996) verificaram que a bebida inibia o crescimento das bactérias patogênicas *Helicobacter pylori* (principal causa de gastrite relacionada a úlceras pépticas e cancro do estômago), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Agrobacterium tumefaciens*. Entretanto, seus resultados não mostraram atividade antibiótica além da causada pelo ácido acético, um produto primário da sua fermentação. Battikh et al. (2013) estudaram a atividade antimicrobiana da kombucha preparada com chá preto e com chá verde, e verificaram que, apesar de ambas inibirem o crescimento da maior parte dos microrganismos estudados, a de chá verde apresentou maior potencial antimicrobiano.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparação do substrato

Neste trabalho, foram testados dois tipos de extrato de plantas como substrato para a produção de kombucha: uma com chá verde (*Camellia Sinensis*) e outra com erva-mate pura folha (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), separadamente. Ambas as ervas foram preparadas nas mesmas condições e quantidades de substrato.

A erva foi adicionada em um recipiente com água fervida na concentração de 10g/L durante 5 minutos de infusão. Com uma peneira de 1,7mm de abertura, a infusão foi coada e adoçada com açúcar cristal (marca Organic) na concentração de 90g/L e agitada até sua dissolução. Esperou-se o substrato chegar à temperatura ambiente (em torno de 25 °C) para inocular 10% do volume total de kombucha já fermentada ao substrato (inóculo). Foram feitos dois tipos de fermentação e controle para ambos os tipos de substratos, descritos no item a seguir.

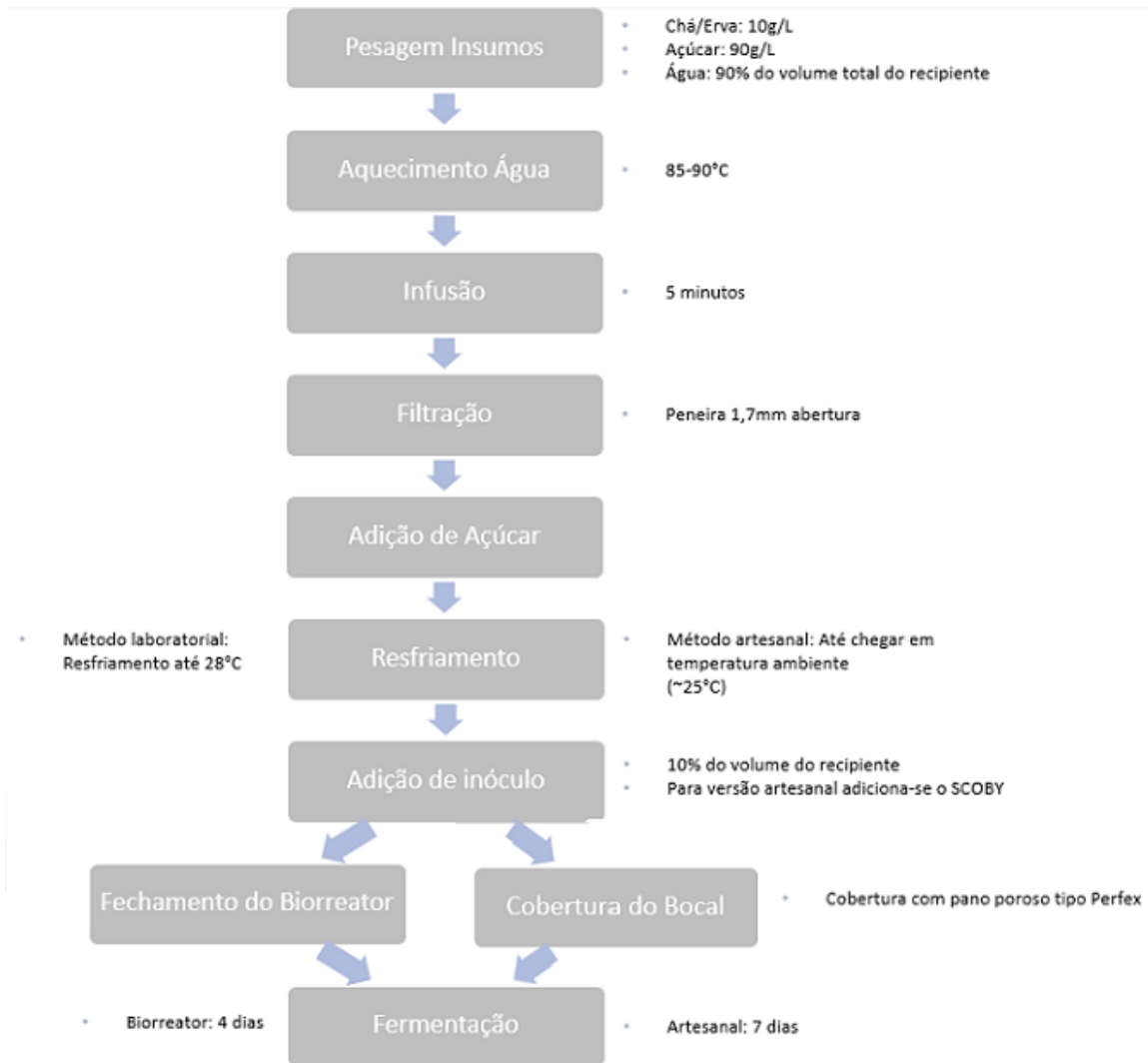


Figura 2: Fluxograma de preparação da kombucha artesanal e laboratorial.

## 4.2 Método artesanal

O método artesanal foi feito do modo padrão: em uma jarra de vidro com capacidade de 1,5 litros, abertura de 9 centímetros de diâmetro e coberto com pano poroso tipo Perfex que possibilita a passagem de ar sem que haja contaminação por insetos e/ou sujeiras físicas, conforme a Figura 3. Os experimentos foram realizados em duplicata, tanto para o substrato de erva-mate como para o de chá verde, e deixados sem contato com a luminosidade. As jarras ficaram em temperatura ambiente ( $\approx 25$  a  $28$  °C) e amostras de 4 mL foram retiradas no momento de sua inoculação (tempo zero) e a cada 24 horas até completar 7 dias de fermentação. Medições de pH foram feitas em todas amostras. As amostras foram congeladas a  $-18$  °C até o momento da análise.



Figura 3: Recipiente utilizado no método artesanal das kombuchas.

### 4.3 Método laboratorial

O método laboratorial foi feito em biorreator STR de 2L de volume útil em duplicata. Foram testados os substratos de erva-mate e chá verde em cada experimento, como mostrado na Figura 4. O pH foi monitorado com um eletrodo acoplado ao reator, previamente calibrado, na unidade de controle do biorreator *Biostat-B Plus. B. Braun* (Alemanha). O processo foi conduzido a 28 °C com agitação de 50 rpm e aeração de 0,42 vvm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas até o final de 7 dias de fermentação.



Figura 4: Biorreator utilizado na produção de kombucha em escala laboratorial.

#### 4.4 Análises/Métodos analíticos

##### 4.4.1 Análise de fenólicos

Os fenólicos totais foram determinados de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu adaptado de acordo com a amostra (BECATTI et al., 2010). Foram feitas três soluções para a análise: uma de Folin na proporção de 10:1 Folin: água destilada; uma de carbonato de sódio com concentração de 20%; e uma solução de 100 ppm de ácido gálico (EAG), utilizada para a curva padrão. As amostras foram previamente centrifugadas a 3.000 g, por 10 minutos a 4 °C e filtrada em membrana de 45 µm. Em uma cubeta, foi adicionado 25 µL da amostra de kombucha e 1.375 µL da solução de Folin preparada. Após 8 minutos de reação sob proteção da luz, foram adicionados 600 µL de água destilada e 500 µL da solução de carbonato de sódio 20% e colocados sob abrigo da luz novamente para reagir por 30 minutos. Os teores de fenólicos totais foram expressos em mg de equivalentes de EAG por L de bebida e sua absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm à temperatura ambiente.



