

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LETÍCIA REIS PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO NO PROCESSO DE CARBONATAÇÃO
NATURAL E FORÇADA EM AMOSTRAS DE KOMBUCHAS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

LETÍCIA REIS PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO NO PROCESSO DE CARBONATAÇÃO
NATURAL E FORÇADA EM AMOSTRAS DE KOMBUCHAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P654a
2023

Pinheiro, Leticia Reis, 1995-

Avaliação do teor alcoólico no processo de carbonatação natural e forçada em amostras de kombuchas / Leticia Reis Pinheiro. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (55 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 2023.

Referências bibliográficas: f. 48-52.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.444>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Chá de Kombucha. 2. Fermentação. 3. Bebidas fermentadas - Legislação. I. Pereira, Alexandre Fontes, 1979-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDD 22. ed. 663.13

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

LETÍCIA REIS PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO NO PROCESSO DE CARBONATAÇÃO
NATURAL E FORÇADA EM AMOSTRAS DE KOMBUCHAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LETÍCIA REIS PINHEIRO
Data: 25/07/2023 14:04:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Letícia Reis Pinheiro
Autora

Documento assinado digitalmente
 ALEXANDRE FONTES PEREIRA
Data: 22/07/2023 06:48:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Alexandre Fontes Pereira
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar e guiar os meus passos.

Aos meus pais, Gerson e Nazareth, por todo apoio, amor incondicional e dedicação. Sem medir esforços para realizar meus sonhos, vocês me ensinaram a importância da humildade e da perseverança. Essa conquista é nossa!

À minha irmã, Laís, por todo o amor, por torcer e vibrar pelas minhas conquistas, mesmo à distância.

À Tia Carla, que se faz presente com orações, amor e carinho, mesmo à distância.

Ao Gustavo e família, por todo cuidado, companheirismo e amor. Vocês foram essenciais e tornaram essa jornada mais leve.

À minha amiga Nunu, pela parceria e cumplicidade em cada desafio enfrentado. Sua presença e apoio foram fundamentais para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao Alexandre, pela orientação e conhecimento compartilhado, que foram cruciais para o meu crescimento profissional.

À Universidade Federal de Viçosa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas oportunidades e pelo impacto positivo que tive na minha vida acadêmica e pessoal. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigada a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a que eu alcançasse este momento significativo em minha jornada acadêmica.

RESUMO

PINHEIRO, Letícia Reis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação do teor alcoólico no processo de carbonatação natural e forçada em amostras de kombuchas.** Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

Kombucha é uma bebida de baixo teor alcoólico que apresenta alto teor de compostos bioativos derivados do chá de folhas *Camellia sinensis* adoçado com sacarose, em conjunto com a atividade metabólica de microrganismos de leveduras, bactérias ácido-acéticas e ácido-láticas. Atualmente, atrai um número crescente de consumidores devido às suas propriedades promotoras de saúde relatados pela literatura e por uma parcela da população que busca por hábitos saudáveis. Este fato motivou o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a definir um padrão de qualidade e identidade para a bebida, para que o consumidor possa apreciar a kombucha em condições ideais de pH, acidez volátil, teor alcoólico e carbonatação. A Instrução Normativa (IN) nº 41 trouxe grandes desafios para produtores da bebida, principalmente para mantê-la com níveis de álcool em até 0,5% (v/v) para ser considerada um produto não alcoólico, como também mensurar este parâmetro, visto que, até o presente momento, apenas metodologias de alto custo foram validadas para medir níveis tão baixos com precisão e exatidão. Desta forma, este estudo objetivou validar uma metodologia rápida, confiável e de baixo custo capaz de mensurar o teor de álcool, assim como investigar se o processo de carbonatação forçada foi eficiente para manter este parâmetro dentro do valor estabelecido pela legislação, já que é uma alternativa citada em várias literaturas, porém ainda não existe comprovação desta afirmação. Para isto, foram produzidos 5 lotes de kombuchas para analisar amostras submetidas à carbonatação natural e forçada (injetando CO₂ industrialmente puro à 2,5 pressão de atm) finalizadas após 30, 60, 90 e 120 dias. O teor alcoólico foi mensurado através da cromatografia a gás com detecção de ionização de chama em paralelo com um equipamento portátil (*ABValuer*) capaz de mensurar níveis de álcool abaixo de 0,5% (v/v) com o intuito de avaliar sua eficiência e precisão nas análises. Durante a vida de prateleira das amostras, todos os parâmetros analisados (pH, acidez volátil e teor alcoólico) mantiveram dentro dos limites estabelecidos pela legislação. O *ABValuer* foi capaz de mensurar baixos níveis de álcool apresentando um valor satisfatório quando comparado aos valores encontrados por GC-FID. A carbonatação forçada não foi uma metodologia capaz de diminuir o teor alcoólico das amostras em estudo, apresentando maiores níveis de teor alcoólico quando comparada com a carbonatação natural.

Palavras-chave: Fermentação. Bebida. Legislação. Teor alcoólico. Carbonatação forçada.

ABSTRACT

PINHEIRO, Letícia Reis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2023. **Evaluation of alcohol content in the process of natural and forced carbonation in kombucha samples.** Advisor: Alexandre Fontes Pereira.

Kombucha is a low-alcohol beverage that has a high content of bioactive compounds derived from *Camellia sinensis* leaf tea sweetened with sucrose, together with the metabolic activity of yeast microorganisms, acetic acid and lactic acid bacteria. Currently, it attracts a growing number of consumers due to its health-promoting properties reported in the literature and by a portion of the population that seeks healthy habits. This fact motivated the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) to define a quality and identity standard for the drink, so that the consumer can enjoy kombucha under ideal conditions of pH, volatile acidity, alcohol content and carbonation. Normative Instruction (IN) No. 41 brought great challenges to drink producers, mainly to keep it with alcohol levels of up to 0.5% (v/v) to be considered a non-alcoholic product, as well as to measure this parameter, since, until now, only high-cost methodologies have been validated to measure such low levels with precision and accuracy. Thus, this study aimed to validate a fast, reliable and low-cost methodology capable of measuring the alcohol content, as well as to investigate whether the forced carbonation process was efficient in keeping this parameter within the value established by law, since it is cited in several literatures, but there is still no proof of this statement. For this, 5 batches of kombuchas were produced to analyze samples submitted to natural and forced carbonation (injecting industrially pure CO₂ at 2.5 atm pressure) finalized after 30, 60, 90 and 120 days. The alcohol content was measured through gas chromatography with flame ionization detection in parallel with a portable equipment (ABValuer) capable of measuring alcohol levels below 0.5% (v/v) in order to evaluate its efficiency and accuracy in the analyses. During the shelf life of the samples, all parameters analyzed (pH, volatile acidity and alcohol content) remained within the limits established by law. ABValuer was able to measure low levels of alcohol, presenting a satisfactory value when compared to the values found by GC-FID. Forced carbonation was not a methodology capable of reducing the alcohol content of the samples under study, presenting higher levels of alcohol content when compared to natural carbonation.

Keywords: Fermentation. Beverage. Legislation. Alcohol content. Forced carbonation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cepas saudáveis de SCOBY.....	21
Figura 2 - Metabolismo e interações microbianas que envolvem a produção da kombucha.....	25
Figura 3 - Equipamento portátil para medição de teor alcoólico em bebidas. Em (1) display, (2) sensor de temperatura, (3) pedra difusora de ar.....	28
Figura 4 – Equipamentos necessários para realizar a carbonatação forçada. Em (1) cilindro CO ₂ , (2) válvula reguladora, (3) mangueira, (4) tampa para carbonatação, (5) válvula extratora, (6) barril de inox.....	30
Figura 5 - Kombuchas preparadas para iniciar a primeira fermentação.....	33
Figura 6 - Carbonatação forçada. Em (1) kombucha gaseificada artificialmente e lacrada, (2) imagem ampliada das bolhas de CO ₂ que foram injetados na bebida.....	34
Figura 7 - Amostra de kombucha analisada através do ABValuer. Em (1) equipamento no momento da medição, em (2) display ampliado com o valor de álcool expresso em %vol e temperatura em °C.....	38
Figura 8 - Determinação do pH em amostras de kombuchas em vida de prateleira em Carbonatação forçada (CF) e natural (CN). A) Variação do pH da kombucha em Dias, em carbonatação natural e carbotação forçada. Letras iguais demostram que não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). B) regressão linear de amostras submetidas à CN e C) regressão Linear de amostras submetidas à CF.....	39
Figura 9 - Determinação da acidez volátil em amostras de kombuchas em vida de prateleira em Carbonatação forçada (CF) e natural (CN). A) Acidez volátil em amostras de kombuchas em vida de prateleira. Letras iguais demostram que não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no período analisado. B) Regressão linear da acidez volátil em amostras submetidas à CN e B) Regressão linear da acidez volátil em amostras submetidas à CF.....	41
Figura 10: Comparação entre as metodologias GC-FID e ABValuer, com relação ao teor alcoólico em dias de vida de prateleira em A) Carbonatação forçada e B) Carbonatação natural, letras diferentes diferem pelo teste de Tukey e 95% de confiança.....	43
Figura 11: Comparação dos valores do teor alcoólico obtidos entre as duas metodologias em Regressão Linear. Em (A1) amostras submetidas à CN em <i>ABValuer</i> , (A2) amostras submetidas à CF em <i>ABValuer</i> . (B1) amostras submetidas à CN em GC - FID e (B2) amostras submetidas à CF em GC – FID	44
Figura 12 - Comparação de teor alcoólico entre C.N. e C.F. A) pelo método <i>ABValuer</i> e B) pelo método GC- FID ; letras diferentes diferem pelo teste de Tukey e 95% de confiança.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros analíticos definidos pelo MAPA.....	18
Tabela 2 - Diferentes parâmetros iniciais utilizados por diferentes autores.....	24
Tabela 3 - Comparação de tecnologias de medição de álcool.....	27
Tabela 4 - Níveis de carbonatação em equilíbrio na água em várias temperaturas.....	30

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Etapas de produção artesanal de kombucha.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

AAB - Bactérias do ácido acético

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATM - Unidade de pressão atmosférica

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

CF - Carbonatação forçada

CG - Cromatografia gasosa

CG-FID - Cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama

CN - Carbonatação natural

CO₂ - Dióxido de carbono

Cu - Cobre

DMS - Diferença mínima significativa

F₁ - Primeira fermentação

F₂ - Segunda fermentação

Fe - Ferro

IN - Instrução normativa

KBI - Kombucha Brewers International

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mn - Manganês

NaOH - Hidróxido de sódio

Ni – Níquel

PET - Polietileno Tereftalato

PIG - Padrão de qualidade e identidade

pH - Potencial hidrogeniônico

SCOBY - Cultura simbiótica de bactérias e leveduras

(v/v) - Volume por volume

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	15
2.1.	Objetivo Geral	15
2.2.	Objetivos específicos	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1.	Kombucha	16
3.2.	Contexto histórico	16
3.3.	Legislação	17
3.4.	Composição química.....	18
3.5.	Insumos	19
3.5.1.	Chá verde	19
3.5.2.	Açúcar	20
3.5.3.	SCOBY	20
3.6.	Produção.....	21
3.6.1.	Etapas de produção	21
3.6.2.	Parâmetros de produção	23
3.7.	Processo fermentativo	24
3.8.	Teor alcoólico.....	25
3.9.	Alternativas para medição e controle de teor alcoólico em kombuchas	27
3.9.1.	Determinação do teor alcoólico	27
3.9.2.	Carbonatação forçada.....	28
4.	MATERIAIS E METODOLOGIA	32
4.1.	Materiais.....	32
4.2.	Processo de produção	32
4.3.	Primeira fermentação	33
4.4.	Segunda Fermentação	33
4.5.	Análises físico-químicas	35
4.5.1.	pH e acidez volátil.....	35
4.5.2.	Teor alcoólico.....	36
4.5.2.2.	ABValuer	37
4.5.3.	Análise estatística.....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Determinação dos valores de pH das amostras de kombucha.....	39

5.2. Determinação da acidez volátil das amostras de kombucha	40
5.4. Controle de teor alcoólico de Kumbucha por carbonatação Forçada	44
6. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

Devido aos benefícios alegados à saúde, a kombucha tornou-se uma bebida popular consumida mundialmente. É um produto que possui alta aceitação sensorial e dispõe de um sabor levemente ácido, adocicado e carbonatado. Tradicionalmente, é obtida a partir da fermentação resultante da atividade metabólica do SCOBY (Cultura simbiótica de bactérias e leveduras) em chá de folhas *Camellia sinensis* adoçado (GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000; MIRANDA *et al.*, 2022; VICK; BRANAN, 2022; VITAS *et al.*, 2018).

A popularidade da kombucha foi impulsionada devido aos benefícios relatados em literaturas e por uma parcela de consumidores que afirmam o seu potencial anti-inflamatório, sua capacidade de reduzir níveis de colesterol, pressão, câncer, de melhorar o sistema imunológico e do fígado. A redução no desenvolvimento de doenças em geral deve-se às propriedades antioxidantes presentes na bebida, como as catequinas, flavonóides e cafeína, além de vitaminas e minerais (ANAGIMOTO *et al.*, 2003; KAPP; SUMNER, 2019; SOARES; DE LIMA; SCHMIDT, 2021; TEOH; HEARD; COX, 2004).

Apesar de ser originalmente produzida em pequenas quantidades e de forma artesanal, houve um crescimento significativo no consumo de kombuchas e no mercado de produção, tornando-a o produto que mais cresce no setor de bebidas saudáveis. Com isso, a indústria de bebidas começou a responder positivamente ao aumento desta demanda (SOARES; DE LIMA; SCHMIDT, 2021; VICK; BRANAN, 2022).

Sendo assim, pesquisadores buscam constantemente detalhar a composição química e análises que possam comprovar as propriedades probióticas e antioxidantes alegadas à bebida, porém, por ser um mercado ainda recente, não está totalmente elucidado. Devido à ampliação de produção e consumo no Brasil, se fez necessário instituir padrões de qualidade e identidade (PIG) para a sua comercialização, tornando-o o primeiro país a possuir uma legislação específica para kombuchas (CHEN; LIU, 2000; SUHRE, 2020).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa (IN) nº 41, estabeleceu parâmetros analíticos a serem seguidos para a sua regulamentação, além de proibir o uso de afirmações funcionais e de saúde a qual a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não autorizou, como também a obrigatoriedade de declarar a graduação alcoólica (BRASIL, 2019).

