

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE
FERMENTAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA
PROBIÓTICA KOMBUCHA**

Paula de Carvalho Cruz

Orientador: Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior

Ouro Branco-MG
Junho/ 2018

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE
FERMENTAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA
PROBIÓTICA KOMBUCHA**

Paula de Carvalho Cruz

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del
Rei.

Orientador: Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior

Ouro Branco-MG

Junho/ 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE
FERMENTAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA
PROBIÓTICA KOMBUCHA**

Paula de Carvalho Cruz

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior

Nome 1 – Orientador

Katialaine Corrêa de Araújo

Nome 2 – examinador 1

Thamires Durso

Nome 3 – examinador 2

Ouro Branco, 03/07/2018

RESUMO

A Kombucha é uma bebida asiática proveniente da fermentação do chá de *Camellia Sinensis* por ação conjunta de leveduras e bactérias do ácido acético. Na literatura seu consumo está relacionado com o controle e prevenção de doenças. Objetivou-se no presente estudo produzir a Kombucha de forma caseira com o foco em analisar os parâmetros físico-químicos da sua fermentação. As amostras foram retiradas em replicatas para a análise. Por se tratar de uma bebida gaseificada, ela possui duas fermentações. Na primeira fermentação foram analisados o pH, acidez titulável, °Brix e açúcares redutores totais. Na segunda fermentação, que corresponde a etapa de carbonatação da bebida, foi analisado a produção de gás com o passar dos dias. Os resultados obtidos nas análises no final da fermentação foram pH = $3,45 \pm 0,042$, acidez titulável de $47,5 \pm 2,5 \text{ mol.L}^{-1}$; teor de sólidos solúveis de $6,15 \pm 1,62$ °Brix e teor de açúcares redutores de $5,0 \pm 0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Na segunda fermentação, a bebida passou a apresentar formação de gases, concluindo que o processo de gaseificação foi atingido.

PALAVRAS-CHAVE: Kombucha, fermentação, bebida probiótica, análises físico-químicas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As estruturas químicas dos principais classes de compostos apresentam em folhas de chá e infusões.....	14
Figura 2: Película fresca recebida por doação	25
Figura 3: Recipiente de chá no momento da inoculação.....	26
Figura 4: Método utilizando a proveta invertida para a observação da produção de gás da bebida	30
Figura 5: Diminuição de pH durante 288h da fermentação	31
Figura 6: Aumento da acidez titulável durante as horas de fermentação	32
Figura 7: Teor de sólidos solúveis (°Brix) em função do tempo de fermentação	33
Figura 8: Curva padrão de glicose	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Planejamento de retirada das amostras durante as horas de fermentação	27
Tabela 2: Dados referentes ao preparo da curva analítica de glicose	28
Tabela 3: Concentração média de açúcares redutores nas amostras.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	10
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 O chá	11
3.2 História do chá	12
3.3 Composição química do chá.....	13
3.4 Propriedades e consumo do chá.....	14
3.5 Os probióticos	15
3.6 A Kombucha	16
3.7 História da Kombucha	17
3.8 Processo de produção de Kombucha	17
3.9 Característica microbiológica e química da Kombucha	18
3.10 Processos metabólicos envolvidos na produção de kombucha ..	19
3.11 Propriedades da Kombucha.....	20
3.12 Contaminação, cuidados e riscos	21
3.13 A Kombucha como um novo produto	22
3.14 Relação da Kombucha com o ph e acidez titulável.....	22
3.15 Relação da Kombucha com o teor de sólidos solúveis.....	23
3.16 Teor de açúcares redutores na kombucha	23
3.17 Kombucha e produção de gás	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Obtenção das culturas de kombucha e material para análise	25
4.2 Preparação da base de chá	25
4.3 Preparação de Kombucha: primeira fermentação.....	26
4.4 Medição do pH.....	27
4.5 Determinação da acidez titulável	27
4.6 Teor de sólidos solúveis	28
4.7 Açúcares redutores totais	28
4.7.1 Preparo da solução mãe e da curva padrão de glicose	28
4.7.2 Preparo da amostra	28
4.8 Segunda Fermentação.....	29

4.8.1	Preparação da Kombucha.....	29
4.8.2	Análise da produção de gás	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.3	Determinação de pH.....	31
5.4	Determinação da acidez titulável	32
5.5	Determinação do teor de sólidos solúveis	33
5.6	Determinação dos teores de açúcares redutores totais	34
5.7	Gaseificação da bebida	36
6	CONCLUSÃO.....	37
7	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, devido a preocupação maior da população em relação à saúde, tem levado a mesma, a optar pela procura de produtos mais naturais para consumo. Esse contexto faz com que os alimentos e bebidas probióticas ganhem extrema importância e um grande destaque aos olhos de quem opta por uma vida mais saudável (PALUDO, 2017). Consequentemente também surgem novas oportunidades de negócios que se baseiam na venda de bebidas funcionais (relacionadas como desintoxicantes ou promotoras do sistema imunológico, entre outras propriedades) e produtos alimentares com baixo valor calórico (SANTOS, 2016).

A kombucha é uma bebida existente há muitos anos, refrescante e levemente azeda, que consiste em chá fermentado. Desde o seu descobrimento que é conhecida pelas suas propriedades curativas, mas só nos últimos anos é que se observou uma explosão na sua popularidade, especialmente nos Estados Unidos, onde atualmente existe um mercado bem estabelecido deste produto. No Brasil o mercado da bebida ainda não é tão forte, mas a cada dia que passa há um aumento da população que produz esse probiótico para consumo próprio (SANTOS, 2016).

A preparação da bebida leva a utilizar substratos simples de baixo custo e facilmente disponíveis como açúcar, chá verde ou chá preto, a temperatura de fermentação está compreendida em média 15 ° C, tornando-o um produto facilmente obtido por baixos requisitos exigidos na fermentação (EDGO, 2011).

Para que se obtenha um resultado adequado da produção da Kombucha, é importante entender todos os parâmetros de fermentação da mesma. No Brasil, não existe uma regulamentação específica para a produção da bebida, sendo sua maior parte produzida de forma caseira e para o próprio consumo. Isso faz com que não exista uma análise de parâmetros de maneira precisa, assim tornando necessário, estudos que determinem sua composição garantindo uma produção de forma segura (SANTOS, 2017).

2 OBJETIVO

Produzir e acompanhar o processo de fermentação da bebida probiótica Kombucha visando observar a mudança dos parâmetros físico químicos pH, acidez, sólidos solúveis totais e teor de açúcares totais durante a fermentação.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar o processo de fermentação da Kombucha;
- Verificar a influência dos parâmetros: pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis e teor de açúcares redutores;
- Avaliar a eficiência da bebida na produção de gás.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O chá

O chá verde, o chá preto e oolong são originados das folhas da mesma planta, conhecida por *Camellia sinensis*. O chá preto é responsável por 75% do chá consumido no mundo e o chá verde, por apenas 22%. O chá que era consumido como medicamento, passou a ser do gosto popular devido as suas características organolépticas (SCHMITZ *et al.*, 2005).

Uma vez que muitas das características sensoriais dos chás fabricados são decorrentes das transformações oxidativas dos fenóis da folha, uma atenção especial tem sido dada a esse tema. Acreditava-se anteriormente que o processo era fermentativo e, por esse motivo, ainda é conhecido como “fermentação”, ao invés de oxidação (LIMA *et al.*, 2008).

O chá verde é preparado a partir das folhas jovens colhidas anteriormente ao seu completo desenvolvimento. As folhas ficam expostas a vapor d'água e depois a altas temperaturas para promover a inativação das enzimas e parar o processo de oxidação. Posteriormente são secas e enroladas ainda quentes para formar o chá verde (SILVA; OLIVEIRA; NAGEM, 2010).

O chá preto possui um sabor mais forte que os demais chás. As principais etapas para a sua preparação são a desidratação das folhas e caules frescos, mistura de ambos já secos, fermentação e secagem através de evaporação de toda a água presente nas folhas e caules. As folhas frescas, as gemas e a porção terminal do caule são secas após a coleta e então passadas em máquinas rotativas para a destruição tissular. Logo após, as folhas são colocadas em um ambiente frio para que ocorra a oxidação enzimática e assim são expostas a altas temperaturas em telas metálicas até que adquiram uma consistência dura e quebradiça (SILVA; OLIVEIRA; NAGEM, 2010).

O chá oolong, que é o chá vermelho, é submetido a um processo de fermentação intermediária entre o chá verde e o preto. A primeira etapa de preparação do chá oolong se baseia na eliminação das enzimas. Seguidamente, as folhas são misturadas e permanecem secando por um tempo determinado, para que finalmente, ocorram as etapas de oxidação, em

que o chá vermelho irá adquirir a sua coloração característica e a secagem final (SILVA; OLIVEIRA; NAGEM, 2010).