#### 4.4.2 Análise de atividade antioxidante

A análise espectrofotométrica da atividade antioxidante foi determinada de acordo com método descrito por Fellegrini et al. (1999), usando a descoloração dos radicais catiônicos de ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]). As moléculas antioxidantes reduzem o radical para ABTS e, assim, diminuem a absorbância da solução. O grau de descoloração da mistura ABTS<sup>o+</sup> com a amostra é proporcional à concentração e ao tempo e é quantificado usando um antioxidante padrão, que, neste caso, foi o trolox.

As amostras foram previamente centrifugadas a 3000 g, por 10 minutos a 4 °C (Centrífuga Sigma 4K15, Alemanha), e filtradas em membrana de 45 µm. O filtrado foi utilizado para as análises.

O radical ABTS<sup>+•</sup> foi produzido por meio da reação de 5 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). A mistura permaneceu em repouso por 16 horas, sob proteção da luz, até o momento das análises. O radical ABTS produzido foi diluído em etanol até absorbância de  $0.700 \pm 0.020$  a 734 nm (Espectrofotômetro Shimadzu CPS-240A, Japão). Para a curva padrão, utilizou-se solução de trolox previamente preparada com diferentes concentrações (176 – 5,5 µM/L).

Em uma cubeta foi adicionado 1 mL de ABTS<sup>o+</sup> e 100 µL de amostra, previamente diluída em 100x, e deixado reagir, sob abrigo de luz, por 6 minutos. A absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm. A capacidade de atividade antioxidante foi expressa mM/L de equivalente de trolox.

#### 4.4.3 Análise de pH

As análises de pH para o método artesanal foram feitas logo após a retirada da amostra em pHmetro de Bancada Kasvi modelo K39-2014B. No método laboratorial, o biorreator monitorou o pH durante toda a fermentação da kombucha, sendo registrado o valor de seu pH no momento da retirada de cada amostra.

#### 4.4.4 Análise cromatográfica

##### 4.4.4.1 Análise do conteúdo de compostos orgânicos

As concentrações de ácido acético, ácido láctico, glicerol e etanol foram monitoradas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corp., Japão) equipado com um detector de índice refrativo RID-10<sup>a</sup> e uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, Estados Unidos). As análises foram feitas utilizando-se fase móvel de ácido sulfúrico 0,005 mol/L, com uma vazão de 0,6 mL/min, a 45 °C. O volume de dosagem da amostra foi de 20 µL. As amostras coletadas nos biorreatores e nos recipientes da metodologia artesanal para essas análises foram primeiramente centrifugadas a 3000 g, durante 15 minutos, a 4 °C; e, após, foram filtradas com membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Sartorius, Alemanha). Os reagentes utilizados para desenvolver as curvas padrão no HPLC tinham pureza acima de 99,5%. As curvas foram feitas com as seguintes concentrações em g/L: 0,2; 0,8; 1,5; 2,5; 3,5; e 5,0. As soluções dos padrões foram filtradas com membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha). O volume de dosagem de cada concentração foi de 20 µL.

##### 4.4.4.2 Análise do conteúdo de açúcares

As concentrações de sacarose, glicose e frutose foram monitoradas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corp., Japão) equipado com um detector de índice refrativo RID-10<sup>a</sup> e uma coluna Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, Estados Unidos). As análises foram feitas utilizando-se fase móvel de ácido sulfúrico 0,005 mol/L, com uma vazão de 0,6 mL/min, a 85 °C. O volume de dosagem da amostra foi de 20 µL. As amostras coletadas nos biorreatores e nos recipientes da metodologia artesanal para essas análises foram primeiramente centrifugadas a 3000 g, durante 15 minutos, a 4 °C; e, após, foram filtradas com membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Sartorius, Alemanha). Os reagentes utilizados para desenvolver as curvas padrão no HPLC tinham pureza acima de 99,5%. As curvas foram feitas com as seguintes concentrações em g/L: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0. As soluções foram filtradas com membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha). O volume de dosagem de cada concentração foi de 20 µL.

#### 4.4.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As amostras de kombucha de extrato de erva-mate pelo método artesanal e pelo método laboratorial foram oferecidas na mesma sessão. Amostras de 30 mL de cada kombucha foram oferecidas a 35 provadores e a eles foi solicitado avaliar a aceitação dos atributos de: aparência, cor, odor, sabor, sabor residual e aceitação global utilizando uma escala 9 pontos (1 – Desgostei muitíssimo e 9 – Gostei muitíssimo). Para cada provador foi entregue a ficha de análise sensorial (Figura 5), as amostras codificadas e um copo de água para tomar entre elas, como disposto na Figura 6.

**ANÁLISE SENSORIAL DE KOMBUCHA**

Nome:..... Data:...../...../.....  
Idade: .....

**PROCEDIMENTOS**

Você está recebendo duas amostras de kombucha codificados. Avalie as características de aparência, cor, odor, sabor, sabor residual e aceitação global das amostras e atribua notas para aceitação de cada atributo, segundo tabela abaixo:

Aceitação
1- desgostei muitíssimo
2- desgostei muito
3- desgostei moderadamente
4- desgostei levemente
5- nem gostei nem desgostei
6- gostei levemente
7- gostei moderadamente
8- gostei muito
9- gostei muitíssimo

Anotar para cada característica e cada amostra o resultado na tabela abaixo. Proceder, avaliando primeiro a aparência, cor e odor. Através de degustação, avaliar textura, sabor, sabor residual e aceitação global.

	AMOSTRA 896	AMOSTRA 748
<b>Aparência</b>		
<b>Cor</b>		
<b>Odor</b>		
<b>Sabor</b>		
<b>Sabor residual</b>		
<b>Aceitação global</b>		

Comentários

Você compraria este produto? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Figura 5: Ficha da análise sensorial de kombucha.

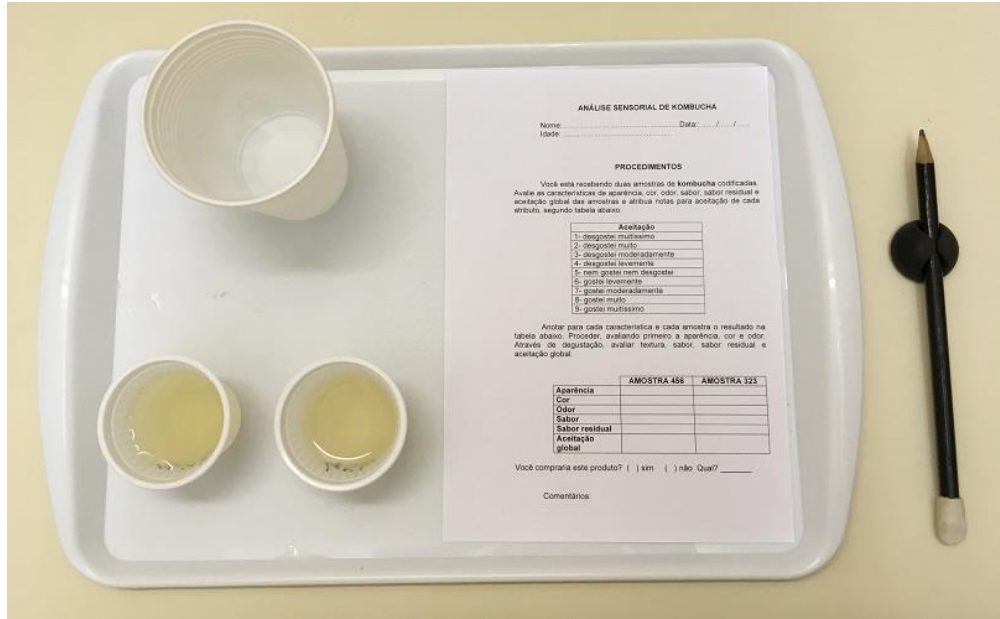


Figura 6: Disposição das amostras de kombucha de erva-mate e ficha da análise sensorial.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de componentes principais, que permite uma análise global dos resultados e sugere quais atributos ou descritores mais caracterizam as amostras, evidenciando também as relações existentes entre elas (Figura 7).

