

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE DE OLIVEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, ANTIOXIDANTE E FÍSICO-QUÍMICA DE
KOMBUCHAS AROMATIZADAS COM ANIS ESTRELADO, CRAVO-DA-ÍNDIA E
CARDAMOMO**

CAMPO MOURÃO

2023

CAROLINE DE OLIVEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, ANTIOXIDANTE E FÍSICO-QUÍMICA DE
KOMBUCHAS AROMATIZADAS COM ANIS ESTRELADO, CRAVO-DA-ÍNDIA E
CARDAMOMO**

**Microbiological, antioxidant, and physico-chemical evaluation of kombuchas
flavored with star anise, clove, and cardamom.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador(a): Marcia Regina Ferreira Geraldo
Perdoncini.

Coorientador(a): Bogdan Demczuk Junior.

CAMPO MOURÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

CAROLINE DE OLIVEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, ANTIOXIDANTE E FÍSICO-QUÍMICA DE
KOMBUCHAS AROMATIZADAS COM ANIS ESTRELADO, CRAVO-DA-ÍNDIA E
CARDAMOMO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 01/08/2023

Marcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini
Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Angela Maria Gozzo
Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Eliane Sloboda Rigobello
Doutorado em Química Analítica e Inorgânica pelo Instituto de Química de São Carlos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2023

Dedico este trabalho ao meu pai, que
acompanhou toda minha trajetória lá do
céu.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me permitir percorrer essa trajetória. Agradeço minha mãe Alice, minha irmã Aline e minha sobrinha Antonella por me apoiarem e serem meu alicerce durante a graduação. Um agradecimento especial ao meu namorado Murilo, que caminhou ao meu lado durante esses anos, me apoiando e segurando a minha mão nos momentos difíceis.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros de graduação, especialmente a Andressa, Igor e a Mariele por todos esses anos juntos e por tornarem menos pesado esse trajeto. Agradeço minha orientadora prof^a Marcia Perdoncini e ao meu co-orientador prof^o Bogdan Demczuck pelas orientações no desenvolver deste trabalho. Aos professores Eliane Rigobello, Angela Gozzo, Augusto Tanamati e Manuel Plata por me auxiliarem em determinadas etapas do meu trabalho de conclusão de curso. A todos os professores, técnicos de laboratório e prestadores da UTFPR-CM por fazerem parte da minha trajetória.

RESUMO

A kombucha é uma bebida de origem asiática, fermentada, adoçada, ácida e gaseificada, produzida a base de chá verde ou preto ambos derivados da planta *Camelia sinensis*, com adição de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (scooby). O objetivo deste trabalho foi realizar análises físico-químicas, microbiológicas e de antioxidantes em kombuchas aromatizadas com anis estrelado (*Illicium verum Hook*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e cardamomo (*Elettaria cardamomum*) pois são especiarias que possuem ação antioxidante e são utilizadas para agregar aroma e sabor. Foram realizadas análises de pH, acidez, açúcares redutores em glicose, teor alcóolico, fenólicos totais, flavonoides, contagem de mesófilos aeróbios e leveduras. Os resultados obtidos mostraram que as três kombuchas atenderam os padrões da legislação vigente no Brasil para pH e teor alcóolico, enquanto a kombucha com cardamomo obteve o maior índice de açúcares redutores em glicose 2,33% e a com anis estrelado o maior índice de acidez 4,39%. O cravo-da-índia e anis estrelado aumentaram a concentração de antioxidantes na bebida, sendo 778,72mg/L e 398,16 mg/L para fenólicos totais e 283,54mg/L e 304,73mg/L para flavonoides, respectivamente. Também houve a identificação de bactérias Gram positivas e leveduras a partir da verificação morfológica. Os resultados estão previamente similares a estudos realizados por outros autores, porém as diferenças podem ser decorrentes do clima, modo de preparo e das especiarias utilizadas por cada autor.

Palavras-chave: kombucha; físico-químicas; antioxidantes; microbiológicas.

ABSTRACT

Kombucha is a fermented, sweetened, acidic, and carbonated beverage of Asian origin, made from green or black tea, both derived from the *Camelia sinensis* plant, with the addition of a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY). The aim of this study was to perform physicochemical, microbiological, and antioxidant analyses on kombuchas flavored with star anise (*Illicium verum Hook*), clove (*Syzygium aromaticum*), and cardamom (*Elettaria cardamomum*), as they are spices known for their antioxidant properties and used to add aroma and flavor. The pH, acidity, reducing sugars as glucose, alcohol content, total phenolics, flavonoids, aerobic mesophilic count, and yeast count were analyzed. The results showed that all three kombuchas met the current Brazilian legislation standards for pH and alcohol content, while the cardamom-flavored kombucha obtained the highest level of reducing sugars as glucose at 2.33%, and the star anise-flavored one had the highest acidity at 4.39%. Clove and star anise increased the antioxidant concentration in the beverage, with 778.72mg/L and 398.16mg/L for total phenolics, and 283.54mg/L and 304.73mg/L for flavonoids, respectively. Gram-positive bacteria and yeast were also identified through morphological examination. The results are consistent with previous studies conducted by other authors, although differences may arise from climate, preparation method, and spices used by each author.

Keywords: kombucha; physicochemical; antioxidant; microbiological.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anis estrelado.....	14
Figura 2 - Cravo-da-índia	15
Figura 3 - Cardamomo	15
Figura 4 - Estrutura química dos flavonoides.....	17
Figura 5 - F1 recém preparada.	21
Figura 6 - F2 recém preparada	21
Figura 7 - Kombuchas em preparo para realização das análises microbiológicas.....	22
Figura 8 - Tubos preparados para análise de fenólicos totais e flavonoides	24
Figura 9 - Acidez da kombucha pré e pós tiulação com NaOH 0,1 M	24
Figura 10 - Coluna de destilação para determinação do teor alcóolico	26
Figura 11 - Visão microscópica de bactérias mesófilas aeróbias.....	28
Figura 12 - Visão microscópica de leveduras.....	28
Figura 13 - Curva padrão do ácido gálico para análise de fenólicos totais	30
Figura 14 - Curva padrão da quercetina para análise de flavonoides	31
Figura 15 - Curva de calibração para análise de teor alcóolico	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes utilizados para o preparo da kombucha F1	20
Tabela 2 - Contagem microbiológica.....	27
Tabela 3 - Antioxidantes presentes na kombucha	29
Tabela 4 - Resultados das análises físico-químicas	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	Kombucha	13
3.2	Especiarias	14
3.2.1	Anis estrelado	14
3.2.2	Cravo-da-índia	14
3.2.3	Cardamomo	15
3.3	Microrganismos na kombucha	16
3.3.1	Mesófilos Aeróbios	16
3.3.2	Leveduras	16
3.4	Antioxidantes presentes na kombucha	16
3.5	Perfil físico-químico da kombucha	18
3.5.1	Açúcares redutores.....	18
3.5.2	Acidez	18
3.5.3	Teor alcóolico	18
3.5.4	pH	19
4	METODOLOGIA	20
4.1	Produção da Kombucha	20
4.1.1	Fermentação 1	20
4.1.2	Fermentação 2.....	21
4.2	Análises Microbiológicas	22
4.2.1	Contagem de bactérias mesófilas aeróbias	22
4.2.2	Contagem de leveduras	22
4.3	Determinação de Antioxidantes	23
4.3.1	Fenólicos totais	23
4.3.2	Flavonoides	23
4.4	Análises físico-químicas	24
4.4.1	Acidez	24
4.4.2	Açúcar redutor em glicose	25
4.4.3	Teor alcóolico	25
4.4.4	pH	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5.1	Análises microbiológicas	27
5.2	Análises de Antioxidantes	29
5.3	Análises físico-químicas	32
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A kombucha é uma bebida fermentada, de origem asiática, adoçada, gaseificada, ácida, podendo ser alcóolica, preparada à base de chá preto ou verde, adicionada de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, conhecida como scoby. Após o preparo da kombucha, ela deve passar pelo primeiro processo de fermentação (F1) que ocorre geralmente por 7 a 10 dias (PALUDO, 2017).