3.2 História do chá

Desde a pré-história, as plantas têm sido utilizadas com finalidade terapêutica. Milhares de produtos de origem vegetal no mundo todo são utilizados nas mais variadas formas: infusão, cataplasmas, macerado filtrado, tinturas, pomadas, xarope, cápsulas e na sua forma *in natura*. O chá é utilizado por infusão que é a forma mais popular dos diferentes produtos de origem vegetais. Os chás são ricos em compostos biologicamente ativos (flavonóides, catequinas, polifenóis, alcalóides, vitaminas, sais minerais) que contribuem para a prevenção e o tratamento de várias doenças (PEREIRA *et al.*, 2005).

O chá surgiu na China, durante o império de Sheng Nung em 2.375 a.C. Diz a lenda que deitado à sombra de um arbusto, o imperador adormeceu antes de beber uma taça de água fervida (o imperador mandava ferver toda a água que bebia com medo dos microorganismos). Uma leve brisa fez algumas folhas caírem na taça, com a água ainda quente, resultando em chá. (SCHMITZ *et al.*, 2005).

Uma das primeiras referências escritas sobre o chá foi no ano de 200 a.C., em que um livro chinês sobre plantas medicinais menciona os efeitos desintoxicantes das folhas do chá. Esse registro mostrou que nessa época já se estudava algumas propriedades medicinais dessa bebida. Já na era cristã, os chás e suas propriedades tornaram-se mais conhecidos. Nessa época, existiam inúmeras plantações no vale do Rio Yangtze, localizado na China, o que proporcionou o cultivo de uma grande variedade de chás, que iam desde os refinados, oferecidos aos imperadores, até os populares, consumidos por todos (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

O consumo do chá atualmente apresenta grande importância socioeconômica, sendo que cerca de três bilhões de toneladas são produzidas anualmente no mundo. Porém, a produção mundial do chá tem aumentado mais do que o consumo, o que vem provocando uma redução do seu preço. Especificamente no Brasil, o cultivo do chá se concentra no Vale do Ribeira,

em São Paulo (SP), sendo que quase toda produção é exportada (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

3.3 Composição química do chá

Um dos componentes químicos que estão presentes nos chás são os chamados compostos fenólicos, com a característica estrutural comum que é a presença de um anel aromático hidroxilado, tais compostos interagem com as proteínas formando complexos, com a possibilidade de inibir algumas enzimas (PEREIRA *et al.*, 2010). Na planta *Camellia sinensis* esses flavonóides constituem cerca de 10-25% de brotos e folhas jovens, são chamados de catequinas (flavan-3-ols), sendo classificadas nos subgrupos: catequina simples (C), epicatequina (EC), galatoepicatequina (ECG), epigalocatequina (EGC), galatoepigalocatequina (EGCG) e galocatequina-galato (GCG) (LIMA *et al.*, 2008).

O chá também contém cafeína, adenina, teobromina, teofilina, ácidos gálico, taninos, galotanino, pequenas quantidades de aminofilina e um óleo volátil, amarelo, que tem forte sabor e odor, sendo sólido a temperaturas normais. A atividade antioxidante depende do grau de polimerização, embora havendo um debate sobre este, da estrutura dos compostos de eliminação de radicais livres e dos os substituintes presentes nos anéis de flavonóides (JAYABALAN, 2008).

Os compostos derivados de flavan-3-óis, os conhecidos theaflavins e tearubiginas formam-se durante o processamento oxidativo, estão envolvidos na produção de oolong e chás pretos. O chá preto possui as tearubiginas como os seus principais compostos, porém não possui a estrutura química totalmente elucidada (PINTO, 2013). Tem-se na Figura 1 a ilustração dos principais grupos de compostos presentes em folhas de chá e infusões para além de flavan-3-óis.

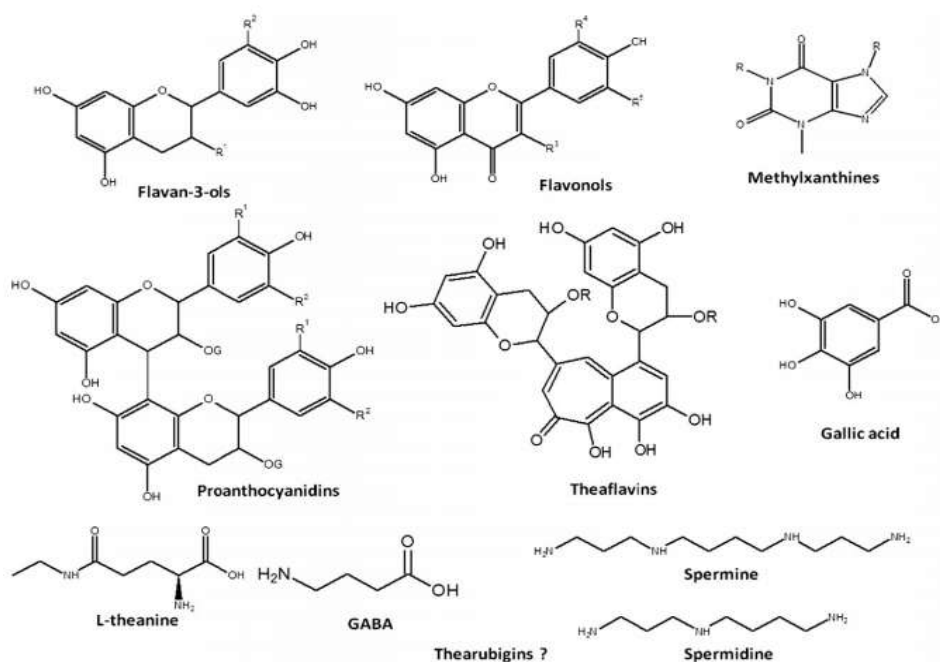


Figura 1: As estruturas químicas dos principais classes de compostos apresentam em folhas de chá e infusões

FONTE: PINTO, 2013

3.4 Propriedades e consumo do chá

A associação do consumo de chá ao benefício à saúde possui evidências que vem de estudos *in vitro*, epidemiológicos, e com animais, mesmo que nos últimos anos tenha ocorrido um aumento no número de estudos de intervenção humana. Porém, até esse momento, não há nenhuma evidência forte sobre o mecanismo exato de ação ou compostos responsáveis pelo bem relatado. Além disso, existem resultados inconsistentes vindos a partir de estudos como, por exemplo, a quantidade de chá e seu tipo, preparação e ingestão inadequada do chá o tipo e quantidade de chá consumida, diferenças culturais no hábito de beber chá (PINTO, 2013).

Maior parte dos benefícios do chá verde são atribuídos aos seus polifenóis, principalmente catequinas e derivados de catequina. As catequinas de chá verde têm sido relatadas como possuidoras de várias propriedades fisiológicas e farmacológicas (TSAI *et al.*, 2013). Ainda segundo TSAI (2013) e colaboradores, analisando os efeitos antioxidantes e antifibróticos do chá verde em um estudo de tetracloreto de carbono (CCl₄), induzida por stress oxidativo em fibrosis hepática em ratinhos ICR do sexo masculino, obtiveram resultados

satisfatórios em relação a capacidade antifibrótica e antioxidante deste tipo de chá.

Em um estudo, foram examinados os efeitos antifúngicos que as catequinas do chá puro combinadas com antimicóticos tem sobre a *Cândida Albicans*. Foram avaliados a susceptibilidade desse fungo para catequina, sob condições de pH variáveis e o sinergismo da combinação de catequina e antimicóticos. Os resultados mostraram que o EGCG (epigallocatequina galato) aumentou o efeito antifúngico de anfotericina B ou fluconazol. O tratamento combinado com catequina permite o uso de doses mais baixas de antimicóticos e induz vários efeitos antifúngicos. Acredita-se que isso possa ajudar a evitar os efeitos colaterais de antimicóticos (HIRASAWA e TAKADA, 2004).

A planta responsável pela obtenção do chá, normalmente cultivada para produção de bebidas, apresenta grande importância econômica. Dados gerados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, informam que a produção de chá mundo é de 3,2 milhões de toneladas por ano, e na Índia (27,4%), China (24,7%) e Sri Lanka (9,8%) são os principais produtores. Alguns extratos de chá são usados em doces, bebidas de chá engarrafado e produtos de panificação (YANG, BALDERMANN e WATANABE, 2013).

