



PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

**O QUE CARACTERIZA A BEBIDA KOMBUCHA?
UMA COMPARAÇÃO ENTRE INFUSÃO DE CHÁ VERDE E
CAFÉ ARÁBICA FERMENTADAS POR CULTURA
SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS
(*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts - SCOBY*)**

LAVRAS – MG

2024

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

O QUE CARACTERIZA A BEBIDA KOMBUCHA?
UMA COMPARAÇÃO ENTRE INFUSÃO DE CHÁ VERDE E CAFÉ ARÁBICA
FERMENTADAS POR CULTURA SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS
(Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts - SCOBY)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias
Coorientador

Profa. Dr. Karina Teixeira Magalhães Guedes
Coorientadora

LAVRAS – MG

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Costa Júnior, Paulo Sérgio Pedroso.

O que caracteriza a bebida kombucha? Uma comparação entre
infusão de chá verde e café arábica fermentadas por cultura
simbiótica de bactérias e leveduras (*Symbiotic Culture of Bacteria
and Yeasts - SCOBY*) / Paulo Sérgio Pedroso Costa Júnior. - 2023.
81 p. : il.

Orientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Coorientador(a): Disney Ribeiro Dias, Karina Teixeira
Magalhães Guedes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. Bebida Funcional. 2. Ácidos Orgânicos. 3. Celulose
Bacteriana. I. Schwan, Rosane Freitas. II. Dias, Disney Ribeiro. III.
Guedes, Karina Teixeira Magalhães. IV. Título.

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

**O QUE CARACTERIZA A BEBIDA KOMBUCHA? UMA COMPARAÇÃO ENTRE
INFUSÃO DE CHÁ VERDE E CAFÉ ARÁBICA FERMENTADAS POR CULTURA
SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS (*Symbiotic Culture of Bacteria and
Yeasts* - SCOBY)**

**WHAT CHARACTERIZES THE KOMBUCHA BEVERAGE? A COMPARISON
BETWEEN GREEN TEA AND ARABIC COFFEE INFUSIONS FERMENTED FROM
SYMBIOTIC CULTURE OF BACTERIA AND YEASTS (SCOBY)**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 28 de fevereiro de 2023.

Dra. Cíntia Lacerda Ramos	UFVJM
Dr. Dirceu de Sousa Melo	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Nádia Nara Batista	UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

LAVRAS – MG

2024

À minha amada sobrinha, Helena Dias, cuja doçura e alegria me inspiram a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela dádiva da vida.

Agradeço aos meus pais, Luisa Dias e Paulo Sérgio, pelo amor incondicional e pelo incentivo aos estudos, que foram fundamentais para a minha formação acadêmica.

Agradeço aos meus irmãos, Ana Paula e Lucas, pela torcida e apoio inabaláveis, que sempre me motivaram a seguir em frente.

Agradeço à minha sobrinha, Helena, por trazer alegria e luz aos meus dias.

Agradeço a toda a minha família, em especial Murilo, Luciano e Tereza, pelo carinho e exemplo de respeito e dedicação.

Agradeço à minha orientadora, Rosane Freitas Schwan, pela confiança, paciência, conselhos e oportunidades oferecidas, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço aos meus co-orientadores, Dr. Disney Ribeiro Dias e Dra. Karina Teixeira Magalhães Guedes, pelo apoio e sugestões valiosas durante todo o processo.

Agradeço aos professores e pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em especial à professora Cristina, e às pós-docs Angélica e Nádia, pelos ensinamentos preciosos e pela contribuição ao meu aprendizado.

Agradeço aos colegas de laboratório, em especial à Andreísa e Pâmela, pela troca de experiências, ajuda mútua e amizade, que tornaram a jornada mais leve e prazerosa.

Agradeço à equipe técnica do laboratório, Cidinha, Dirceu e Ivani, pela assistência e cuidado dedicados à minha pesquisa.

Agradeço aos moradores e agregados da república Homo Sapiens, em especial Bruno, Diogo, Gabriel, Laura e Marcos, por me acolherem e me fazerem sentir em casa durante todo o período em que estive em Lavras.

Agradeço aos amigos e amigas que me acompanharam durante a trajetória do doutorado, em especial Tiago, Erika, Jiscele e Ruanna, pelo carinho, apoio e torcida.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realizar o curso de doutorado e pelos recursos e infraestrutura oferecidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, que é o resultado de uma construção coletiva e colaborativa.

Muito obrigado!

“A persistência é o caminho do êxito.” (Charles Chaplin)

RESUMO

Kombucha é uma bebida não alcoólica, tradicionalmente obtida pela fermentação do chá adoçado de *Camellia sinensis* por um biofilme formado de bactérias e leveduras (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts* – SCOBY). A popularidade da bebida tem crescido devido à sua disponibilidade em diferentes sabores, no entanto, ainda existem lacunas no conhecimento sobre a dinâmica da fermentação e os metabólitos produzidos durante o processo fermentativo do Kombucha preparado com diferentes matérias-primas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar o perfil físico-químico, microbiológico e cromatográfico de Kombucha utilizando infusão de café arábica para a primeira fermentação. Diferentes concentrações de infusão de café (25-100% v/v) foram testadas, com chá verde como tratamento controle. Após 14 dias de fermentação à temperatura ambiente, foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas (pH, °Brix, acidez total, cor instrumental), compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana, além da quantificação de carboidratos, etanol e ácidos orgânicos por HPLC e compostos voláteis por GC-MS. A bebida e o SCOBY apresentaram altas populações de bactérias do ácido lático (5,0 e 8,4 log UFC/mL, respectivamente), correlacionadas com o aumento da concentração de café. As fermentações com café apresentaram alterações físico-químicas semelhantes ao controle, com redução do pH (3,4-4,0) e do teor de sacarose (37,4-84%), com acidez total ideal (~0,4%) para kombucha. Um total de 111 compostos voláteis orgânicos foi detectado, incluindo álcoois, ésteres, ácidos, aldeídos e cetonas. A concentração de álcool residual (0,05-0,09% v/v) estava dentro do limite legal ($\leq 0,5\%$ v/v). A diferença total de cor entre os tempos inicial e final variou de 2,28 a 16,15, indicando influência da fermentação na cor. Houve tendência de aumento de compostos fenólicos e atividade antioxidante após a fermentação, mais pronunciada com o aumento da concentração de café. Nenhum tratamento apresentou atividade antimicrobiana. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) do SCOBY revelou bactérias e leveduras entre microfilamentos de celulose bacteriana, confirmando a bioatividade do SCOBY em kombucha de café. Este estudo demonstrou a viabilidade da fermentação de kombucha com infusão de café arábica, resultando em bebida com características físico-químicas semelhantes ao controle de chá verde, abrindo novas possibilidades para a indústria de bebidas fermentadas.

Palavras-chave: bebida funcional; ácidos orgânicos; celulose bacteriana; GC-MS; HPLC.

ABSTRACT

Kombucha is a non-alcoholic beverage traditionally obtained by fermenting sweetened *Camellia sinensis* tea with a biofilm formed by bacteria and yeasts (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts - SCOBY). The popularity of the beverage has grown due to its availability in different flavors, however, there are still gaps in the knowledge about the fermentation dynamics and metabolites produced during the fermentation process of Kombucha prepared with different raw materials. In this sense, the objective of this work was to verify the physicochemical, microbiological and chromatographic profile of Kombucha using Arabica coffee infusion for the first fermentation. Different concentrations of coffee infusion (25-100% v/v) were tested, with green tea as the control treatment. After 14 days of fermentation at room temperature, microbiological, physicochemical (pH, °Brix, total acidity, instrumental color), phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity, as well as quantification of carbohydrates, ethanol and organic acids by HPLC and volatile compounds by GC-MS were performed. The beverage and the SCOBY presented high populations of lactic acid bacteria (5.0 and 8.4 log UFC/mL, respectively), correlated with the increase in coffee concentration. The coffee treatments presented similar physicochemical changes to the control, with a reduction in pH (3.4-4.0) and sucrose content (37.4-84%), with total acidity ideal (~0.4%) for kombucha. A total of 111 volatile organic compounds were detected, including alcohols, esters, acids, aldehydes and ketones. The residual alcohol concentration (0.05-0.09% v/v) was within the legal limit ($\leq 0.5\%$ v/v). The total color difference between the initial and final times ranged from 2.28 to 16.15, indicating the influence of fermentation on color. There was a tendency to increase phenolic compounds and antioxidant activity after fermentation, more pronounced with increasing coffee concentration. No treatment showed antimicrobial activity. Scanning electron microscopy (SEM) of the SCOBY revealed bacteria and yeasts among bacterial cellulose microfilaments, confirming the bioactivity of the SCOBY in coffee kombucha. This study demonstrated the feasibility of fermenting kombucha with Arabica coffee infusion, resulting in a beverage with physicochemical characteristics similar to the green tea control, opening up new possibilities for the fermented beverage industry.