Apesar da imposição em informar aos consumidores o teor alcoólico, ainda existem embalagens disponíveis no mercado que não possuem tal informação. A bebidacomercializada como um produto não alcoólico e encontram-se nas prateleiras produtos

com níveis de álcool acima do valor estabelecido, e, para que a mesma seja qualificada como uma bebida não alcoólica, este parâmetro deve ser inferior a 0,5% (v/v). Um problema enfrentado pelos produtores são níveis de álcool acima do valor estabelecido pela legislação, como também dificuldades de mensurá-lo de forma rápida, confiável e com custo menor (EBERSOLE *et al.*, 2017; BRASIL, 2019; SUHRE, 2020).

A kombucha é relativamente um produto novo no mercado de bebidas, com isso, a aplicabilidade dos métodos atuais para mensurar níveis de álcool em bebidas fermentadas, como cerveja e vinho, não são extensivos à kombucha devido ao limite de detecção não ser sensível o suficiente para medir baixos níveis de álcool (MCINTYRE, 2020). Um estudo realizado por Ebersole, *et al.* (2017), validou uma metodologia para determinação de etanol em kombuchas utilizando cromatografia gasosa (CG) por *headspace* com detecção de ionização de chama (CG-FID), porém, devido ao seu custo elevado, não é uma metodologia de fácil acesso aos produtores. Outros métodos já foram testados, porém, ainda apresentam um valor alto de custo e consumíveis para produtores menores (LIU; BROWN, 2017).

Uma alternativa citada por diversos autores para evitar o excesso de álcool em kombuchas é realizar o processo de carbonatação forçada (CF) para suprir a segunda fermentação (F_2), já que a mesma é responsável por gaseificar a bebida, mas, até o presente momento, não foi comprovado a eficácia desta técnica para tal finalidade. Outra possibilidade é manter o transporte e armazenamento da bebida em baixas temperaturas (EYKELBOSH, 2020; PATROCÍNIO, 2022)

A indústria de kombucha necessita de uma método que seja capaz de mensurar níveis baixos de álcool que forneça exatidão e precisão em seus resultados, mas que também apresente custo acessível, principalmente a produtores menores, com tempo de resposta rápido além de que seja confiável para o aprimoramento da produção desta bebida. Também é necessário uma metodologia que seja capaz de reduzir o teor alcoólico (KBI, 2020).

Nesta circunstância, o objetivo deste trabalho é mensurar o teor alcoólico de amostras de kombucha por uma metodologia que apresente baixo custo e boa precisão para quantificação em níveis iguais ou inferiores a 0,5% (v/v), além de investigar se a carbonatação forçada é capaz de controlar o teor alcoólico durante a vida de prateleira da bebida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar uma metodologia precisa e de baixo custo capaz de mensurar teor alcoólico abaixo de 0,5% (v/v) e analisar este parâmetro no processo de fermentação natural e carbonatação forçada em amostras de kombuchas.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir amostras de kombuchas seguindo o processo tradicional de produção para gaseificar a bebida, ou seja, realizando a carbonatação natural (CN);
- Produzir amostras de kombuchas submetidas à carbonatação forçada como substituição da F₂;
- Avaliar a influência da CF em níveis de álcool a longo prazo e comparar esta metodologia à CN.
- Avaliar parâmetros como pH, acidez volátil e teor alcoólico conforme a Instrução Normativa n° 41 imposto pelo MAPA;
- Analisar a vida de prateleira das amostras de kombuchas (CN e CF) em 30, 60, 90 e 120 dias com base nos parâmetros acima;
- Avaliar uma metodologia que seja acessível aos produtores, capaz de mensurar o teor alcoólico com níveis abaixo de 0,5% (v/v) e que apresente valores compatíveis com os de um método já aprovado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Kombucha

A kombucha é uma bebida conhecida pelo seu sabor agri-doce e pode ser facilmente produzida em casa. Sua produção acontece através da fermentação do chá preto e/ou verde açucarado (*Camellia sinensis*). O consórcio simbiótico responsável pela fermentação desse açúcar é formado por bactérias acéticas e leveduras, gerando o que se denomina de SCOBY. O resultado desse processo de fermentação é de uma bebida ácida e sutilmente gaseificada (SANTOS *et al.*, 2018).

Biomoléculas orgânicas estão presentes em sua composição as quais possuem propriedades terapêuticas, como anti-inflamatórias, anticancerígenas e antioxidantes. Devido a isto, desde sua descoberta houve um grande interesse em seu consumo, uma vez que há vários relatos evidenciando o auxílio da kombucha na redução de doenças crônicas, possuindo também propriedades curativas (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

Mesmo com pesquisas recentes não comprovando os efeitos totais dessa bebida no corpo humano, há registros e depoimentos afirmando que a ingestão da kombucha tem impactodireto no alívio de dores de cabeça, equilíbrio do colesterol, prevenção de problemas digestivos, entre outros (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014). Sendo assim, é comum a presença desse líquido refrescante em dietas saudáveis, por ser considerado um alimento com alto índice nutricional e alegações funcionais (SANTOS, 2016).

Tem-se como prova dados levantados pela Kombucha Brewers International (KBI, 2022), associação focada no desenvolvimento e preservação mundial do comércio da kombucha, relatando que a mesma é um dos produtos que tem tido maior destaque referente ao crescimento comercial no setor de bebidas. O interesse em mudar o estilo de vida por parte da população, o sabor agradável deste chá, juntamente com um alto índice de ocorrências de doenças como hipertensão arterial, diabetes e câncer são fatores chaves que explicam o aumento de sua procura nos últimos anos (BRUSCHI *et al.*, 2018).

3.2. Contexto histórico

É válido destacar a origem desta bebida, sua história e expansão. Apesar de hoje ser consumida em diferentes lugares do mundo, a kombucha se originou no nordeste da China há milhares de anos atrás, durante a era “Tsin” (dinastia chinesa). Época essa em que já existiam crenças em suas propriedades desintoxicantes e energéticas (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019 a,b).

Em 414 a.C. a bebida foi introduzida no território japonês através de um médico coreano cujo nome era Kombu. O uso desse líquido inicialmente teve como objetivo curar questões do trato digestivo sofridas pelo rei Ikyo da época. A partir de então, a bebida ganhou o nome popular conhecido hoje como kombucha, em homenagem ao médico Kombu (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019).

A notícia de seus benefícios se espalhou e fez com que a kombucha se dispersasse pelo mundo, devido suas vantagens funcionais e nutricionais. Relatos mostram que a mesma chegou à Rússia através de embarcações e após a Segunda Guerra mundial, século XX, teve os primeiros consumos em alguns países da Europa, como Alemanha e Itália.

Em meio a um surto de HIV nos Estados Unidos a popularidade da bebida foi consolidada por indícios que a mesma fortalecia o sistema imunológico que estava prejudicado pela doença (PETRUZZELLO, 2017). Os primeiros consumos deste produto natural em países como Austrália, Canadá e mais recentemente no Brasil ocorreu de forma mais tardia, mais precisamente no século XXI (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

No âmbito nacional, este mercado ainda é bem novo e conta com alguns eventos que indiciam sua consolidação no Brasil. Somente em 2019, por exemplo, que o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento deixou estabelecido os padrões de qualidade e identidade da kombucha (ORTIZ *et al.*, 2022).

3.3. Legislação

Devido ao aumento da procura pela kombucha e sua popularização, há muitos casos em que sua produção é feita artesanalmente. Porém, é comum a falta de controle em cima das características físico-químicas e microbiológica da bebida em tais produções artesanais. Vale destacar que o produto carece de um número maior de legislações que estabeleçam parâmetros de identidade e qualidade da bebida ao redor do mundo. Desta forma, o MAPA abriu um consulta pública em 2018 sobre a parametrização da bebida e, posteriormente, em 2019, publicou uma instrução normativa de número 41 onde estabeleceu o Padrão de Identidade e Qualidade da kombucha em todo o território brasileiro (BRASIL, 2019).

A definição trazida, segunda a IN nº 41, foi de que a kombucha é uma “bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)” (BRASIL, 2019).

Foram estabelecidos também alguns padrões referentes à rotulagem da bebida na instrução normativa, que são eles: especificar a espécie de vegetal usado na infusão, citar o

nome do componente acrescido após a etapa de fermentação (alternativo), indicar o aroma utilizado, gaseificada (caso gás carbônico for adicionado) e, por fim, definir o teor alcoólico caso o mesmo seja acima de 0,5% (v/v).

A tabela 1 a seguir, demonstra quais são os parâmetros analíticos máximos e mínimos instaurados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento referente ao uso da kombucha.

Tabela 1: Parâmetros analíticos definidos pelo MAPA

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

Fonte: MAPA (2019)

As normativas referentes a essa bebida têm como ponto focal dar ao consumidor segurança, qualidade e conformidade acerca dos critérios utilizados em todo seu processo de produção e envase. Além disso, os parâmetros analíticos estabelecidos são de grande importância, uma vez que estão conectados diretamente aos sabores característicos da kombucha (SANTANA, 2019).

3.4. Composição química

Os benefícios das folhas de *Camellia Sinensis* já são comprovados em literatura, com isto, torna-se relevante o valor nutricional da kombucha (JÚNIOR *et al.*, 2022). Dentre os compostos presentes na bebida, encontram-se flavanóis, catequinas e teaflavinas provenientes do chá, como também diversos ácidos orgânicos (por exemplo, cítrico, láctico, malônico, glicurônico), além de vitaminas hidrossolúveis do complexo B e C e minerais (Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) (ABACI; DENIZ; ORHAN, 2022; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Dos produtos principais que são formados após finalizado o processo de fermentação, têm-se o etanol, ácido glucônico e principalmente ácido acético (JÚNIOR *et al.*, 2022).

Como a kombucha sofre interferências em sua composição química devido a fonte de nutrientes, o tempo de fermentação, o ambiente, no preparo e temperatura, pode-se considerar que a bebida é bem diversificada, como também variável quantitativamente. Todas as variações citadas podem fomentar a produção de compostos nutricionais específicos (ASPIYANTO *et al.*, 2017). Apesar disso, há componentes que foram constatados na maioria, como os polifenóis,

ácidos orgânicos, vitaminas e aminoácidos (PALUDO, 2017).

A sua caracterização vem sendo realizada por diversos pesquisadores e está sempre em atualização de novas composições, isso deve-se ao mercado ser atual e inovador (COELHO *et al.*, 2020; SUHRE, 2020).

3.5. Insumos

De acordo com o MAPA (2019), os ingredientes obrigatórios para o preparo da bebida são: água potável, infusão de *Camellia Sinensis*, açúcar e o SCOBY. Alguns ingredientes também são permitidos, como exemplo: frutas, especiarias, mel e CO₂ (dióxido de carbono) industrialmente puro. Além de vitaminas e de aditivos como aromatizantes e corantes naturais, e fibras que só poderão ser utilizados em kombucha não alcoólica.

Suhre (2020) afirma que para ocorrer o processo fermentativo os microrganismos existentes no SCOBY necessitam de uma demanda nutricional, visto que os mesmos utilizam nutrientes simples como oxigênio, carbono, água, nitrogênio e outros minerais em suas vias metabólicas. A seguir, encontram-se a caracterização dos principais insumos para a produção da kombucha.

3.5.1. Chá verde

Dentre as bebidas mais populares do mundo, o chá preparado por folhas frescas da planta *Camellia sinensis* é um grande destaque pelo seu sabor agradável e por proporcionar diversos benefícios à saúde já comprovados (GU *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2021). O chá verde possui a maior produção e participação no mercado, e a China é o principal país que produz e consome chás do mundo. Geralmente, a qualidade de um chá está relacionada às condições ambientais em que são cultivados e sua origem geográfica (YE, 2012).

Quando as folhas de chá verde são submetidas à infusão com água potável fervida, resulta em uma bebida com fonte confiável de elementos essenciais para a dieta humana. A composição química do chá é diversificada, porém é influenciada por fatores como clima, solo de cultivo, época de colheita, entre outros, mas, em sua maioria encontram-se polifenóis, vitaminas, minerais, ácidos e sacarídeos (HE *et al.*, 2022; POHL; SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA, 2020).

O sabor do chá é associado a várias combinações de substâncias não voláteis, incluindo as catequinas que concede o amargor, a cafeína como estimulante e os aminoácidos para o frescor. Estes são os principais componentes do chá com importantes efeitos biológicos, como exemplo a cafeína, que atua como antiobesidade, as catequinas, que são os polifenóis mais

abundantes e que atua na eliminação de radicais livres e antioxidantes, e os aminoácidos que possuem efeitos de relaxamento (XU *et al.*, 2021).

No processo de obtenção do chá, mantêm-se preservado o teor de polifenóis devido à inativação da enzima polifenol oxidase, ou seja, os compostos com atividades funcionais e as catequinas ficam em abundância na bebida. Por consequência, e juntamente pelo chá verde possuir o sabor menos intenso comparado à outros chás, ele é vastamente utilizado em produções de kombuchas (PALUDO, 2017).

3.5.2. Açúcar

O açúcar sólido, ou sacarose, é um composto orgânico obtido através da extração do caldo presente na cana-de-açúcar seguido de um processo de evaporação, obtendo-se assim o açúcar granulado em forma de cristal ou refinado (CHANTASIRIWAN, 2017).

A sacarose é a principal fonte de carbono utilizada no crescimento de microrganismos do processo de fermentação em kombuchas, visto que as leveduras presentes fermentam a glicose e frutose em etanol, que posteriormente é oxidado e, por consequência, produz diversos ácidos orgânicos, como também produzem CO₂ responsável pela carbonatação natural da bebida (BORTOLOMEDI, PAGLARINI, BROD, 2022; GAMBOA-GÓMEZ *et al.*, 2016).

3.5.3. SCOBY

Na década de 1990, o termo SCOBY foi criado por Len Porzio para diferenciar a cultura mãe da nova cultura formada na kombucha. Em sua definição, é uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras em que seu desenvolvimento e composição microbiológica podem ser afetados por diversas condições, como tempo de fermentação, tipo de chá, temperatura, açúcares, entre outros (SOARES; DE LIMA; SCHMIDT, 2021).

Apesar da composição química sofrer variações, existem substâncias que estão presentes na maioria. Como exemplo as bactérias acéticas, em predominância a *Acetobacter pasteurianus*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinoides* e a *Acetobacter xylinum*, que é a bactéria mais comum capaz de sintetizar o SCOBY. Já considerando as leveduras, encontram-se com maior frequência a *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces custersii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces lambicus*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida stellate* e *Kloeckera apiculata*, sendo que, *Hanseniaspora* e *Kloeckera* são responsáveis por sintetizar ácidos e ésteres voláteis concedendo aroma ao substrato similar à sidra. Já a *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* são responsáveis

pelo aroma frutado da bebida (PALUDO, 2017).