3.5 Os probióticos

Os probióticos são microorganismos vivos, presentes em alimentos como iogurtes, chás e gelados, que quando ingeridos em doses adequadas, trazem benefícios à nossa saúde. Estes alimentos destacam-se principalmente por melhorarem o bem-estar intestinal. Entretanto de acordo com os estudos científicos mais recentes, os seus efeitos benéficos estendem-se a muitos outros problemas de saúde (COOK, 2004).

A microbiota saudável é definida como a microbiota que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, principalmente do trato gastrointestinal. A terapia por probióticos fundamenta-se justamente na correção das propriedades da microbiota desbalanceada. Os benefícios dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como os efeitos antagônicos e a competição contra microrganismos indesejáveis e os efeitos imunológicos (SAAD, 2006).

Diversos microorganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras (SAAD.et al, 2002). É importante que os probióticos se mantenham viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal, possuir propriedades anticarcinogênicas e anti-mutagênicas, assim como resistir a fagos e ao oxigênio não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos (COPOLLA e TURNES, 2004).

Há possíveis mecanismos de ação dos probióticos, apesar de não terem sido completamente elucidados (COPOLLA e TURNES, 2004). Os modos de ação dos probióticos baseiam-se nos mesmos utilizados para a microbiota intestinal no desenvolvimento de suas funções, dentre eles, exclusão competitiva, no qual o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação (BUSANELLO *et al.*, 2012).

Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas, proteínas metabolicamente ativas que auxiliam na destruição de microorganismos indesejáveis inibindo proliferação bacteriana e o dano ao epitélio intestinal (MORAIS; JACOB, 2006). Alguns *Lactobacillus* podem estimular secreção de mucina pelas células intestinais espessando a barreira intestinal local contribuindo assim, para uma diminuição de processos alérgicos e cancerígenos, que podem ocorrer quando há o contato de macromoléculas no sangue(MACK *et al.*, 2003). Outros podem ser capazes de promover lise de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, minimizando o risco de alergia alimentar (MORAIS e JACOB, 2006).

3.6A Kombucha

A Kombucha é uma bebida popular, feita a partir do chá fermentado, possui propriedades medicinais e é promotora da saúde. A cultura da Kombucha tem o aspecto de uma panqueca. Trata-se um biofilme resultado de uma simbiose complexa entre bactérias e leveduras e outros micro-organismos (MOREIRA *et al.*, 2013). A cultura é colocada no chá preto ou chá verde adoçado. O caldo contém uma quantidade de chá Kombucha previamente fermentado. Assim, a comunidade microbiana da Kombucha pode ser dividida

em duas partes; a primeira o biofilme celulósico e a segunda um líquido subjacente (CHAKRAVORTY, 2016).

A fermentação ocorrida é estática e seu tempo é de 7 a 12 dias à temperatura ambiente. A bebida tem como metabolitos principais os ácidos acético, láctico, glucônico e ácidos glucorônico e o etanol e álcoois de glicerol. O ácido acético é dominante na bebida pois, é capaz de estimular a produção de etanol pela levedura e, por sua vez, etanol estimulou a produção de ácido acético (KALLEL *et al.*, 2012)

Várias reações bioquímicas significativas acontecem durante a fermentação aeróbia, ocorrida na produção de bebidas Kombucha. A qualidade da bebida obtida pode ser determinada através da escolha adequada de parâmetros de fermentação permite obter um produto de alta qualidade reprodutível restante em um nível estável, que também é rica em componentes saudáveis (SKOCIŃSKA *et al.*, 2017)

3.7 História da Kombucha

O uso de Kombucha para consumo como uma bebida fermentada iniciou-se em 220 a.C em Manchúria (ČETOJEVIĆ-SIMIN *et al.*, 2012). Durante a dinastia Tsin, o chá foi procurado por apresentar propriedades mágicas ainda supostas. Depois a Kombucha viajou para a Rússia e Europa Oriental através de rotas comerciais. O chá tornou-se muito popular na Rússia e foi consumido como um tratamento para doenças metabólicas e reumatismo (GREENWALT *et al.*, 2000).

A maior parte de informações e literatura sobre o chá vem de médicos russos citando seus usos medicinais. Uma observação foi que após a Segunda Guerra Mundial, as regiões da Rússia em que se bebiam Kombucha, tinham as taxas de câncer notadamente menores do que as outras regiões, apesar das toxinas industriais presentes desde a guerra (GREENWALT *et al.*, 2000).

3.8 Processo de produção de Kombucha

Os recipientes a serem utilizados devem ser esterilizados para que durante a preparação de Kombucha, não haja a contaminação por micro-organismos patogênicos. Por se tratar de um chá (infusão feita com a planta do

chá, *Camellia Sinensis*), podem ser usados, chá preto, branco, verde, entre outros (GREENWALT *et al.*, 2000).

A infusão a ser preparada pode ser forte ou fraca. O açúcar adicionado para adoçar o chá deve ser derivado da cana ou da beterraba e pode ser em quantidade a gosto de quem prepara. Logo após o chá estar adoçado, espera-se o seu resfriamento para que então ele possa ser colocado em um recipiente de vidro ou cerâmica para a fermentação. Deve-se adicionar uma quantidade de Kombucha madura ao chá, sendo aproximadamente 5 a 10% do volume do chá. O interessante de se usar um pouco de kombucha madura é a acidificação do meio. Um meio ácido é seletivo e favorável aos micro-organismos da Kombucha, e além disso serve como empecilho a possíveis contaminantes ao meio (KATZ, 2014).

Com todos os ingredientes no recipiente de fermentação, finalmente o cultivo mãe poderá ser adicionado, que é a película contendo a cultura simbiótica de bactérias e leveduras, também conhecida como scoby. Uma cultura considerada viável é aquela em que após dias de fermentação da origem a uma película “filha”. É importante cobrir o recipiente de fermentação com um pano poroso para proteger a cultura de mosquitos e permitir a circulação de oxigênio (KATZ, 2014).

Todo o procedimento descrito acima corresponde a primeira fermentação. Para cumprir o objetivo de produzir a Kombucha, bebida probiótica gaseificada, é necessário realizar a segunda fermentação. Consiste em separar o chá da mãe e facultativamente acrescentar os extratos desejados, que podem ser especiarias, frutas ou até mesmo outros vegetais. Feito isso inicia-se a carbonatação. A bebida é envasada e hermeticamente fechada. Isso faz o gás carbônico, que antes ia para a atmosfera, ficar retido no recipiente hermeticamente fechado e passa a se diluir no líquido. É esse processo que transforma a bebida gaseificada naturalmente. O gás é produzido pelos próprios microrganismos (COMPANHIA DOS FERMENTADOS, 2018).

3.9 Característica microbiológica e química da Kombucha

A composição microbiológica da Kombucha pode variar de acordo com a origem dos seus inóculos. Entretanto alguns microrganismos são comumente

encontrados nessa bebida. É muito comum a presença de *Acetobacter xylinum*, que é um bactéria responsável pela produção da rede celulósica que flutua à superfície, *A. pasteurianus*, *A. aceti* e *Gluconobacter oxydans* (CARVALHO,2016).

Além das bactérias foram encontradas leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula* e *Mycoderma* (JAYABALAN *et al.*, 2014).

A “kombucha mãe” é constituída em sua maior parte por proteína e fibra. É rica em aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo a lisina o aminoácido mais abundante em sua composição (JAYABALAN *et al.*, 2010).

Em sua análise química, a kombucha pode apresentar vários tipos de ácidos orgânicos tais como, acético, láctico, glucônico, glucurônico, cítrico, málico, malônico, pirúvico. Contêm minerais e vitaminas do complexo B e C; glicerol, etanol, aminas, aminoácidos, lipídeos, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas, dióxido de carbono e polifenóis do chá. Também possuem açúcares, nomeadamente sacarose, glucose e frutose (CARVALHO, 2016; DUSFRENE, 2000).

3.10 Processos metabólicos envolvidos na produção de Kombucha

Em condições aeróbicas, a simbiose da kombucha é capaz de converter um substrato simples normalmente o chá verde ou preto adoçado com sacarose, ao longo de um período de 7-10 dias, numa bebida gaseificada, probiótica e ligeiramente ácida (VITAS *et al.*, 2013).

O modo como os microrganismos presentes em kombucha utilizam os substratos é diferente, porém complementar. As bactérias acéticas utilizam a glicose para a produção de ácido glucônico, e o etanol para a síntese de ácido acético. Já as leveduras hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, por ação de enzimas invertases, e também produzem etanol por fermentação alcoólica (JAYABALAN *et al.*, 2014).