Keywords: functional beverage; organic acids; bacterial cellulose; GC-MS; HPLC.

INDICADORES DE IMPACTO

O estudo sobre a produção de kombucha utilizando infusão de café arábica como alternativa ao chá verde apresenta impactos significativos em diversas esferas. Socialmente, a pesquisa promove a democratização do acesso à ciência ao explorar uma bebida popular e funcional, ampliando o conhecimento sobre suas propriedades benéficas e fortalecendo a interação entre academia e sociedade. No campo tecnológico, destaca-se a inovação no processo fermentativo, demonstrando a viabilidade de utilizar uma matéria-prima amplamente consumida no Brasil, como o café, para produzir kombucha com características físico-químicas e microbiológicas semelhantes ao tradicional. Economicamente, a inclusão de novos ingredientes expande o mercado de bebidas funcionais, oferecendo alternativas que podem fortalecer a cadeia produtiva do café, incentivando pequenos e médios produtores locais. Culturalmente, a pesquisa valoriza e diversifica o uso de insumos tradicionais brasileiros, como o café, reforçando a identidade nacional e fomentando práticas de sustentabilidade ao possibilitar o uso de resíduos agroindustriais. Os resultados alcançados indicam o potencial de novas possibilidades na indústria de alimentos e bebidas, com enfoque em inovação e funcionalidade, consolidando o Brasil como referência no setor.

IMPACT INDICATORS

The study on kombucha production using Arabica coffee infusion as an alternative to green tea has significant impacts in various spheres. Socially, the research promotes the democratization of access to science by exploring a popular and functional beverage, expanding knowledge about its beneficial properties and strengthening the interaction between academia and society. Technologically, it highlights innovation in the fermentation process, demonstrating the feasibility of using a raw material widely consumed in Brazil, such as coffee, to produce kombucha with physicochemical and microbiological characteristics similar to the traditional version. Economically, the inclusion of new ingredients expands the functional beverage market, offering alternatives that can strengthen the coffee production chain and encourage small and medium-sized local producers. Culturally, the research values and diversifies the use of traditional Brazilian inputs, such as coffee, reinforcing national identity and fostering sustainable practices by enabling the use of agro-industrial residues. The results achieved indicate the potential for new possibilities in the food and beverage industry, focusing on innovation and functionality, consolidating Brazil as a reference in the sector.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Passo a passo para preparar Kombucha tradicional de <i>Camellia sinensis</i>	18
Figura 2: Frasco de fermentação contendo as diferentes fases de Kombucha tradicional de <i>Camellia sinensis</i>	20
Figura 3: Resumo do processo fermentativo do Kombucha	21
Figura 4: <i>Heatmap</i> da área dos compostos voláteis nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde	53
Figura 5: Quantidade de compostos voláteis em bebida Kombucha nos tempos inicial e após 14 dias de fermentação.....	53
Figura 6: Representação visual em RGB dos parâmetros cromáticos em amostras de kombucha de café comparadas entre tempo inicial e final de fermentação.	56
Figura7: Resultado colorimétrico em microplaca referente ao teste de atividade antimicrobiana, onde a coloração rósea indica que houve crescimento microbiano	60
Figura 8: Aspecto macroscópico dos SCOBY em diferentes concentrações de café arábica e chá verde após 14 dias de fermentação.	63
Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura dos microfilamentos de celulose na superfície de SCOBY após 14 dias de fermentação	64
Figura 10: Diversidade celular de microrganismos fixos em microfilamentos de celulose do SCOBY de Kombucha.....	64
Figura 11: Possível produção de microfilamentos de celulose bacteriana por BAA	65
Figura 12: Esquema da produção de celulose bacteriana.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades biológicas <i>in vitro</i> de Kombucha	24
Tabela 2: Proporção de chá e café utilizada para a preparação da bebida	31
Tabela 3: População de bactérias e leveduras presente em bebida Kombucha e SCOBY após 14 dias de fermentação.....	38
Tabela 4: Características macroscópicas das colônias isoladas de SCOBY em diferentes meios de cultivo.....	41
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos gerados pela fermentação em bebida Kombucha produzida a partir de diferentes concentrações de café e chá nos tempos inicial e final da fermentação	42
Tabela 6: Carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos (g/L) presente na bebida Kombucha nos tempos inicial e após 14 dias de fermentação.....	43
Tabela 7: Compostos voláteis encontrados por GC-MS nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde	47
Tabela 8: Parâmetros cromáticos em amostras de kombucha de café comparadas entre tempo inicial e final de fermentação	55
Tabela 9: Conteúdo de fenólicos totais em amostras de kombucha pelos métodos de Fast Blue	57
Tabela 10: Atividade antioxidante em amostras de kombucha pelos métodos de DPPH e Fosfomolibdênio.....	59
Tabela 11: Avaliação da produção de celulose bacteriana entre os diferentes tratamentos de Kombucha após 14 dias de fermentação	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	Ácido Ascórbico
AG	Ácido Gálico
AN	Ágar Nutriente
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATT	Acidez Total Titulável
BAA	Bactéria do Ácido Acético
BAL	Bactéria do Ácido Lático
CB	Celulose Bacteriana
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COVID-19	<i>Corona Virus Disease 2019</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPH	<i>1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
DTC	Diferença Total de Cor
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
GYC	<i>Glucose Yeast Extract</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IN	Instrução Normativa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRS	<i>De Man Rogosa Sharpe</i>
ND	Não Detectado
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PCM	Peroxidação de Ácidos Graxos
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
RGB	<i>Red, Green, Blue</i>
SCOBY	<i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
TPC	Teor Total de Polifenóis
UFC	Unidade Formadora de Colônia
YEPG	<i>Yeast Extract Peptone Glucose</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Histórico.....	15
2.2. Consumo e mercado.....	16
2.3. Processo fermentativo de Kombucha.....	18
2.4. Composição físico-química da bebida fermentada	21
2.5. Benefícios para saúde humana.....	22
2.6. Outras formulações.....	25
2.7. SCOBY.....	26
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo Geral.....	30
4.2. Objetivos Específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1. Kombucha.....	31
5.1.1. Obtenção das matérias primas	31
5.1.2. Aclimação das colônias (SCOBY) e preparo das infusões	31
5.2. Análises	32
5.2.1. Análises microbiológicas.....	32
5.2.2. Análises físico-químicas.....	33
5.2.3. Determinação de açúcares, álcoois e ácidos orgânicos por HPLC.....	33
5.2.4. Determinação de compostos voláteis por GC-MS	34
5.2.5. Análise de cor instrumental	34
5.2.6. Compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante da bebida	35
5.2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana da bebida	36
5.2.8. Análise microscópica do SCOBY.....	37
5.2.9. Análises estatísticas	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1. Caracterização microbiológica	38
6.2. Dinâmica da fermentação.....	41
6.3. Atividade biológica.....	57
6.4. Celulose bacteriana - SCOBY	62
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
8. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida não-alcoólica obtida através da fermentação do chá de *Camellia sinensis* com adição de açúcar. A palavra “Kombucha” é derivada das palavras japonesas “algas marinhas” (Facts) e “chá” (cha) (Ernst, 2003, Martínez Leal *et al.*, 2018). O Kombucha pode ser dividido em duas fases: um biofilme na superfície do chá, formado pelo crescimento de microrganismos e um líquido acidificado, contendo principalmente ácido acético, ácido glucônico e etanol (Czaja *et al.*, 2006, Watawana *et al.*, 2016). O biofilme formado é chamado de SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) ou “tea fungus” (Sreeramulu *et al.*, 2000). O processo fermentativo que ocorre no Kombucha é o resultado da atividade metabólica entre bactérias do ácido acético (*Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter* sp.), bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus* sp.) e leveduras (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*) (Marsh *et al.*, 2014, Coton *et al.*, 2017, De Roos & De Vuyst, 2018). O período de fermentação do Kombucha requer de 7 a 15 dias, podendo estender por mais tempo dependendo das práticas culturais e substrato utilizado (Watawana *et al.*, 2015).

Alimentos funcionais são aqueles que possuem efeitos benéficos no organismo comprovado cientificamente, em uma ou mais funções, melhorando a saúde e bem-estar, independentemente do seu valor nutricional (Jayabalan & Waisundara, 2019). De acordo com Jayabalan & Waisundara (2019), Kombucha pode ser considerada uma bebida funcional devido seus diversos benefícios associados à saúde humana, como estimulação imunológica, desintoxicação, propriedades antioxidantes e antitumorais, atividade antimicrobiana, antidiabética e anticarcinogênica. Porém, a maioria dos estudos acerca das propriedades funcionais da bebida foram realizados *in vitro*, e os efeitos do consumo de Kombucha em humanos ainda são escassos (Kapp & Sumner, 2019). O mercado global de Kombucha está desfrutando de taxa de crescimento exponencial devido à crescente população global, aumento de rendimentos, além da modernização no armazenamento e transporte de alimentos e bebidas (Willett *et al.*, 2019, Bueno *et al.*, 2021).