O processo de produção da kombucha, ocorre normalmente em duas etapas envolvendo fermentações. A primeira etapa envolve aerobiose e anaerobiose, onde os microrganismos hidrolisam o açúcar que é convertido em etanol pela primeira fermentação (F1) e posteriormente em ácidos, em aerobiose, causando a queda no pH, resultando em uma bebida ácida (PALUDO, 2017).

Na segunda fermentação (F2), o scoby é retirado e a bebida pode ser aromatizada, geralmente com 20-25% do volume com a adição de especiarias, sucos de fruta, ervas, a fim de agregar sabor a bebida (MAIA *et al.*, 2020). Esta etapa ocorre em ambiente de anaerobiose com duração de aproximadamente 4 dias, onde as kombuchas são envasadas e armazenadas para que ocorra a carbonatação, aromatização e savorização da bebida (MORENO; STIEBE; MICHIELIN, 2021).

Há vários anos as especiarias são utilizadas na culinária a fim de agregar aroma e sabor em alimentos e bebidas. O termo especiaria é usado para produtos de origem vegetal natural, podendo ser em pó, pau, frutos secos inteiros ou desagregados. O anis estrelado é de origem asiática e também é conhecido como anis-verdadeiro e anis-da-china, muito utilizado devido seu sabor adocicado (BINATTI; GEROMEL; FAZIO, 2016).

O cravo-da-índia possui um formato de botão de flor seco e é usado na culinária a fim de agregar sabor e aroma, geralmente em doces, já seu óleo essencial é muito utilizado em fármacos, devido sua ação anestésica. O cardamomo é uma especiaria de origem oriental que chegou à Europa há milhares de anos e seu uso era voltado para fabricação de perfumes, devido seu aroma agradável e ao longo dos anos foi se tornando presente na culinária, agregando sabor e aroma (BINATTI; GEROMEL; FAZIO, 2016). As especiarias foram escolhidas devido a seus benefícios, como a capacidade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória, além de agregarem sabor e aroma para a kombucha.

As análises físico-químicas exercem um papel fundamental na indústria de alimentos e bebidas, auxiliando na garantia da qualidade, segurança dos produtos, possibilitando a comparação de resultados com as legislações, no caso da kombucha existe a Instrução Normativa nº41 de 17 de setembro de 2019 que nos mostra os parâmetros físico-químicos para comercialização da kombucha (BRASIL,2019).

As análises microbiológicas são de grande importância na produção da kombucha, garantindo a qualidade da bebida, avaliando a viabilidade dos microrganismos presentes benéficamente no fermentado, além de auxiliar no controle de microrganismos indesejados (LOPEZ, 2017). Já a análise de antioxidantes é comumente realizada em alimentos a fim de identificar e quantificar os compostos antioxidantes na amostra analisada, apresentando a capacidade da bebida/alimento em fornecer a ação antioxidante e benefícios à saúde do consumidor (ANGELO; JORGE, 2006).

No presente trabalho produziu-se a kombucha e a partir da primeira fermentação F1, realizou-se três formulações de kombuchas F2 aromatizadas com anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo respectivamente. Análises foram realizadas nas três formulações, a fim de avaliar e comparar os parâmetros microbiológicos, antioxidantes e físico-químicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades microbiológicas, antioxidantes e físico-químicas das kombuchas aromatizadas com anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de bactérias mesófilas aeróbias e de leveduras por meio de análises microbiológicas nas kombuchas aromatizadas com anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo;
- Determinar a quantidade de antioxidantes presente nas kombuchas aromatizadas em fenólicos totais e flavonoides;
- Determinar por meio de análises físico-químicas os açúcares redutores em glicose, acidez, teor alcóolico e pH, nas kombuchas aromatizadas;
- Realizar análise estatística para verificar se houve diferença significativa entre as kombuchas aromatizadas;
- Comparar os resultados entre formulações com a legislação vigente e com estudos semelhantes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Kombucha

A kombucha é uma bebida obtida a partir da fermentação do chá verde ou preto adoçado, com sabor levemente ácido, gaseificada, aromatizada, podendo conter álcool. Sua primeira fermentação ocorre geralmente em 10 dias após a adição do scoby, (*Symbiotic Culture Of Bacterias and Yeasts*) que é uma colônia simbiótica de microrganismos - bactérias e leveduras (COELHO *et al.*, 2020).

É uma bebida originada da Ásia, tradicionalmente preparada com o chá preto, porém o chá verde também passou a ser muito utilizado como base. Um dos primeiros registros da bebida fermentada foi por volta de 221 a.C. Todavia apenas em 414 d.C., quando Kombu, médico coreano, levou a bebida para o Japão, a fim de curar distúrbios digestivos do Imperador Inkyo. ela recebeu o nome kombucha, devido ao nome do médico “Kombu” e “chá” devido a base da bebida (SANTOS, 2016).

O scoby, composto por uma película de celulose e microrganismos em simbiose, é a cultura responsável pela fermentação da kombucha, que realizam diversas reações bioquímicas durante o processo. Além disso, conforme ocorre a fermentação da bebida, o scoby se duplica, gerando assim outra colônia simbiótica, a qual pode ser armazenada em um “hotel para scoby” ou utilizado para o preparo de outra kombucha (SANTOS, 2016).

O processo de fermentação da kombucha ocorre devido a hidrólise do açúcar (sacarose, glicose e frutose) realizada pelos microrganismos ali presentes. O etanol é gerado, pois as leveduras consomem os açúcares, transformando-os em álcool (F1). Já as bactérias (láticas e acéticas) efetuam o metabolismo do etanol e dos açúcares, produzindo ácido acético, tartárico, málico e glucônico, que geram uma queda do pH e sabor ácido na bebida (ETGETON, ZANETTE, 2020).

Após a primeira fermentação (F1), pode-se realizar a segunda fermentação (F2) que leva cerca de 3 a 4 dias, etapa na qual acontece a adição de especiarias, sucos ou frutas, a fim de saborizar, aromatizar, carbonatar e melhorar os benefícios ofertados pela bebida (MORENO; STIEBE; MICHIELIN, 2021). Bruschi, Souza e Modesto (2018) e Medeiros e Zanchetti (2019) realizaram levantamentos a respeito dos benefícios da kombucha a saúde humana. Cintra e Kawashima (2018) relatam que entre os benefícios da bebida, podem ser citados o enriquecimento do sistema

imunológico, devido sua ação antioxidante, equilíbrio da flora intestinal e o aprimoramento da absorção de nutrientes no intestino delgado.