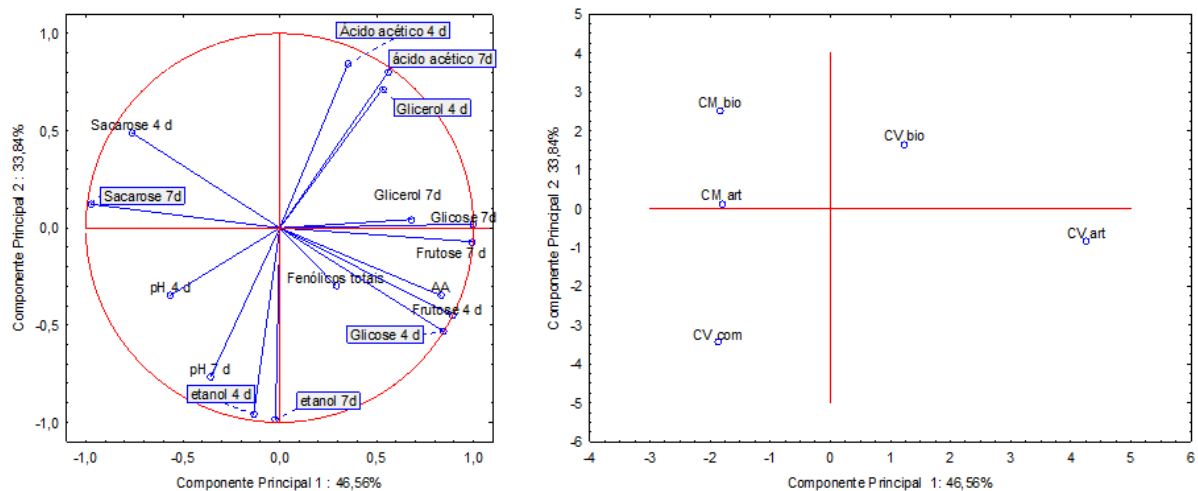


Figura 7: Análise de componentes principais das kombuchas: erva-mate artesanal (CM art), erva-mate laboratorial (CM bio), chá verde artesanal (CV art), chá verde laboratorial (CV bio) e chá verde comercial (CV com) e em plano fatorial “B”.

A partir da Figura 7, percebe-se que o maior teor de sacarose durante (4 dias) e ao final (7 dias) da fermentação ocorre na kombucha de erva-mate, tanto na escala artesanal quanto na laboratorial, e, conseqüentemente, os menores teores de ácido acético, glicose e frutose estão presentes nessas kombuchas, pois a velocidade de sua fermentação foi inferior ao do substrato de chá verde, não hidrolisando maior quantidade de sacarose para transformação dos produtos resultantes.

Também se pode observar que os teores mais elevados de ácido acético, juntamente com os menores valores de pH e etanol, foram reproduzidos na kombucha de chá verde do biorreator. A diminuição do pH está ligada ao aumento da produção de ácido acético e, nesse caso específico, o teor alcoólico da kombucha foi drasticamente reduzido pela interferência da microaeração no biorreator, em que as leveduras anaeróbicas não converteram o açúcar efetivamente em etanol e o teor remanescente do inóculo e foi convertido em ácido acético pelas bactérias.

O chá verde comercial apresentou os maiores valores de pH e de etanol, e menor quantidade de ácido acético ao final de sua fermentação. O chá verde artesanal, por sua vez, apresentou o menor nível de sacarose, mostrando que ela foi mais efetivamente hidrolisada, e os maiores níveis de seus subprodutos: glicose, frutose e ácido acético.

### 5.1 Análise de compostos fenólicos

Compostos fenólicos são chamados de antioxidantes de alto nível devido à sua capacidade para eliminar as espécies de radicais livres e ativos de oxigênio, como oxigênio singlete, radicais livres superóxido e radicais hidroxila (JAYABALAN et al., 2008). A quantificação dos fenólicos totais foi realizada ao final dos 7 dias de fermentação de todas as kombuchas e seus resultados foram expressos em mg/mL de equivalentes de EAG, como apresentado na Figura 8.

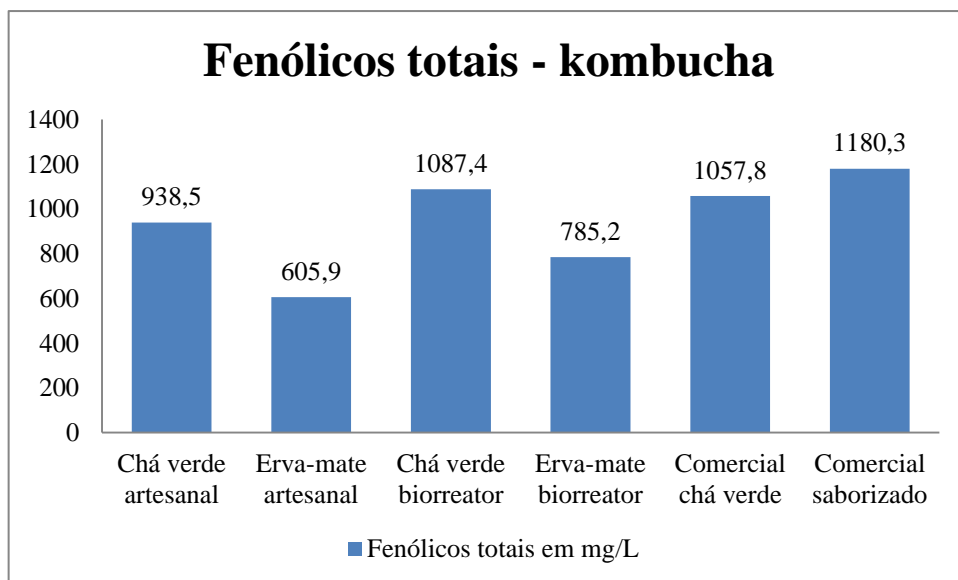


Figura 8: Quantidades de fenólicos totais presentes nas kombuchas após 7 dias de fermentação.

Os resultados para as kombuchas de erva-mate foram de 605,9 mg/L na versão artesanal e de 785,2 mg/L de fenólicos totais na versão laboratorial. Segundo o estudo de Bassani, Nunes e Granato (2014), o conteúdo de fenólicos totais nas folhas de erva-mate variou de 349,9 a 428,31 mg de EAG equivalente por litro de chá.

Kallel et al. (2012) analisaram os fenólicos totais expressos em g/L de EAG de kombucha de chá verde ao longo de sua fermentação e obtiveram como resultado no primeiro dia 0,78 g/L e, ao final de 15 dias, a concentração de 1,08 g/L de fenólicos totais. Similarmente, Jayabalan et al. (2008) relataram valores de 0,85 g/L de concentração inicial e

de 1,25 g/L de fenólicos totais após 18 dias de fermentação, demonstrando que as concentrações de fenólicos aumentaram ao longo da fermentação da kombucha.

Segundo Zhu et al. (1997), a estabilidade das catequinas, um dos compostos presentes no chá verde, depende do pH, e são muito instáveis em solução alcalina, mas estáveis em soluções ácidas.

Quando comparadas as versões artesanais e laboratoriais, em ambas as kombuchas a versão laboratorial apresentou maior teor de compostos fenólicos. A condição de aeração e de menor pH provavelmente facilitou a extração de compostos bioativos dos substratos no biorreator.