Estudos *in vitro* comprovam que os microrganismos presentes no chá fermentado são capazes de produzir diversos metabólitos que são benéficos à saúde humana, como: atividade antimicrobiana frente à patógenos alimentares, atividade antioxidante, anticarcinogênicas (Jayabalan *et al.*, 2011, Watawana *et al.*, 2015, Vitas *et al.*, 2018), antidiabéticos (Aloulou *et al.*, 2012, Bhattacharya *et al.*, 2013), tratamento para úlceras gástricas (Banerjee *et al.*, 2010),

diminuição de colesterol (Yang *et al.*, 2010), além de demonstrar ter influência na resposta imune (Sai Ram *et al.*, 2000) e desintoxicação do fígado (Petrovic *et al.*, 2000).

Além dos efeitos benéficos à saúde, alterações nos componentes químicos e microbianos durante a fermentação do Kombucha também tem sido investigada por pesquisadores. Chen & Liu (2000) encontraram mudanças nos principais componentes (como concentração de sacarose, glicose, frutose, ácido glucônico e acidez titulável) e microbiota do Kombucha preparados com SCOBY de nove fontes diferentes da região de Taiwan durante uma fermentação de chá verde prolongada de até 60 dias, demonstrando que o perfil de microrganismos e os metabólitos produzidos variam de acordo com o SCOBY utilizado. Na última década foram publicados trabalhos utilizando outras bases de infusão diferentes de *C. sinensis* para fermentação de Kombucha, como chá de erva-cidreira, chá de hortelã, chá de sálvia e até mesmo café (Battikh *et al.*, 2012, Watawana *et al.*, 2015).

O efeito benéfico do consumo de café para saúde humana se dá pela presença de seus principais compostos bioativos, como cafeína, ácidos clorogênicos e outros fenólicos, que conferem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Barrea *et al.*, 2023). Pessoas que consomem quantidades moderadas de café (até cinco xícaras de café por dia) têm menor risco de doenças cardiovasculares, derrame, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e mortalidade por causas gerais (Guercio, 2022). O Brasil detém a maior produção e exportação de cafés no mundo, ocupando a segunda posição para consumo (Costa, 2020). O café é considerado um meio alternativo para a produção de Kombucha pela maior organização comercial mundial de fabricantes de Kombucha, *Kombucha Brewers International*, com investigações científicas recentes sobre Kombucha de café (Zofia *et al.*, 2020, Bueno *et al.*, 2021). Segundo *Mordor Intelligence* (2021), o mercado global de bebidas funcionais deverá registrar uma taxa de crescimento anual composta de 5,8% entre 2020 e 2025 e o consumo de Kombucha de café pode favorecer o aumento deste mercado (Chan & Liu, 2022). A elaboração de um produto diferenciado que estimule consumo e potencialize os efeitos benéficos a saúde, além da investigação da inoculação do SCOBY em diferentes formulações de infusões é uma demanda que necessita ser pesquisada. Por esses motivos, o presente estudo objetivou verificar se a substituição parcial ou total do chá verde por infusão de café arábica é capaz de produzir Kombucha com características físico-químicas e microbiológicas similares às bebidas tradicionais fermentadas com chá verde. A interação dos microrganismos e produção de celulose bacteriana no SCOBY a partir das diferentes formulações foi também avaliada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Histórico

O primeiro relato disponível sobre o consumo de Kombucha data de 220 a.C. na China, durante a dinastia Chinesa. Nesta época, os chineses denominaram o SCOBY como o divino “*Ling-tche*” ou “*Che*”, que significa "Remédio da Imortalidade" ou "Chá da Imortalidade", devido as suas propriedades energéticas e desintoxicantes. Em 414 d.C., um médico coreano chamado Kombu foi convocado para curar os problemas digestivos do rei japonês Inkyo. Kombu trouxe o divino “*Che*” com ele, que se acredita ser mais tarde popularizado no Japão como “*Kombu-che*”, tornando-se depois o “*Kombucha*” (Dutta & Paul, 2019). Outra possível origem do nome “*Kombucha*” se dá através da derivação das palavras japonesas “algas marinhas” (Facts) e “chá” (*cha*) (Martínez Leal *et al.*, 2018). Outros nomes para a bebida e suas variantes são *Eastern tea*, *Fungus japonicus*, *Cembuya orientalist*, *Combuchu*, *Tschambucco*, *Volga spring*, *Mo-Gu*, *Champignon de longue vie*, *Teekwass*, *Kwassan*, e *Kargasok tea* (Dutta & Paul, 2019).

Além da China, Coréia e Japão, o consumo de chás fermentados era comum na região de Kargasok, na Rússia. Os povos dessa região eram conhecidos por ter um estilo de vida saudável, com envelhecimento retardado e expectativa de vida superior a cem anos. Com a extensão das rotas comerciais, o Kombucha chegou na Rússia em 1800 e foi reconhecido como medicina popular eficaz em muitas comunidades rurais. Na Rússia, o SCOBY é chamado de “cogumelo do chá” e a bebida é chamada Grib (cogumelo), “chá *kvass*” ou simplesmente “*kvass*” (Villarreal-Soto *et al.*, 2018, Chandrakala *et al.*, 2019).

Após a Primeira Guerra Mundial, o Kombucha chegou a outros países rapidamente com a ajuda de prisioneiros russos e alemães que imigraram. Na década de 1920, o Kombucha era popular em toda a Alemanha como um remédio caseiro e popular, avançando para França, e dos franceses para África (Frank, 1995, Blanc, 1996). Nos Estados Unidos, Kombucha ganhou popularidade por conta do seu poder refrescante e propriedades medicinais. De acordo com relatos, Kombucha era "ansiosamente procurado em certos círculos, e alegremente passado para outros" (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Pesquisas com Kombucha só iniciaram ao fim da década de 1960 na Suíça, devido a um boato que se espalhou sobre efeitos tóxicos da bebida. Neste estudo, cientistas suíços relataram que beber Kombucha era igualmente benéfico como comer iogurte. Outros estudos iniciais datam no ano de 1986, na Rússia, onde análises de dados indicaram que pessoas que consumiam Kombucha eram mais resistentes aos efeitos da radiação causadas pelo desastre de Chernobyl.

A Unidade Central de Pesquisa Oncológica da Rússia determinou que o consumo diário dessa bebida tem correlação com a resistência ao câncer (Villarreal-Soto *et al.*, 2018, Dutta & Paul, 2019).

2.2. Consumo e Mercado

Embora a história do mercado comercial do Kombucha seja recente, com pouco mais de 20 anos, seu tamanho de mercado e variedade de produtos estão em rápido crescimento. Nas últimas duas décadas esta bebida fermentada à base de chá tornou-se cada vez mais popular nas culturas ocidentais, principalmente dentro do grupo de alimentos funcionais por seus benefícios à saúde humana. O Kombucha é considerado uma bebida alternativa para quem quer substituir refrigerantes tradicionais, com características funcionais aliadas a finalidade básica de hidratação. Um refrigerante tradicional, como a Coca-Cola™, tem um teor calórico médio de 39,5 kcal em 100 mL e um teor médio de açúcar de 10% (p/v). Com base nos produtos comerciais de Kombucha atuais no mercado, o teor calórico médio por 100 mL é de 14,12 kcal e o teor médio de açúcar por 100 mL é de 3,17 g. O Kombucha tem um perfil de teor calórico e de açúcar menor em comparação com os refrigerantes comuns (Kim & Adhikari, 2020). Devido ao alto potencial nutracêutico e terapêutico, o Kombucha é classificado na primeira posição como alimento do século XXI, junto ao Kefir (Magalhães-Guedes *et al.*, 2019).

A demanda por Kombucha é alta nos mercados desenvolvidos, particularmente nos Estados Unidos e em outros países da Europa. A América do Norte é o mercado mais significativo para o Kombucha, sendo que os EUA contribuem com a maior fatia do mercado. A América do Norte dominou o mercado global em 2019, com participação de receita de aproximadamente 52%. Além disso, o crescimento substancial do mercado também está sendo testemunhado na Ásia-Pacífico, Oriente Médio e África (Jayabalan & Waisundara, 2019). O Kombucha comercialmente engarrafado tornou-se disponível nos Estados Unidos ao final dos anos 90, sendo classificada como a bebida fermentada mais vendida, com lucro de US \$ 180 milhões em 2015 (Kombucha - Statistics & Facts, 2015). O mercado global de kombucha teve um crescimento significativo nos últimos anos, chegando a US\$ 1,84 bilhão em 2020, com taxa de crescimento projetada de 23,2% (US\$ 10,45) até 2027 (Insights, 2020). Embora a pandemia do COVID-19 tenha impactado negativamente muitos setores, o mercado de bebidas fermentadas testemunhou um ligeiro aumento à medida que a demanda do consumidor mudou para bebidas que aumentam a imunidade em meio a taxas crescentes de infecção por coronavírus (Nyhan *et al.*, 2022).