Uma cultura de qualidade, como apresentado na figura 1, pode ser identificada por características físicas, como a espessura do biofilme que deve ter entre 6 e 12 mm. Caso esteja muito fino, pode ser um sinal de contaminação, do contrário, uma espessura maior pode dificultar a entrada de oxigênio para produzi-lo. Culturas saudáveis sempre irão produzir novas culturas e também serão resistentes ao rasgo quando forem pressionadas. As cepas podem variar de cor do branco ao marrom claro (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2019).

O SCOBY vêm sendo aplicado em diversas áreas, como indústria de embalagens de alimentos, indústria têxtil, como ração animal, agente de biolixiviação, engenharia de tecidos e até mesmo baterias eletrônicas. Além disso, com o intuito de aumentar o potencial terapêutico nas formulações das bebidas, como também na qualidade sensorial, o mesmo vêm sendo testado com frequência (SOARES; DE LIMA; SCHMIDT, 2021).



Figura 1: Cepas saudáveis de SCOBY
Fonte: Abope Stock (2020)

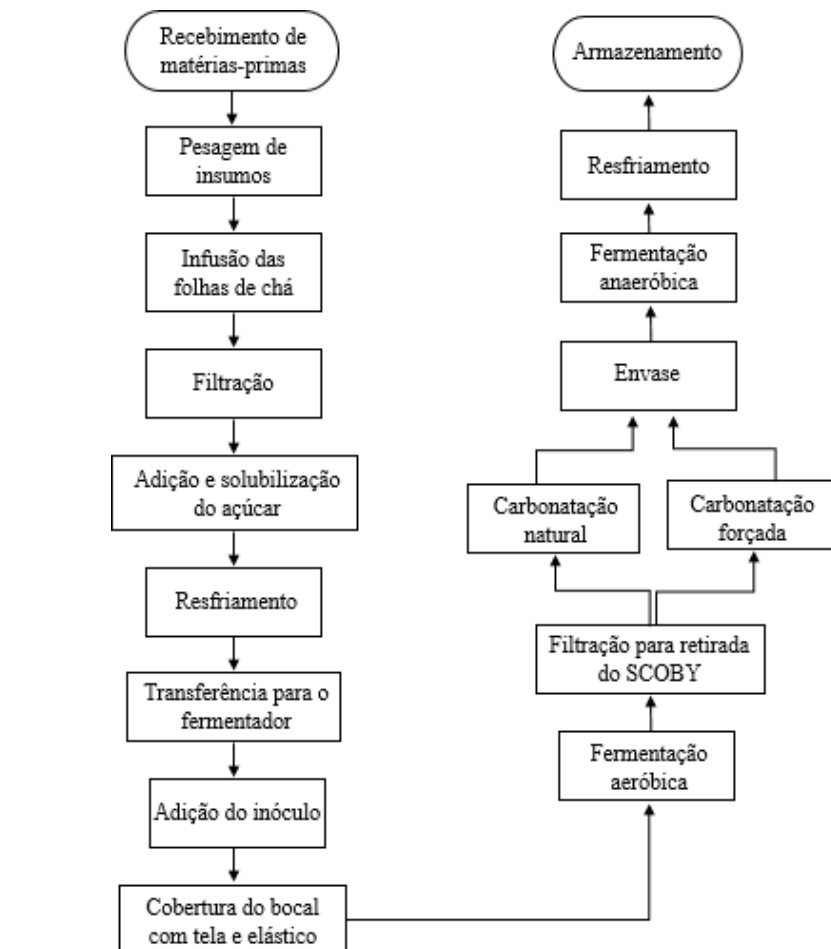
3.6. Produção

3.6.1. Etapas de produção

Existem na literatura diversas maneiras de produzir kombucha. Todas as metodologias se assemelham nos passos de preparação do chá, adição do substrato, inoculação e fermentação e se diferem na proporção utilizada de chá, açúcar e SCOBY, no tempo e temperatura de fermentação utilizados (MACEDO *et al.*, 2020).

. O início do processo de fermentação se dá pela inoculação do SCOBY ao chá adoçado. Posteriormente, o chá de kombucha é armazenado em um fermentador à temperatura ambiente por alguns dias ou semanas. A bebida formada durante a fermentação é o principal produto desejado, assim como o SCOBY rico em celulose que é gerado como subproduto (PRIYADHARSHINI *et al.*, 2022). O fluxograma de Silva (2021) adaptado, descreve os

principais passos de uma produção de kombucha artesanal.



Fluxograma 1: Etapas de produção artesanal de kombucha

Fonte: Adaptado de Silva (2021)

A kombucha resultante da primeira fermentação (F_1) deve ser filtrada para remover os resíduos do SCOBY e pode ser submetida a uma F_2 quando o objetivo for carbonatar a bebida (produzir CO_2) e dar sabor ou não com ervas ou frutas, de forma natural ou artificialmente. Finalizado o processo, ainda encontram-se bactérias e leveduras presentes na mesma, dessa forma, o ideal é que seja armazenada em um ambiente refrigerado à 4°C para reduzir a velocidade da fermentação e melhorar seu aspecto sensorial (MIRANDA *et al.*, 2022).

Blauth (2019) ressalta que em produções da bebida, sendo ela industrial ou caseira, cada batelada pode ser distinta uma das outras por não ser muito comum o controle de todo o processo. Diferentes configurações, devido a preferência do produtor ou de acordo com cada região em que a kombucha é produzida, podem ocasionar em produtos distintos. (JAYABALAN; MALBASA; SATHISHKUMAR, 2016).

Para evitar contaminações indesejadas no preparo da kombucha, é de extrema

importância que a mesma seja produzida em ambiente limpo juntamente com utensílios higienizados e esterilizados (BISHOP *et al.*, 2022; MIRANDA *et al.*, 2022). Os recipientes mais propícios para a produção da bebida devem ser feitos de vidro ou aço inoxidável para evitar o risco de contaminação por compostos tóxicos presentes, por exemplo, em cerâmica e chumbo, além da formação intensa de ácidos orgânicos que podem causar corrosão do local (BISHOP *et al.*, 2022; BRUSCHI; CRISTINA; MODESTO, 2018).

Durante o período de fermentação, o recipiente deve ser coberto com gaze para evitar a contaminação por insetos e por se tratar de uma fermentação aeróbica, é imprescindível que o recipiente nunca esteja completamente fechado, para que permita o contato da bebida com o ar. A recomendação é que o recipiente possua um diâmetro maior, de acordo com a produção, para que haja mais contato o ar, facilitando o processo de fermentação e de remoção do SCOBY (BRUSCHI; CRISTINA; MODESTO, 2018).

3.6.2. Parâmetros de produção

O tempo, a temperatura de fermentação e proporção de insumos por diferentes autores podem ser observados na tabela 2. A divergência entre as quantidades utilizadas dos autores listados é significativa, principalmente para a quantidade de folhas de chá, que variam desde 1,5 g/L, usados por Malbasa *et al.* (2006), até 12 g/L, sendo a quantidade mais utilizada pelos autores citados, como nos experimentos de Jayabalan *et al.* (2008), Cardoso *et al.* (2019) e Kallel *et al.* (2012).

A quantidade de açúcar já possui uma variação menor, de 50 à 100g/L, sendo as mais utilizadas 70 e 100 g/L. Apesar de 100g/L ser a porção mais utilizada, Malbasa *et al.* (2008) afirma que é possível realizar uma fermentação bem-sucedida com um substrato contendo 70g/L, a qual corresponde a uma ótima concentração de fonte de carbono e metabólitos desejáveis. Porções acima deste valor, podem ocasionar em níveis mais altos de álcool.

A inoculação pode ser feita somente com um volume de kombucha previamente fermentada, apresentado por Jakubczyk *et al.* (2020) que utilizou 100ml/L, como também a bebida acrescida do SCOBY, com uma variação de 15 à 50 g/L. A quantidade mais utilizada de SCOBY foi de 30g/L acrescidos de 100ml/L de uma kombucha já fermentada.

Já para a temperatura, houve pouca diferença entre os valores utilizados, entre 22 e 30°C. Autores recomendam 25°C como a temperatura ideal para a fermentação, como Neffe-Skocińska *et al.* (2017) que concluiu que esta temperatura apresenta as melhores condições quando analisadas as características físico-químicas, microbiológicas e propriedades sensoriais.

Por fim, o tempo de fermentação pode ocorrer com mínimo de 7 e máximo de 28 dias.

É um parâmetro decisivo quando se trata do sabor da bebida, podendo ocasionar em bebidas mais doces ou azedas, dependendo da preferência do produtor e/ou consumidor (BLAUTH, 2019). Desta forma, não há um consenso entre os autores sobre os parâmetros utilizados.

Tabela 2: Diferentes parâmetros iniciais utilizados na produção de kombucha

Referência	Quantidade de folhas (g/L)	Quantidade de açúcar (g/L)	Quantidade de SCOBY (g/L) + kombucha (ml/L), respectivamente	Temperatura (°C)	Tempo (dias)
Malbasa <i>et al.</i> (2006)	1,5	70	15 + 100	22 ± 1	28
Neffe-Skocińska <i>et al.</i> (2017)	2 e 4	100	50 + 60	20, 25 e 30	10
Jakubczyk <i>et al.</i> (2020)	8	100	0 + 100	28	7 e 14
Villarreal-Soto <i>et al.</i> (2020)	10	70	20 + 20	25	15
Jayabalan <i>et al.</i> (2008)	12	100	30 + 100	24 ± 3	14
Cardoso <i>et al.</i> (2019)	12	50	30 + 100	25	10
Kallel <i>et al.</i> , (2012)	12	100	30 + 100	24	15

3.7. Processo fermentativo

A conversão biológica que impulsiona o desenvolvimento da kombucha é uma combinação de inter-relações metabólica microbianas, a qual não se deve limitar a uma simples fermentação (TRAN *et al.*, 2020). Como exemplificado na figura 2, em um ambiente aeróbico a fermentação acontece naturalmente onde espécies diferentes de bactérias e leveduras agem em paralelo produzindo produtos distintos: o chá fermentado e o biofilme. Inicialmente, as leveduras hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, e posteriormente, por meio da frutose preferencialmente como substrato, as mesmas produzem álcool e CO₂ (MALBAŠA *et al.*, 2008; SUHRE, 2020; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Como o sistema está em contato com o ar, as bactérias aeróbicas obrigatórias do ácido acético usam a glicose e o etanol disponíveis para produzir ácidos orgânicos, principalmente o acético, mas outros ácidos também são notáveis, como o glucônico e glucurônico (DE FILIPPIS *et al.*, 2018; MALBAŠA *et al.*, 2008). As bactérias do ácido acético (AAB) são microrganismos dominantes durante a fermentação da kombucha.

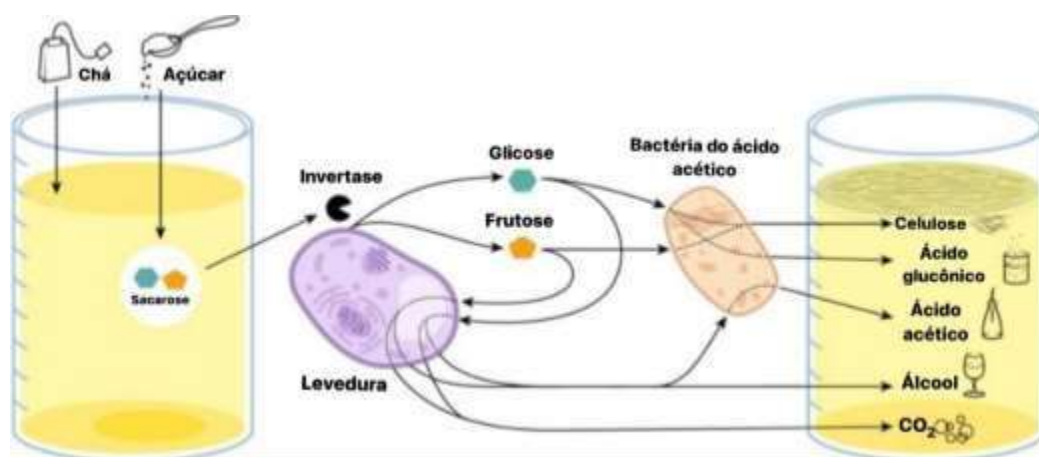


Figura 2: Metabolismo e interações microbianas que envolvem a produção da kombucha
 Fonte: Adaptado de Tran *et al.* (2020)

Uma parte da glicose permanece disponível para as leveduras, apesar de serem utilizadas pelas AAB, assim como a frutose como substrato que favorece a fermentação alcoólica (SIEVERS *et al.*, 1995). O ácido acético e o álcool como subproduto são importantes para evitar qualquer contaminação microbiológica, visto que ambos promovem uma disputa com outros microrganismos patogênicos, o que proporciona uma proteção para bebida (CABRAL; PAULA, 2021).

Já em condições anaeróbicas após o envase da bebida, há uma interrupção da síntese de celulose devido à privação de oxigênio após o consumo do oxigênio residual pelos microrganismos, sendo eles bactérias acéticas ou leveduras com metabolismo respiratório. Com isso, a conversão acética é inibida e a fermentação alcoólica é favorecida através das leveduras, transformando os açúcares residuais em etanol e CO₂. Ainda existem poucas investigações em relação a esta segunda fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2014; TRAN *et al.*, 2020).

Sendo assim, têm-se uma bebida refrescante, levemente ácida e carbonatada, contendo um conteúdo diversificado de componentes, como ácidos orgânicos, açúcares, etanol, aminoácidos, enzimas hidrolíticas e vitaminas (SUHRE, 2020; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

3.8. Teor alcoólico

A kombucha, como as demais bebidas fermentadas, também produz traços de álcool que podem variar de 0,1 a 2% (v/v) e depende de fatores como teor de açúcar, condições de armazenamento e parâmetros de fermentação. Cada país possui uma legislação vigente para determinar se a mesma é uma bebida alcoólica ou não, com obrigatoriedade de apresentar no rótulo. Dessa forma, é preciso métodos precisos para garantir produtos confiáveis e compatíveis

(KBI, 2020).