3.2 Especiarias

3.2.1 Anis estrelado

O anis estrelado (*Illicium verum Hook*) pertencente da família *Illiciaceae*, é uma especiaria aromática, com formato de estrela, coloração marrom e sabor adocicado. Geralmente cultivada em países asiáticos é utilizada na indústria de alimentos a fim de agregar aroma e sabor (DESTRO, 2019), além de sua ação antioxidante e suas funções anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana, propriedades presentes no óleo, contido no fruto (PEREIRA, 2016).

Figura 1 - Anis estrelado



Fonte: DESTRO (2019)

3.2.2 Cravo-da-índia

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) pertence à família *Myrtaceae*, possui formato de botão floral e é conhecido na culinária devido seu sabor frutado e levemente picante, muito utilizado para agregar sabor e aroma em comidas e bebidas. Por conta de sua ação antimicrobiana, antioxidante, antisséptica, anestésica e anti-inflamatória, o cravo e seu óleo (eugenol) são muito utilizados em pesquisas e na área medicinal (AFFONSO *et al.*, 2012).

Figura 2 - Cravo-da-índia

Fonte: AFFONSO *et al.*, (2012)

3.2.3 Cardamomo

O cardamomo (*Elettaria cardamomum*) pertencente da família *Zingiberaceae* é uma especiaria geralmente cultivada na Índia, tem formato encapsulado, com coloração esverdeada. Com custo elevado, o cardamomo é bastante conhecido como alimento funcional, além de seu sabor intenso, doce e aroma agradáveis, também possui propriedades farmacológicas, antibacteriana, anti-inflamatórias e contribui no controle de irritações e de distúrbios renais e intestinais (ASHOKKUMAR *et al.*, 2020).

Figura 3 – Cardamomo

Fonte: MELARA (2022)

3.3 Microrganismos na kombucha

Os microrganismos são os responsáveis pelos processos bioquímicos que levam à produção da kombucha, representados pelas bactérias acéticas dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Gluconobacter*, enquanto as bactérias lácticas pertencem aos gêneros *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, entre outros. As leveduras presentes na kombucha pertencem a vários gêneros e diversas espécies, principalmente *Zygosaccharomyces*, *Torulospora*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyce* (SOBRINHO; MELO; MARTINS, 2021).

3.3.1 Mesófilos Aeróbios

Os microrganismos mesófilos aeróbios presentes na kombucha incluem as bactérias acéticas e lácticas, que agem de maneira probiótica na bebida e são responsáveis pela geração do novo scoby. As bactérias acéticas são responsáveis pela conversão da glucose em ácido glucônico e da frutose em ácido acético. Com a produção destes ácidos, favorecem o meio para a síntese de etanol por intermédio das leveduras, que posteriormente é convertido em mais ácido acético, porém agora pelas bactérias lácticas (BRUINI *et al.*, 2019).

3.3.2 Leveduras

As leveduras presentes na kombucha, geralmente são isoladas e pertencem a diversos gêneros e de várias espécies como citadas acima. São responsáveis pela hidrólise da sacarose em frutose e glicose, além da produção de etanol, dióxido de carbono e compostos aromáticos durante o processo de fermentação (BRUINI *et al.*, 2019).

3.4 Antioxidantes presentes na kombucha

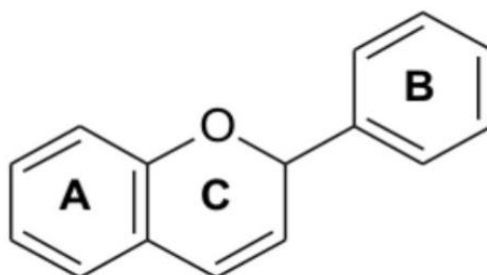
A kombucha possui grande ação antioxidante, auxiliando na remoção dos radicais livres, devido a fermentação e a presença de polifenóis no chá (VIEIRA *et al.*, 2021). Com isso alguns estudos a caracterizam como uma bebida funcional, contribuindo para um melhor funcionamento e proteção do organismo humano em

relação ao estresse oxidativo (MENDONÇA, *et al.*, 2020). Porém essa ação antioxidante pode variar de acordo com o tipo de chá utilizado, tempo de fermentação e da qualidade da microbiota cultural da kombucha (VIEIRA *et al.*, 2021).

Fenólicos totais é a medida da quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra (alimentos, bebidas), com ampla variedade, esses compostos são estruturas químicas que apresentam formato de anéis e hidroxilas e possuem grande ação antioxidante, a qual auxilia na neutralização de radicais livres. A análise de fenólicos totais é realizada para identificar a quantidade de antioxidantes presente de um composto ou de um grupo de compostos fenólicos, de modo geral. Porém no grupo de fenólicos as classes que mais se destacam são os ácidos fenólicos, tocoferóis e taninos (ANGELO; JORGE, 2006).

Os flavonoides são compostos naturais presentes no reino vegetal, em especial nas frutas, sementes e folhas, em forma de glicosídeos ou agliconas. Possuem baixo peso molecular e estrutura de anel, sua cadeia é composta por 15 átomos de carbono, tendo configuração C6–C3–C6 (Figura 4) (ANGELO; JORGE, 2006).

Figura 4 - Estrutura química base dos flavonoides



Fonte: ANGELO; JORGE (2006)

Com grande ação antioxidante, os flavonoides auxiliam no combate de radicais livres, protegendo as células de estresses oxidativos. Sua análise em alimentos permite identificar a quantidade e a presença desses compostos, podendo ser utilizada como indicador da qualidade (ANGELO; JORGE, 2006). Geralmente os compostos encontrados em maiores quantidades no chá utilizado para a produção da kombucha, são os flavonóis, catequinas e quercetinas (LEAL *et al.*, 2017).

3.5 Perfil físico-químico da kombucha

3.5.1 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores é de grande importância, pois o conhecimento da quantidade de açúcares presentes em um alimento e/ou bebida, auxilia no controle de qualidade e no atendimento das legislações. Os açúcares redutores possuem grupo carbonílico e cetônico livres, sendo capazes de oxidarem em soluções alcalinas na presença de agentes antioxidantes (SOUZA; OLIVEIRA; SOUZA, 2021).

3.5.2 Acidez

A determinação da acidez em bebidas e alimentos pode ser realizada para controle de qualidade e cumprimento de legislações, pois é um parâmetro crítico que auxilia no controle do processo de fermentação, tornando possível ajustes durante o processo, a fim de obter um alimento e/ou bebida com a acidez desejada (SUGARI; BENNEMANN, 2011).

Além de ser um ponto de controle para o desenvolvimento de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, que podem causar alterações sensoriais e de qualidade no produto, a análise de acidez permite avaliar a eficácia dos processos de fermentação (SUGARI; BENNEMANN, 2011).

3.5.3 Teor alcoólico

A análise de teor alcoólico é um parâmetro muito importante para bebidas fermentadas, pois influencia no sabor e aroma do produto, além de permitir a determinação exata de álcool presente, garantindo a qualidade da bebida e a correta rotulagem, pois com a quantidade de álcool conhecida é possível realizar a comparação com a legislação (PONTE *et al.*, 2022).

Também auxilia no controle da qualidade de bebidas fermentadas, possibilitando monitorar todo o processo de fermentação, além da realização de

ajustes para obtenção da fermentação e teor alcóolico desejados (PONTE *et al.*, 2022).