3.11 Propriedades da Kombucha

Com a possibilidade de utilizar outras espécies da planta como material na fermentação de Kombucha, foi realizado um estudo onde foi investigada a ação anti-cândida e antibacteriana dos análogos de Kombucha. A conclusão foi que todos os microrganismos testados foram sensíveis à atividade antimicrobiana das infusões fermentadas (BATTIKH *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana de Kombucha foi analisada contra diversos patógenos, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori* e *Listeria monocytogenes*. Todos eles foram considerados sensíveis a Kombucha (SREERAMULU. G; ZHU. Y e KNOL. W, 2000).

Os antioxidantes são moléculas que podem atuar em concentrações muito baixas, antes ou durante uma reação em cadeia de radicais livres podendo ser na fase de iniciação, propagação rescisão, subsequentes de decomposição ou oxidação produtos (JIMÈNES, 2015). Em um estudo onde foi analisada a atividade antioxidante de Kombucha fazendo uso de uma folha como substrato contendo fenol, foram obtidos ótimos resultados. Obtiveram uma atividade antioxidante de 88,24% até 92,97% até o dia 8 da fermentação e diminuição da atividade antioxidante do dia 8 a dia 14 (SUHARDINI E ZUBAIDAH, 2016).

Em uma pesquisa que avaliava a atividade antioxidante da Kombucha utilizando o substrato da folha do café, também foi observada uma atividade antioxidante ótima à fermentação no oitavo dia (89,51%) e a diminuição da atividade antioxidante sobre a fermentação no décimo segundo dia (53,43%) (NURIKASARI *et al.*, 2014).

Em suas investigações, VITAS *et al.*, (2013) concluíram que as bebidas de leite fermentado podem ser produzidas com sucesso através da aplicação de arranque Kombucha. Foi observado que a aplicação de diferentes entradas de Kombucha causou um desenvolvimento de diferentes atividades antioxidantes.

Em um estudo ficou demonstrado que as atividades antilipídêmicas e hipoglicêmicas exibidas por Kombucha foram eficazes para aliviar a indução de alxina na diabetes em ratos utilizados no experimento. O efeito benéfico de kombucha é relacionado às suas propriedades hipoglicemiantes e antilipídêmicas potentes, assim como potencial antioxidante (ALOULOU *et al.*, 2012).

O chá fermentado Kombucha, em um estudo mostrou-se eficiente para modular a apoptose induzida por stress oxidativo em hepatócitos de murino. Isso pode ter ocorrido devido à sua atividade antioxidante e por funcionar através de vias dependentes de mitocôndria, podendo assim, ser benéfico contra doenças do fígado (BHATTACHARYA *et al.*, 2011).

3.12 Contaminação, cuidados e riscos

A Kombucha está associada a diversos benefícios a saúde, como a ação contra doenças no metabolismo, artrite, prisão de ventre, e hipertensão. Entretanto, ainda não existem provas sólidas da sua eficácia, com isso torna-se necessário estudos que determinem sua composição, garantindo a produção e comercialização de forma segura. Apesar disto, ela se torna cada vez mais popular em decorrência a sua fama como bebida promotora de saúde (CARVALHO, 2016).

É importante observar a Kombucha para detectar alguma possível contaminação. O mais preocupante são as espécies de *Aspergillus* que podem ser encontradas. Diferentemente das espécies de *Aspergillus* que participam na produção de cerveja, molho de soja e outros fermentados, existem algumas que liberam toxinas. Isso pode ser prejudicial, uma vez que são cancerígenas. Por isso evitar a contaminação por bolores, acidificando cada lote com kombucha madura. No caso de desenvolvimento de bolores o correto a se fazer é descartar o lote juntamente com a cultura (KATZ, 2014).

Foi feito um estudo com o objetivo de obter uma nova simbiose concebida a partir das leveduras isoladas e estirpes bacterianas para a produção de um alto nível de ácido glucurônico na kombucha e evitar contaminantes microbianos inesperados. Porém, devido à elevada acidez durante a longa fermentação, pessoas com problemas de gastropatia pode

obter susceptibilidade ao beber Kombucha. Assim, é importante reduzir a acidez, para que não afete essas pessoas.

3.13 A Kombucha como um novo produto

Um estudo recente apresentou um potencial nutricional e tecnológico da Kombucha como uma cultura de partida inovadora na indústria de laticínios. Podem ser produzidos produtos semelhantes ao kefir e iogurte a partir da fermentação de leite por inóculos kombucha (HRNJEZ *et al.*, 2014).

Um experimento fazendo a administração de Kombucha fracionada com acetato de etilo, em ratos velhos. O uso do KEAf (kombucha fracionado com acetato de etilo) aumentou significativamente o teor de colágeno, e proporcionou melhoras da pele em anormalidades dos tecidos conjuntivos na pele envelhecida. Além de não ter apresentado qualquer sensibilidade ou irritação. Assim sugeriu-se que KEAf pode ser um candidato a ser um produto cosmético para melhorar anormalidades na pele relacionadas com o envelhecimento e regeneração da pele envelhecida (PAKRAVAN *et al.*, 2017).

CARVALHO (2016), em seu trabalho desenvolveu vinagres a partir de diferentes chás com sacarose utilizando a scoby na fermentação, com o intuito de se obter um produto inovador e tradicional. Pela análise sensorial efetuada ficou concluído que os vinagres obtidos a partir da base de chá com ambos os tipos de inóculo apresentaram características sensoriais agradáveis aos consumidores, que declararam a intenção de compra, podendo por isso considerar-se produtos com potencial de comercialização futura.

3.14 Relação da Kombucha com o pH e acidez titulável

A medição do pH é o fator que controla o curso apropriado de fermentação e é usado para determinar o final do processo. Além disso, a concentração de ions de hidrogénio é um fator que pode ativar ou inibir o desenvolvimento de cada uma das espécies de microorganismos em produtos alimentares (PALUDO, 2017).

Durante o processo fermentativo a Kombucha tende a sofrer uma diminuição em seu pH consequentemente significando o aumento da sua acidez. Por isso ela se caracteriza como uma bebida levemente azeda. É

interessante observar que o aumento da acidez na Kombucha tem relação com a grande quantidade de ácidos orgânicos gerados. As leveduras fermentam o açúcar, que é então oxidado pelas bactérias de ácido acético para produzir o ácido acético (TEOH, 2014). Há diversos estudos de quantificação de ácidos produzidos, entre eles PALUDO (2017) que quantificou o ácido acético 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.

De acordo com GUTTAPADU (2000) o pH ideal da bebida é de 3,5 a 4,5. SKOCIŃSKA *et al.*, (2017) analisando o processo de fermentação observou que o pH em todas as bebidas Kombucha diminuiu de 3 para 2,60 unidades em média. O pH baixo pode fazer com que a bebida não seja agradável ao paladar. Por isso é necessário se atentar para que o pH não chegue a tão baixo. NURIKASARI *et al.*, (2017) obteve um resultado satisfatório na análise da sua bebida, observou que o pH no primeiro dia de fermentação (pH 5,93) diminuíram gradualmente no terceiro dia de fermentação (pH 5,31), 5 dias (pH 5,12), dia 9 (pH 4,06) e dia 11 (pH 3,65).

3.15 Relação da Kombucha com o teor de sólidos solúveis

O teor de °Brix se refere à porcentagem de sólidos solúveis (açúcares e sais) contidos em uma solução de açúcares e sais. Pode ser determinado via densimetria ou refratometria (CTC, 2011). Por se tratar de uma fermentação de Kombucha, na qual as leveduras hidrolisam a sacarose (açúcar), a tendência é que com o decorrer do processo haja uma diminuição no teor de sólidos solúveis (SANTOS, 2016).

Em um estudo da produção da bebida a partir de chá de hibisco, obteve um teor de sólidos solúveis final de 8,10 °Brix (RODRIGUES *et al.*, 2018). Em uma avaliação de um processo de fermentação acética de Kombucha em substrato de glicose e frutose o teor inicial era 20,5 °Brix e final era de 9,1 °Brix (PEDRAZA, 2014).

3.16 Teor de açúcares redutores na kombucha

O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um

composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (DEOTI, 2013).

A sacarose é um dos açúcares mais frequentemente adicionados na produção de Kombucha (JAYABALAN *et al.*, 2014). Uma vez que a sacarose se caracteriza por ser um açúcar não redutor, deve-se fazer a hidrólise ácida nas amostras de Kombucha para então conseguir determinar o teor de glicose e frutose que se caracterizam como açúcares redutores (BARROS, 2005).

Com a progressão da fermentação é esperado que haja uma redução do teor de açúcar que pode ser atribuído à hidrólise da sacarose em glicose e frutose. A levedura utiliza o açúcar anaerobicamente para produzir etanol (CHAKRAVORTY, 2016). Sendo que algumas delas, como as do género *Saccharomyces* tem preferência por glicose, ao passo que determinadas leveduras do género *Zygosaccharomyces* tem preferência por frutose como substrato (SILVA, 2016).