Ebersole, *et al.* (2017) validaram uma metodologia para determinar o teor de etanol por meio da cromatografia gasosa por *headspace* com detecção de ionização de chama com precisão média do método de 98,2%. O estudo contou com sete kombuchas comerciais adquiridas em Carmel, Estados Unidos, selecionadas com base em uma pesquisa de mercado preliminar levando em consideração a popularidade, nível de álcool rotulado e os ingredientes utilizados para garantir os melhores produtos do mercado.

Ivory, *et al.* (2021) determinaram o teor alcoólico de oito kombuchas comerciais diferentes adquiridos na Irlanda, além de cinco soluções aquosas de etanol, duas cervejas sem álcool, cerveja com baixo teor alcoólico e amostras de suco de frutas para finalmente validar uma metodologia enzimática, conhecida como *Ethanol Assay Kit*. O método necessita que as amostras de kombuchas sejam diluídas para remover qualquer interferência como pH ou cor da amostra e experimentos mostraram alta precisão em todos os materiais de referência testados.

Já no Brasil, Suhre, (2020) analisou 6 marcas diferentes de kombuchas para entender as circunstâncias em que o consumidor ingere a bebida, avaliando pH, teor alcoólico e acidez total titulável. A metodologia utilizada para mensurar o teor alcoólico, a Alcolyzer Beer da Anton Paar, obteve resultados satisfatórios compatíveis com a CG. É uma metodologia que mensura baixo teor de álcool e possui tolerância até 0,3 %. As amostras analisadas pela autora apresentaram teor alcoólico acima do valor estabelecido pelo MAPA.

A associação Kombucha Brewers International, (2020), realizou a medição de 8 amostras de kombuchas em teste cego com quatro tecnologias diferentes: CG, um sistema detecção de etanol OptiEnz Sensors, um Alcolyzer Anton-Paar e destilação emparelhada com um densitômetro Anton-Paar, e apresentou as principais vantagens e desvantagens, descritas na tabela 3.

As medições de concentração de etanol feitas usando GC foram consideradas a concentração alvo para cálculos de precisão neste estudo devido ao uso generalizado da tecnologia como um “padrão ouro”. No entanto, altos custos iniciais e de manutenção, procedimentos complicados e longos tempos de medição impedem a maioria dos produtores de kombucha de usar esta tecnologia em suas instalações.

Tabela 3: Comparação de tecnologias de medição de álcool

	CROMATOGRAFIA GASOSA	SENSOR OPTIENZ	ALCOLYZER ANTON-PAAR	DESTILAÇÃO E DENSITÔMETRO
Compra do instrumento	\$\$\$\$	\$	\$\$\$	\$
Consumível	\$\$	\$	-	-
Preparação da amostra (tempo)	Longo	Pequeno	Médio	Longo
Medição (tempo)	Longo	Pequeno	Pequeno	Pequeno
Nível de habilidade	Químico	Técnico	Técnico	Químico
Precisão	XXXX	XXX	XXXXX	-

Fonte: Adaptado de KBI (2020)

O sistema de detecção de etanol OptiEnz Sensors é uma metodologia mais acessível do que a CG e AlcoLyzer. A Anton-Paar oferece uma tecnologia com medições de concentração de etanol próximas às obtidas por CG, além de ser mais fácil de utilizar e possuir menor tempo de medição dentre propostas apresentadas, porém ainda possui custo elevado. Já a destilação tem um custo inicial baixo, tempos de preparação de amostra muito longos e requer um treinamento técnico de alto nível. As medições de etanol feitas com esta tecnologia foram consistentemente inferiores às medições do GC.

O baixo nível de etanol necessário para uma kombucha não alcoólica demanda um teste rápido, acessível e confiável para amplo uso dos produtores da bebida que necessitam averiguar se a concentração de álcool está igual ou inferior a 0,5% (v/v) (KBI, 2020). Além disso, como a kombucha é comercializada como um produto não alcoólico, produtores enfrentam dificuldades para mantê-lo dentro da faixa estabelecida pela legislação devido à possibilidade de uma fermentação contínua quando armazenada em temperaturas acima de 4 °C. Essa possibilidade pode levar ao aumento do teor alcoólico abaixo de 0,5% (v/v) no momento da produção para níveis mais altos no momento do consumo (EBERSOLE *et al.*, 2017; IVORY *et al.*, 2021).

3.9. Alternativas para medição e controle de teor alcoólico em kombuchas

3.9.1. Determinação do teor alcoólico

Em Abril de 2022, foi lançado no Brasil o primeiro medidor de concentração alcoólica portátil capaz de realizar medições em uma faixa de 0,0 a 2,0% (v/v). O *ABValuer*, apresentado na figura 3, possui uma precisão de 0,05% (v/v) e o tempo necessário para obter as respostas dos testes são de apenas 1 minuto. É um equipamento que possui um custo mais acessível comparado às tecnologias já citadas pela literatura, além dos consumíveis serem apenas 150 ml

da própria amostra a ser analisada e um antiespumante de uso alimentar.

De acordo com o ABValuer (2022), inicialmente é necessário realizar a calibração do equipamento com valores de álcool conhecidos (92,8° INPM), criando-se padrões de calibração e realizando a medição destes no equipamento. A concentração alcoólica das amostras devem estar com a temperatura próxima da temperatura utilizada no momento da calibração, com obrigatoriedade entre 20 e 27 °C, caso contrário, podem ocorrer interferências no resultado.

Como é um equipamento recente no mercado brasileiro, até o presente momento não existem evidências em literatura que comprovem a sua eficácia para mensurar teor alcoólico com concentrações abaixo de 0,5% (v/v). Para isto, é necessário realizar medições em amostras de bebidas no *ABValuer* em paralelo a uma metodologia já validada para comprovar a sua eficiência.



Figura 3: Equipamento portátil para medição de teor alcoólico em bebidas. Em (1) display, (2) sensor de temperatura, (3) pedra difusora de ar

Fonte: *ABValuer* (2022)

3.9.2. Carbonatação forçada

Um dos componentes importantes da identidade visual da kombucha é o aspecto e a abundância das bolhas presentes na bebida que dependem do processo de carbonatação obtido naturalmente após finalizada a primeira fermentação em um recipiente fechado, ou injetando CO₂ artificialmente, ou seja, realizando o processo de carbonatação forçada (TRAN *et al.*, 2020). A carbonatação utilizando gás carbônico industrialmente puro para kombuchas, de

acordo com a legislação, é permitida em condição de pressão entre 1,1 e 3,9 atm (unidade de pressão atmosférica) (BRASIL, 2019).

O método de carbonatar artificialmente é utilizado principalmente em indústria de bebidas gaseificadas por poder rapidamente e facilmente carbonatar volumes maiores de bebidas dentro de um período curto de tempo. O nível de carbonatação depende principalmente da pressão de CO₂ e temperatura, sendo que, em temperaturas mais baixas, o dióxido de carbono possui maior solubilidade (SONG *et al.*, 2020).

O processo de carbonatação forçada consiste em adicionar CO₂ em bebidas com o objetivo de conferir uma sensação de refrescância, melhorar o sabor e aparência, além de atuar como conservante contra fungos, leveduras e bactérias indesejadas. O mesmo deve ser de qualidade alimentar e livre de impurezas para não afetar o odor ou sabor do produto final (ABU-REIDAH, 2019).

Basicamente, a técnica requer apenas uma etapa e consiste em pressurizar e dissolver o CO₂ contido em um cilindro para um barril preenchido com o líquido da amostra a ser carbonatada a uma dada pressão e temperatura. Para isto, a pressão é controlada por um regulador de pressão e conta-se com o auxílio de válvulas de ajuste, um conjunto de mangueiras e conectores (CALIX; FERRENTINO; BALABAN, 2008), como representado na figura 4.

A quantidade de dióxido de carbono dissolvido é expressa em gramas de CO₂ por litro de bebida (g/L) ou em volumes de CO₂ por volume de líquido (v/v). Para que o consumidor consiga detectar a carbonatação é necessário que seu nível mínimo seja de aproximadamente 0,6 volumes de CO₂ e para evitar uma queimadura excessiva e desagradável ao consumir uma bebida carbonatada, seu nível máximo deve ser até 8 volumes. (MCMAHON *et al.*, 2017).

Cada bebida possui um nível ideal de carbonatação, como exemplo, para ser classificado como vinho espumante, o nível desta bebida deve atingir volumes de CO₂ superiores a 2. A maioria dos refrigerantes, como água tônica, são carbonatados em aproximadamente 3 à 3,5 volumes de CO₂. Já no champanhe é empregado 4,6 à 6 volumes de CO₂ e na maioria das cervejas artesanais e estilo lager são carbonatadas de 2,4 à 2,6 volumes de CO₂ (MORIAUX *et al.*, 2018).



Figura 4: Equipamentos necessários para realizar a carbonatação forçada. Em (1) cilindro CO₂, (2) válvula reguladora, (3) mangueira, (4) tampa para carbonatação, (5) válvula extratora, (6) barril de nox
Fonte: Cerveja da Casa (2018)

Embora a quantidade de CO₂ seja estipulada, a sua solubilidade será afetada pelas concentrações de açúcar e etanol disponíveis na bebida. Porém, existem valores aproximados calculados através da lei de Henry assumindo as propriedades da água (SONG *et al.*, 2020), como observado na tabela 5.

Tabela 4: Níveis de carbonatação em equilíbrio na água em várias temperaturas

Concentração de CO ₂ (v/v) à determinada temperatura				
Pressão CO ₂ puro (atm)	0°C	5°C	10°C	15°C
1,0	1,6	1,37	1,17	1,01
1,34	2,15	1,83	1,57	1,36
1,68	2,69	2,3	1,97	1,70
2,02	3,24	2,76	2,37	2,05
2,36	3,78	3,23	2,77	2,39
2,70	4,36	3,69	3,17	2,74

Fonte: Adaptado de Song *et al.* (2020)

A técnica possui várias vantagens como permitir um controle aproximado da quantidade de CO₂ dissolvido na bebida em poucas horas, o que resulta em uma textura uniforme e consistente, como também um aumento da vida útil do produto devido à inibição do crescimento de microrganismos indesejados e melhora significativa no sensorial de bebidas. É um método relativamente simples de executar e possui baixo custo de mão de obra

(MCMAHON *et al.*, 2017; MORIAUX *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2020).

Em produções maiores de kombuchas, a CF na literatura é citada como uma estratégia considerável para diminuir o teor alcoólico, visto que o tempo de produção será menor por não precisar de uma segunda fermentação para carbonatá-la, porém, até o presente momento, não existem indícios. A técnica já foi realizada em kombuchas para analisar se teria a mesma aceitabilidade comparada às carbonatadas naturalmente, e foram aprovadas pelos consumidores.

4. MATERIAIS E METODOLOGIA

Os experimentos do presente estudo foram realizados no Laboratório de Bebidas Fermentadas e Destiladas do Departamento de Química, e no Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, ambos localizados na Universidade Federal de Viçosa.

4.1. Materiais

Os insumos utilizados para a produção da kombucha foram: açúcar cristal e folhas de chá verde adquiridos em mercado local de Viçosa – Minas Gerais, água filtrada e SCOBY juntamente de uma kombucha previamente fermentada obtidos por meio de doação por um produtor local. Também foram utilizados garrafas PET (polietileno tereftalato) de 250 ml para o envase da bebida finalizada e gás carbônico industrialmente puro para a gaseificação da mesma.

4.2. Processo de produção

Em um fermentador de inox, 2 litros de água filtrada foram aquecidos até atingir a temperatura de 75 °C. Posteriormente, foi realizada a infusão das folhas de chá verde por aproximadamente 2 minutos em uma concentração de 12 g/L. Após a infusão, as folhas de chá verde foram retiradas com o auxílio de uma peneira de inox e em seguida, o açúcar cristal foi adicionado a uma concentração de 70 g/L. Com a utilização de uma pá, também de inox, o substrato foi misturado até a sua completa homogeneização e mantidos em banho de gelo até atingir a temperatura de 25°C para evitar a inativação dos microrganismos (KIM; ADHIKARI, 2020). Em um fermentador de vidro com capacidade de 3 litros, devidamente higienizado, foram adicionados 3% (p/v) de SCOBY que foram pesados antecipadamente em uma balança analítica - Bioscale® FA2204B-BI, acrescidos de 100ml/L de um lote de kombucha previamente fermentado para que fosse evitado a proliferação de microrganismos indesejáveis (JAYABALAN *et al.*, 2014). O substrato preparado foi transferido para o fermentador junto ao inóculo e, em seguida, o recipiente foi coberto com um tecido de poliamida em malha elástica com furos médios para que fosse possível a troca de ar com o ambiente e evitar contaminação por insetos e/ou sujeiras físicas.

Este processo foi realizado em 5 bateladas em 5 fermentadores de vidro independentes, como apresentado na figura 5, e, para que o processo de fermentação não sofresse variação de temperatura, os fermentadores foram transferidos para uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) – Nova Ética®, modelo 411 D, em uma temperatura fixa de 25 °C.



Figura 5: Kombuchas preparadas para iniciar a primeira fermentação

4.3. Primeira fermentação

O parâmetro utilizado como referência para definir o tempo de fermentação foi o pH. Para isso, foram coletadas alíquotas diariamente por uma torneira localizada no fundo do fermentador até que fosse encontrado um valor aproximado de 3,0, que, segundo Loncar *et al.* (2006) é próximo ao valor encontrado no trato digestivo, totalizando em 7 dias de fermentação. Após este processo, o SCOBY foi removido e armazenado para ser utilizado em futuras fermentações.

4.4. Segunda Fermentação

Na segunda fermentação (F_2), amostras foram submetidas à carbonatação natural e forçada (CF) paralelamente com o intuito de investigar se a longo prazo a CF é uma metodologia eficiente para diminuir o teor alcoólico da bebida, para isso, uma amostra de cada lote e para cada método foram analisadas após 30, 60, 90 e 120 dias de acordo com os parâmetros estabelecidos pela IN n° 41.

As amostras que foram submetidas à CN foram envasadas em garrafas PET com capacidade de 250 ml em ambiente anaeróbico e armazenadas sob à mesma condição de temperatura da F_1 . Santos (2016) afirma que deve-se permanecer nestas condições até que se

obtenha a carbonatação desejada, senso assim, a F₂ submetida à CN teve uma duração de 7 dias. O processo foi verificado através da pressão no recipiente, que aumentou devido a formação de CO₂ (BLAUTH, 2019). Posteriormente, foram refrigeradas à 4 °C de acordo com a metodologia de Suhre (2020) de armazenamento.