## 5.2 Análise de atividade antioxidante

O poder de redução de uma bebida descreve sua capacidade de doar elétrons para outro composto e assim refletir sua potencial atividade antioxidante (FERREIRA et al., 2007).

Tabela 1: Atividade antioxidante quantificada em percentual de inibição e equivalente em trolox nas respectivas kombuchas.

Kombuchas	% Inibição	Equivalente trolox (mMol/L)
Chá verde artesanal	41,0	9,02
Erva-mate artesanal	13,4	2,99
Chá verde laboratorial	41,0	9,05
Erva-mate laboratorial	20,0	4,38
Comercial chá verde	37,0	8,19
Comercial saborizado	56,0	12,4

As atividades antioxidantes nas kombuchas foram quantificadas em percentuais de inibição e em equivalentes de trolox (mMol/L), conforme a Tabela 1. Seus resultados variaram de 13,4% de inibição e 2,99 mMol/L na kombucha de erva-mate artesanal até 41% e 9,05 mMol/L na kombucha de chá verde laboratorial após 7 dias de fermentação. Foram quantificadas também duas kombuchas comerciais de chá verde antes e depois de sua saborização, a fim de comparações entre as kombuchas produzidas. Os valores foram semelhantes entre as kombuchas de chá verde em suas diferentes metodologias, e também em sua versão comercial, com um acréscimo na atividade antioxidante da kombucha saborizada

em função dos compostos presentes em seus saborizantes, mostrando que esse potencial antioxidante se mantém na fermentação da kombucha e pode vir a ser potencializada.

Srihari e Satyanarayana (2012) avaliaram a atividade antioxidante da kombucha ao longo de sua fermentação pela metodologia do ABTS e obtiveram valores de percentual de inibição de 43,4% no primeiro dia e de 70,1% ao final de 18 dias de fermentação, mostrando um aumento da atividade oxidante no processo de fermentação.

Quando foi analisada a correlação entre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante medido por ABTS, observou-se uma correlação positiva significativa ( $R^2=0,95$ ), o que indica que a atividade antioxidante da bebida está diretamente correlacionada ao teor de compostos fenólicos.

### 5.3 Análise de pH

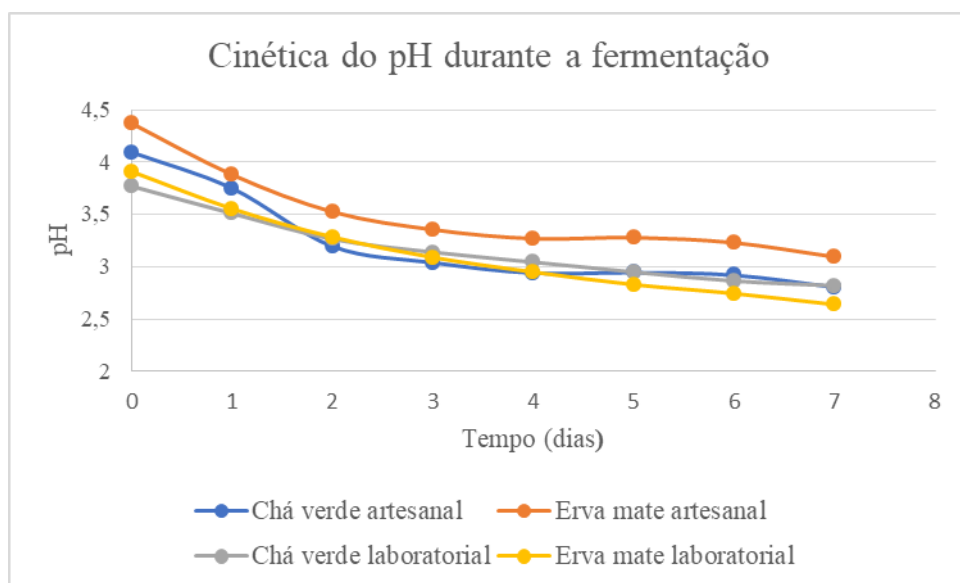


Figura 9: Cinética do pH durante o processo de fermentação da kombucha.

As análises artesanais de chá verde e erva-mate foram feitas em duplicatas durante a mesma semana e utilizando o mesmo inóculo, não apresentando diferenças significativas em seus resultados (Figura 9). A kombucha de erva-mate artesanal iniciou a fermentação com pH de 4,37 e, após os 7 dias de fermentação, foi detectado pH de 3,10. Já a kombucha de chá verde teve o valor inicial de pH de 4,10 e de 2,81 após os 7 dias de fermentação. Kallel et al. (2012) analisaram o comportamento do pH durante a fermentação de kombuchas utilizando



chá verde e chá preto em sua composição. Os autores verificaram que não houve variação significativa no valor do pH entre os dois substratos: as kombuchas iniciaram com pH de 3,8 logo após a inoculação e, após 15 dias, seus pHs estavam a 2,6 e 2,7 para chá verde e chá preto, respectivamente. Após 7 dias de fermentação o pH estava em 2,9, semelhante ao valor encontrado em nosso experimento.

As kombuchas laboratoriais foram feitas em duplicata no biorreator, testando-se, a cada vez, uma kombucha de cada substrato. Assim, seus inóculos utilizados não foram os mesmos, pois foi utilizado como inóculo a kombucha artesanal já pronta da fermentação seguinte. A kombucha de chá verde fermentada no biorreator teve sua replicata sem diferença significativa entre os valores monitorados de pH, iniciando com 3,77 e terminando sua fermentação de 7 dias em 2,82, valor semelhante ao processo artesanal. Já a kombucha de erva-mate laboratorial teve diferença significativa de valores de pH em sua replicata. Uma das possíveis explicações é devido ao inóculo da segunda batelada ter um valor inicial de pH menor e estar com os microrganismos mais adaptados à erva-mate, causando um decréscimo mais rápido do pH durante a fermentação. O valor médio inicial do pH da kombucha de erva-mate laboratorial foi de 3,91 e seu valor final após os 7 dias foi de 2,64.

A medição do pH é o fator que controla o curso correto de fermentação e é usado para determinar o fim do processo (MALBAŠA; LONČAR; DJURIĆ, 2008). Devido à diferença de pH na kombucha de erva-mate da versão artesanal e laboratorial, foi decidido que, para a análise sensorial, o fim da fermentação laboratorial se daria no 4º dia em que o pH estivesse a 2,95, pois, de acordo com Chu e Chen (2006), o baixo pH pode contribuir para a diminuição da qualidade sensorial geral da bebida para um nível inaceitável em decorrência da produção de ácidos orgânicos, principalmente do ácido acético. Neffe-Skocińska et al. (2017) testaram a fermentação de kombucha de chá verde com chá preto em 20 °C, 25 °C e 30 °C e obtiveram os seguintes valores de pH após 7 dias de fermentação: 2,88, 2,79 e 2,71, respectivamente. Esses valores são próximos dos encontrados nas kombuchas desenvolvidas no respectivo trabalho.

## **5.4 Análises cromatográficas**

### *5.4.1 Análise do conteúdo de compostos orgânicos*

Enquanto as leveduras convertem o açúcar em álcool e dióxido de carbono, as bactérias acéticas se concentram no SCOBY da cultura inicial da kombucha e são responsáveis pela criação de novas camadas de celulose, além de metabolizarem o álcool

produzido pelas leveduras em ácidos orgânicos (CHAKRAVORTY et al., 2016; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). Os compostos orgânicos formados estão representados na Figura 10.

O ácido láctico foi detectado apenas no 6º e 7º dias de fermentação do chá verde artesanal. Porém, as amostras foram diluídas em 10x para leitura no HPLC e, com essa diluição, a concentração de ácido láctico foi inferior a 0,2 g/L, estando fora da concentração mínima da curva padrão e impossibilitando sua quantificação exata.