3.17 Kombucha e produção de gás

A carbonatação é a liberação do dióxido de carbono aprisionado. As bebidas fermentadas em recipientes abertos podem ser efervescentes, mas se o objetivo é obter uma bebida carbonatada deve-se esperar a fase em que a fermentação esteja progredindo ativamente e assim transferi-la para garrafas capazes de conter alguma pressão. A garrafa deve ser bem fechada e a fermentação deverá ser por pouco tempo (KATZ, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das culturas de kombucha e material para análise

As culturas de Kombucha (Figura 2) foram fornecidas por doação. As culturas em simbiose apresentavam-se na forma de uma película fresca imersa em Kombucha já fermentada. A mãe de Kombucha havia sido cultivada em chá verde e foi transportada e armazenada à temperatura ambiente.

Parte do material utilizado para as análises, como, pHmetro, soluções, béqueres, bureta estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio, aquecedor e espectrofotômetro foi utilizado do laboratório biotecnológico da UFSJ-Campus Alto Paraopeba, localizado na cidade de Ouro Branco. A outra parte do material como reagentes, refratômetro e tubos falcon, foi fornecido pelo professor orientador do presente trabalho.



Figura 2: Película fresca recebida por doação

FONTE: O AUTOR, 2018

4.2 Preparação da base de chá

A base de chá para a Kombucha foi preparada com água fervida e filtrada, na qual foram adicionadas 2 saquetas de chá para cada 1000 mL de

água, sendo usados 2 litros. O chá foi deixado em infusão durante 10 minutos.. Após seu resfriamento foi adicionado açúcar branco granulado (200 gramas) numa concentração de 10 % (m/v). Após a dissolução do açúcar, verteu-se em um recipiente de vidro estéril onde ocorreria a fermentação.

4.3 Preparação de Kombucha: primeira fermentação

Com o chá já vertido em um recipiente procedeu-se à inoculação do chá com a scoby de aproximadamente 15 cm recebida pela doação e uma porção de Kombucha já fermentada (1/4 do litro de chá fermentado). O recipiente foi fixado com uma gaze estéril para assegurar condições aeróbicas para a fermentação (figura 3).



Figura 3: Recipiente de chá no momento da inoculação

FONTE: O AUTOR, 2018

A fermentação foi realizada. Em todos os dias da fermentação eram anotados os valores da temperatura durante o dia e a noite. A cada 72 horas da fermentação foi retirado um pequeno volume em duplicata do fermentado para realizar as análises dos parâmetros de pH, acidez, teor de sólidos solúveis e açúcares redutores totais. Para entender melhor essa etapa do experimento tem-se a tabela 1:

Tabela 1: Planejamento de retirada das amostras durante as horas de fermentação

Tempo (h)	Duplicata		Temperatura (°C)	
	Amostra retirada	Amostra retirada	Dia	Noite
0	1	1.1	24	15
24			24	16
48			24	20
72			26	20
96	2	2.2	25	18
120			24	19
144			25	20
168			26	20
192	3	3.3	24	19
216			23	16
240			25	19
264			15	11
288	5	5.5	6	8

FONTE: O AUTOR, 2018

4.4 Medição do pH

O pH das amostras foi medido utilizando-se um medidor de pH da marca Digimed modelo DM-22, previamente calibrado.

4.5 Determinação da acidez titulável

A acidez titulável foi feita seguindo o protocolo do MAPA (2012), código: MET LABV/05/03/01 para a determinação de acidez total em bebidas não alcoólicas por titulometria. A titulação foi realizada contra solução padrão de NaOH 0,1M com auxílio de um agitador magnético. O cálculo da acidez total das amostras é expresso em mEq/L e calculado pela seguinte fórmula :

$$AT \left(\frac{mEq}{L} \right) = \frac{1000 \times n \times N_{NaOH}}{v}$$

Onde: n = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL)

N = Molaridade da solução de NaOH (0,1 mol/L)

v = Volume da amostra (mL)

4.6 Teor de sólidos solúveis

O instrumento utilizado foi um refratômetro já calibrado, que consiste em um instrumento de determinação de teor de sólidos solúveis em escala de °Brix. Inicialmente uma parte da amostra foi filtrada. Uma gota desse filtrado foi depositada no prisma do refratômetro e sua tampa foi fechada. Apontando-se a extremidade frontal do instrumento para a direção da luz branca, e com o anel de ajuste o foco, pode ser visto a escala nitidamente.

4.7 Açúcares redutores totais

4.7.1 Preparo da solução mãe e da curva padrão de glicose

A solução padrão de glicose foi preparada na concentração de 1mgmL^{-1} . Foram preparados cinco ensaios com concentrações descritas na Tabela 2 e o branco.

Tabela 2: Dados referentes ao preparo da curva analítica de glicose

Tubo	Solução de glicose (mL)	Água destilada (mL)	Solução de DNS (mL)	Concentração final(mg.mL^{-1})
1	0,04	0,16	0,2	0,2
2	0,08	0,12		0,4
3	0,12	0,08		0,6
4	0,16	0,04		0,8
5	0,2	0		1
Branco	0	0,2		0

FONTE: O AUTOR, 2018

Após adição da solução de glicose e água, os tubos de ensaio foram levados ao banho-maria durante 5 minutos e a temperatura de 100°C . Em seguida os tubos foram resfriados em água a temperatura ambiente e as absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de $\lambda=520\text{nm}$.

4.7.2 Preparo da amostra

Por se tratar de uma amostra que contém sacarose, foi necessário primeiramente realizar a hidrólise ácida com a finalidade de converter a sacarose que é um açúcar não redutor em glicose e frutose que são açúcares

redutores. Para a hidrólise ocorrer foram adicionados em cinco erlenmeyers 5mL de cada amostra e 0,25 mL de HCl, foram levados a fervura por 20 minutos em banho-maria. Após o resfriamento a solução foi completada com 20 mL de água. Utilizando a amostra diluída e passada pelo procedimento de hidrólise ácida foi retirados de cada um dos 5 erlenmeyers 0,2 mL em duplicata, e foi adicionado 0,2 mL do reagente DNS. Então foram levados ao banho-maria juntamente com os tubos da curva analítica, em seguida também foram resfriadas em água fria e elevado seu volume com água destilada a 1,6 mL.

4.8 Segunda Fermentação

4.8.1 Preparação da Kombucha

Após decorrido o tempo da primeira fermentação em que as amostras foram retiradas para a análises físico-químicas descritas acima, foi iniciada a segunda fermentação. Esta consistiu em deixar o líquido fermentar sem a presença da *scooby*, deixando-o no mesmo recipiente hermeticamente fechado, para que houvesse a formação de gás.

4.8.2 Análise da produção de gás

Para verificar a eficiência que a bebida tem de se gaseificar foi utilizado o método da proveta invertida. Consistiu em utilizar uma proveta invertida para observar o gás sendo produzido. Para isso um béquer de 600 mL foi preenchido com água até um pouco mais que $\frac{2}{3}$ de seu volume (aproximadamente 500 mL). Utilizando uma proveta de 25 mL encheu-a quase completamente com água. Um pedaço de papel foi colocado tapando a boca da proveta, inverteu-a e mergulhou-a na água do béquer. Retirou-se o papel e verificou que a parte sem água na proveta atingia 6,5 mL. A seguir fixou-se a proveta no béquer com uma fita adesiva. Introduziu-se uma mangueira de borracha, no interior da proveta invertida. A outra extremidade da mangueira foi conectada ao reator onde ocorria a fermentação da bebida. Para que assim a medida que houvesse a produção de gás, o volume de água da proveta abaixasse, pois as moléculas de gás irão expulsar a água da mesma.

Finalmente, o sistema foi montado para que se pudesse observar se há a produção de gás pela bebida. O experimento foi semelhante a figura 4:

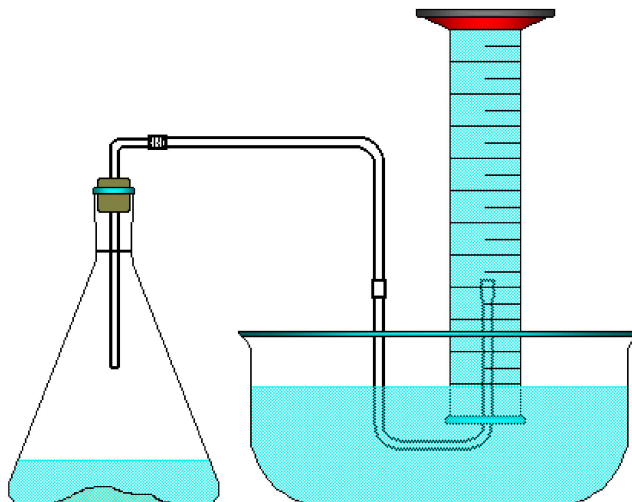


Figura 4: Método utilizando a proveta invertida para a observação da produção de gás da bebida

FONTE: objetoseducacionais2.mec.gov

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3 Determinação de pH

Os valores médios de pH das amostras estão representados na figura 5.