Já para as amostras que foram submetidas à CF, seguindo o mesmo método de Calix; Ferrentino; Balaban, (2008), cada lote foi adicionado em um barril higienizado para ser carbonatado separadamente. Após adicionar a bebida fermentada resfriada à 5°C no barril, deixando espaço livre para injetar o CO₂, a metodologia rápida utilizada por CO₂Meter (2022), foi empregada devido ao CO₂ se dissolver melhor em baixas temperaturas. Em uma pressão de aproximadamente 2,5 atm, o gás foi injetado e agitado por 3-5 minutos para facilitar a dissolução do mesmo na bebida. Feito isso, o barril contendo o bebida carbonatada artificialmente ficou em repouso por 30 minutos. Posteriormente, foram envasados manualmente e refrigerados à 4 °C. Na figura 6 pode ser observado em (2) as bolhas de CO₂ contidas na bebida após a finalização da CF. As garrafas PET foram sanitizadas com Pluron 461 A1, sanitizante utilizado em indústria alimentícia, para evitar possíveis contaminações após o envase da bebida.

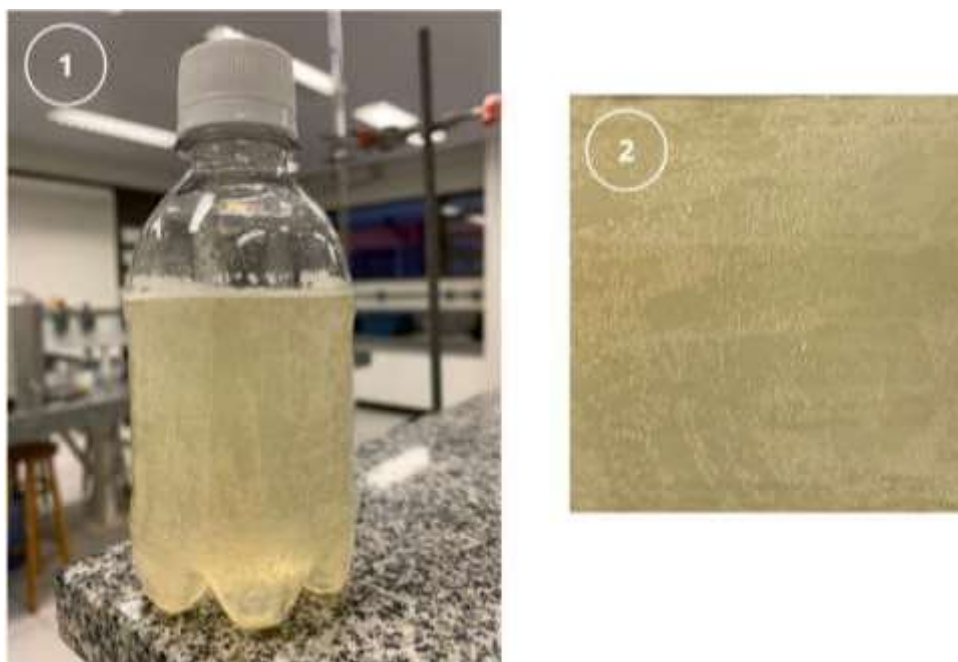


Figura 6: Carbonatação forçada. Em (1) kombucha gaseificada artificialmente e lacrada, (2) imagem ampliada das bolhas de CO₂ que foram injetados na bebida

4.5. Análises físico-químicas

4.5.1. pH e acidez volátil

Os parâmetros de pH e acidez volátil foram analisados com o intuito de acompanhar o processo fermentativo. Os valores de pH das amostras foram mensurados através de um medidor de pH MS Tecnopon®, modelo RS 232, previamente calibrado em soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

A acidez volátil foi determinada através da metodologia descrita pelo Mapa (1986) em que foi adicionado 10 ml de amostra em um borbulador e no gerador de vapor do equipamento, e adicionados 250 ml de água destilada. Com o vapor aberto através da torneira, o processo foi levado à ebulição para que ocorresse a eliminação do ar presente no equipamento e, posteriormente, o CO₂ da água destilada. A torneira foi fechada para o vapor pudesse borbular na amostra, o que acarretou no arraste dos ácidos voláteis. Através do condensador anexado ao sistema, foi recolhido 100 ml do destilado que foi titulado com hidróxido de sódio (NaOH) padronizado a uma concentração de 0,01 mol/L na presença de fenolftaleína como indicador, obtendo o resultado expresso em % (p/v) de ácido acético. A equação utilizada para determinação da acidez volátil é expressa por:

$$Av = \frac{Eq \times n \times N}{10 \times V} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

Av - Acidez volátil;

Eq - Equivalente grama de ácido acético (60);

n - Volume gasto na titulação de NaOH em ml;

N - Normalidade da solução de NaOH;

V - Volume da amostra em ml.

Como a acidez volátil é expressa em gramas de ácido acético por 100 ml de amostra, foi necessário converter a unidade para miliequivalentes por litro (mEq/L), unidade expressa na IN n° 41.

4.5.2. Teor alcoólico

4.5.2.1. Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID)

Como a cromatografia gasosa é uma metodologia validada para mensurar o teor alcoólico em kombuchas, a mesma foi realizada com o intuito de comparar os resultados obtidos das amostras com os mesmos obtidos através do equipamento portátil *ABValuer*.

Inicialmente, foi realizado o preparo das amostras a serem analisadas. Em um recipiente de vidro tipo vial, foram adicionados 1 ml de cada amostra acrescidas de uma proporção 1g/L de 4-metil-2-pentanol utilizado como padrão interno, com o auxílio de uma micropipeta automática e, após finalizadas, foram devidamente etiquetadas e identificadas.

Para realizar a análise quantitativa do etanol nas amostras, foi utilizado um GC-FID GC17A Shimadzu com uma coluna Supelco PAG (30 m de comprimento x 0,25 mm de espessura do filme x 0,25 µm de diâmetro interno). Com o auxílio de uma microagulha, 1 µL de cada solução (amostra kombucha + padrão interno) foram injetadas separadamente e diretamente no equipamento.

As taxas de fluxo de gás foram mantidos para todas as análises em: 1 ml/min de gás hélio, utilizado como gás de arraste, 175 ml/min de ar sintético como gás de ignição e manutenção da chama e 20 ml/min de hidrogênio utilizado na chama do detector. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 180 e 200°C, respectivamente. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 35°C por 5 minutos, em seguida, aumentada para 120°C a uma taxa de 10°C/min e mantida por 10 minutos. Repetidamente, a uma taxa de 10°C/min, a temperatura foi aumentada até atingir 180°C, permanecendo por aproximadamente 10 minutos. E por fim, a mesma taxa foi utilizada até alcançar 200°C. O valor de *Split* utilizado neste processo foi 2.0.

Finalizado este processo analítico no cromatógrafo, foi realizada a manipulação dos cromatogramas que foram gerados (em anexos), para quantificar a concentração do composto em identificação, que são expressos em função da retenção dos compostos (FELIZZOLA *et al.*, 2014). Ao utilizar uma solução com concentração conhecida de etanol (1% v/v, a mesma utilizada na calibração do *ABValuer*) e outra contendo apenas o padrão interno, é possível identificar o etanol contido na amostra presente no tempo de retenção apresentado no cromatograma.

A concentração do composto volátil de interesse é calculado a partir dos dados obtidos no cromatograma, utilizando a equação 2:

$$C = \frac{c \times h \times I}{H \times i} \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

C - concentração do composto identificado;

c - concentração do composto na solução padrão de referência; h - área de pico do composto na amostra;

I - área de pico do padrão interno na solução padrão de referência; H - área de pico do composto na solução padrão de referência;

i - área de pico do padrão interno na amostra.

Como os resultados são obtidos em g/ml, converter para uma relação volumétrica (vol. etanol/vol. amostra) foi necessário para comparar os resultados obtidos através do *ABValuer* que são expressos em (% v/v). Portanto, o valor da densidade do etanol e das amostras foram necessários para esta conversão.

4.5.2.2. *ABValuer*

Inicialmente, no equipamento foi conectado uma fonte de alimentação à uma tomada que, após o tempo de aquecimento do sensor de aproximadamente 5 minutos, foi calibrado conforme as instruções disponíveis no manual disponibilizado pelo fornecedor. Foram criados padrões de calibração com concentrações de álcool conhecidas e a medição destes no equipamento que, através de um botão de calibração, ficaram salvos como parâmetro conhecido. A graduação alcoólica para realizar este procedimento foi de 0,0%, 0,2%, 0,5%, 1,0% e 2,0%.

Para mensurar o teor alcoólico das amostras de kombucha que estavam a 22°C, ou seja, mesma condição utilizada na leitura no momento de calibração, foram colocadas 150 ml de amostra acrescidos de uma gota de antiespumante Batfoam SB1 para evitar a formação de espumas durante a medição (ABValuer, 2022). A bomba de ar foi acionada e ao final de 1 minuto programado em um timer, o resultado pôde ser verificado no display. Posteriormente, a amostra foi descartada e o frasco foi higienizado para realizar uma nova medição. Porém, antes de inserir uma nova amostra fez-se necessário colocar 150 ml de água pura e ligar a bomba de ar até que o valor exibido no display apresentasse valores abaixo de 0,03%, para evitar resíduos

de álcool de uma amostra pra outra. Este processo foi necessário em todas as etapas de medição. Na figura 7, pode-se observar um exemplo de uma amostra de kombucha e o seu teor alcoólico expresso no display após o tempo de medição.



Figura 7: Amostra de kombucha analisada através do ABValuer. Em (1) equipamento no momento da medição, em (2) display ampliado com o valor de álcool expresso em %vol e temperatura em °C

4.5.3. Análise estatística

Foram realizadas 5 repetições e todas as análises consideradas em vida de prateleira (30, 60, 90 e 120 dias) foram realizadas em triplicata. Dessa forma, os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, além de comparar as médias de diferentes períodos de armazenamento através da significância estatística em $p \leq 0,05$ por meio de um teste de análise de variância (ANOVA) utilizando o *software Minitab Statistics* e o teste de comparação múltipla de Tukey, para investigar a eficiência da carbonatação forçada em diminuir o teor alcoólico nas amostras de kombuchas, os dados experimentais obtidos foram manipulados pelo *software Minitab Statistics*. As regressões lineares, coeficiente de determinação (R^2) e os gráficos foram produzidos através do *software Graphic prisma*, também foi utilizado para comparar os melhores ajustes encontrados das metodologias em estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação dos valores de pH das amostras de kombucha

A determinação de pH mostrou que ocorreram modificações em ambos os testes. Amostras submetidas à CN tiveram variação de 2,64 a 3,0, enquanto as amostras submetidas à CF, a variação ocorreu entre 2,78 e 3,05. Durante as 4 aferições de pH, as amostras de CF apresentaram valores de pH não diferindo estatisticamente de CN pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) dentro dos intervalos avaliados.

No entanto, houve queda nos valores de pH com o decorrer do tempo de vida de prateleira no ensaio, onde os maiores valores de pH foram obtidos em todos os ensaios a 30 dias e os menores valores foram observados com o decorrer de 120 dias (figura 8 - A). Logo, é possível observar que o tempo em dias é um fator de variação para a redução do pH, como nos mostram as equações de regressão linear tanto para CN, quanto para CF (Figura 9 - B-C).

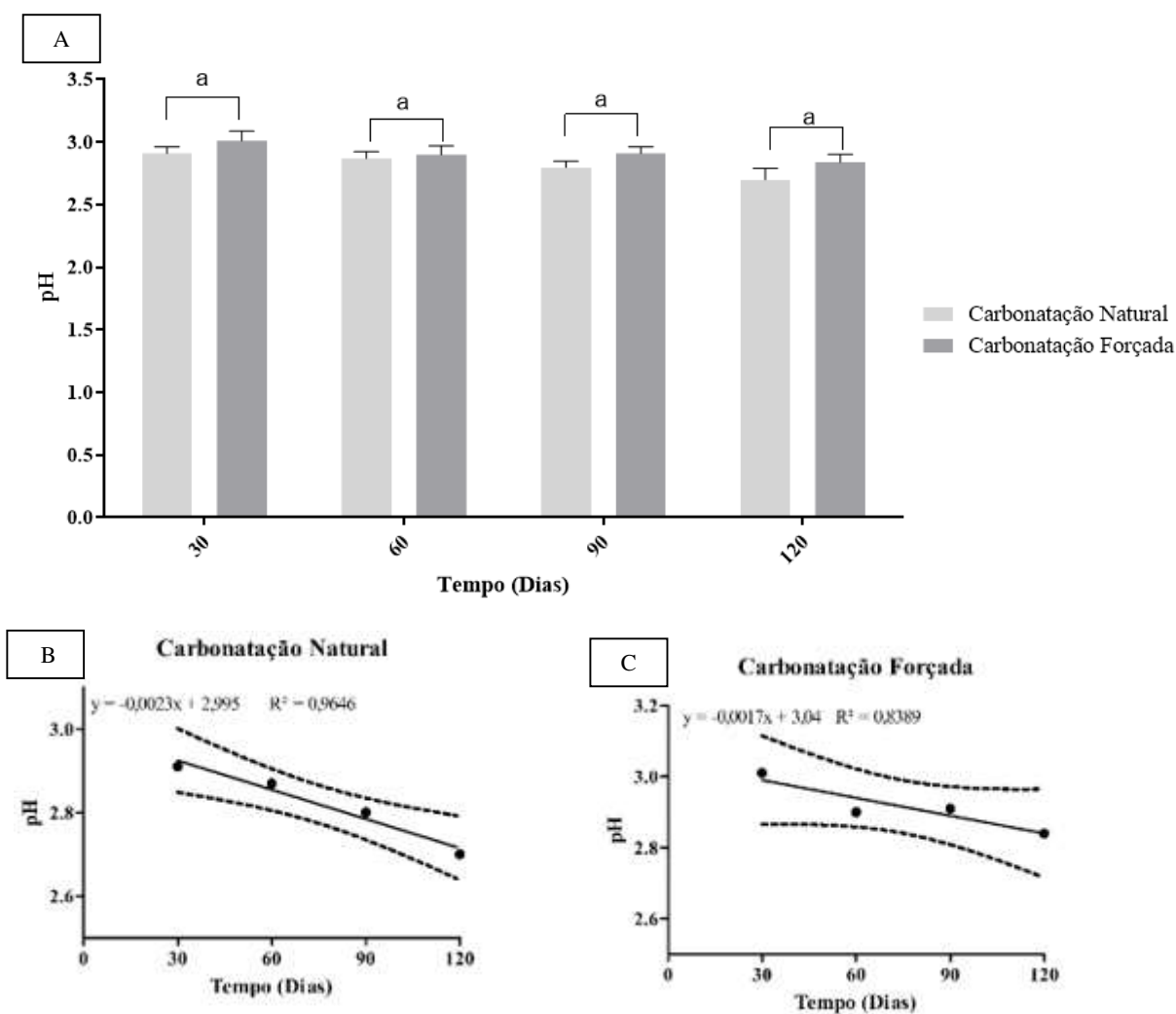


Figura 8 - Determinação do pH em amostras de kombuchas em vida de prateleira em

Carbonatação forçada (CF) e natural (CN). **A)** Variação do pH da kombucha em Dias, em carbonatação natural e carbotação forçada. Letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). **B)** regressão linear de amostras submetidas à CN e **C)** regressão Linear de amostras submetidas à CF.