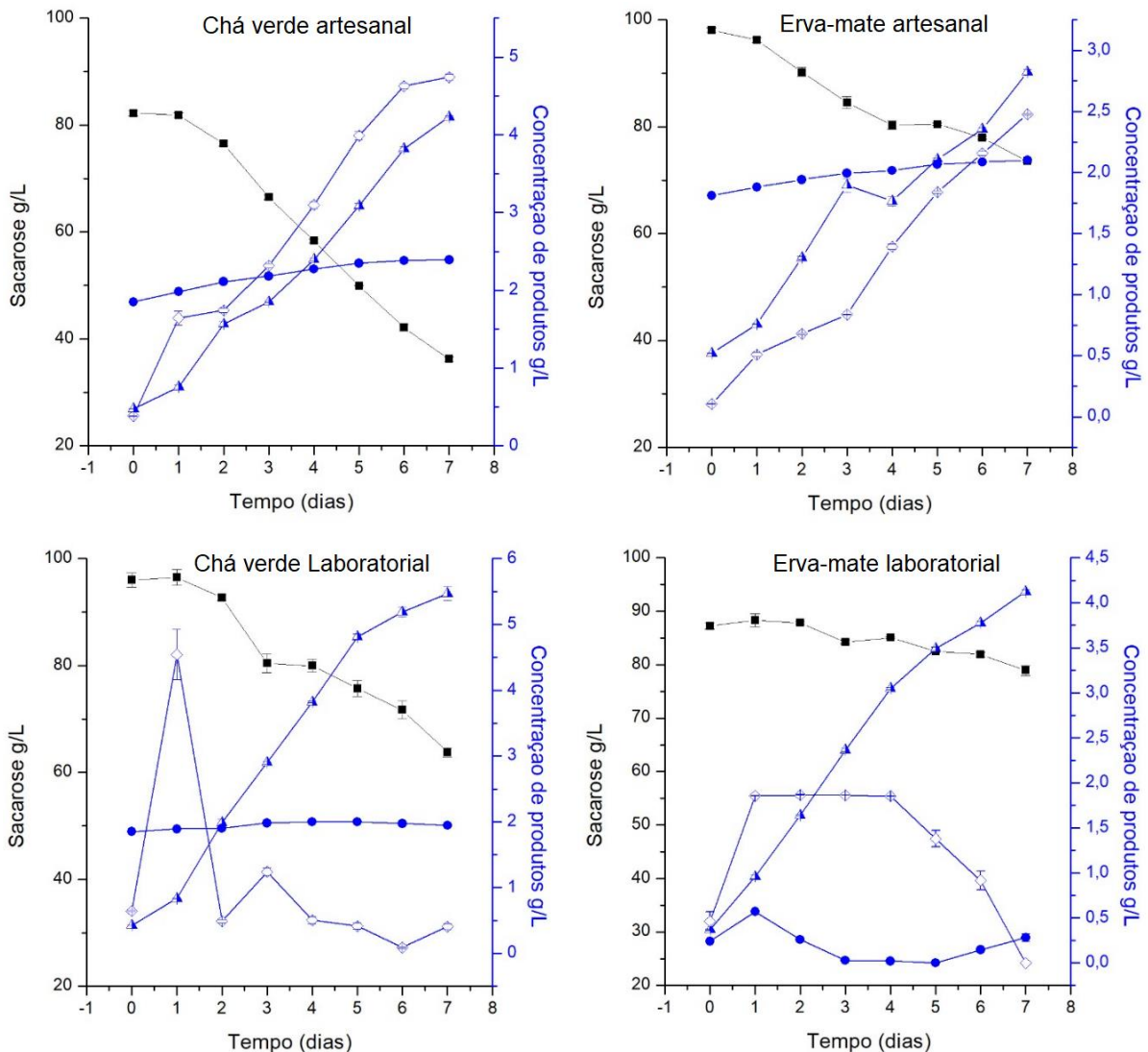


Figura 10: Cinética do consumo de sacarose (■) e seus subprodutos formados: ácido acético (▲), etanol (◇) e glicerol (●).

O ácido acético foi quantificado durante a fermentação de todas as kombuchas, chegando a um valor final de 2,72 g/L na de erva-mate artesanal até 5,47 g/L na de chá verde laboratorial. A versão laboratorial da kombucha de erva-mate produziu, ao final dos 7 dias de fermentação, 4,12 g/L de ácido acético, 51,5% a mais quando comparado à sua versão

artesanal. Já para o chá verde artesanal, a concentração final foi de 4,23 g/L de ácido acético, 30% a menos do que em sua versão laboratorial, mas também com diferença significativa entre as metodologias. Uma das possíveis explicações para essa discrepância nas metodologias é que as bactérias acéticas, nas condições estabelecidas, converteram o etanol do meio em ácido acético em maior velocidade, visto que juntamente com a maior quantificação de ácido acético na versão laboratorial está também a menor quantidade e até mesmo o consumo total do etanol.

Jayabalan et al. (2008) analisaram o conteúdo de ácido acético na fermentação de kombucha de chá verde e obtiveram o valor de ácido acético de 1,64 g/L no 6º dia e de 3 g/L no 9º dia de fermentação. Já Kallel et al. (2012) obtiveram um aumento quase linear da concentração de ácido acético ao longo das fermentações propostas, resultando em uma concentração de ácido acético de 9,5 g/L na kombucha de chá verde e de 6,2 g/L na kombucha de chá preto ao final de 15 dias. Na kombucha de chá verde, a concentração foi de 3,15 g/L no 7º dia. Para Neffe-Skocińska et al. (2017), a concentração de ácido acético ao final de 7 dias foi de 1,26 g/L. O nível de ácido acético varia entre as kombuchas dependendo do conteúdo e das atividades das bactérias ácido acéticas residentes (KALLEL et al., 2012).

O etanol é um dos subprodutos das bactérias e leveduras na conversão da sacarose. Verificou-se que o etanol e o ácido acético produzidos pelas leveduras podem prevenir a competição com outros microorganismos patogênicos, proporcionando assim uma proteção contra a contaminação da kombucha. (LIU et al., 1996). A concentração de etanol aumenta ao longo da fermentação, como comprovado nas kombuchas artesanais, que obtiveram concentrações finais de 4,74 g/L no chá verde e de 2,48 g/L na de erva-mate. As concentrações de etanol nas kombuchas analisadas foram de 1,1 g/L até 7,8 g/L, as quais estão de acordo com estudos já publicados até o momento com fermentações em condições semelhantes. Em geral, além da microbiota de cada kombucha, o que define o maior teor de etanol na bebida final é seu maior tempo de fermentação e maior quantidade de sacarose inicial (BLANC, 1996; CHEN; LIU, 2000; LONČAR et al., 2006; NEFFE-SKOCIŃSKA et al, 2017).

As kombuchas laboratoriais foram submetidas a uma microaeração por estarem fechadas em um biorreator e possuem bactérias aeróbias. No entanto, o processo inibiu as leveduras anaeróbias de converterem a sacarose em etanol, fazendo com que o etanol presente inicialmente pela adição do inóculo fosse consumido por completo pelas bactérias acéticas e estagnado já nos primeiros dias de fermentação dependendo de sua concentração inicial.