Em 2016, a PepsiCo™ adquiriu a empresa *KeVita*, com sede na Califórnia, empresa líder em bebidas fermentadas que atualmente possui 4 linhas de produtos (*Master Brew Kombucha*, *Sparkling Probiotic Drink*, *Apple Cider Vinagar Tonic* e *Prebiotic Shots*) abrangendo 28 sabores. Em junho de 2018, a *Clearly Kombucha* foi adquirida pela *Molson Coors Brewing Company*, um passo estratégico para fortalecer a oferta de bebidas não alcoólicas da empresa. A Coca-Cola™ adicionou sua primeira linha de produtos Kombucha em 2018 ao adquirir a *Organic and Raw Trading Co.* O interesse contínuo da Coca-Cola™ no mercado de Kombucha resultou em um investimento de capital de US\$ 20 milhões na *Health-Ade Kombucha* em 2019, uma empresa que mais tarde vendeu uma participação de controle para o parceiro de longa data *First Bev*. Em 2018, a *Peet's Coffee* (empresa dos EUA que produz café *ready-to-drink* (pronto para beber) adquiriu participação majoritária na *Revive Kombucha* por um valor não revelado (Nyhan *et al.*, 2022).

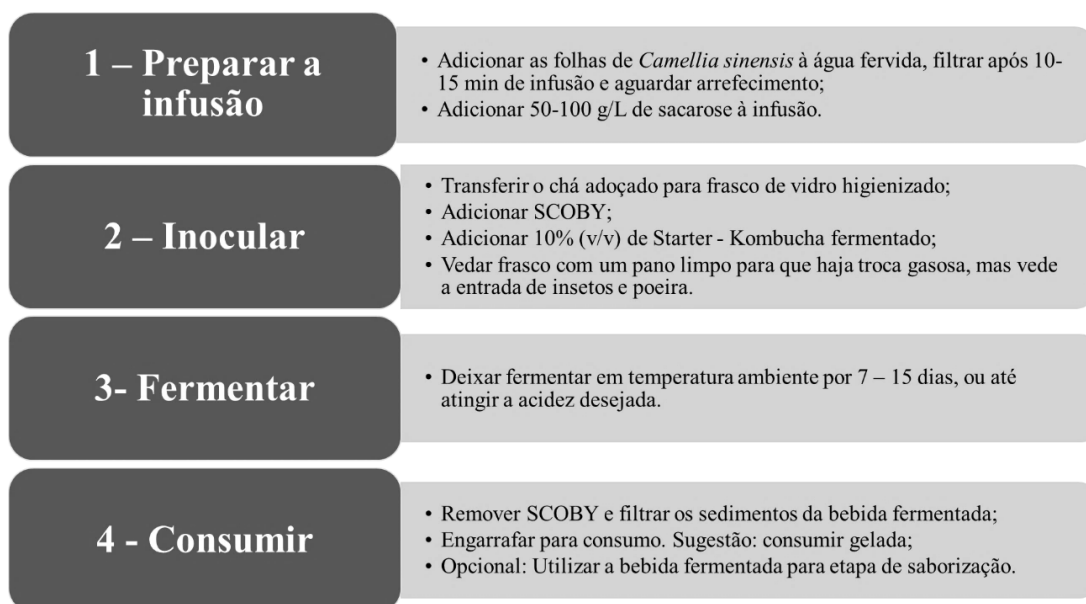
A variedade de sabores inovadores de Kombucha disponíveis também está atraindo cada vez mais a atenção do consumidor, como lavanda, melancia, pêssego e maracujá, juntamente com suas bebidas originais de Kombucha (Insights, 2020). Estima-se que o mercado global de cafés funcionais (fortificados com ingredientes como canabidiol, ginseng, L-teanina, vitaminas do complexo B e açafrão, para fornecer benefícios adicionais além daqueles inerentes ao café) deverá registrar taxa de crescimento anual composta de 5,8% entre 2020 e 2025. Estes, são comercializados como impulsionadores imunológico, alívio da ansiedade e potencializadores das capacidades cognitivas (Beverage Daily, 2020; Euromonitor Internacional, 2021; Mordor Intelligence, 2021; Chan & Liu, 2022). O consumo de Kombucha de café pode favorecer o aumento deste mercado.

O Kombucha também é considerado como o iogurte do século XXI, que crescerá como uma indústria multibilionária no futuro, como a indústria de iogurtes em geral. Regulamentos rigorosos deverão ser desenvolvidos por vários governos em todo o mundo para monitorar o mercado de Kombucha (Troitino, 2017). O Brasil foi o primeiro país a registrar legislação específica para Kombucha em forma de Instrução Normativa (IN nº 41, de 17 de setembro de 2019) para o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da produção da bebida dentro de todo território nacional, aplicadas as Kombucha que são submetidas a processos industriais tecnologicamente adequados e destinada ao consumo humano como bebida (Brasil, 2019).

2.3. Processo fermentativo de Kombucha

A bebida tradicional é obtida através da fermentação de chá de *Camellia sinensis* (chá preto, verde, branco, marrom) com adição de sacarose como fonte de carbono (Jayabalan *et al.*, 2014, Martínez Leal *et al.*, 2018). A fermentação ocorre por meio de uma cultura simbiótica de bactérias do ácido acético (BAA), leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL) (Marsh *et al.*, 2014, Coton *et al.*, 2017, De Roos & De Vuyst, 2018). O modo de preparo do Kombucha tradicional segue algumas etapas simples e semelhantes, independentemente da quantidade e substrato utilizados. O processo de preparo está ilustrado na Figura 1, com base nos métodos descritos por Greenwalt *et al.* (2000) e Sinir *et al.* (2019).

Figura 1: Passo a passo para preparar Kombucha tradicional de *Camellia sinensis*.



Fonte: Do autor, adaptado de Sinir *et al.* (2019).

O preparo da infusão pode variar dependendo do método utilizado. Alguns autores preferem um tempo de infusão curto de 5-10 minutos (Sun *et al.*, 2015), enquanto outros recomendam o tempo de 15-30 minutos antes de retirar as folhas de chá (Greenwalt *et al.*, 2000, Aloulou *et al.*, 2012). O chá adoçado precisa ser resfriado à temperatura ambiente antes que a cultura de Kombucha seja adicionada, para evitar choque térmico aos microrganismos. O chá é normalmente adicionado a uma jarra de vidro higienizada coberta com um pano limpo (Jayabalan *et al.*, 2010; Sievers *et al.*, 1995), o que garante condições aeróbicas durante o processo de fermentação e mantém o ambiente livre de poeira e insetos.

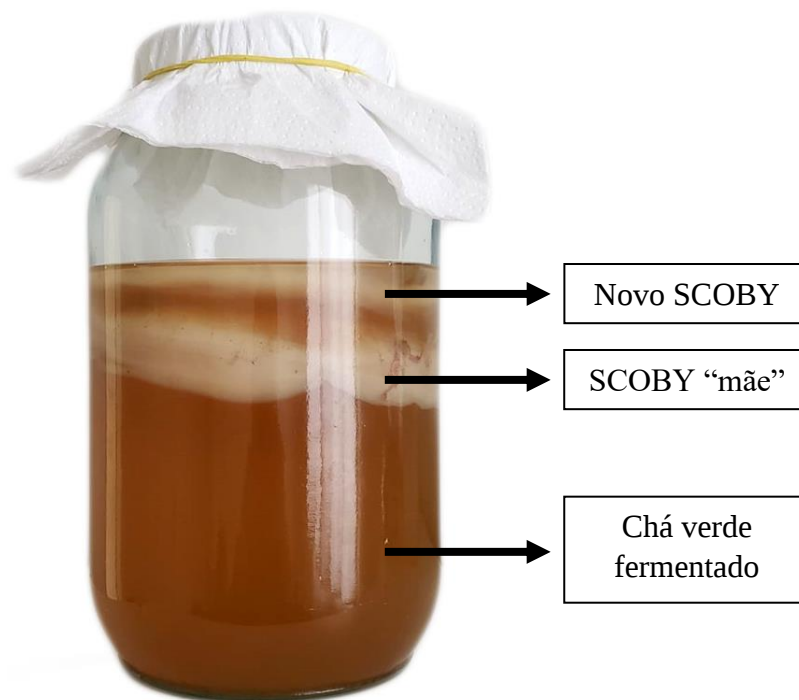
SCOBY e 10% (v/v) de chá fermentado (*starter*) devem ser utilizados como culturas iniciadoras da fermentação, sendo adicionados na infusão adoçada (Vina *et al.*, 2014). Desta forma, os microrganismos são transferidos de um lote antigo para um novo lote, técnica conhecida como *back-slopping*. Este método é frequentemente utilizado em fermentações que envolvem culturas iniciadoras indefinidas e garante alta carga inicial de microrganismos bem adaptados ao substrato, acelerando o processo de produção e melhorando a reprodutibilidade (Holzapfel, 1997). A adição de líquido de um lote anterior também estabelece um ambiente que limita o risco de crescimento de patógenos e microrganismos indesejados, especialmente se o pH estiver abaixo de 4,2 (Nummer, 2013). É possível inocular o chá apenas com a cultura líquida fermentada, o que levará à formação de um novo SCOBY na superfície da bebida, porém de forma mais lenta (May *et al.*, 2017).