3.5.4 pH

O pH é uma medida de controle de acidez ou alcalinidade, que varia de 0 a 14, indicando meio ácido ($\text{pH} < 7,0$), neutro ($\text{pH}=7,0$) e alcalino ($\text{pH} > 7,0$) (BRUINI *et al.*, 2019), auxiliando no controle de qualidade e de fermentação da kombucha. Para obter uma bebida segura e agradável, seu pH não deve ultrapassar a faixa de 2,5 - 4,2 segundo a IN nº 41 de 17 de setembro de 2019 (PEZZINI, 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 Produção da Kombucha

4.1.1 Fermentação 1

A kombucha foi preparada de acordo com Maia *et al.* (2020), onde os componentes e quantidades estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Ingredientes utilizados para o preparo da kombucha F1

Ingredientes	Quantidades
Água Filtrada	2250 mL
Chá verde	12,5 g
Açúcar	125 g
Starter (*)	250 mL

Fonte: Autoria própria

(*) Starter: scoby com kombucha

De acordo com a metodologia de Maia *et al.* (2020) adaptada, aqueceu-se 1,5 litros de água filtrada até atingir a temperatura de 93°C em dois béqueres de 1000 mL. Após foi adicionado chá verde seco (adquirido à granel), onde o mesmo permaneceu em infusão por 15 minutos e em seguida foi coado com o auxílio de uma peneira de inox. Em seguida, adicionou-se o açúcar ao chá quente, dissolvendo-o e resfriado a temperatura ambiente. O volume total foi dividido em três frascos de vidro já higienizados e de volume igual. Por último foi adicionado o starter (scoby com kombucha), completando o sistema com água até atingir 2,5 L em cada vidro. Os frascos foram tampados com papel toalha e preso com elástico na borda do frasco de vidro para haver a passagem de oxigênio (Figura 5) e guardados em local seco e isento de luz para o processo metabólico aeróbio e anaeróbio (F1) em temperatura ambiente (inverno). Finalizado sete dias, obteve-se a F1.

Figura 5 - F1 recém preparada.

Fonte: Autoria própria

4.1.2 Fermentação 2

A partir da F1, seguiu-se para fermentação 2 (F2). Onde transferiu-se 300 mL da F1 para cada frasco e adicionou-se o anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo, (ambos inteiros, adquiridos a granel) em concentração de 25% (%m/v). Após agitação, os frascos foram totalmente fechados com tampa e armazenados por três dias (Figura 6). Durante esse período ocorreu o processo de gaseificação, aromatização e saborização do fermentado. Após a finalização da fermentação das kombuchas, iniciou-se imediatamente as análises e as bebidas foram armazenadas em geladeira, aproximadamente à 8°C (MAIA *et al.*, 2020).

Figura 6 - F2 recém preparada

Fonte: Autoria própria

4.2 Análises Microbiológicas

A análise de contagem de bactérias mesófilas aeróbias e de leveduras foi realizada de acordo com as metodologias adaptadas 6.2 e 7.2.a respectivamente do Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água (SILVA *et al.*, 2017). Para a realização das análises microbiológicas, todos os materiais e meios de cultivo foram esterilizados em autoclave. As análises foram realizadas em duplicata, sendo os resultados expressos pela média.

4.2.1 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias

Foi utilizado o meio de cultura Ágar para Contagem Padrão (PCA). Inoculou-se 1 mL de cada amostra em placas de Petri, verteu-se 15 mL de PCA seguido de homogeneização da amostra com o meio de cultura. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas à 35°C por 48 horas.

4.2.2 Contagem de leveduras

O meio de cultura utilizado foi o Ágar Batata Dextrose (BDA). Inoculou-se 1 mL de cada amostra em placas de Petri e em seguida verteu-se 15 mL de BDA, pela técnica pour-plate e a incubação foi realizada à 25°C por 5 dias (Figura 7).

Figura 7 - Kombuchas em preparo para realização das análises microbiológicas



Fonte: Autoria própria

4.3 Determinação de Antioxidantes

As análises foram realizadas em triplicata imediatamente após a finalização da segunda fermentação e os resultados foram expressos pela média.

4.3.1 Fenólicos totais

Para a análise de fenólicos totais utilizou-se o Método de Folin-Ciocalteu, onde primeiramente foi realizada a curva padrão com o ácido gálico, em seguida embrulhou-se os tubos de ensaio em papel alumínio a fim de impedir a passagem de luz, adicionou-se a kombucha, água ultrapura e o reagente de folin, após 2 minutos adicionou-se carbonato de sódio 15%. As amostras ficaram armazenadas em local fresco e escuro por 2 horas e em seguida realizou-se a leitura no espectrofotômetro UV/Vis com o comprimento de onda em 765nm e cubeta na quarta posição (SIGLETON; ROSSI, 1965).

4.3.2 Flavonoides

Para a realização da análise de flavonoides, utilizou-se o método citado por Annegowda *et al.*, (2013) adaptado, onde primeiramente foi realizada a curva padrão com quercetina, em seguida embrulhou-se os tubos de ensaio em papel alumínio para impedir a passagem de luz e em seguida adicionou-se a kombucha, água ultrapura e nitrito de sódio 5% e aguardou-se 5 minutos, após adicionou-se cloreto de alumínio 10%, aguardou-se 6 minutos e por último foi adicionado o hidróxido de sódio 1 mol/L e realizou-se a leitura imediatamente em espectrofotômetro UV/Vis com comprimento de onda 510 nm e cubeta na quarta posição (Figura 8).

Figura 8 - Tubos preparados para análise de fenólicos totais e flavonoides



Fonte: Autoria própria

4.4 Análises físico-químicas

4.4.1 Acidez

Para a determinação de acidez na kombucha, utilizou-se o método 016/IV das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Onde pipetou-se 10 mL de kombucha, transferiu-se para um Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 50 mL de água destilada e 3 gotas da solução fenolftaleína, em seguida titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até obter-se coloração rósea (Figura 9) (IAL, 2008).

Figura 9 – Acidez da kombucha pré e pós titulação com NaOH 0,1 M



Fonte: Autoria própria

4.4.2 Açúcar redutor em glicose

Para a determinação de açúcares redutores em glicose, utilizou-se o método 239/IV e 038/IV das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, onde pipetou-se 50 mL de kombucha e transferiu-a para um béquer de 150 mL, o qual foi levado em banho-maria por 30 minutos até a total evaporação do álcool. Em seguida, a kombucha foi resfriada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 1 mL da solução de acetato de chumbo (50 mL de água destilada + 10g de acetato de chumbo) a fim de clarificar a amostra, e completou-se com água destilada até atingir o menisco. A solução foi homogeneizada e filtrada, sendo descartado os primeiros mL.

Pipetou-se 30 mL de kombucha, transferindo-a para um balão volumétrico de 100 mL e completado com água destilada até atingir o menisco, após homogeneizado, a solução da kombucha foi transferida para bureta. Em Erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 10 mL de cada solução de Fehling A e B (preparadas de acordo com o método), 40 mL de água destilada e gotas do indicador azul de metileno 1% e titulou-se com a solução da kombucha até o sobrenadante ficar incolor e o fundo avermelhado, sendo o resíduo de cobre presente (IAL, 2008).

4.4.3 Teor alcólico

A determinação de etanol foi obtida pelo índice de refração baseando-se no método adaptado utilizado por Ihsani *et al.*, (2021), onde foi realizada uma curva de calibração com etanol/água e em seguida, realizou-se a destilação da kombucha, na qual foi adicionada 100 mL da bebida em uma coluna de destilação (Figura 10), após 30 minutos, iniciou-se a coleta do destilado, foi medido o índice de refração em um refratômetro portátil digital e por meio de cálculos através da equação da reta foi possível obter o teor alcólico.