O pH final das amostras estão na faixa aceitável e seguro para o consumo humano, logo pode-se observar que os todos valores obtidos de pH estão dentro dos limites aceitáveis para kombuchas, tanto nas amostras submetidas à CN, quanto à CF (figura 8 B e C). (VOIDAROU *etal.* 2020; LA TORRE, 2021).

A variação do pH nas condições fermentativas testadas mostra que provavelmente na vida de prateleira o pH diminui devido à produção de ácidos orgânicos, como o ácido acético, que são produzidos durante a fermentação, e o ideal é que estes valores não ultrapassem o limite mínimo de 2,0 para garantir que a bebida esteja agradável sensorialmente e evitar problemas gastrointestinais. O valor ideal e seguro deste parâmetro deve ser entre 2,5 – 4,2, em âmbitos microbiológicos.

Resultados semelhantes são encontrados em processos fermentativos com o decorrer do tempo de prateleira. Nummer (2013) apontou uma variação do pH em kombuchas de 5 tipos de até 2,5 após sete dias de vida de prateleira, da mesma forma Chakravoty *et al.*, (2016) obteve resultados onde o pH diminuiu de 5,03 em período inicial de análise e até 2,5 após sete dias de fermentação. Resultados semelhantes foram relatados por Amarasinghe *et al.*, (2016) em que o pH diminuiu de 5,6 para 3,6 na primeira semana (7 dias) de fermentação na amostra controle.

Durante a fermentação, as leveduras e/ou algumas bactérias convertem os açúcares presentes na bebida em etanol que é metabolizado em ácido acético (LAURESYS *et al.*, 2020). Esse processo de conversão pode resultar em um aumento ou diminuição do pH, dependendo das condições de fermentação. (JAFARI *et al.*, 2021).

Qualquer alteração nas condições de fermentação pode afetar as características organolépticas e físico-químicas do produto final, alterando condições físico-química das bebidas (TRAN, 2020).

5.2. Determinação da acidez volátil das amostras de kombucha

As amostras testadas apresentaram aumento na acidez ao longo da fermentação durante o ensaio. Os valores de acidez sofreram variações na CN, que foi de 36,14 mEq/L até 58,85 mEq/L; na CF 37,53 mEq/L até 59,5 mEq/L. As regressões lineares mostram que ao decorrer

do tempo os valores de acidez aumentaram linearmente (figura 9 – B e C).

Dentro dos períodos analisados não ocorreram diferenças significativas entre a variação da acidez entre CN e CF pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (figura 9 - A). Quando comparadas, pode-se perceber que ao decorrer do ensaio as variações de acidez para CN e CF não obtiveram diferenças dentro de cada período de leitura em 30, 60, 90 e 120 dias.

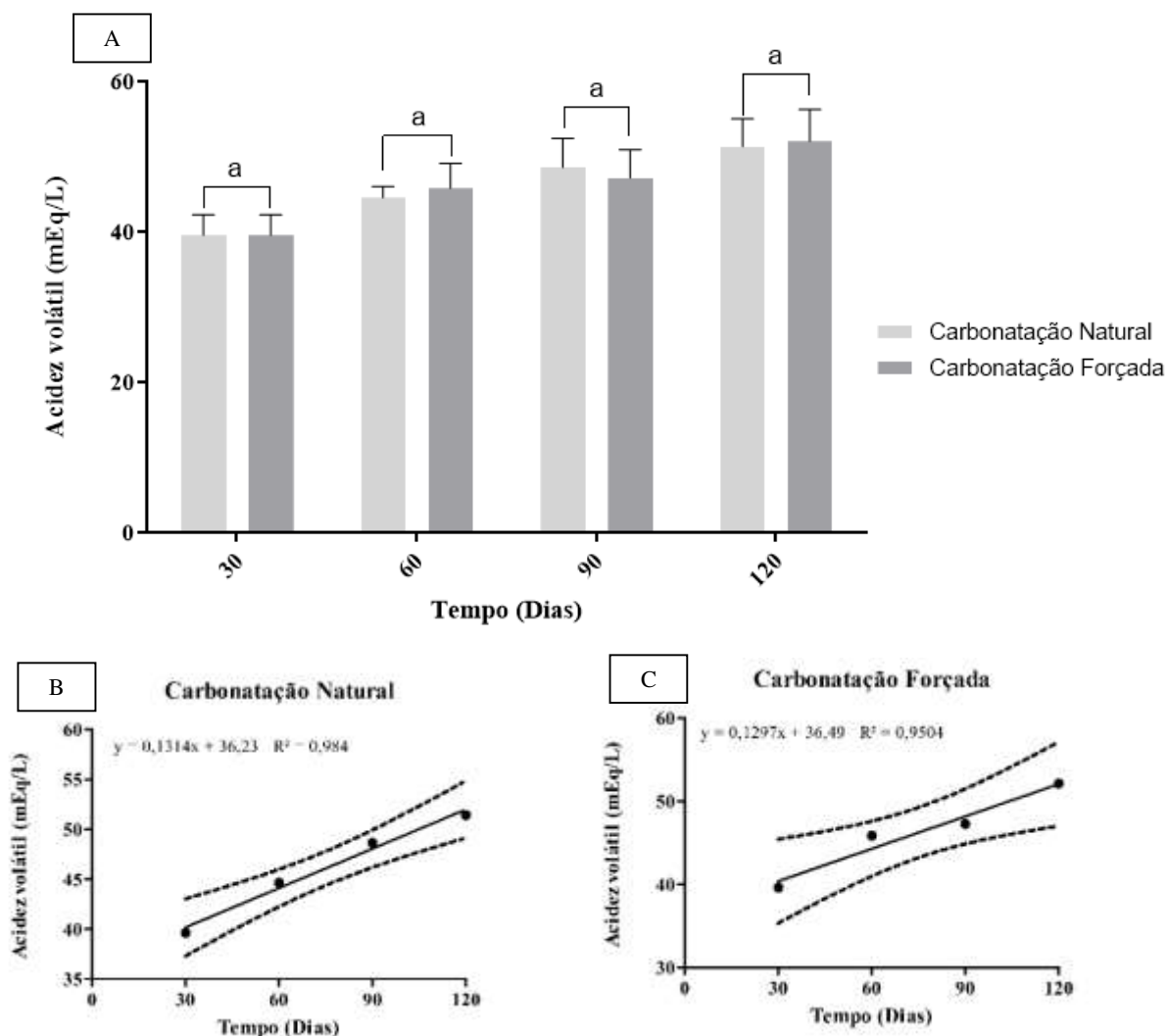


Figura 9- Determinação da acidez volátil em amostras de kombuchas em vida de prateleira em Carbonatação forçada (CF) e natural (CN). **A)** Acidez volátil em amostras de kombuchas em vida de prateleira. Letras iguais demonstram que não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no período analisado. **B)** Regressão linear da acidez volátil em amostras submetidas à CN e **B)** Regressão linear da acidez volátil em amostras submetidas à CF.

O aumento da acidez em kombuchas se dá pela produção de ácido acético e outros ácidos

orgânicos que são formados através das bactérias e leveduras do SCOBY que utilizam metabólitos (glicose e frutose) como fonte de nutrientes (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; TORÁN-PEREG *et al.*, 2021). Este aumento pode ser observado na figura 9, onde estão apresentados os valores da acidez volátil em vida de prateleira tanto em amostras submetidas à CN quanto à CF. Resultados semelhantes foram obtidos por TRAN e colaboradores (2020) ao avaliarem a dinâmica microbiana entre leveduras e bactérias do Ácido Acético em kombucha. A acidez volátil é um parâmetro que tem como limite instituído pela IN n° 41 entre 30 – 130 (mEq/L) e as amostras analisadas em vida de prateleira apresentaram valores satisfatórios dentro deste intervalo (BRASIL, 2019), logo os valores se encaixam dentro dos estabelecidos em legislação.

Diversos fatores podem influenciar nos valores da acidez volátil, principalmente quando é adicionado outros componentes na segunda fermentação provenientes de fontes de sacarose, como frutas e especiarias que favorecem a fermentação contínua (SUHRE, 2020), porém, neste experimento foram produzidos somente amostras com sabor natural.

Ainda foi possível observar uma proporcionalidade inversa entre pH e acidez volátil (Figura 8 – A e 9 – A) em que, enquanto o pH diminuiu com o decorrer do ensaio, a acidez volátil aumentou, como era de se esperar. Assim, os parâmetros utilizados para a fermentação podem influenciar a quantidade de acidez volátil produzida, e é por isso que a este parâmetro pode variar entre diferentes bebidas fermentadas, dependendo do tipo de fermentação utilizada e das condições de fermentação.

5.3. Avaliação do ABValuer

Os resultados encontrados mostraram proximidade nos valores obtidos pelas metodologias utilizadas, tanto nas amostras submetidas à CN, quanto nas amostras submetidas a CF, nos mostrando que a metodologia *ABValuer* obteve resultados que se equiparam a metodologias utilizadas para avaliação de teor alcoólico, como a própria GC-FID, (figura 10 A e B). As regressões Lineares mostram que as duas metodologias seguem conformações linear e similares (figura 11).

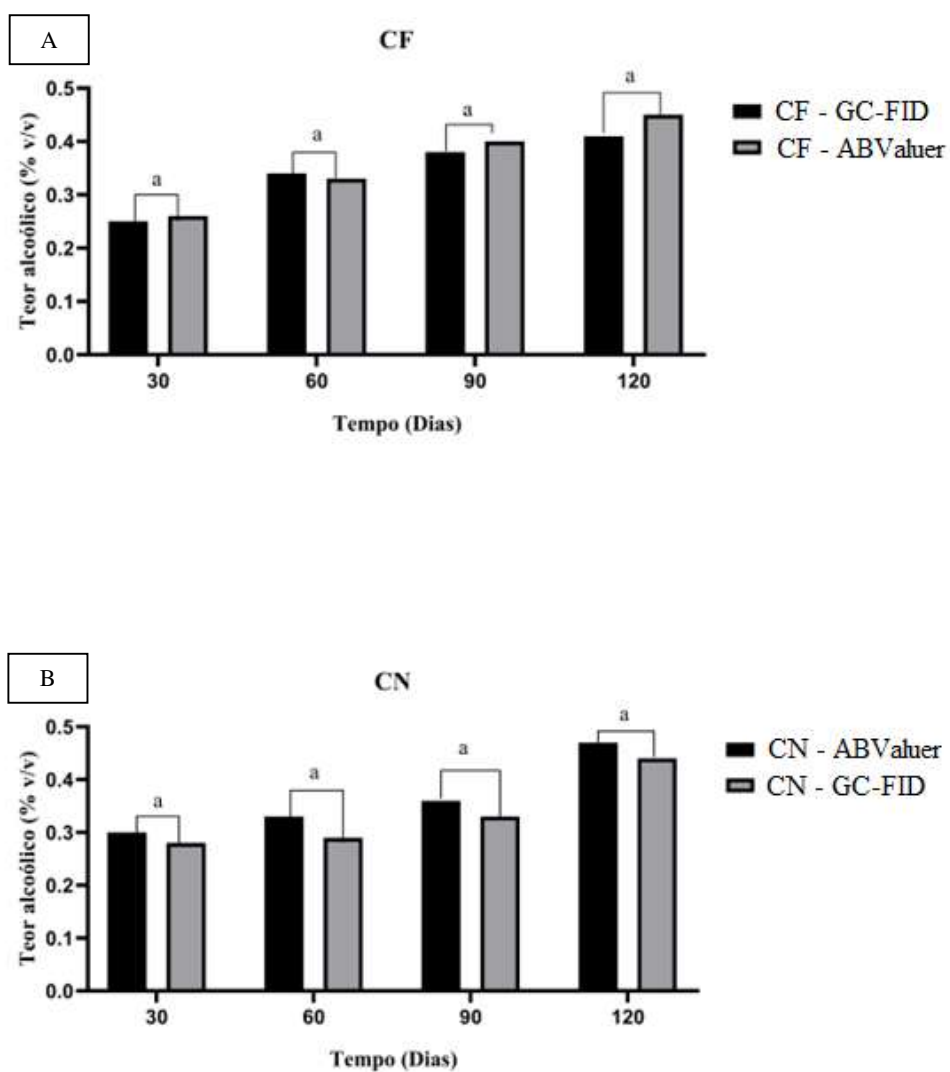


Figura 10: Comparação entre as metodologias GC-FID e *ABValuer*, com relação ao teor alcoólico em dias de vida de prateleira em A) Carbonatação forçada e B) Carbonatação natural, letras diferentes diferem pelo teste de Tukey e 95% de confiança.