O período ideal para fermentação do Kombucha é de 7 a 12 dias, podendo estender para um máximo de 60 dias, dependendo das práticas culturais (Watawana *et al.*, 2015). Uma fermentação prolongada resulta no desenvolvimento de um sabor ácido semelhante ao vinagre e níveis de acidez potencialmente perigosos para a saúde humana (Nummer, 2013; Sievers *et al.*, 1995). A fermentação do Kombucha é realizada à temperatura ambiente (28 ± 3 °C), de forma estática. A temperatura pode estimular ou inibir seletivamente o crescimento de grupos específicos de microrganismos na cultura (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Temperaturas de fermentação mais altas estão associadas a um consumo de sacarose mais rápido e taxas de produção mais altas de ácidos e outros metabólitos de fermentação (Lončar *et al.*, 2006). A sacarose é usada como a principal fonte de carbono em uma concentração de 5 a 10% (p/v), favorecendo o desenvolvimento dos microrganismos. Altas concentrações de sacarose (acima de 100 g/L) podem dificultar o crescimento de microrganismos durante a fermentação e demonstraram resultar em menores rendimentos de celulose e diminuição do pH menos pronunciada em comparação com concentrações moderadas de sacarose, provavelmente devido à pressão osmótica (Goh *et al.*, 2012). Vários estudos exploraram agentes adoçantes alternativos, como mel, açúcar mascavo e melaço (Malbasa *et al.*, 2008, Watawana *et al.*, 2015). Deve-se notar que a adição de mel pode influenciar a composição microbiana do SCOBY, reduzindo bactérias do ácido acético e introduzindo novas leveduras (Reva *et al.*, 2015). A natureza antimicrobiana do mel depende de vários fatores que atuam de forma singular ou sinérgica, sendo os mais salientes o peróxido de hidrogênio, compostos fenólicos, pH do mel e pressão osmótica exercida pelo mel, e as diferentes concentrações desses componentes em diferentes méis resultam em seus efeitos antimicrobianos variados (Mandal & Mandal, 2011).

Molan & Cooper (2000) relataram que a diferença na potência antimicrobiana entre diferentes méis pode ser mais de 100 vezes, dependendo de sua fonte geográfica, sazonal e botânica, bem como das condições de colheita, processamento e armazenamento.

Durante a fermentação, o Kombucha é dividida em duas fases (Figura 2): (1) biofilme de celulose flutuando na superfície da bebida (SCOBY), formado da atividade de certas espécies de bactérias do ácido acético e (2) chá fermentado, levemente ácido e gaseificado (Laureys *et al.*, 2020). Os principais ácidos orgânicos produzidos no processo fermentativo são: acético, glucônico, tartárico, málico e em menor proporção ácido cítrico. Todos esses ácidos são responsáveis pelo sabor azedo característico, o que provê grande aceitação entre os consumidores desta bebida (Jayabalan *et al.*, 2007).

Figura 2: Frasco de fermentação contendo as diferentes fases de Kombucha tradicional de *Camellia sinensis*.

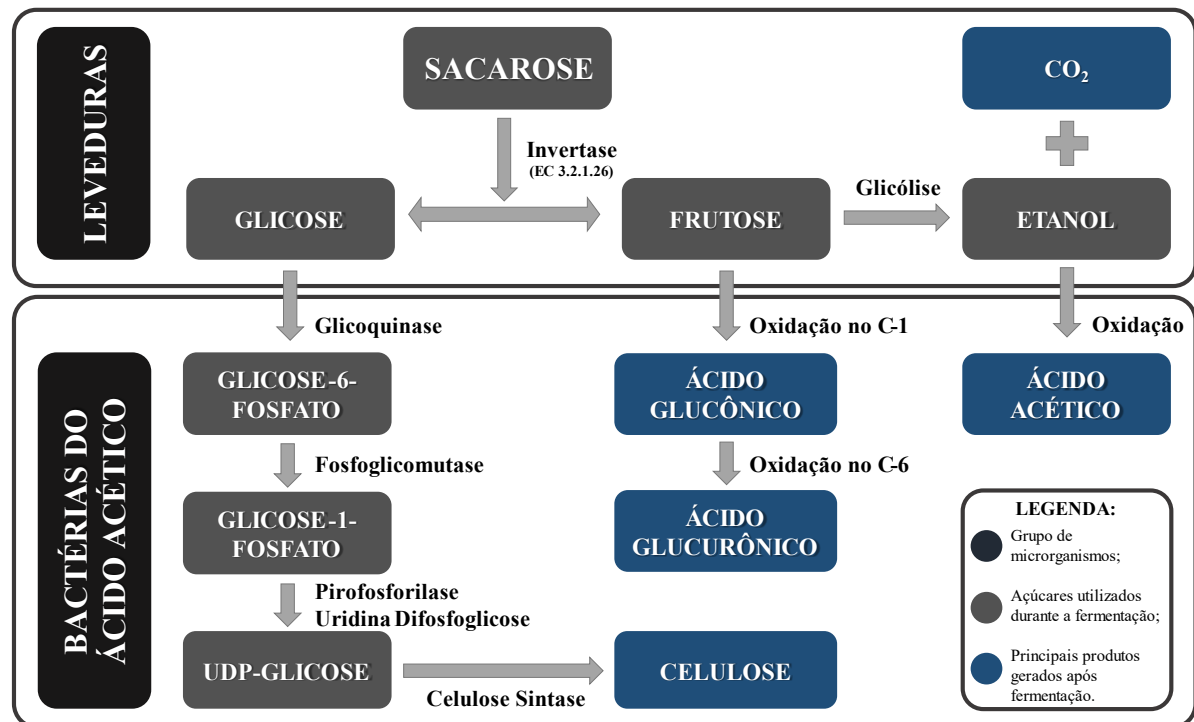


Fonte: Do autor (2024).

O processo fermentativo está resumido na Figura 3. Durante a fermentação, as leveduras hidrolisam a sacarose em glicose e frutose pela enzima invertase e produzem etanol. Bactérias do ácido acético utilizam a glicose e etanol para produzir ácido glucônico e ácido acético, respectivamente. A glicose também se transforma em ácido glucurônico por oxidação na

posição C-6 de sua molécula, principal agente terapêutico entre os principais constituintes da Kombucha (Laureys *et al.*, 2020). O tempo de fermentação, o tipo de matéria-prima e a microbiota nativa do SCOBY são os fatores dependentes responsáveis pela formação de metabólitos funcionais durante a fermentação (Dutta & Paul, 2019).

Figura 3: Resumo do processo fermentativo do Kombucha.



Fonte: Do autor (2024).

Após a fermentação, o líquido é filtrado, despejado em uma garrafa lacrada e refrigerado até o consumo. O líquido fermentado pode ser utilizado como base para uma segunda fermentação opcional como etapa de saborização. Nesta etapa, é adicionado sucos, extratos ou até pedaços inteiros de frutas para fermentação alcoólica em condições anaeróbicas, o que favorece o crescimento de leveduras e leva a uma bebida gaseificada (Crum & LaGory, 2016).

2.4. Composição Físico-Química da Bebida Fermentada

Estudos relatam a presença de diversos ácidos orgânicos (ácido acético, glucônico, glucurônico, cítrico, L-lático, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico); açúcares (sacarose, glucose e frutose); vitaminas (B₁, B₂, B₆, B₁₂ e C); aminoácidos, aminas biogênicas, purinas, pigmentos, lipídios, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas, etanol, matéria antibiótica ativa, dióxido de carbono, fenol, bem como alguns polifenóis do chá,

minerais, entre outros metabólitos de levedura e bactérias (Jayabalan *et al.*, 2017, Vitas *et al.*, 2018). No entanto, a composição e concentração destes metabólitos diferiram em todos os relatos. Isso se deve ao fato de que a composição microbiana varia de acordo com a região (Nguyen *et al.*, 2015), da concentração de sacarose e chá (Watawana *et al.*, 2017), do tempo de fermentação (Chen & Liu, 2000) e a temperatura utilizada (Jayabalan *et al.*, 2008). Qualquer alteração nas condições de fermentação pode afetar o produto final (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

O chá de *Camellia sinensis* possui vários componentes, como cafeína, alcalóides, aminoácidos, carboidratos, proteínas, clorofila, flúor, alumínio, minerais e oligoelementos. As folhas frescas desta erva possuem cerca de 25% (p/v de matéria fresca) de flavonoides (ou catequinas), um polifenol derivado do ácido cinâmico. O que diferencia o chá verde do chá preto é um processo fermentativo, onde o chá preto passa por este processo e o chá verde não (Tanaka & Kouno, 2003). A composição de polifenóis do chá verde tende a ser semelhante das folhas frescas, uma vez que as enzimas são inativadas imediatamente após a colheita pelo processo de secagem. Como as folhas não são fermentadas, elas permanecem na cor verde e possuem quase todo o seu teor de polifenóis. Durante o processo de fermentação do chá preto, as catequinas são oxidadas enzimaticamente, resultando em flavonóis diméricos e poliméricos, conhecidos como “teaflavinas” e “thearubigins”, sendo compostos laranja-avermelhados e responsáveis pela coloração levemente acobreada (Chan *et al.*, 2011; Ngure *et al.*, 2009). Por isso mesmo, os chás têm uma composição diferente e, portanto, seu efeito na saúde varia de um para outro (Tanaka & Kouno, 2003, Valenzuela, 2004). Também já foi relatado que o chá verde tem melhor eficácia na fermentação do Kombucha em comparação com o chá preto (Sinir *et al.*, 2019).