Figura 10 - Coluna de destilação para determinação do teor alcólico



Fonte: Autoria própria

4.4.4 pH

O pH das kombuchas foi medido diretamente com o pHmetro digital de bancada, previamente calibrado com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (PEZZINI, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análises microbiológicas

Para determinar a quantidade de bactérias mesófilas aeróbias e de leveduras presentes nas kombuchas analisadas, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), em duplicata, obtendo assim os resultados expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Contagem microbiológica

Especiaria da Kombucha	Bactérias Mesófilas Aeróbias (UFC/mL)	Leveduras (UFC/mL)
Anis estrelado	$32,00 \times 10^3$	$1,05 \times 10^5$
Cravo-da-Índia	$18,40 \times 10^3$	$7,24 \times 10^5$
Cardamomo	$9,14 \times 10^3$	$6,76 \times 10^5$

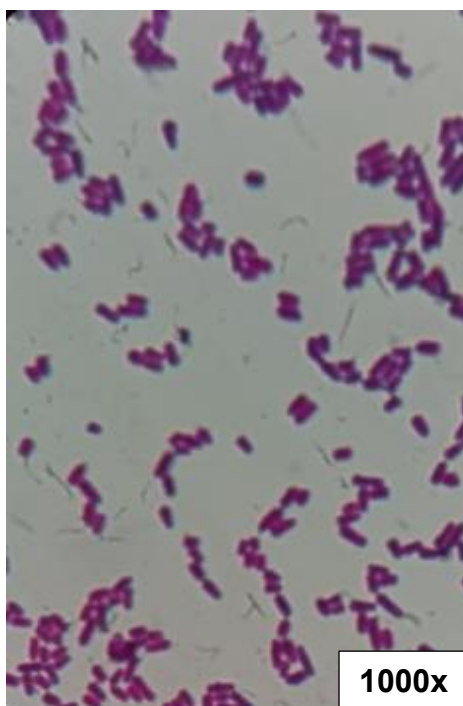
Fonte: Autoria própria

Como ainda não há legislação vigente de kombucha na parte microbiológica, os resultados foram comparados com outras pesquisas que realizaram as mesmas análises. De acordo com o estudo realizado por Bruini *et al.*, (2019) a quantidade de bactérias mesófilas aeróbias encontradas na kombucha aromatizada com uva foi de $13,0 \times 10^3$ UFC/mL enquanto a de leveduras foi $10,0 \times 10^5$ UFC/mL. Com isso foi possível perceber a similaridade dos resultados do estudo feito por Bruini *et al.*, (2019) com a kombucha de uva com os resultados obtidos neste trabalho com as kombuchas de anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo.

O estudo realizado por Silva e Paulo (2021) para kombucha F1 com 7 dias de fermentação apontou contagem de $3,85 \times 10^3$ UFC/mL para mesófilos aeróbios e de $3,85 \times 10^6$ UFC/mL para leveduras. O autor indica que em bebidas fermentadas como a kombucha é comum o alto índice de bactérias mesófilas aeróbias e de leveduras, pois ambas são as grandes responsáveis pela fermentação da bebida, podendo ter seu desenvolvimento influenciado pelo pH e acidez da kombucha, já que a baixa acidez e pH podem destruir tais células, diminuindo seu crescimento.

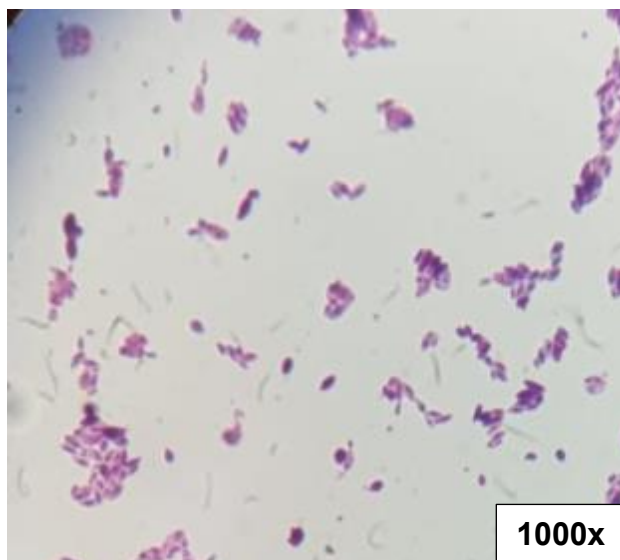
Foi realizada coloração para verificação morfológica dos microrganismos (Figura 11 e Figura 12) onde verifica-se que predominam bacilos Gram positivos e leveduras ovaladas.

Figura 11 - Visão microscópica de bactérias mesófilas aeróbias



Fonte: Autoria própria

Figura 12 - Visão microscópica de leveduras



Fonte: Autoria própria

5.2 Análises de Antioxidantes

Para determinar a quantidade de antioxidantes presentes em cada kombucha, realizou-se as análises de fenólicos totais e de flavonoides, em triplicata, cujos resultados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Antioxidantes presentes na kombucha

Especiaria da kombucha	Fenólicos totais (mg/L)	Flavonoides (mg/L)
Anis estrelado	398,16 ^b ±0,02	304,73 ^a ±0,04
Cravo-da-Índia	778,72 ^a ±0,01	283,54 ^a ±0,06
Cardamomo	88,72 ^c ±0,03	162,59 ^a ±0,10

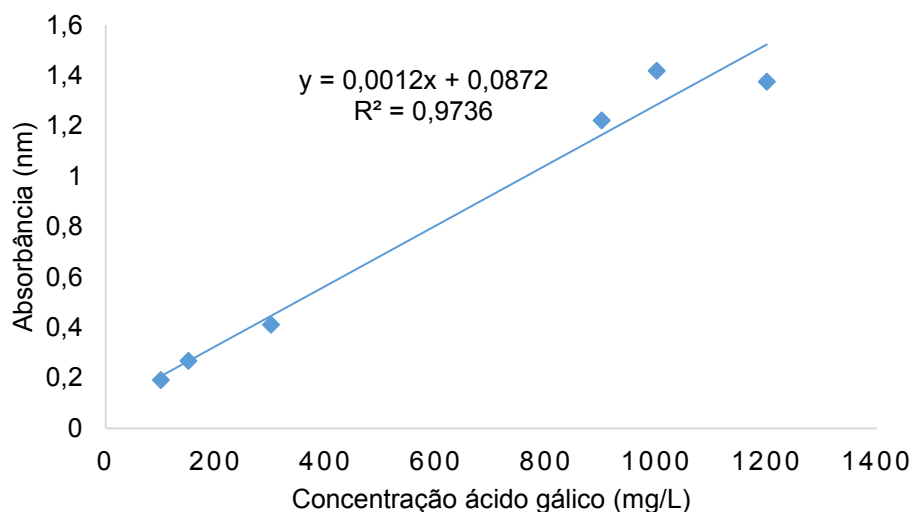
Fonte: Autoria própria

Nota: Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Na análise de antioxidantes, com resultados de médias e desvios-padrões apresentados na Tabela 3, fenólicos totais diferem entre si segundo a significância exigida e a amostra cravo-da-índia apresentou maior valor (778,72±0,01), enquanto a amostra contendo cardamomo foi a que apresentou menor fenólicos totais (88,72±0,03). Com relação à extração de flavonoides, as três amostras apresentaram a mesma média significativa.