Em relação ao glicerol, sabe-se que durante uma fermentação alcoólica típica, pelo menos cerca de 5% dos açúcares presentes no meio são desviados para a produção de glicerol, que é, quantitativamente, o produto mais importante após o etanol e o dióxido de carbono. Além disso, em situações de estresse osmótico, provocado, por exemplo, por elevadas concentrações de açúcares, o glicerol é o principal soluto compatível produzido pela célula como forma de contrabalançar a pressão osmótica externa (BLOMBERG; ADLE, 1992; SCANES; HOHMANN; PRIOR, 1998). Ainda não há muitos estudos quantificando e discutindo a presença e a atividade do glicerol na kombucha, diferente do seu papel no vinho, em que já é comprovada sua contribuição nas propriedades aromáticas e de viscosidade, tornando-o mais denso e encorpado (REMIZE et al., 1999). Na metodologia laboratorial, o glicerol se manteve estável em ambos os substratos ao longo da fermentação, entre 1,85 g/L e 1,95 g/L, e não foi detectado no dia 6 e 7 para a kombucha de erva-mate. Porém, nas kombuchas artesanais sua concentração variou de 1,85 g/L para 2,39 g/L, na kombucha de chá verde, e de 1,81 g/L até 2,1 g/L na kombucha de erva-mate. Houve um pequeno aumento na concentração de glicerol para a metodologia artesanal das kombuchas ao longo da fermentação.

#### *5.4.2 Análise do conteúdo de açúcares*

A Figura 11 ilustra o consumo da sacarose e os produtos formados a partir dessa reação em todas as kombuchas, variando sua velocidade e quantidade. Durante o processo de fermentação da kombucha, os dissacarídeos sofrem decomposição em monossacarídeos sob influência de enzimas e ácidos, isto é, açúcares simples. As moléculas de sacarose se ligam ao sítio ativo da enzima em que são transformados em glicose e frutose, que continuam a se converter em outros produtos por meio de uma série de reações consecutivas e paralelas. Portanto, a mistura de reação altera sua composição (qualitativa e quantitativamente) durante a fermentação. Essa hidrólise inicial da sacarose é atribuída à ação das leveduras. Com a progressão da fermentação, as leveduras utilizam o açúcar de modo anaeróbico para produzir etanol, enquanto as bactérias acéticas utilizam o açúcar e o etanol para produzir ácido glucônico e ácido acético, respectivamente (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN et al., 2010; LONČAR et al., 2014).

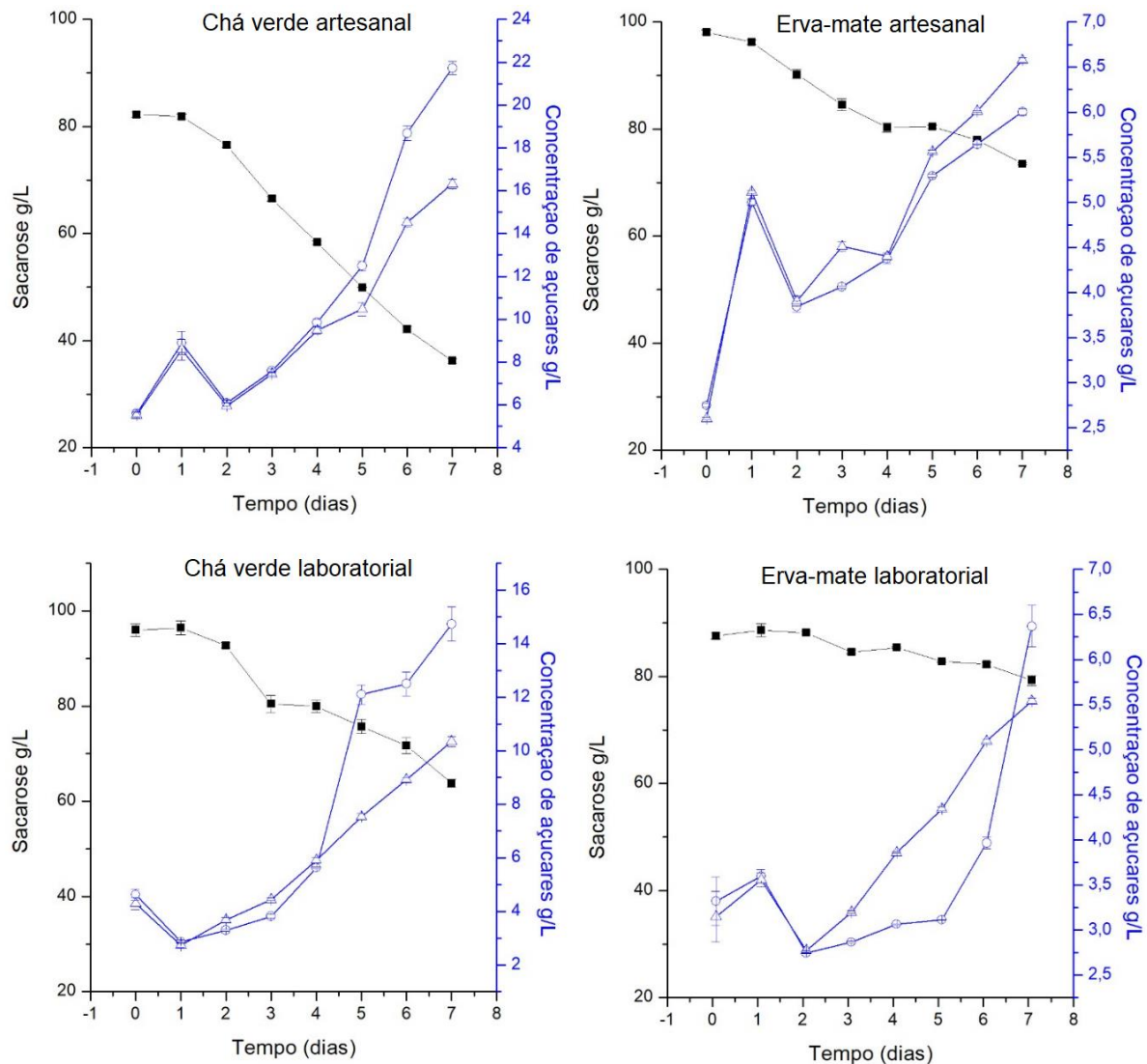


Figura 11: Cinética do consumo de sacarose (■) e da glicose (○) e frutose (△) formados nas kombuchas preparadas.

As kombuchas de erva-mate foram as que tiveram o menor consumo de sacarose ao longo da fermentação, possivelmente pela microbiota presente no inóculo ainda não estar devidamente adaptada ao novo substrato. Elas obtiveram o mesmo comportamento no consumo de sacarose e produção de ácidos e monossacarídeos, porém, em uma velocidade menor do que quando comparadas ao substrato de chá verde. Os valores finais de sacarose das kombuchas de erva-mate artesanal e laboratorial foram, respectivamente, 73,54 g/L e 78,94 g/L. Seus subprodutos formados, glicose e frutose, tiveram os valores finais de 6 g/L e 6,58 g/L para a kombucha artesanal, e de 6,25 g/L e 5,29 g/L para a versão laboratorial. A diminuição da hidrólise da sacarose na versão laboratorial ocorreu porque ela não foi convertida em etanol em função da inibição de algumas leveduras devido à microaeração

proposta, acumulando, assim, maior quantidade de sacarose de ambas as kombuchas laboratoriais.

Os quatro tipos de kombuchas e metodologias testadas mostraram que entre os dias 2 e 3 da fermentação houve a maior velocidade de hidrólise da sacarose. Por serem os substratos tradicionais e sua microbiota já estar adaptada, as kombuchas de chá verde foram as que consumiram mais conteúdo de sacarose durante a fermentação, tanto na versão artesanal quanto na laboratorial. A concentração de sacarose ao final dos 7 dias de fermentação foi de 36,25 g/L na kombucha de chá verde artesanal e de 63,8 g/L na versão laboratorial. E a formação de glicose e frutose foi de, respectivamente, 21,73 g/L e 16,32 g/L na versão artesanal e de 14,73 g/L e 10,35 g/L na versão laboratorial. A diferença entre as metodologias deve-se ao fato de a versão artesanal, mesmo que utilizada em recipiente aberto coberto com pano poroso, formar o SCOBY em sua superfície, o que torna um meio próximo ao anaeróbio abaixo dele e suas leveduras conseguem consumir a sacarose presente para a formação de etanol.