2.5. Benefícios para Saúde Humana

Os alimentos e bebidas fermentadas possuem risco reduzido de contaminação, devido os diversos produtos metabólicos microbianos, como ácidos orgânicos, etanol e bacteriocinas, sendo por muito tempo utilizado como um método biológico para preservação destes produtos (Marco *et al.*, 2017). Como o Kombucha tem sido consumido em muitos países durante muito tempo, muitos benefícios para a saúde foram descritos com base em observações pessoais e depoimentos. No entanto, apenas alguns deles foram cientificamente e experimentalmente comprovados (Chandrakala *et al.*, 2019).

Os benefícios à saúde relatados com o consumo de Kombucha foram amplamente referidos aos polifenóis, em especial, o ácido glucurônico. O ácido glucurônico tem despertado grande interesse devido à sua comprovada capacidade desintoxicante. Ele pode ser convertido em vários compostos benéficos para a saúde humana, como a glucosamina, por exemplo, que está associada à produção de colágeno (Jayabalan *et al.*, 2008, Nguyen *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2017).

Além disso, ácidos orgânicos, vitaminas, aminoácidos, antimicrobianos e vários micronutrientes produzidos durante a fermentação do Kombucha também podem ter um papel nos benefícios para a saúde (Srihari & Satyanarayana, 2012). Dufresne & Farnworth (2000) relataram efeitos benéficos de desinfecção sanguínea, redução de inflamações, diminuição de obesidade, redução nos níveis de colesterol, entre outros.

Investigações foram feitas para entender o impacto da fermentação do chá com os consórcios microbianos e algumas de suas atividades biológicas, como anti-inflamatória e potencial anticarcinogênico, parecem ser melhoradas (Tabela 1). Outros benefícios relatados são: neutralização de radicais livres (Srihari & Satyanarayana, 2012, Jayabalan *et al.*, 2014); atividade antimicrobiana (Cetojevic-Simin *et al.*, 2008); equilíbrio de ácido-alcalino (Jayabalan *et al.*, 2014); prevenção e redução de úlceras gástricas (Banerjee *et al.*, 2010); prevenção de diabetes (Koh *et al.*, 2010).

Entretanto, o consumo excessivo de Kombucha pode trazer alguns riscos para a saúde ou efeitos colaterais, como por exemplo: insuficiência renal, reação alérgica, icterícia, acidose metabólica, intoxicação por chumbo de pote de cerâmica, náusea, vômito, entre outros. Estes relatos geralmente estão relacionados ao consumo excessivo de Kombucha altamente ácido, potencial contaminação de metais pesados que foram lixiviados de recipientes ou consumo de Kombucha por pessoas com condições de saúde ou doenças pré-existentes. Apesar de não haver consenso científico sobre quanto de Kombucha pode ser consumido por dia, um relatório de 1995 do Centro de Controle de Doenças (*Center for Disease Control report*) mencionou a recomendação de 118 mL de Kombucha até 3 vezes por dia, embora nenhuma recomendação atual tenha sido feita (Centers for Disease & Prevention, 1995, Kapp & Sumner, 2019). A maioria dos estudos de pesquisa que tentam provar o efeito benéfico do consumo de Kombucha são estudos *in vitro* e alguns estudos *in vivo* em roedores, pequenos animais e linfócitos do sangue periférico humano (Kapp & Sumner, 2019). Ainda faltam trabalhos científicos disponíveis na literatura com ensaio clínico *in vivo* com seres humanos (Jayabalan & Waisundara, 2019).

Tabela 1: Atividades biológicas *in vitro* de Kombucha.

Ensaio	Condições testadas	Resultados	Autores
Atividade Antimicrobiana	14 dias de fermentação	Inibição do crescimento de: <i>Shigella sonnei</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> .	(Sreeramulu <i>et al.</i> , 2000)
	9 dias de fermentação	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	(Greenwalt <i>et al.</i> , 2000)
	21 dias de fermentação	<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Candida dubliniensis</i> e <i>Candida albicans</i> .	(Battikh <i>et al.</i> , 2013)
Atividade Antioxidante (DPPH)	10 dias de fermentação com uma cultura mista de bactérias acéticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60% de inibição contra o radical DPPH com 0,1 mL de Kombucha.	(Malbaša <i>et al.</i> , 2011)
	21 dias de fermentação	IC ₅₀ de 0.92 mg/mL.	(Chakravorty <i>et al.</i> , 2016)
Atividade Anti-inflamatória	8 dias de fermentação	Supressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-6.	(Vazquez-Cabral <i>et al.</i> , 2017)
Potencial Anticarcinogênico	14 dias de fermentação com subsequente fragmentação por solvente (clorofórmio, acetato de etilo e butanol)	Efeito citotóxico de 21,5% em 786-O e 93,45% de inibição de células U2OS com 100 µg / mL; reduziu a motilidade celular em A549.	(Jayabalan <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Villarreal-Morales *et al.* (2018).

2.6. Outras formulações

Dependendo da composição da matéria-prima usada para fermentação de Kombucha, as propriedades do produto irão variar. A aplicação do SCOBY para criar produtos funcionais com base em outras matérias-primas que não *Camellia sinensis* ainda é uma questão em aberto. Se o crescimento do SCOBY não for afetado pelos constituintes e metabólitos formados, assim como os efeitos benéficos à saúde, qualquer extrato de planta misturado com a quantidade certa de sacarose pode ser usado para preparar a bebida de Kombucha (Battikh *et al.*, 2013). Seguindo este raciocínio, diversos autores realizaram estudos modificando a matéria-prima para fermentação de Kombucha, objetivando aumentar as propriedades funcionais da bebida final.

O mais comum é o uso do chá de *Camellia sinensis* com adição de algum aditivo afim de aumentar as suas propriedades funcionais. A primeira fermentação de chá verde adoçado com adição de canela na faixa de 25 a 75% (p/v) resultou em aumento das quantidades de ácidos orgânicos e alta atividade antioxidante e antimicrobiana dos produtos. Essas propriedades aumentaram à medida que a concentração de canela no chá foi aumentada. A forte atividade antibacteriana de Kombuchas com canela é provavelmente causada pela presença de cinamaldeído e eugenol derivados da canela. Esses componentes rompem a bicamada lipídica da membrana celular bacteriana e causam maior permeabilidade, o que leva a um extenso vazamento de íons e compostos celulares importantes (Nuryastuti *et al.*, 2009; Shahbazi *et al.*, 2018). Kombucha feito de chá preto com adição de 15% de suco de maçã (v/v) após 10 dias da primeira fermentação apresentou maior teor de polifenóis do que o Kombucha feito apenas com chá, pois o suco de maçã contém quantidade significativa de polifenóis. O teor de álcool e ácido também foi maior no Kombucha de chá com suco de maçã do que no Kombucha feito apenas com o chá (Liamkaew *et al.*, 2016).

O uso de outras infusões para primeira fermentação também já foi relatado na literatura. Essawet *et al.* (2015) investigaram a contribuição de extrato de café na fermentação do Kombucha e na capacidade antioxidante da bebida. O estudo mostrou que o extrato de café contribuiu para uma fermentação mais rápida e todas as amostras demonstraram notável atividade antioxidante sobre os radicais DPPH e OH tóxicos. A fermentação de infusão de café adoçado apresentou maior atividade antioxidante e maior teor de ácido clorogênico e cafeico, além de inibir a atividade da hidrolase de amido quando comparada com a infusão não fermentada ao final do sétimo dia. Semelhante ao chá adoçado à base de *C. sinensis*, o SCOBY foi capaz de converter o açúcar adicionado no café em ácidos orgânicos e etanol. Portanto, o consumo de Kombucha de café pode ser útil na manutenção da saúde e bem-estar por contribuir

na redução de glicose no sangue ao retardar a digestão de amido (Poole *et al.*, 2017; Watawana *et al.*, 2015). A cafeína e compostos relacionados (teofilina e teobromina) também já foram relatados como estimulantes da síntese de celulose no SCOBY por bactérias (Dufresne & Farnworth, 2000, Lončar *et al.*, 2001).