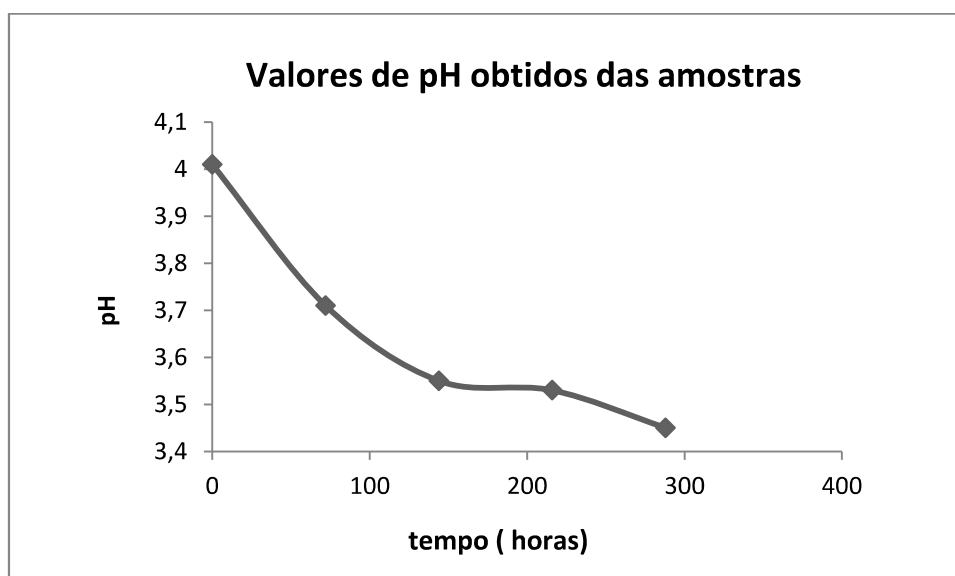


Figura 5: Diminuição de pH durante 288h da fermentação

FONTE: O AUTOR, 2018

Por meio da figura, é possível observar que com o decorrer dos dias de fermentação houve um decaimento do pH. O pH no tempo 0 de fermentação foi de 4,01, chegando a 3,42 ao final da fermentação. É comum ocorrer a diminuição de pH no decorrer da fermentação. Isso se deu porque durante o processo de fermentação, as bactérias e leveduras metabolizam a sacarose em um número de ácidos orgânicos tais como o ácido glucorônico e ácido acético JAYABALAN R *et al.*, (2007). Quanto maior o tempo de fermentação, mais haverá uma diminuição do pH da Kombucha, isso faz com que ela apresente um gosto mais ácido (NURIKASARI. M; PUSPITASARI. Y; SIWI. R.P.Y., 2017).

NURIKASARI *et al.*, (2017) com a sua Kombucha obteve no primeiro dia de fermentação (pH 5,93) diminuiu gradualmente no terceiro dia de fermentação (pH 5,31), 5 dias (pH 5,12), 9 dias (pH 4,06) e 11 dias (pH 3,65). JAYABALAN *et al.*, 2008, analisando os parâmetros da produção de Kombucha

observou a redução do pH de 5,0 para 3,0 dentro de 3 dias de fermentação e, em seguida, continuou a diminuir ligeiramente até 18 dias. Na produção de Kombucha do trabalho de LONCAR (2006) os pH's obtidos também mostraram uma diminuição. EGDO (2011), em sua investigação utilizando quatro tipos de tratamento que variavam dois fatores, tipo de substrato e concentração de chá, percebeu que em 280,25 horas de fermentação do melhor tratamento obteve um pH final de 3,03.

O pH baixo pode contribuir para uma diminuição da qualidade sensorial geral da bebida a um nível inaceitável em decorrência da produção de ácidos orgânicos, principalmente do ácido acético (PALUDO, 2017). Isso permite concluir que os valores de pH representados na tabela 3 são satisfatórios no sentido de garantir uma boa qualidade da bebida. Se os valores de pH forem mais baixos a bebida se torna muito ácida e com o gosto desagradável.

5.4 Determinação da acidez titulável

Os valores da acidez titulável das amostras estão representados na figura 6:

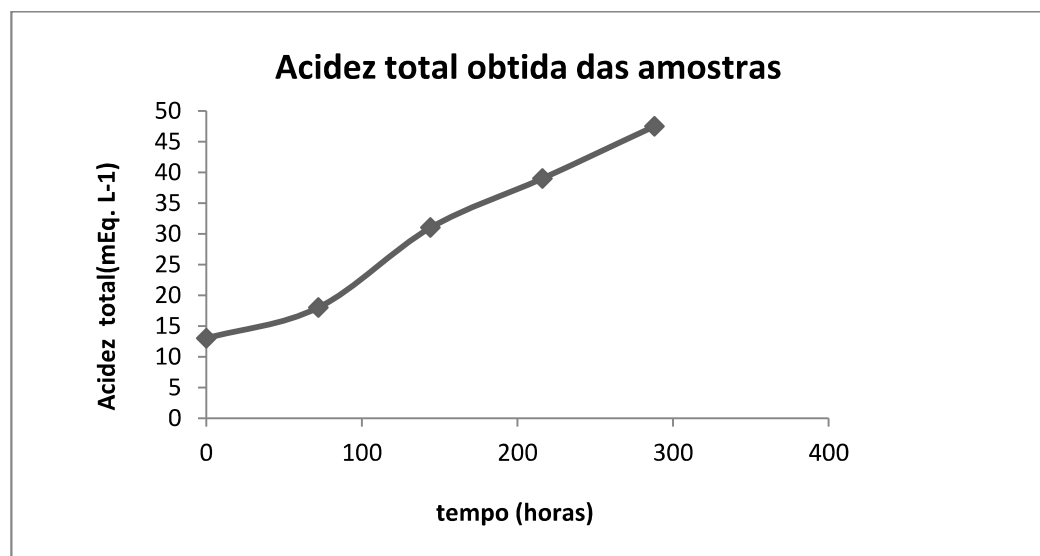


Figura 6: Aumento da acidez titulável durante as horas de fermentação

FONTE: O AUTOR, 2018

Observando a figura 6 pode-se constatar que com o decorrer do tempo de fermentação a acidez titulável aumenta, pois a quantidade de NaOH em mL gastos por 10 mL de amostra aumenta. O que já era esperado uma vez que os valores de pH representados na figura 5 mostraram uma diminuição com o passar dos dias de fermentação.

A mesma explicação para a diminuição de pH serve para o aumento da acidez. A acidez aumenta devido a produção de ácidos orgânicos. Ao longo de sua fermentação. A bebida vai ficando com o sabor mais ácido, originado do ácido acético produzido, diminuindo sua aceitação sensorial (PALUDO, 2017).

5.5 Determinação dos teores de sólidos solúveis

Os teores de sólidos solúveis totais (°Brix) durante o tempo de fermentação são apresentados na figura 7.