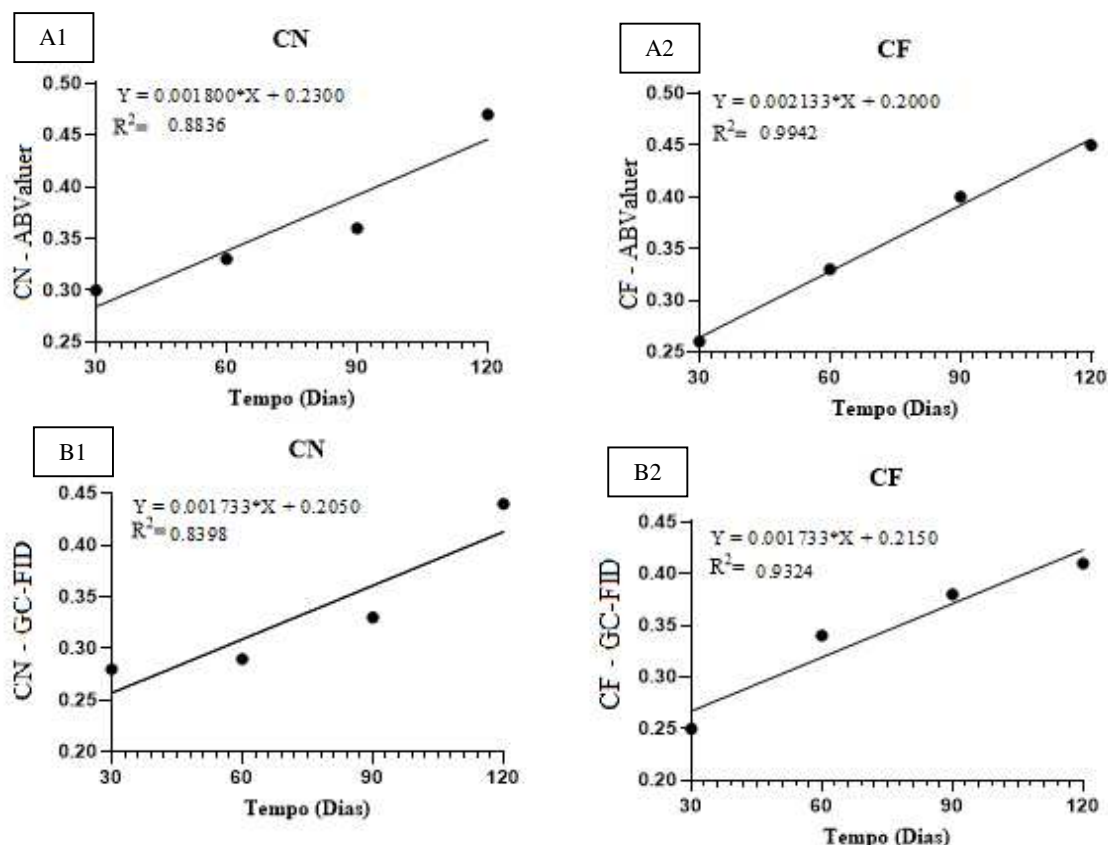


Figura 11: Comparação dos valores do teor alcoólico obtidos entre as duas metodologias em Regressão Linear. Em (A1) amostras submetidas à CN em *ABValuer*, (A2) amostras submetidas à CF em *ABValuer*. (B1) amostras submetidas à CN em GC - FID e (B2) amostras submetidas à CF em GC - FID .

Nas amostras observadas, como exemplo GC-FID à CN (figura 11 A1), cerca de 83,98% da variação dos valores obtidos por GC-FID pode ser explicado por uma relação linear em relação aos obtidos pelo *ABValuer*. Os demais 1,82% podem ser considerados como uma variação provocada por outros fatores não considerados no modelo (BARBETTA; REIS; BORNIA 2008).

Valores próximos de 1 apontam que o modelo proposto é adequado para descrever o processo, sendo assim, os valores encontrados em estudo em (A) e (B) foram satisfatórios, podendo-se considerar o *ABValuer* como uma metodologia capaz de mensurar níveis de álcool abaixo de 0,5% (v/v) (PETERNELLI, 2004). Todos os valores de álcool encontrados estão dentro dos limites estabelecidos pela IN n° 41.

5.4. Controle de teor alcoólico de Kumbucha por carbonatação Forçada

De acordo com os testes anteriores, o *ABValuer* é uma metodologia capaz de mensurar níveis confiáveis de álcool menores que 0,5% (v/v), portanto, ele foi utilizado para acompanhar

o teor alcoólico de todo o processo de vida de prateleira das amostras submetidas à carbonatação natural e forçada.

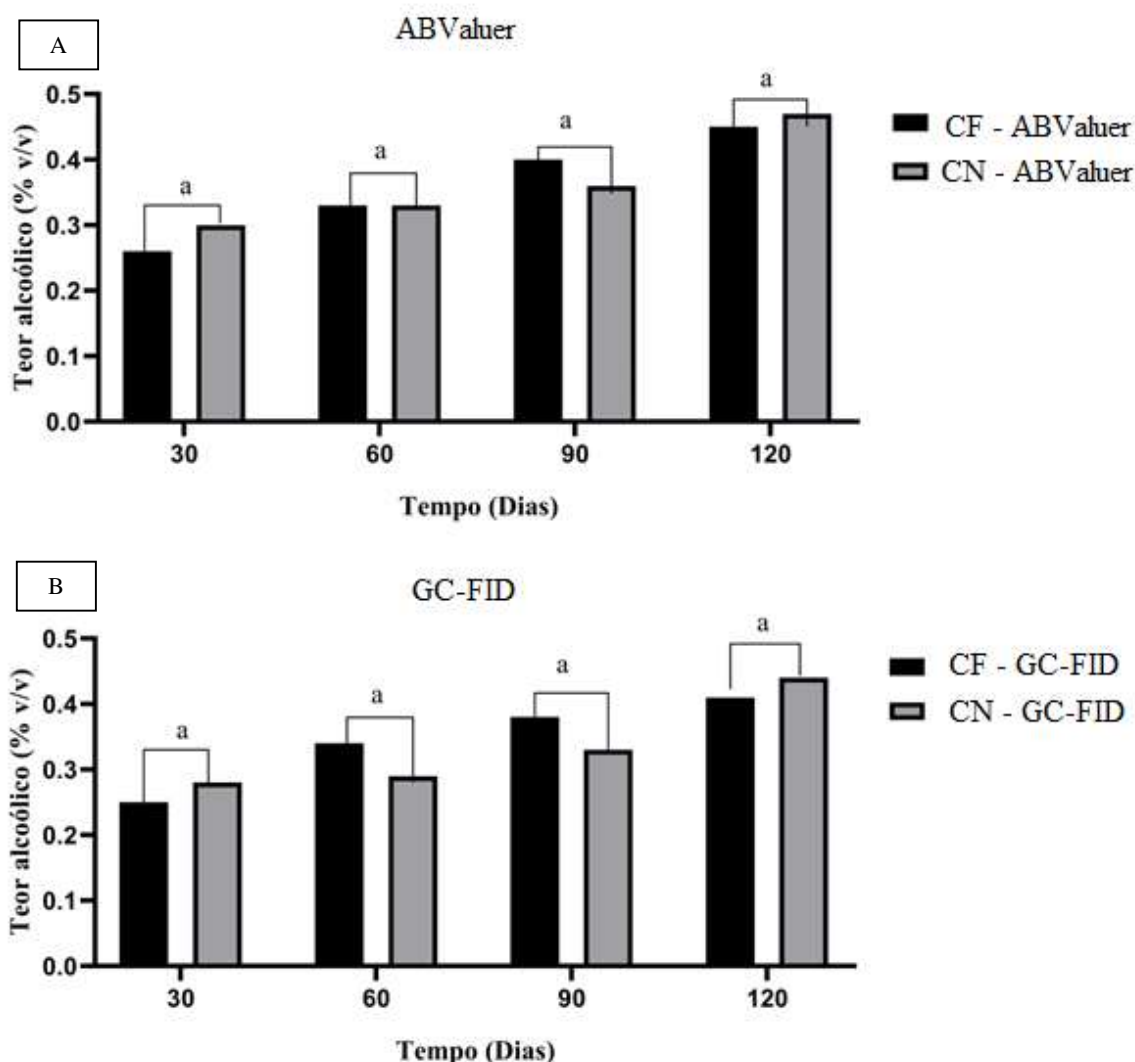


Figura 12 - Comparação de teor alcoólico entre C.N. e C.F. A) pelo método ABValuer e B) pelo método GC-FID; letras diferentes diferem pelo teste de Tukey e 95% de confiança.

A Comparação de teor alcoólico entre C.N. e C.F pelo método ABValuer (Figura 11 – A) e pelo método GC-FID (Figura 11 – B), não apresentou diferença significativa entre os métodos de fermentação em dentro das metodologias avaliadas. As regressões lineares das duas formas de carbonatação mostram um aumento do teor alcoólico com o decorrer do tempo de prateleira, no entanto esse teor continua abaixo de 0,5% em ambos os tratamentos (figura 11 A e B).

Chan *et al.*, (2021) utilizaram um método Headspace GC-MS (SLV) que foi otimizado para a quantificação de etanol em kombucha, apresentando resultados de leituras semelhantes

aos encontrados neste trabalho, da mesma forma os resultados de Sours e Bezabeh (2021) com o método HS-GC–MS que fornece determinação confiável de concentrações de etanol (% v/v ou % peso/peso) em uma variedade diversificada de amostras de produtos de consumo dentre elas a kombucha.

A CF é uma metodologia citada por diversos autores como uma alternativa à segunda fermentação capaz de diminuir o teor alcoólico de kombuchas após à sua refrigeração. Porém, neste estudo, pode-se identificar que os valores obtidos da metodologia não foram satisfatórios para as amostras produzidas com sabor natural, apresentando valores superiores às amostras submetidas a CN. Provavelmente as condições de pressão, CO₂, as concentrações de açúcar, pH, favoreceram esse resultado. Portanto, é válido analisar a metodologia em kombuchas em que são adicionados sabor na segunda fermentação para averiguar se realmente é eficiente para diminuir o teor alcoólico, visto que, quando é dado sabor por meio de frutas ou sacarose, pode ocorrer o aumento do teor alcoólico.

6. CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos através das análises avaliadas neste estudo, foi possível concluir que foram produzidas amostras de kombucha com todos os parâmetros analíticos dentro dos limites estabelecidos pelo MAPA contidos na IN n° 41 durante a vida de prateleira de 120 dias, além de qualificar um equipamento portátil para mensurar níveis de álcool abaixo de 0,5% (v/v) e que, por fim, a carbonatação forçada no presente estudo, não foi uma alternativa eficiente para diminuir o teor alcoólico do produto em vida de prateleira. A carbonatação forçada apresentou maiores níveis de teor alcoólico quando comparada com a carbonatação natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACI, N.; DENIZ, F. S. S.; ORHAN, I. E. Kombucha—An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. **Food Chemistry: X**, v. 14, p. 100302, 2022.

ABU-REIDAH, I. M. Carbonated beverages. **Trends in non-alcoholic beverages**, p. 1-36, 2019.

AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food science & nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.]

ANAGIMOTO, K. E. Y. et al. Antioxidative Activities of Volatile Extracts from Green Tea, Oolong Tea , and Black Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7396–7401, 2003.

ASPIYANTO et al. Characteristic of Fermented Spinach (*Amaranthus spp.*) Polyphenol by Kombucha Culture for Antioxidant Compound. **Research Center for Chemistry**, v. 020018, n. 1, 2017.

BISHOP, P. et al. Kombucha : Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100025, 2022.

BRUSCHI, S.; CRISTINA, R.; MODESTO, K. R. O RESSURGIMENTO DO CHÁ DE KOMBUCHA. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 1, n. Esp, p. 162–168, 2018.

CABRAL, E. D.; PAULA, S. M. P. DE. ELABORAÇÃO DE KOMBUCHAS ARTESANAIS À BASE DE CHÁ VERDE: ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA. **FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE**, p. 1–22, 2021.

CALIX, T. F.; FERRENTINO, G.; BALABAN, M. O. Measurement of high-pressure carbon dioxide solubility in orange juice, apple juice, and model liquid foods. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 439–445, 2008.

CARDOSO, R. R. et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, p. 108782, 2020.

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

CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha: a promising functional beverage prepared from tea. In: **Non-alcoholic beverages**. Woodhead Publishing,. v. 6, p. 285-327, 2019.

CHAN, M. et al. Determination of ethanol content in kombucha using headspace gas chromatography with mass spectrometry detection: Single-laboratory validation. **Journal of AOAC International**, v. 104, n. 1, p. 122-128, 2021.

CHANTASIRIWAN, S. Distribution of juice heater surface for optimum performance of

evaporation process in raw sugar manufacturing. **Journal of Food Engineering**, v. 195, p. 21–30, 2017.

COELHO, R. M. D. et al. International Journal of Gastronomy and Food Science Kombucha : Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, p. 100272, 2020.

DE FILIPPIS, F. et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11–16, 2018.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea , Kombucha , and health : a review. **Food Research International**, v. 33, p. 400–421, 2000.

EBERSOLE, B. et al. Determination of Ethanol in Kombucha Products: Single-Laboratory Validation, First Action 2016.12, **Journal of AOAC International**, v. 100 n. 3, p. 732–736, 2017.

FELIZZOLA, J. F. et al. Passo a Passo para o Uso do Cromatógrafo Gasoso Modelo GC-CP3800 Varian para Análises de Gases de Efeito Estufa (GEEs). **Embrapa Amazônia Orienta**, p. 1–70, 2014.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. O que realmente significa o valor-p? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 485–485, 2015.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha , the Fermented Tea : Microbiology , Composition , and Claimed Health Effects. **Journal of food protection**, v. 63, n. 7, p. 976–981, 2000.

GU, H. W. et al. Geographical origin identification and chemical markers screening of Chinese green tea using two-dimensional fingerprints technique coupled with multivariate chemometric methods. **Food Control**, v. 135, p. 108795, 2022.

HE, G. et al. Discrimination and polyphenol compositions of green teas with seasonal variations based on UPLC-QTOF/MS combined with chemometrics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 105, p. 104267, 2022.

IVORY, R. et al. Determination of Ethanol Concentration in Kombucha Beverages: Single-Laboratory Validation of an Enzymatic Method, First Action Method 2019.08. **Journal of AOAC International**, v. 104, n. 2, p. 422–430, 2021.

JAYABALAN, R. et al. A Review on Kombucha Tea — Microbiology , Composition , Fermentation , Beneficial Effects , Toxicity , and Tea Fungus. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014.

JAFARI, R. et al. Kombucha iniciador microbiano com produção aumentada de compostos antioxidantes e invertase. **Biocatálise e Biotecnologia Agrícola** , v. 29, p. 101789, 2020.

JÚNIOR, J. C. S. et al. Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 360–365, 2022.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Annals of Epidemiology Brief communication Kombucha : a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70, 2019.

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 2020.

LA TORRE, C. Efeitos do armazenamento a longo prazo nas propriedades de eliminação de radicais e no conteúdo fenólico do Kombucha do chá preto. **Moléculas**, v. 26, n. 18, pág. 5474, 2021.

LAUREYS, David; BRITTON, Scott J.; DE CLIPPELEER, Jessika. Kombucha tea fermentation: A review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 3, p. 165-174, 2020.

LIU, W. et al. Authentication of the geographical origin of Guizhou green tea using stable isotope and mineral element signatures combined with chemometric analysis. **Food Control**, v. 125, p. 107954, 2021.

MACEDO, R. et al. International Journal of Gastronomy and Food Science Kombucha : Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, n. October, p. 100272, 2020.