Dependendo do substrato, parte das características sensoriais e/ou funcionais são provenientes do substrato e parte do metabolismo microbiano. Bebidas obtidas a partir do soro de soja durante seis dias de fermentação apresentaram sabores frutados e florais de aldeídos, gerados como produtos da fermentação. Foi demonstrado que esses produtos apresentaram maior atividade antioxidante do que o soro de soja não fermentado e atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Tu *et al.* 2019). Estudos de alguns meios de cultivo alternativos mostraram que chá verde e chá de erva-cidreira têm efeito estimulante para fermentação do Kombucha do que o chá preto, fornecendo assim o produto de fermentação em um tempo menor (Greenwalt *et al.*, 2000, Velićanski *et al.*, 2007). Outro exemplo interessante de um produto fermentado por SCOBY foi obtido a partir do extrato de casca de banana. O produto foi caracterizado por um novo sabor, aroma e coloração. (Pure & Pure 2016).

Sucos de fruta, vegetais, folhas, leite e subprodutos também já foram utilizados como base de fermentação utilizando SCOBY. A fermentação de sucos pasteurizados de romã, uva vermelha, cereja e maçã permitiu a obtenção de vinagre de Kombucha (4% de ácido acético). Durante o processo de fermentação de todos os sucos, ocorreram alterações físico-químicas semelhantes: aumento significativo da concentração de ácidos e frutose, e diminuição do pH, teor de álcool e sacarose (Akbarirad *et al.*, 2017). Talawat *et al.* (2006) obtiveram sucesso no preparo de bebidas fermentadas com SCOBY de infusão de amora, chá verde japonês, chá de jasmim e chá oolong. Velićanski *et al.* (2013) utilizaram infusão de sálvia, tomilho e hortelã-pimenta para fermentação de Kombucha, demonstrando que essas ervas medicinais podem ser usadas com sucesso como o único substrato. O conteúdo de polifenóis em extrato de folhas de goiaba fermentada por SCOBY aumentou com o tempo de fermentação e diversos novos produtos foram formados, resultando em uma bebida com composição completamente diferente da não fermentada (Moreno-Jimenez *et al.*, 2018).

2.7. SCOBY

O SCOBY é resultado da produção de celulose pela bactéria do ácido acético *Komagataeibacter xylinum* (anteriormente classificada como *Acetobacter xylinum* e reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus*) durante a fermentação do Kombucha (Marsh

et al., 2014, Jayabalan & Waisundara, 2019). O resultado dessa produção aparece como uma membrana fina na superfície do caldo de chá, onde a massa celular de bactérias e leveduras é fixada ao emaranhado de nanofibras de celulose composto de monômeros de beta-D-glicose unidos por ligação beta 1,4-glicosídica. A celulose produzida por *K. xylinum* tem característica única em termos de estabilidade química, estrutura molecular e resistência mecânica (Czaja *et al.*, 2006). Pesquisadores por todo mundo tem utilizado SCOBY seco como um biossorvente para remoção de poluentes metálicos de águas residuárias (Mamisahebei *et al.*, 2007, Razmovski & Šćiban, 2008, Murugesan *et al.*, 2009).

Devido ao pH naturalmente baixo da bebida, combinado com a produção de metabólitos antimicrobianos e a competição por nutrientes pelas bactérias e leveduras presentes no meio, o risco de contaminação no Kombucha é mínimo (Marsh *et al.*, 2014, Vitas *et al.*, 2018). Mais importante ainda, os ácidos produzidos durante a fermentação protegem a colônia simbiótica presente no SCOBY da contaminação com microrganismos indesejados que, essencialmente, não fazem parte do Kombucha (Sreeramulu *et al.*, 2000). Cada fermentação leva a formação de uma nova camada de celulose, que pode ser utilizada como cultura iniciadora para uma nova fermentação (Laureys *et al.*, 2020).

A composição microbiológica do SCOBY é principalmente por bactérias do ácido acético (BAA: *Acetobacter pasteurianus*, *A. xylinum*, *A. xylinoides*, *A. peroxydans*, *Gluconobacter oxidans*, *G. europaeus*, *G. saccharivorans*) e leveduras (*Saccharomyce cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custersii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida stellata*, *C. stellimalicola*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulopsis spp.*, *Pichia mexicana*, *Eremothecium cymbalariae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Meyerozyma caribbica*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania telluris*, *Starmera amethionina*) (Teoh *et al.*, 2004, Malbaša *et al.*, 2011, Chakravorty *et al.*, 2016, Coton *et al.*, 2017). Bactérias lácticas (BAL; *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. bovis*, *S. lutetiensis*, *Brevibacterium sp.*) também foram isoladas de Kombucha (Marsh *et al.*, 2014, Ayed *et al.*, 2017, Coton *et al.*, 2017).

Essa comunidade microbiana pode variar entre diferentes fermentações de Kombucha em todo o mundo, dependendo da fonte do inóculo usado (Malbaša *et al.*, 2011). Geralmente essa identificação tem sido baseada em microrganismos cultiváveis (Dutta & Gachhui, 2006, 2007). Apenas recentemente, outros estudos têm realizado análises baseadas em sequências de nucleotídeos para identificação das populações de bactérias e leveduras da Kombucha

(Chakravorty *et al.*, 2016). Marsh *et al.* (2014) identificaram os microrganismos presentes em cinco SCOBY e chás fermentados obtidos de pontos comerciais do Canadá, Reino Unido, Estados Unidos e Irlanda usando a técnica baseada no sequenciamento de nova geração. Neste estudo, *Gluconacetobacter* foi o principal gênero encontrado (> 85%), seguido por espécies de *Lactobacillus*. Espécies de *Zygosaccharomyces* dominaram a população de leveduras (> 95%) tanto chá, quanto no SCOBY.

A celulose bacteriana (CB) presente no SCOBY pode ser produzida por bactérias gram-negativas e gram-positivas, como *Aerobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Sarcina* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Gluconacetobacter* sp. Bactérias do gênero *Komagataeibacter* (família *Acetobacteraceae*) são geralmente utilizadas para a produção industrial de CB, especialmente *K. xylinus* (anteriormente *Gluconacetobacter xylinus*) (Mohammadkazemi *et al.*, 2015, Villarreal-Morales *et al.*, 2018).

A CB pode ser utilizada com sucesso de diferentes formas na indústria como por exemplo, na indústria alimentícia como estabilizador de emulsão, espessante e fonte de fibra dietética na dieta. A CB possui maior atividade na redução de triglicerídeos séricos e colesterol total, bem como lipídeos e colesterol no fígado em comparação a celulose vegetal, podendo ser usado como um ingrediente alimentar promissor de baixa caloria para diferentes aplicações (Chau *et al.* 2008). Além disso, pode ser utilizado na indústria cosmética como máscara facial, esfoliante, formulação de limpeza e, por sua biocompatibilidade, permeabilidade a líquidos e gases e transparência, como material para lentes de contato. Seu uso também é aplicado na medicina. A CB já é usada com sucesso como material para curativos de feridas, tratamentos de queimaduras e como sistemas de liberação de drogas. Testes em animais mostraram a possibilidade de usar BC como implantes cardiovasculares (Kończowska *et al.* 2019). Outra aplicação na medicina seria seu uso como vasos sanguíneos artificiais, cartilagem, ossos, pele e como suporte de cicatrização de feridas para a membrana timpânica (Cacicedo *et al.* 2016; de Oliveira Barud *et al.* 2016).

3. JUSTIFICATIVA

A kombucha vem ganhando cada vez mais espaço no mercado global de bebidas funcionais, impulsionado pela crescente demanda por produtos que ofereçam benefícios à saúde e bem-estar. Atualmente, a bebida é caracterizada por uma ampla variedade de sabores, obtidos a partir de diferentes infusões de especiarias, ervas, frutas e extratos de flores. No entanto, a produção de kombucha ainda é majoritariamente baseada na fermentação do chá de *Camellia sinensis*, e a exploração de novas matérias-primas, como o café, apresenta um potencial inovador para a indústria.

O café, sendo a segunda bebida mais consumida no mundo, possui um mercado global em expansão, impulsionado principalmente pelas inovações em bebidas à base de café e seus atributos funcionais. A presença de compostos bioativos no café, como a cafeína e os ácidos clorogênicos, confere à bebida propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas, com potencial efeito terapêutico. A fermentação desses compostos pelo SCOBY pode aumentar sua concentração e biodisponibilidade, potencializando seus efeitos benéficos à saúde.

A combinação da kombucha com o café apresenta um grande potencial para o mercado brasileiro, que é um dos maiores produtores e consumidores de café do mundo. A crescente demanda por bebidas funcionais e o interesse por produtos inovadores e saudáveis tornam o kombucha de café uma alternativa atrativa para o mercado nacional.