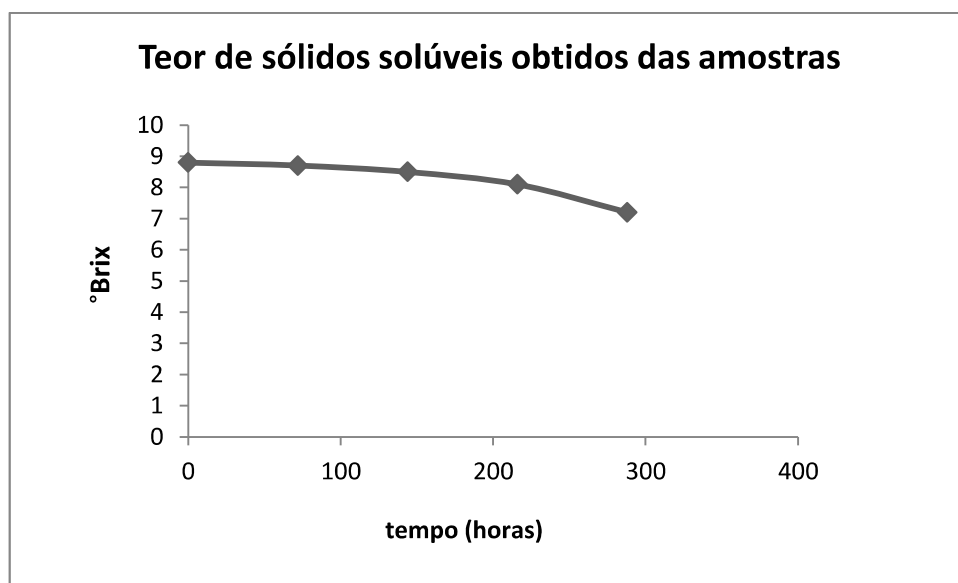


Figura 7: Teor de sólidos solúveis (°Brix) em função do tempo de fermentação

FONTE: O AUTOR, 2018

Ao analisar todas as amostras referentes aos dias da fermentação foi observado que durante esse tempo houve uma diminuição gradativa no teor de sólidos solúveis no chá contendo açúcar como substrato. Nas amostras referentes a 0, 72, 144, 216 e 288 horas de fermentação apresentaram respectivamente 8,75; 8,65; 8,4; 8,15; 6,15 °Brix em média. Houve um decrescimento significativo a partir das 216 horas. Como se trata de uma fermentação de Kombucha, com o decorrer das horas a tendência é se formar

uma nova película simbiótica, que necessita de mais nutrientes para crescer, pode ser por isso a redução significativa de teor de sólidos ao final do processo.

EGDO (2011), em seu experimento de elaboração da bebida refrescante Kombucha, visando a melhoria de qualidade de vida dos consumidores de bebidas não alcoólicas, quando usou o açúcar como substrato, constatou que em 209 horas de fermentação a média obtida foi de 11,13 °Brix de sólidos solúveis. Do primeiro dia de fermentação ao último a diminuição era de 12°Brix que foi diminuindo lentamente. Isso mostra a tendência que o teor de sólidos solúveis tem de diminuir com o aumento das horas de fermentação. No presente também ocorreu o decréscimo de °Brix com a progressão do processo.

5.6 Determinação dos teores de açúcares redutores totais

Na figura 8 é representada a curva analítica de glicose usada para o cálculo dos teores de açúcares redutores totais.

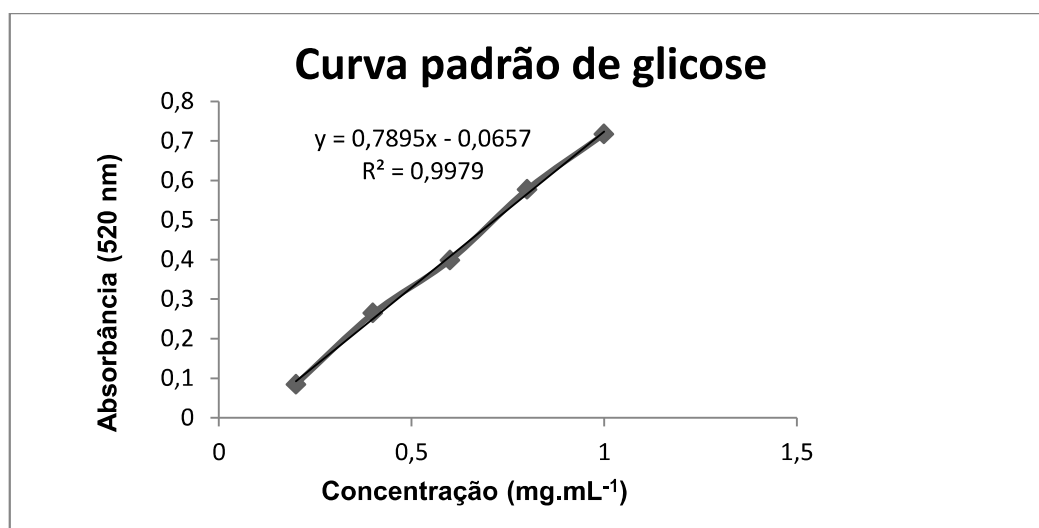


Figura 8: Curva padrão de glicose

FONTE: O AUTOR, 2018

Para a determinação das concentrações de açúcares redutores foi utilizada a seguinte equação:

$$y = 0,7895x - 0,0657 \quad \text{equação 1}$$

onde:

x: é o valor da concentração em mg.mL^{-1} ;

y: é o valor da absorbância;

Substituindo os valores das absorbâncias na equação, foi feito o cálculo da concentração de açúcares redutores totais. Na Tabela 3 estão os valores dos teores de açúcares redutores totais ao longo do tempo de fermentação.

Tabela 3: Concentração média de açúcares redutores nas amostras

Amostra	Tempo de fermentação (hrs)	Concentração (mg.mL^{-1})
1	0	$8,3 \pm 0,7$
2	72	$7,3 \pm 1,0$
3	144	$5,4 \pm 0,5$
4	216	$5,2 \pm 0,6$
5	288	$5,0 \pm 0,5$

FONTE: O AUTOR, 2018

A concentração média de açúcares redutores durante a fermentação de Kombucha foi diminuindo gradativamente durante a fermentação. No primeiro dia a concentração foi de $8,3 \pm 0,7 \text{mg.mL}^{-1}$ e no último foi de $5,0 \pm 0,5 \text{mg.mL}^{-1}$. Como foi feita a hidrólise ácida que converteu a sacarose do meio em glicose e frutose, observar que houve uma diminuição dos mesmos pelo método de DNS, significa dizer que o teor de sacarose diminuiu com o passar dos dias, o que já era esperado com base em dados da literatura. O consumo de açúcar nos 7 primeiros dias de fermentação (3 primeiras amostras) foi maior. Isso se deu pelo fato de haver uma população grande de micro-organismos necessitando de nutrientes para a fermentação.

A enzima invertase, presente em alguns micro-organismos da Kombucha, converte sacarose em glicose e frutose e ambas em etanol, ácido acético, e um grande número de outros compostos (MALBAŠA, 2008). O nível de açúcar consumido reflete a fase de crescimento do micro-organismo, a

cultura simbiótica utiliza desse açúcar para crescer. Quanto maior a população, mais sacarose é consumida (NGUYEN *et al.*, 2015).

Pela quantidade de sacarose adicionada na Kombucha inicialmente na fermentação (200g), a concentração de $8,3 \pm 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ de açúcares redutores encontrada no tempo 0 hrs de fermentação, parece relativamente pequena. A explicação para isso se dá pelo fato de durante o período de recebimento da scoby até o momento de inoculação, ela possa ter passado por escassez de nutrientes, então no momento da inoculação, como uma grande quantidade de microorganismos estavam precisando de substrato, pode ser que tenham absorvido uma quantidade de açúcar considerável de uma só vez.

5.7 Gaseificação da bebida

Inicialmente a região da proveta sem água ocupava a marca de 6,5.mL, durante as 96 horas foram anotadas na tabela abaixo volume ocupado pelo gás na proveta.

Tabela 4: Volume ocupado pelo gás produzido pela Kombucha com a progressão das horas da segunda fermentação

Tempo (hrs)	Região da proveta não ocupada por água (mL)
0	6,5
24	9
48	12
72	15,5
96	21

FONTE: O AUTOR, 2018

Foi possível notar a gaseificação da bebida, uma vez que o volume de gás na proveta que inicialmente se encontrava na marca dos 6,5 mL, após 24 horas se encontrava na marca dos 9,0 mL; após 48 horas na marca dos 12 mL; após 72 horas na marca de 15,5 mL; e finalmente atingiu a marca de 21 mL às 96 horas da segunda fermentação consequentemente abaixando o nível da água indicando produção do gás durante o processo de fermentação.

6 CONCLUSÃO

A bebida probiótica Kombucha tende a conquistar seu espaço no mercado futuramente. No entanto, a maior parte da sua produção no Brasil é para consumo próprio. Por isso foi interessante e enriquecedor produzir e acompanhar o seu processo fermentativo para mostrar a influência de alguns parâmetros na obtenção de um resultado final satisfatório.

A produção da Kombucha artesanal em um meio contendo sacarose e chá verde, resultou em uma bebida com características físico-químicas compatíveis a mesma quando produzida em outros estudos. Os parâmetros de pH, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis e teor açúcares redutores, se comportaram de forma similar aos apresentados em outros trabalhos encontrados na literatura. Através do método da proveta invertida, foi possível comprovar a gaseificação da bebida na segunda fermentação.

7 REFERÊNCIAS

ALOULOU, A. et al. *Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. BMC Complementary and Alternative Medicine*.v.12,n. 63, 2012.

Banco internacional de objetos educacionais. Disponível em:< <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/10264> > Acesso em: 14 de maio, 2018.