Para a análise de fenólicos totais foi realizada a curva padrão com ácido gálico, representada na Figura 13 e por meio da equação da reta obtida no gráfico foi possível calcular a quantidade de fenólicos totais presentes nas kombuchas aromatizadas com anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo.

Figura 13 - Curva padrão do ácido gálico para análise de fenólicos totais



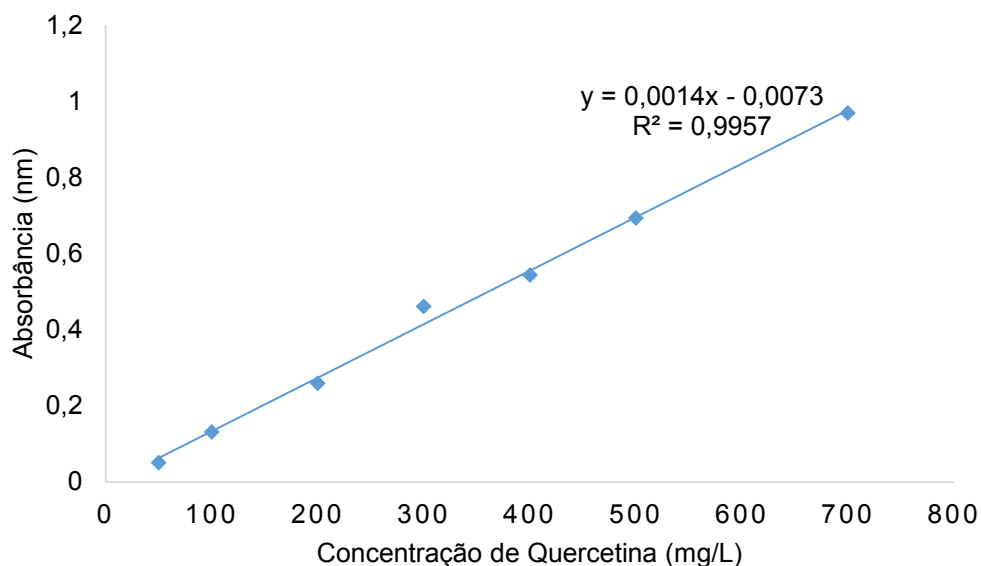
Fonte: Autoria própria

Segundo o estudo realizado por Perieto *et al.*, (2022) para análise de fenólicos totais com curva padrão de ácido gálico para kombucha F1 com fermentação de 14 dias, o resultado obtido para fenólicos totais foi de aproximadamente 367 mg/L, então é possível considerar que o anis estrelado e o cravo-da-índia aumentaram a capacidade de antioxidantes na kombucha F2 analisada neste trabalho, enquanto que a kombucha aromatizada com o cardamomo teve sua quantidade de antioxidantes reduzidos para a análise de fenólicos totais com curva padrão de ácido gálico.

Na pesquisa realizada por Shahbazi *et al.*, (2018) em kombuchas aromatizadas com canela e cardamomo com 16 dias de fermentação, produzidas com 0,7% chá verde, 6,5% de sacarose e 0,35% p/p de especiaria, apresentaram resultados de 582 mg/L e aproximadamente 280 mg/L respectivamente para fenólicos totais. O autor comenta que em seu estudo, o cardamomo foi a especiaria que demonstrou menores resultados, justificando com o apoio de outras pesquisas, que o cardamomo não possui grande ação antioxidante em relação à fenólicos totais, comparado com a canela e com anis estrelado e cravo-da-índia que foi apresentado neste estudo.

Para a análise de flavonoides realizou-se a curva padrão com quercetina, representada na Figura 14 e por meio da equação da reta obtida no gráfico foi possível calcular a quantidade de flavonoides presentes nas kombuchas aromatizadas com as três especiarias utilizadas.

Figura 14 - Curva padrão da quercetina para análise de flavonoides



Fonte: Autoria própria

De acordo com o estudo realizado por Shahbazi *et al.*, (2018) em kombuchas aromatizadas com cardamomo e canela, foi apresentado resultados de análise de flavonoides após 16 dias de fermentação, onde a kombucha com cardamomo apresentou 1,35 mg/L enquanto a kombucha com canela apresentou 3,12 mg/L. Os resultados do estudo analisado diferiram dos obtidos neste trabalho, apresentados na Tabela 3, porém deve-se levar em consideração o preparo, variedade de espécies de microrganismos, especiarias e clima para a produção das kombuchas, fatores que podem influenciar no metabolismo de produção desses compostos.

Segundo Ferreira *et al.*, (2022) em seu estudo de kombucha saborizada com suco de uva (40% da formulação) para 8 dias de fermentação, foi obtido o resultado de 112 mg/L de flavonoides e de 766 mg/L de fenólicos totais, similares com os resultados obtidos neste trabalho para o cardamomo (162,59 mg/L) e cravo-da-índia (778,72 mg/L), apresentados na Tabela 3. O autor realizou a pesquisa em diferentes tempos de fermentação, sendo 0, 4 e 8 dias e nota-se que a quantidade de fenólicos foi diminuindo ao longo da fermentação sendo 816, 752 e 766 mg/L respectivamente, enquanto a quantidade de flavonoides se manteve estável com 111, 114 e 112 mg/L para 0, 4 e 8 dias de fermentação respectivamente.

5.3 Análises físico-químicas

Para determinar os resultados das análises físico-químicas, a fim de compará-las com a literatura e com a Instrução Normativa N°41, de 17 de setembro de 2019, as análises foram realizadas em triplicata para cada uma das kombuchas, as quais seus resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados das análises físico-químicas

Especiaria da kombucha	Açúcar Redutor em Glicose (%)	Acidez (%)	pH	Teor alcóolico (%v/v)
Anis estrelado	1,92 ^b ±0,07	4,39 ^a ±0,03	3,74 ^c ±0,02	0,36 ^a ±0,01
Cravo-da-Índia	1,99 ^b ±0,19	3,51 ^c ±0,18	3,92 ^b ±0,03	0,32 ^a ±0,02
Cardamomo	2,33 ^a ±0,72	3,97 ^b ±0,12	4,19 ^a ±0,01	0,39 ^a ±0,05

Fonte: Autoria própria

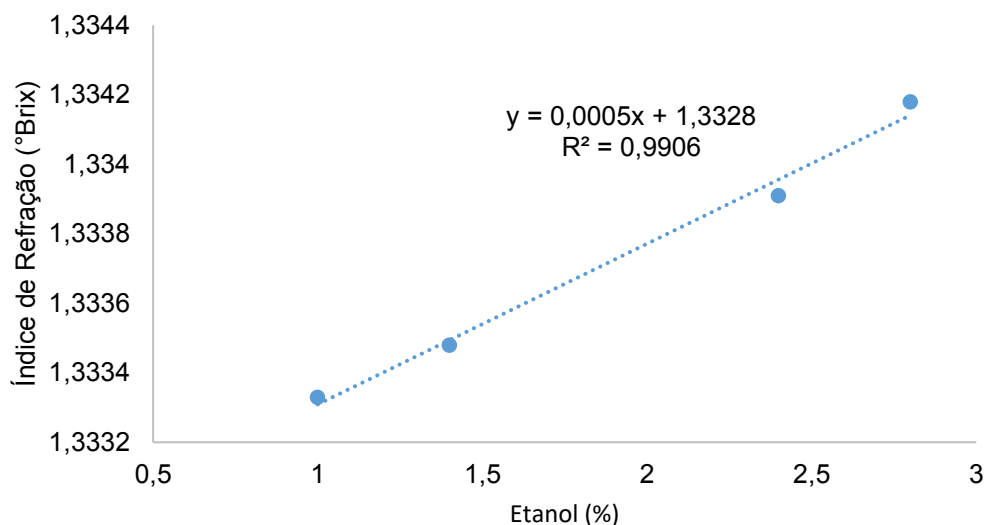
Nota: Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Nas análises físico-químicas, que contemplaram valores para açúcar redutor em glicose, acidez, pH e teor alcóolico, os resultados das médias e desvios-padrões se encontram na Tabela 4. O maior teor de açúcar redutor em glicose foi observado na amostra contendo cardamomo (2,33±0,72), enquanto as amostras de anis estrelado e cravo-da-índia apresentaram a mesma média significativa. A acidez maior foi observada em anis estrelado (4,39±0,03), enquanto que a menor em cravo-da-índia (3,51±0,18).