Analisando os subprodutos da hidrólise da sacarose, pode-se notar que o conteúdo de glicose é superior ao de frutose durante e ao final da fermentação de todas as kombuchas, com exceção da artesanal de erva-mate – que apresentou valores semelhantes entre os dois –, o que sugere que a frutose é preferida como fonte de carbono pelas células de levedura. Essa afirmação é comprovada por outros estudos, como o de Lončar et al. (2014), que analisaram a cinética da fermentação da sacarose e obtiveram em todas as condições um valor de glicose superior ao de frutose na fermentação de kombucha.

O mecanismo das mudanças bioquímicas durante a fermentação do chá açucarado com o sistema simbiótico das leveduras e bactérias é complexo. A ordem e uma imagem detalhada dessas mudanças não são totalmente compreendidas, embora uma série de estudos sobre a composição química da kombucha já tenham sido realizados (KALLEL et al., 2012).

## **5.5 Análise sensorial**

A análise sensorial foi feita comparando-se atributos de aceitação das kombuchas de erva-mate, com uma amostra na versão artesanal e outra na versão laboratorial. A aceitação de atributos traduz o grau de gostar ou não dos diferentes atributos sensoriais. A kombucha ainda é pouco reconhecida no Brasil, por isso, a minoria dos provadores já tinha ouvido falar e/ou havia degustado anteriormente. Sendo assim não houve uma pré-seleção dos provadores que

já tivessem contato ou consumisse a kombucha tradicional, o que pode ter tido grande influência da aceitação no geral.

Analisando a Figura 12, percebe-se que o atributo odor obteve a menor aceitação em ambas as amostras, com o percentual de 57,8% para a kombucha artesanal e 51,4% para a laboratorial. O odor foi o único atributo com diferença significativa entre as amostras, com alguns comentários de que, principalmente a amostra laboratorial, remetia ao odor de vinagre (devido ao ácido acético produzido). O aroma remetente ao vinagre já é atrelado à kombucha (JAYABALAN, 2010) e vai se intensificando ao longo da fermentação. Por isso, mesmo que ao longo de sua fermentação a bebida consuma mais sacarose e produza mais ácidos orgânicos benéficos, o que define o tempo final de sua fermentação é a análise sensorial referente aos ácidos formados. Conforme é apresentado na Tabela 2, aparência e cor tiveram boa aceitação, com índices de 75,2 e 76,2% para a Kombucha artesanal, e 76,5 e 77,1% para a laboratorial, respectivamente. As amostras não passaram por uma segunda fermentação, na qual, em geral, é feita a saborização e há intensificação de gás carbônico, o que aumenta sua aceitação, sendo um dos prováveis motivos de não ter havido melhor aceitação na maioria dos atributos.

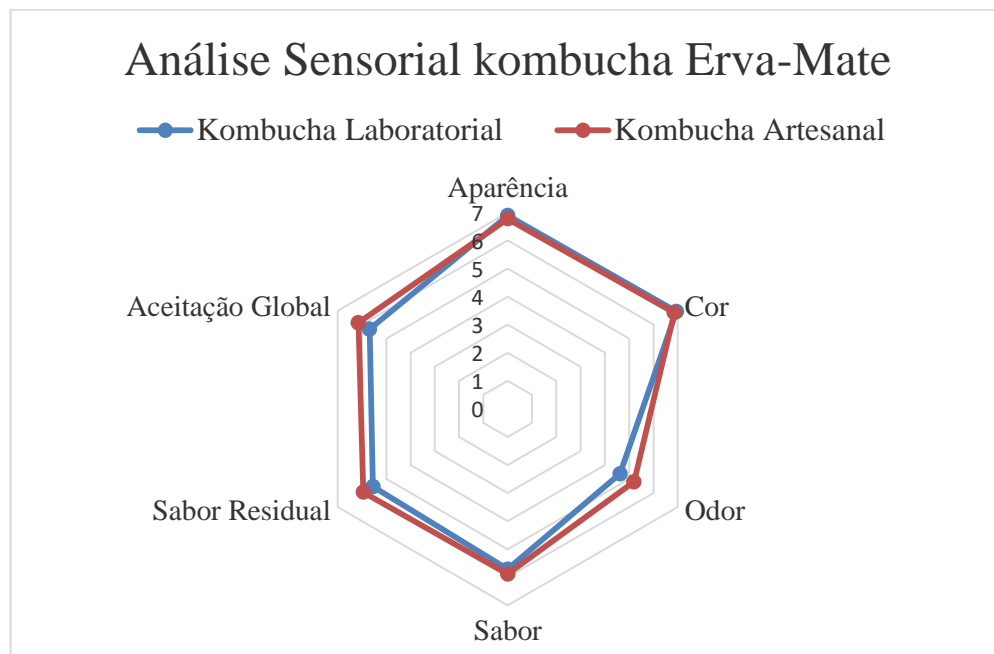


Figura 12: Valores médios dos atributos da análise sensorial de aceitação global de uma kombucha de erva-mate artesanal e outra laboratorial.

Vázquez-Cabral et al. (2014) analisaram a aceitação global de uma kombucha obtida de folhas de carvalho, utilizando a mesma escala hedônica (1 – Desgostei muitíssimo e 9 –

Gostei muitíssimo), e obtiveram resultados semelhantes aos da kombucha de erva-mate. Para concentração de 70 g/L de açúcar e 7 dias de fermentação, foi obtida a aceitação em torno de 50%, enquanto para o mesmo período de fermentação, mas com concentração de 100 g/L de açúcar, houve aceitação de 75%. Na kombucha de erva mate produzida neste estudo a concentração de açúcar foi de 90g/L e teve uma aceitação global de 68,3% para o método artesanal e de 63,2% para o método laboratorial. Apesar da aceitação global das kombuchas preparadas não atingirem o mínimo necessário (70%) para serem indicadas para comercialização, pode-se concluir que a aceitação foi promissora já que a quantidade de provadores (35) foi menor que a recomendada para testes sensoriais (50 provadores) e a maioria dos provadores não tinham conhecimento prévio da bebida.

Apesar de já terem sido realizados alguns estudos acerca da kombucha, sua microbiota e seu funcionamento ainda não estão bem definidos e padronizados, sendo necessário compreender melhor como os microrganismos interagem entre si, qual sua proporção e papel para melhor caracterizar o perfil dessa bebida.

Tabela 2: Notas e índices de aceitação referentes aos atributos avaliados na análise sensorial das kombuchas de erva-mate.

	<b>Kombucha artesanal</b>	<b>Índice de aceitação (%)</b>	<b>Kombucha laboratorial</b>	<b>Índice de aceitação (%)</b>
<b>Aparência</b>	6,77 ±1,44	75,24	6,89±1,51	76,51
<b>Cor</b>	6,86±1,52	76,19	6,94±1,58	77,14
<b>Odor</b>	5,20±1,51	57,78	4,63±1,64	51,43
<b>Sabor</b>	5,89±2,01	65,40	5,71±1,99	63,49
<b>Sabor residual</b>	5,94±2,06	66,03	5,54±1,92	61,59
<b>Aceitação global</b>	6,14±1,83	68,25	5,69±1,85	63,17



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A kombucha, apesar de ainda não ser muito reconhecida, vem ganhando espaço no mercado brasileiro e se adequa aos interesses referentes à saudabilidade que estão em alta. Os compostos bioativos e as atividades antioxidantes das kombuchas produzidas neste estudo apresentaram resultados satisfatórios, visto que suas concentrações estavam de acordo com a literatura para ambas as infusões.