MALBAŠA, R. et al. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 926–932, 2008.

MCINTYRE, L. A STUDY OF ALCOHOL LEVELS IN KOMBUCHA PRODUCTS IN BRITISH COLUMBIA PREPARED BY: A STUDY OF ALCOHOL LEVELS IN KOMBUCHA PRODUCTS IN BRITISH COLUMBIA. **BC CENTRE FOR DISEASE CONTROL**, p. 30, 2020.

MCMAHON, K. M. et al. The production and consumer perception of sparkling wines of different carbonation levels. **Journal of Wine Research**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2017.

MIRANDA, J. F. DE et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503–527, 2022.

MORAIS, C. **Descrição, análise e interpretação de informação quantitativa**: Escalas de medida, estatística descritiva e inferência estatística. 2005. Disponível em: <<http://www.ipb.pt/~cmmm/discip/ConceitosEstatistica.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2023.

MORIAUX, A. et al. Monitoring gas-phase CO₂ in the headspace of champagne glasses through combined diode laser spectrometry and micro-gas chromatography analysis. **Food Chemistry**, v. 264, p. 255–262, 2018.

NUMMER, B. A. RELATÓRIO ESPECIAL: Kombucha fermentando sob o Código Alimentar Modelo Food and Drug Administration: Análise de risco e orientação de processamento. **Revista de saúde ambiental**, v. 76, n. 4, p. 8-11, 2013.

ORTIZ, A. L. P. P. et al. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE

KOMBUCHAS COMERCIAIS. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 3, n. 12, p. e3122396-e3122396, 2022.

PALUDO, N. Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO**, p. 1–47, 2017.

POHL, P.; SZYMZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M. Direct ICP-OES multielement analysis of infused black and green teas and chemical fractionation of selected essential and non-essential elements prior to evaluation of their bioavailability and classification of teas by pattern recognition. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1955–1965, 2020.

PRIYADHARSHINI, T. et al. Machine learning prediction of SCOBY cellulose yield from Kombucha tea fermentation. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, p. 101027, 2022.

RICHTER, S. J.; MCCANN, M. H. Using the Tukey-Kramer omnibus test in the Hayter-Fisher procedure. **British Journal of Mathematical and Statistical Psychology**, v. 65, n. 3, p. 499–510, 2012.

SANTANA, S. DE S. V. REVISÃO ACERCA DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHA E O. **Centro Universitário Estadual da Zona Oeste**, p. 49, 2019.

SANTOS, Y. M. A. et al. HIBISCO E PRETO CHEMICAL CHARACTERIZATION OF KOMBUCHA BASED ON HIBISCUS AND Yasmim Maria Azevedo Santos 1 ; Gerla Castello Branco. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 3, p. 0–5, 2018.

SIEVERS, M. et al. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation ~ : -. **Systematic and applied microbiology**, v. 18, n. 4, p. 590–594, 1995.

SOARES, M. G.; DE LIMA, M.; SCHMIDT, V. C. R. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, p. 539–550, 2021.

SONG, X. et al. A Guide to Carbonating Beverages at Small Scale 1 Carbonation Methods : Forced Carbonation. **University of Florida**, p. 1–5, 2020.

SOURS, Ryan E.; BEZABEH, Dawit Z. A Static Headspace GC–MS Method for the Determination of Ethanol in Solid or semi-solid Consumer Goods. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 12, p. 2569-2575, 2021.

SUHRE, T. Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO**, p. 1–64, 2020.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119–126, 2004.

TORÁN-PEREG, P. et al. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY

for culinary applications. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 23, 2021.

TRAN, T. et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2050–2070, 2020.

TRAN, T. et al. Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: impacts on the chemical composition of the beverage. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 963, 2020.

VICK, O.; BRANAN, B. ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANTS IN HOMEMADE VS . COMMERCIAL KOMBUCHA. **Journal of Undergraduate Chemistry Research** v. 21, n. 3, p. 74–80, 2022.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation : A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 83, n. 3, 2018.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 44–54, 2019.

VITAS, J. S. et al. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 95–102, 2018.

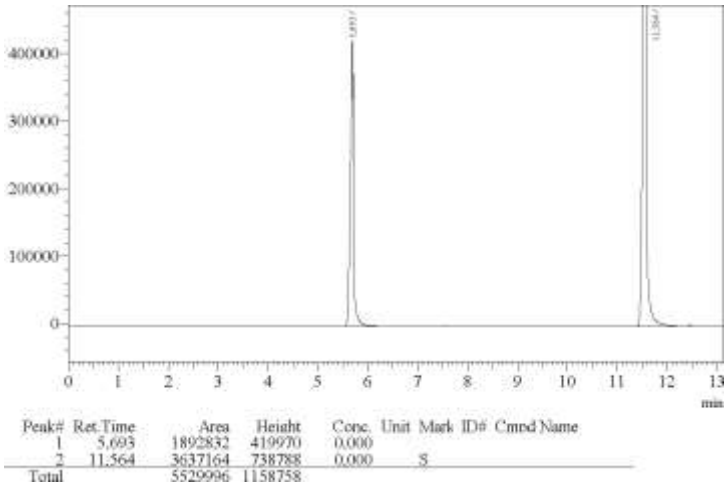
VOIDAROU, C. et al. Alimentos fermentativos: Microbiologia, bioquímica, potenciais benefícios para a saúde humana e questões de saúde pública. **Alimentos**, v. 10, n. 1, p. 69, 2020.

XU, C. et al. Studies of quality development and major chemical composition of green tea processed from tea with different shoot maturity. **Lwt**, v. 142, p. 111055, 2021.

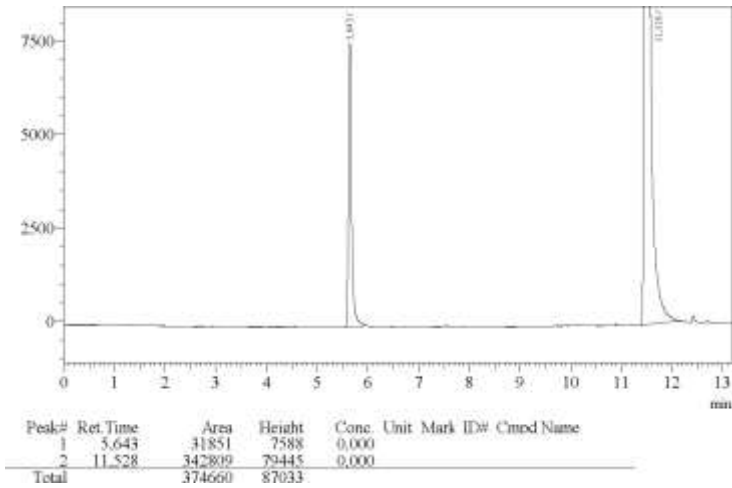
YE, N. S. A minireview of analytical methods for the geographical origin analysis of teas (*Camellia sinensis*). **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 9, p. 775–780, 2012.

ANEXOS

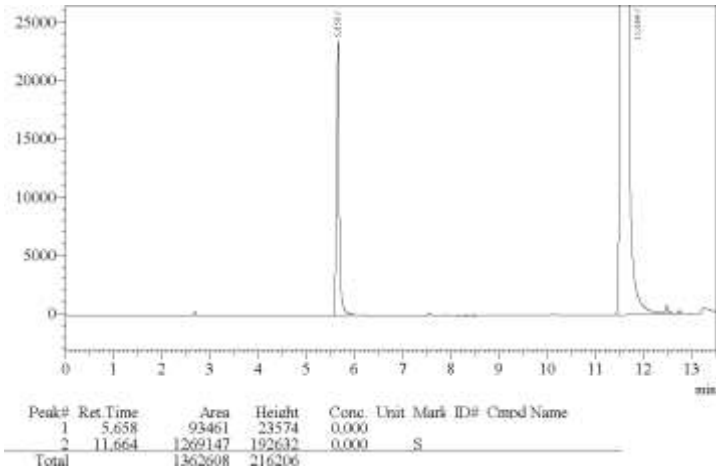
Cromatograma 1 – Concentração conhecida de etanol (1%)



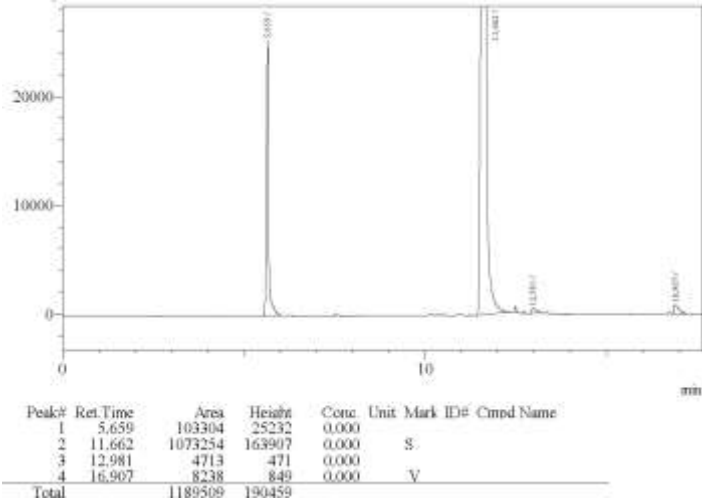
Cromatograma 2 – K4 submetida à CN em 30 dias



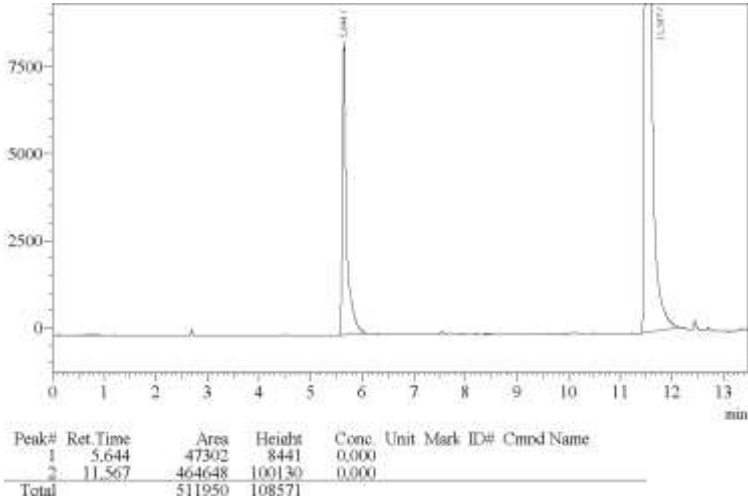
Cromatograma 3 – K4 submetida à CF em 30 dias



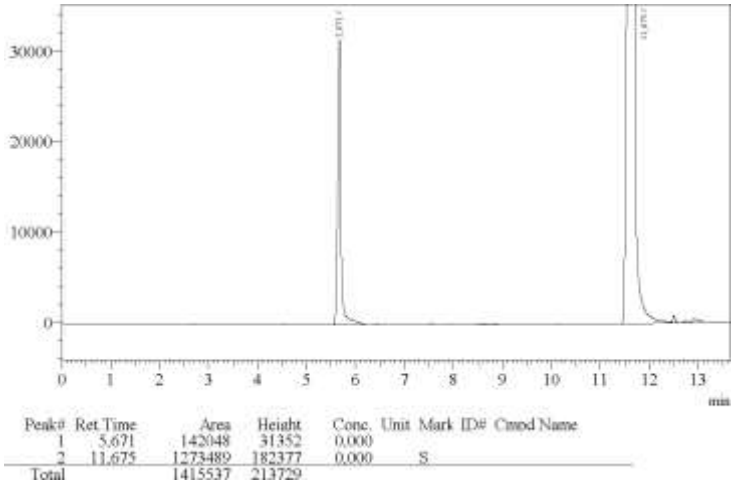
Cromatograma 4 - K4 submetida à CN em 60 dias



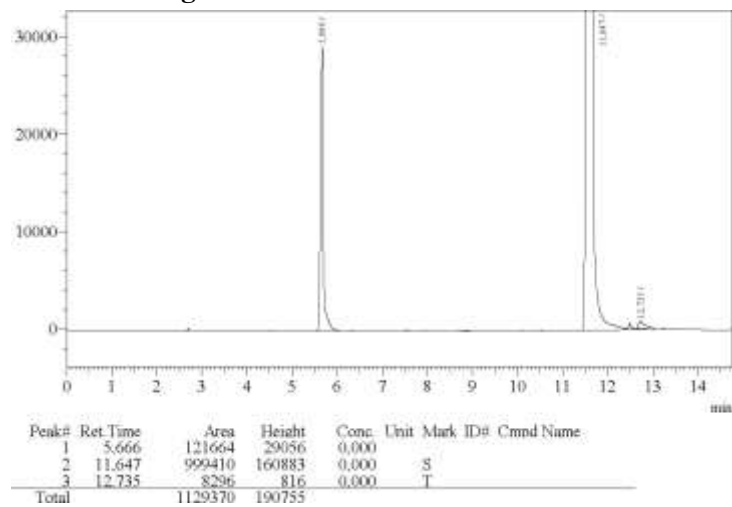
Cromatograma 5 - K4 submetida à CF em 60 dias



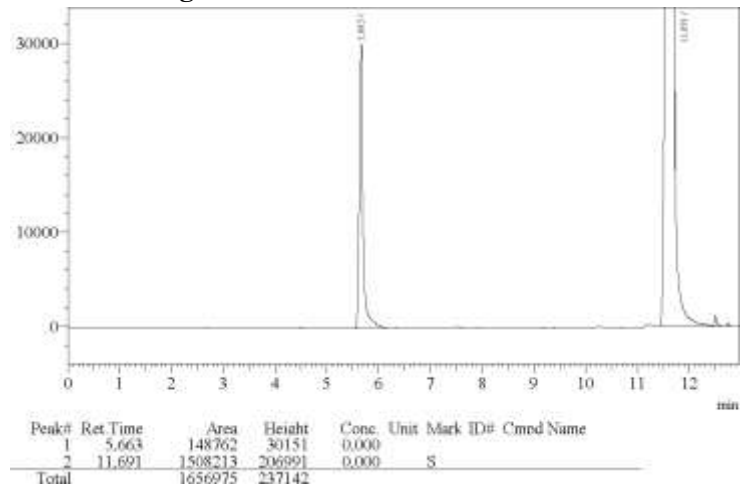
Cromatograma 6 - K4 submetida à CN em 90 dias



Cromatograma 7 - K4 submetida à CF em 90 dias



Cromatograma 8 - K4 submetida à CN em 120 dias



Cromatograma 9 - K4 submetida à CF em 120 dias