Para o pH, as três amostras apresentaram diferenças significativas entre si, com maior pH observado para a amostra cardamomo (4,19±0,01) e menor pH para a amostra anis estrelado (3,74±0,02). Com relação ao teor alcóolico, as três amostras apresentaram a mesma média significativa.

Para a determinação do teor alcóolico realizou-se uma curva de calibração etanol/água e por meio da equação da reta foi possível obter o teor alcóolico presente nas kombuchas aromatizadas com anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo, a curva de calibração está expressa na Figura 15.

Figura 15 - Curva de calibração para análise de teor alcóolico



Fonte: Autoria própria

De acordo com o estudo feito por Perito *et al.*, (2022) os índices de açúcares redutores e de acidez com 14 dias de fermentação, foram aproximadamente 0,12% e 1,5% respectivamente, porém a kombucha por eles analisada foi a F1, não tendo assim a saborização decorrente da F2. Em outro estudo realizado por Bruini *et al.*, (2019) onde foram realizadas as análises de glicídios redutores em glicose (4,31%), acidez (1,023%), pH (3,29) e teor alcóolico (<0,5 °GL) em kombucha com uva, os resultados ainda se diferiram, podendo ser em decorrência das especiarias utilizadas, clima e condições de preparo entre as kombuchas.

A pesquisa realizada por Dada *et al.*, (2021) para kombucha F1 com fermentação de 18 dias, indica o resultado de 4,62% de acidez, mostrando similaridade com o estudo. Segundo o autor, essa alteração na acidez da bebida já finalizada, pode ser decorrente a degradação térmica da glutamina, pois o chá verde foi mantido em infusão. Já o resultado de pH de Dada *et al.*, (2021) foi de 3,32, alegando que o tempo de fermentação, o teor de chá e a presença das bactérias e leveduras são fatores que influenciam diretamente no pH da bebida.

Segundo a Instrução Normativa n° 41, de 17 de setembro de 2019, que designa parâmetros para comercialização da kombucha, os valores ideais de pH e graduação alcóolica para kombuchas sem álcool tem que ser 2,5 – 4,2 e <0,5 %v/v, respectivamente, então pode-se dizer que as três kombuchas produzidas com as diferentes especiarias, atenderam os critérios de pH e teor alcóolico, citados na legislação vigente de kombucha no Brasil (BRASIL,2019).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados conclui-se que as três kombuchas obtiveram resultados de pH e teor alcóolico satisfatórios para a legislação vigente, Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019. Já em relação aos demais resultados físico-químicos (acidez e açúcar redutor) estiveram similares com literatura.

Sobre os resultados de antioxidantes, pode-se considerar que o anis estrelado e principalmente o cravo-da-índia aumentaram o potencial antioxidante das kombuchas, enquanto a bebida aromatizada com o cardamomo apresentou resultados muito abaixo em relação as demais formulações exploradas neste trabalho e da kombucha F1 relatada em outras pesquisas.

Para as análises microbiológicas, não houve grande diferença entre os resultados obtidos para o cardamomo e cravo-da-índia com os comparados a partir da literatura para kombuchas F1 com 7 dias de fermentação e kombucha aromatizada com suco de uva. Os resultados que mais diferiram da literatura foram os da kombuchas aromatizadas com anis estrelado, porém essas diferenças podem ser decorrentes do meio de cultura utilizado, clima, armazenamento e as especiarias que podem ter interferido diretamente no crescimento microbiológico.

As diferenças entre os resultados obtidos com os da literatura podem ser justificadas pelo modo de preparo, tempo de fermentação, clima de produção, armazenamento e principalmente a interferência das especiarias utilizadas, sendo o anis estrelado, cravo-da-índia e cardamomo.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANCA, T.C.C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química, Rio de Janeiro**, v. 4, n. 2, 2012. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/254/234>. Acesso em: 8 ago. 2022.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 66 n. 1 p. 1-9, 2006. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32841/31672>. Acesso em: 15 jun. 2023.
- ANNEGOWDA, H. V.; BHAT, R.; TZE, L. M.; KARIM, A. A.; MANSOR, S. M. The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchidiana* (Howard) – an underutilized legume. **Journal of Food Science Technology**, [s. l.], v. 50 n. 3 p. 535-541, [s. l.], 2013.
- ASHOKKUMAR, K.; MURUGAN, M.; DHANYA, M.K.; WARKENTIN, T.D. Botany, traditional uses, phytochemistry and biological activities of cardamom [*Elettaria cardamomum* (L.) Maton] – A critical review. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 246, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874119308918>. Acesso em: 14 jun. 2023.
- BINATTI, T.T.; GEROMEL, M.R.; FAZIO, M.L.S. Ação antimicrobiana de especiarias sobre o desenvolvimento bacteriano. **Higiene Alimentar**, Catanduva-SP, v. 30, ed. 260/261, 2016. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/11/2786/260-261-sitecompressed-105-108.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2023.
- BRASIL. **Portaria nº 41 de 17 de setembro de 2019**. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. padrão de identidade e qualidade da kombucha. Diário Oficial da União, Brasília, DF.
- BRUINI, B.; BERTOLANI, J.A.C; BERDUSCO, J.P.; TREVISAN, C.J. Aspectos físico-químicos e microbiológicos no processo de fabricação da kombucha. **Revista Engenho**, [s. l.], v. 11, ed. 1, dezembro 2019. Disponível em: <https://revistas.anchieta.br/index.php/RevistaEngenho/article/view/1509/1386>. Acesso em: 17 abr. 2023.
- BRUSCHI, J. S.; SOUSA, R. C. S.; MODESTO, K. R. Ressurgimento do chá de Kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, Goiás, 2018. Disponível em: <https://revistasfacesa.senaaires.com.br/index.php/iniciacaocientifica/article/view/68/35>. Acesso em: 12 maio 2022.
- CINTRA, B. P. G; KAWASHIMA, L. M. Desenvolvimento e avaliação de formulações de chá fermentado (kombucha). **Revista Científica UMC**, [s. l.], 2018. Disponível em: <http://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/509/401>. Acesso em: 4 abr. 2022.

COELHO, R.M.D.; ALMEIDA, A.L.; AMARAL, R.Q.G.; MOTA, R.N.; SOUZA, P.H.M. Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [s. l.], v. 22, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878450X20301499>. Acesso em: 19 jun. 2023.