BARROS, O. S. **Determinação a baixo custo de açúcares redutores totais em caldo de cana, empregando sistemas de análise por injeção em fluxo, com o uso de DNS.** Dissertação- Instituto de química da Universidade federal de São Paulo. p.62. São Paulo, 2005.

BATTIKH.H et al. *Antimicrobial effect of Kombucha analogues - Food Science and Technology*. V.47, p. 71-77, 2012.

BHATTACHARYA. S, et al. *Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. Pathophysiology*. v.18, p. 221–234, 2011.

BRAIBANTE, M. E. F. et al. A química dos chás. **Quím. nova esc.** São Paulo.Vol. 36, N° 3, p. 168-175, 2014.

BRUICE, PAULA Y. **Fundamentos de química orgânica.** 2. Ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014. E-book. Disponível em: <<http://univates.bv3.digitalpages.com.br/users/publications/9788543006543/pages/-16>>. Acesso em: 05 nov. 2016.

BUSANELLO. M. et al. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agraria Paranaensis**. V. 11, n. 4, p.14-24, 2012.

CARVALHO, S.P.F., **Desenvolvimento de vinagres a partir de chás e infusões.** Dissertação de mestrado-Universidade de Lisboa, Lisboa 2016.

ČETOJEVIĆ-SIMIN, D. et al. *Bioactivity of Lemon Balm Kombucha. Food Bioprocess Technol* . V.5. p.1756–1765, 2012.

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

COOK, M. S. Probióticos, a solução. A chave para uma vida saudável. Saiba como os alimentos probióticos permitem prevenir e curar doenças, equilibrar o seu organismo e melhorar o seu bem estar. Especialista em nutrição, 2016.

COPPOLA, M. M.; L. TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. s e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, Santa Maria, 2004.

CTC, CENTRO TECNOLOGIA CANAVIEIRA; **Manual de Métodos Analíticos Controle Químico da Fermentação**. 2011. Central Analítica. Maceió.

DEOTI, J. R. et al. **Nova Metodologia de Dosagem de Açúcares Redutores Confere Maior Velocidade à Análise de Parâmetros de Processos Fermentativos**. Seminário do ensino e pesquisa de Extensão da UFFS ISSN 2317- 7489. Vol 3, 2013.

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

E. LONCAR, M. DJURIC, R. MALBASA, LJ. KOLAROV e M. KLASNJA. *Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea*. **Trans IChemE, Part C, Food and Bioproducts Processing**. v. 84, n.C3, p. 186–192, 2006

EGDO, F. J. V. M. “**Elaboración de una bebida refrescante fermentando la simbiosis kombucha con el objeto de mejorar la calidad de vida de los consumidores de bebidas no alcohólicas**”. Seminario de graduação. Universidade Técnica de Ambato, 2011.

GEMMER, R. E. et al. Análise de açúcares totais, redutores e não redutores em refrigerantes pelo método titulométrico de Eynon-Lane. **Revista Destaques Acadêmicos**, Lajeado, v. 8, n. 4, 2016.

GUTTAPADU, S; ZHU. Y; KNOL. W.. *Kombucha fermentation and its antimicrobial activity, en la revista*. **Journal Agric. Food Chem**. p. 2589, 2594, v.48. 2000.

GREENWALT, C. J. et al. *Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects*. **Journal of Food Protection**, v. 63, N. 7, p. 976–981, 2000.

HIRASAWA, M; TAKADA, K. *Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, V. 53, p. 225-229. 2004

HRNJEZ. D. et al. *The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage*. **Journal of functional foods**. v.10, p.336 – 345, 2014.

JAYABALAN, R. et al. *Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation*. **Food Chemistry**.vol. 109, p. 227–234, 2008.

JAYABALAN R., et al. *Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation*. **Food Science and Biotechnology**.v. 19, n.3, p. 843-847.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. *A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity and Tea Fungus, Comprehensive Reviews in*. **Food Science and Food Safety**. V.13, p. 538 – 550, 2014.

JAYABALAN R. et al. *Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation*. **Food Chemistry**. V. 102 p. 392–398, 2007.

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

KATZ, S.E. **A arte da fermentação. Explore os confeitos e processos essenciais da fermentação praticados ao redor do mundo**. 1 edição. São Paulo: Tapioca. SESI-SP, 2014. KOMBUCHA: UMA BEBIDA QUE TRAZ PRAZER E SAÚDE. COMPANHIA DOS FERMENTADOS. Disponível em: <<https://www.ciadosfermentados.com.br/kombucha/>> Acesso em: 13 de março, 2018.

JIMÈNES, A. D. L. **Características físico-químicas y capacidad antioxidante de “Kombucha”**. Biblioteca Digital - Gestão de Sistemas de Informação e Comunicações - Universidade Nacional de Trujillo. Perú, 2015.

LIMA, D.L. et al. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online. Campinas, 2008.

MACK D.R, AHRNE, S.; HYDE, L.; WEI S.; HOLLINGSWORTH M. A. *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. **Gut**. V. 52,n.6, p. 827-33, 2003.

MALBASA,R.; LONCAR, E.; DJURIC, M. *Comparison of the products of Kombucha fermentation sucrose and molasses*. **Food Chemistry**. V. 106 , p.1039–1045, 2008.

MORAIS M. B D. E.;JACOB C.M.A. *The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice*. **J Pediatr**.v. 82, n. 5, p. 189-S197, 2006.

MOREIRA, R.R.L.S. et al. Avaliação de Mudanças de Moringa para doses do Biofertilizante Kombucha. **Cadernos de Agroecologia**. Vol 8, No. 2, Porto Alegre, 2013.

NURIKASARI. M; PUSPITASARI. Y; SIWI. R.P.Y. *Characterization and analysis kombucha tea antioxidant activity based on long fermentation as a beverage functional*. **Journal of global research in public health**.v.2, n.2, 2017.

NGUYEN, N. K., et al. *Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid*. **Food Science and Technology** . v. 64, p.1149-1155, 2015.

PAKRAVAN, N. et al. *Cosmeceutical effect of ethyl acetate fraction of Kombucha tea by intradermal administration in the skin of aged mice*. **Jornal of Cosmetic Dermatology**. p. 1–9, 2017.

PALUDO, N. **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. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, 2017.

PEDRAZA, D. A. G. *Determinación potenciométrica de nitrógeno total en muestras de polen corbicular con digestión previa asistida con microondas.* **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín.** Janeiro, 2014.

PEREIRA, L. L. S. et al. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.12, n.4, p.516-518, Botucatu, 2010.

PINTO, M. S. *Tea: A new perspective on health benefits.* **Food Research International** v. 53 p. 558–567. 2013.

RODRIGUES, R. da S. **Características físicas e químicas de kombucha à base de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*, L.).** In: 6º Simpósio de segurança alimentar. Gramado, 2018.

SANTOS, W. C. R. et al. **Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto.** In: 69ª Reunião Anual da SBPC - 16 a 22 de julho de 2017 - UFMG - Belo Horizonte.

SANTOS, M. J. **kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração.** Dissertação de mestrado- Faculdade de ciências e tecnologia, Lisboa 2016.

SKOCIŃSKA, K. N. et al. *Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties.* **CyTA - Journal of Food.** V.15, n. 4,p. 601-607, 2017.

SREERAMULU. G; ZHU. Y; KNOL. W. *Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity.* **J. Agric. Food Chem.** v. 48,p. 2589-2594, 2000.

SUHARDINI, P.N.; ELOK, D. Z. *Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha Dari Berbagai Jenis Daun Selama Fermentasi.* **Jurnal Pangan dan Agroindustri.** Vol. 4 N ° 1 p. 221-229, 2006
SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.42, no.1, São Paulo, 2006.

SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian. Journal of Pharmaceutical Sciences.** vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002

SILVA, S.R.S ; OLIVEIRA, T.T ; NAGEM, T.J. Uso do chá preto (*Camellia sinensis*) no controle do diabetes mellitus. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** V. 31,n. 3,p. 133-142,Viçosa, 2010.

SCHMITZ, W. et al. **O chá verde e suas ações como quimioprotetor.** Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 26, n. 2, p.119-130, jul./dez. 2005.

TEOH, A. L. *Yeast ecology of Kombucha fermentation.* **Jornal Internacional de Microbiologia Alimentar.** V. 95,p. 119-126, 2004.

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

TSAI, C.F. et al. *The in vivo antioxidant and antifibrotic properties of green tea (Camellia sinensis, Theaceae).* **Food Chemistry,** v. 136, p. 1337–1344. 2013.

YANG. Z; BALDERMANN. S; WATANABE. N. *Recent studies of the volatile compounds in tea.* **Food Research International.** v. 53, p. 585–599, 2013.