A escala laboratorial com controle de parâmetros é uma das alternativas para uma possível padronização da bebida, por conter microrganismos aeróbios e anaeróbios simultaneamente. Os parâmetros utilizados na metodologia laboratorial do trabalho não aproveitaram devidamente a parte anaeróbia da microbiota devido a microaeração utilizada, porém, demonstrou o comportamento diferente nessas condições, o que abre portas para um estudo otimizando tais parâmetros para chegar a uma kombucha desejada e, posteriormente, padronizada. Durante a fermentação, a kombucha de erva-mate apresentou o mesmo comportamento que a kombucha padrão de chá verde, entretanto, com uma velocidade inferior de conversão da sacarose em seus subprodutos. A microbiota ainda não estava totalmente adaptada ao novo substrato e pode ser um dos fatores da diferença significativa. Apesar de seu índice de aceitação na análise sensorial ter ficado em 68,3%, ele pode ser melhorado a partir da segunda fermentação em recipiente fechado para maior carbonatação aliada à saborização, do mesmo modo que são feitas as kombuchas comerciais, o que não foi realizado para este trabalho.

O presente trabalho despertou interesse para futuros estudos para uma padronização em maior escala da kombucha. Devido ao pouco tempo de desenvolvimento do trabalho, apenas uma combinação de parâmetros na escala laboratorial foi testada, porém mesmo resultando em uma aceitação sensorial levemente inferior ao mínimo para indicação a comercialização, observa-se que teve a mesma aceitação da kombucha obtida pelo processo clássico artesanal. A kombucha desenvolvida em escala laboratorial foi superior em algumas análises e abre possibilidades de novos estudos que aperfeiçoem os parâmetros para uma produção padronizada e em escala industrial.

Algumas perspectivas que podem ser estudadas para melhor compreender o funcionamento geral da kombucha e uma possível padronização são:

- testar outras concentrações de erva-mate e sacarose, além de esperar outras bateladas de fermentação para verificar se a microbiota do SCOBY se adaptará à erva-mate, bem como aumentar a velocidade de conversão da sacarose em seus subprodutos;

- analisar a microbiota do SCOBY, podendo, futuramente, inibir ou adicionar microrganismos desejados na fermentação da kombucha;

- analisar os compostos bioativos e antioxidantes específicos presentes inicialmente e ao longo da fermentação da kombucha;

- testar diferentes valores de parâmetros utilizados para temperatura, tempo de fermentação e microaeração.

## REFERÊNCIAS

- ADRIANI, L. et al. The effect of feeding fermented kombucha tea on HLD, LDL and total cholesterol levels in the duck bloods. **Biotechnology in Animal Husbandry**, Zemun, v. 27, n. 4, p. 1749-1755, 2011.
- BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, England & Wales, v. 37, n. 8, p. 693-704, 1997.
- BASSANI, D. C.; NUNES, D. S.; GRANATO, D. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using response surface methodology. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 923-934, Jun. 2014.
- BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 3, p. 423-432, 2007a.
- BASTOS, D. H. M. et al. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 37-46, 2007b.
- BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT – Food Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 71-77, Jun. 2012.
- BATTIKH, H. et al. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.
- BECATTI, E. et al. Short-term postharvest carbon dioxide treatments induce selective molecular and metabolic changes in grape berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, p. 8012-8020, 2010.
- BLANC, P. J. Characterization of the tea fungus metabolites. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 139-142, Feb. 1996.
- BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, [s. l.], v. 33, p. 145-212, 1992.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, Burbank, v. 28, n. 6, p. 657-664, jun. 2012.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.
- BRASIL. **RDC nº 271, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar. ANVISA: Brasília, 2005.

BRASIL. **Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999**. Estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. ANVISA: Brasília 1999.

BRAVO, L.; GOYA, E.; LECUMBERRI. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 393-405, Apr. 2007.

CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial effects of green tea: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 25, n. 2, p. 79-99, 2006.

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

CHENG, T. O. All teas are not created equal: the chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 301-308, 2006.

CHU, S.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 98, p. 502-507, 2006.

CRUM, H.; LAGORY, A. **The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea**. North Adams (MA): Storey Publishing, LLC, 2016.

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

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, Sep. 2009.

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

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 193-204, maio-ago. 2002.

FELLEGRINI, N. et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 299, p. 379-389, 1999.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 1511-1516, 2007.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, Netherlands, v. 72, n. 7, p. 774-778, Nov. 2001.

FILIP, R.; DAVICINO, R.; ANESINI, C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. **Phytherapy Research**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 715-719, 2010.

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Mycologist**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 166-170, Nov. 2000.

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

JAYABALAN, R. et al. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. **Food Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 843-847, 2010.

JAYABALAN, R. et al. Changes in free radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008.

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

KIM, S. I. et al. Anti-obesity effects of yerba mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complement. Altern. Med.**, [s. l.], v. 15, p. 338, 2015.

KLEIN, G. A. et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 30, n. 5, p. 320-332, out. 2011.

KOZYROVSKA, N. O. et al. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 103-113, 2012.

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

LONČAR, E. et al. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 186-192, 2006.

LONČAR, E. et al. Kinetics of saccharose fermentation by Kombucha. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 345-352, 2014.

MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 106, p. 1039-1045, 2008.

MARSH, J. A. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 38, 171-178, Apr. 2014.

MAYSER, P. et al. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. **Mycoses**, [s. l.], v. 38, n. 7-8, p. 289-295, Jul-Aug. 1995.

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

NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA Journal of Food*, [s. l.], v. 15, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2017.1321588>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

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

NISHINO, H. et al. Cancer prevention by phytochemicals. **Oncology**, [s. l.], v. 69, Suppl. 1, 38-40, 2005.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 476, n. 2, p. 178-185, Aug. 2008.

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

RASMUSSEN, S. E. et al. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. **Mol. Nutr. Food Res.**, Weinheim, 49, p. 159-174, 2000.

REISS, J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Z. Lebensm. Unters. For.**, Berlin, v. 198, n. 3, p. 258-261, 1994.

REMIZE, F. et al. Glycerol overproduction by engineered *saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 143-149, Jan. 1999.

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 133, n. 10, p. 3275-3284, 2003.

RODIGHERI, H. R.; SCHLOSSNACHER NETO, L.; CICHACZEWSKI, I. F. Custos, produtividade e renda da erva-mate cultivada na região de Guarapuava, PR. Colombo: EMRAPA-CNPF, 1995. 21p. (Circular técnica, 24).

SCANES, K. T.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 17-24, 1998.

- SRIHARI, T.; SATYANARAYANA, U. Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation. **J. Pharm. Sci. & Res.**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1978-1981, 2012.
- SRINIVASAN, R.; SMOLINSKE, S.; GREENBAUM, D. Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea: is this beverage healthy or harmful? **Journal of General Internal Medicine**, Alexandria, v. 12, p. 643-644, 1997.
- STAGG, G.V.; MILLIN, D. J. The nutritional and therapeutic value of tea – a review. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 26, p. 1439-1459, 1975.
- STEINKRAUS, K. H. et al. Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage. **Acta Biotechnologica**, [s. l.], v. 16, n. 2-3, p. 199-205, 1996.
- TANAKA, T.; KOUNO, I. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. **Food Science Technology Research**, [s. l.], v. 9, p. 128-133, 2003.
- TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 95, p. 119-126, 2004.
- VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1994. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.
- VÁZQUEZ-CABRAL, B. D. et al. Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the kombucha consortium under different processing conditions. **Nutrafoods**, v. 13, n. 4, p. 169-178, 2014.
- VINA, L. et al. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 179-188, Feb. 2014.
- YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. **Journal of agricultural and food chemistry**, München, v. 51, n. 25, p. 7396-7401, Dec. 2003.
- YANG, Z. -W. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. **J. Sci. Food Agric.**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 150-156, Jan. 2009.
- ZHU, Y. Q. et al. Stability of Green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v. 45, n. 12, p. 4624-4628, 1997.