DADA, A.P.; LAZZARI, A.; CESTÁRIO, A.C.O.; SILVA, D.S.; SARAIVA, B.R.; ROSA, C.I.L.F.; PINTRO, P.I.M. Caracterização de kombucha elaborado a partir de chá verde. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 10, ed. 15, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22992/20592>. Acesso em: 4 jul. 2023.

DESTRO, B. G. I. **Extração de óleo essencial de anis-estrelado (*illicium verum*) e imobilização em microcápsula para liberação guiada**. Tese de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/63257/R%20-%20T%20-%20BARBARA%20GOMES%20IAREMA%20DESTRO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 abr. 2022.

ETGETON, S. A. P.; ZANETTE, C. M. Desenvolvimento de kombucha: caracterização microbiológica, físico-química e aspectos de mercado. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 11, n. 4, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/view/14679/pdf#>. Acesso em: 8 abr. 2022.

FERREIRA, C.D.; SCHMITT, J.; ROCHA, W.J.; GARRIDO, E.B.; HOFFMANN, J.F. Alterações nos compostos bioativos e atividade antioxidante de kombucha em função da proporção de suco de uva e fermentação secundária. **Inovação e Sustentabilidade**: em saúde, nutrição e alimentos, São Leopoldo - RS, v. 1, ed. 2, p. 54-61, 2022. Disponível em: <https://issuu.com/mpna/docs/08-ferreira>. Acesso em: 4 jul. 2023.

IHSANI, N. The variation of ethanol concentration and kombucha characterization on several incubation periods. **Journal of Physics: Conference Series**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1764/1/012008/pdf>. Acesso em: 12 abr. 2023.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tigela – São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, edição IV, 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf. Acesso em: 29 abr. 2022.

LEAL, J.M.; SUAREZ, L.V.; JAYABALAN, R.; OROS, J.H.; ABURTO, A.E. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA: Journal of Food**, [s.l.], v. 16, ed. 1, p. 390-399, 18 fev. 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2017.1410499>. Acesso em: 4 jul. 2023.

LOPEZ, L.V. **Análise microbiológica de chá kombucha**. Orientador: Prof^ª. Karen Signori Pereira, D.Sc. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em engenharia de alimentos) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2017. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/20324/1/LVlopez.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2023.

MAIA, Y. L. M.; CORREIA, M. L. S.; NETO, J. V. S.; CASTRO, B. N. Kombucha: características e aspectos biológicos. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás**, Goiânia, 2020. Disponível em: <https://estacio.periodicoscientificos.com.br/index.php/rrsfesgo/article/view/208/199>. Acesso em: 29 abr. 2022.

MELARA, J. **¿Qué es el cardamomo y cuáles son sus beneficios?**. Novembro de 2022. Disponível em: <https://www.cocinafacil.com.mx/salud-y-nutricion/que-es-el-cardamomo-y-cuales-son-sus-beneficios>. Acesso em: 01 jul. 2023.

MENDONÇA, G.R.; PEREIRA, A.L.F.; FERREIRA, A.G.N.; NETO, M.S.; DUTRA, R.P.; ABREU, V.K.G. Propriedades antioxidantes e efeitos antimicrobianos da kombucha: revisão da evidência científica. **Revista Contexto & Saúde**, [s.l.], v. 20, ed. 4, p. 244-251, 2020.

MORENO, H.; STIEBE, J.; MICHIELIN, E.M.Z. Kombucha: produção, consumo e potencialidades. **Repositório Instituto Federal de Santa Catarina**, Santa Catarina, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ifsc.edu.br/bitstream/handle/123456789/2293/Jessica%20e%20Helena%20-KOMBUCHA%20PRODU%20%87%20%83O%20%20CONSUMO%20E%20POTENCIALIDADES%20%20UMA%20REVIS%20%83O.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 25 maio 2023.

PALUDO, N. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate**: processo artesanal e escala laboratorial. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/174899/001061869.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 4 abr. 2022.

PEREIRA, M. V. **Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais de limão tahiti (citrus latifolia), limão siciliano (citrus limon), anis estrelado (illicium verum) e alecrim (rosmarinus officinalis)**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2016. Disponível em: <http://riut.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/15881/1/atividadeantibacterianaantioxidanteoleos.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2022.

PERIOTO, C.Z.; BRANDÃO, É.C.T.A.; MOREIRA, J.M.; PRADO, A.A.O.S.; NETA, M.T.S.L.; NARAIN, N. Potencial antioxidante e caracterização físico-química e microbiológica do kombucha. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 1,

p. 739-751, 6 jan. 2022. Disponível em:
<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/42302/pdf>.
Acesso em: 18 abr. 2023.

PEZZINI, D.C.Z. **Estudo envolvendo kombuchas produzidas de forma industrialmente e artesanalmente**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021. Disponível em:
<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/27835/1/kombuchasproduzidasindustrialmentartesanalmente.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2023.

PONTE, A.A.; DIAS, V.; MARIA, E.; MENDONÇA, C.E.A. Métodos industriais para mensuração do teor de etanol em kombuchas. **Revista Eletrônica Estácio Recife**, Recife, v. 8, ed. 1, 2022. Disponível em:
<https://reer.emnuvens.com.br/reer/article/view/668/326>. Acesso em: 17 jun. 2023.

SANTOS, M. J. **Kombucha**: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas) - Universidade de Lisboa, [S. l.], 2016. Disponível em:
https://run.unl.pt/bitstream/10362/19346/1/Santos_2016.pdf. Acesso em: 5 abr. 2022.

SHAHBAZI, H.; GAHRUIE, H.H.; GOLMAKANI, M.T.; ESKANDARI, M.H.; MOVAHEDI, M. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. **Food Science & Nutrition**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 2568-2577, 25 out. 2018. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.873>. Acesso em: 18 abr. 2023.

SIGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p. ISBN 9788521212263.

SILVA, S.B.; PAULO, E.M. Atividade inibitória de bebidas fermentadas artesanais por bactérias enteropatogênicas. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, ed. 1, p. 6538-6553, 2021. Disponível em:
<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/23314/18746>. Acesso em: 5 jul. 2023.

SOBRINHO, C.P.; MELO, F.S.N.; MARTINS, W.F. Aspectos microbiológicos na produção da bebida kombucha: uma revisão integrativa. *In*: W.F., Martins *et al.* **Tecnologia e microbiologia sob a perspectiva da segurança dos alimentos**. 1. ed. Goiania: Científica Digital, 2021. v. 1, cap. 05, p. 76-85. ISBN 978-65-5360-007-2. Disponível em:
<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/210906290.pdf>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SOUZA, T.S.; OLIVEIRA, J.S.; SOUZA, L.C.C. Glicosímetro digital aplicado a análise de açúcar redutor em polpa de frutas. **Revista Ifes Ciência**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: <https://ojs.ifes.edu.br/index.php/ric/article/view/781/688>. Acesso em: 16 jun. 2023.

SUGARI, A.; BENNEMANN, D. **Avaliação das características de vinhos tintos elaborados no sudoeste do paraná**. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia de alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/11637/2/FB_COALM_2011_2_09.pdf. Acesso em: 16 jun. 2023.

VIEIRA, E. P.; PINTO, O. G.; MORAIS, K. C.; SANTANA, E. S. Análise da a o da kombucha e suas propriedades. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Jandaia, v. 18, n. 38, 2021. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2021D/analise.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2023.