No entanto, ainda há lacunas no conhecimento sobre a viabilidade da substituição do chá de *Camellia sinensis* por infusão de café na produção de kombucha, bem como sobre a influência da concentração de café na fermentação, na composição microbiana, nas características físico-químicas e sensoriais da bebida, e na produção de celulose bacteriana. A investigação desses aspectos é fundamental para o desenvolvimento de um produto de qualidade e com potencial comercial, além de contribuir para a valorização de resíduos agroindustriais, como o café, e para a sustentabilidade da indústria de alimentos e bebidas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade da substituição do chá de *Camellia sinensis* por infusão de *Coffea arabica* na produção de kombucha, caracterizando o perfil físico-químico e microbiológico da bebida, e investigando a influência da concentração de café na fermentação e na produção de celulose bacteriana.

4.2. Objetivos Específicos

- Quantificar e comparar as populações microbianas (bactérias do ácido acético, bactérias do ácido láctico e leveduras) presentes nas bebidas e nos SCOBYs de kombuchas fermentados com diferentes concentrações de café arábica e chá verde.
- Analisar as alterações físico-químicas (pH, °Brix, acidez total, cor instrumental) e cromatográficas (HPLC e GC-MS) que ocorrem durante a fermentação do kombucha com diferentes concentrações de café arábica e chá verde.
- Avaliar a produção, estrutura e rendimento da celulose bacteriana (SCOBY) em kombuchas fermentados com diferentes concentrações de café arábica e chá verde.
- Investigar a presença de compostos bioativos, como polifenóis, e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do kombucha fermentado com diferentes concentrações de café arábica e chá verde.
- Discutir o potencial do kombucha de café arábica como uma alternativa inovadora e promissora para a indústria de bebidas fermentadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Kombucha

5.1.1. Obtenção das matérias primas

A bebida foi produzida utilizando SCOBY cedidos pela empresa Companhia dos Fermentados (ciadosfermentados.com.br), café (Prima Qualità-empresa Cooxupé, Brasil), chá verde (Casa da Dieta Natural, Lavras, Minas Gerais, Brasil) e sacarose (Açúcar Cristal Delta, Delta® Sucroenergia S.A, Minas Gerais, Brasil).

5.1.2. Aclimação das colônias (SCOBY) e preparo das infusões

Inicialmente, os SCOBY passaram por aclimação em infusão de café. Esse processo consistiu em realizar três fermentações sucessivas do SCOBY em diferentes concentrações de infusão de café arábica e chá verde, aumentando gradualmente a concentração de café em cada fermentação (25%, 50%, 75% e 100% v/v, respectivamente).

A preparação do chá consistiu na adição de 80 gramas de folhas secas de chá verde em 8 litros de água filtrada previamente fervida a uma temperatura de aproximadamente 90°C, seguido de um período de infusão de 10 minutos (Sinir *et al.*, 2019). Em seguida, a infusão foi filtrada utilizando um crivo estéril e resfriada até atingir a temperatura ambiente de 28°C ($\pm$ 3°C). Para cada litro de água, 84 gramas de café moído foram coados (SCA, 2019). Ao final das preparações, foi adicionada sacarose em uma concentração de 7% (p/v). Posteriormente, foi adicionado 3% (p/v na base de peso úmido) de fragmento da película celulósica (SCOBY) e 10% (v/v) de starter (kombucha de chá verde e café fermentado previamente), totalizando um litro de infusão. A mistura resultante foi colocada em potes de vidro estéril com capacidade para 3 litros, cobertos com pano de algodão e vedados firmemente com auxílio de elástico. As concentrações de chá verde e café utilizadas para as fermentações estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Proporção de chá e café utilizada para a preparação da bebida.

Amostra	Chá Verde	Café Arábica	Sacarose	SCOBY	Starter
F100	-	100%	7%	3%	10%
F75	25%	75%	7%	3%	10%
F50	50%	50%	7%	3%	10%
F25	75%	25%	7%	3%	10%
C100	100%	-	7%	3%	10%

Fonte: Do autor (2024).

A fermentação foi realizada em temperatura ambiente de $28 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 14 dias (Goh *et al.*, 2012). Ao final da fermentação, a celulose bacteriana produzida foi pesada de acordo com a seguinte equação: Peso de celulose bacteriana (g/L) = (peso total do recipiente contendo SCOBY + infusão) - (peso do copo pré-pesado + caldo de chá). O rendimento do SCOBY foi calculado pela fórmula: Redimento (%) = peso úmido SCOBY (g/L) ÷ Concentração Inicial de Sacarose (g/L) (Goh *et al.*, 2012).

5.2. Análises

As análises físico-químicas, cromatográficas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. Microscopia eletrônica de varredura foi conduzida no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, Minas Gerais. Todas as análises foram realizadas em triplicata dos tempos inicial e final.

5.2.1. Análises microbiológicas

Bactérias do ácido acético, bactérias do ácido láctico, leveduras e mesófilas totais foram quantificados da bebida fermentada e SCOBY. O plaqueamento e contagem de colônias foi realizado utilizando a técnica de plaqueamento em superfície. Inicialmente foi adicionado 25 g de SCOBY macerado de cada tratamento em 225 mL de água peptonada 0,1% (Peptona Bacteriológica 1 g/L), equivalendo à diluição 10^{-1} e posteriormente realizadas diluições seriadas até 10^{-4} . Foram feitas diluições diretas para as amostras líquidas. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL da amostra foram adicionadas em placas de Petri contendo os meios *Glucose Yeast Extract* (GYC: Glicose 50 g/L; Extrato de Levedura 1 g/L; Carbonato de Cálcio 3 g/L; Ágar 15 g/L, adicionando 0,4% (v/v) de nistatina) para bactérias do ácido acético, *De Man Rogosa Sharpe* modificado (MRS: Glicose 20 g/L; Peptona de Caseína 10 g/L; Extrato de Carne 10 g/L; Extrato de Levedura 4 g/L; Fosfato Dipotássico 2 g/L; Acetato de Sódio 5 g/L; Citrato de Triamônia 2 g/L; Sulfato de Magnésio 0,2 g/L; Sulfato de Manganês 0,05 g/L; Tween80 1,08 g/L; Ágar 15 g/L; adicionando 0,4% (v/v) de nistatina) para bactérias do ácido láctico, *Yeast Extract Peptone Glucose* modificado (YEPG: Extrato de Levedura 10 g/L; Peptona 20 g/L; Glicose 20 g/L; Ágar 15 g/L; pH 3,5, adicionado 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol) para leveduras, e Agar Nutriente (AN: Extrato de Carne 1 g/L; Extrato de Levedura 2 g/L; Peptona 5 g/L; Cloreto de Sódio 5 g/L; Agar 15 g/L) para microrganismos totais. Em seguida, com auxílio de alça de *Drigalski* o

inoculo foi espalhado até completa absorção. As condições de incubação foram de 28 °C por 48 horas para YEPG e 35 °C por 72 horas para GYC, MRS e AN. As placas contendo de 30 a 300 colônias foram selecionadas e os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). A presença de enterobactérias na bebida foi avaliada de acordo com o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (da Silva *et al.*, 2017) seguindo as recomendações legislação brasileira (IN nº 60/2019) para cafés, chás e produtos para infusão.

Os coliformes termotolerantes foram avaliados em meio Ágar *Eosin Methylene Blue* – EMB (Hidrolisado pancreático de gelatina 10 g/L; Lactose 5 g/L; Sacarose 5 g/L; Fosfato dipotássio 2 g/L; Ágar 15 g/L; Eosina Y 0,4 g/L; Azul-de-metileno 0,065 g/L). As placas foram incubadas a 45 °C/24 horas. As colônias de coliformes fecais são pretas-azuladas podendo apresentar brilho verde-metálico, enquanto as colônias de *Salmonella* são incolores ou cor âmbar/rosa. Caso houvesse crescimento de colônias típicas, seria verificado a presença de *Salmonella* sp. na bebida a partir de meios específicos de acordo com da Silva *et al.*, 2017.

5.2.2. Análises físico-químicas

O pH das amostras foi verificado com pHmetro digital com eletrodo de vidro, conforme as recomendações da *Association Of Official Analytical Chemisty* - AOAC (Horwitz, 2000). A mensuração foi feita diretamente em 5 mL das amostras nos tempos inicial e final do processo fermentativo (Malbaša *et al.*, 2011).

O teor de compostos solúveis foi determinado pelo °Brix das bebidas em refratômetro óptico (Waterhouse, 2001).

A determinação da acidez titulável foi analisado pelo método volumétrico com a solução padrão de hidróxido de sódio (0,1 N) (Liamkaew *et al.*, 2016).

5.2.3. Determinação de açúcares, álcoois e ácidos orgânicos por HPLC

A concentração de carboidratos (glicose, frutose, sacarose), teor de etanol e ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, láctico e acético) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme descrito por Puerari *et al.* (2012) nos tempos inicial e final de fermentação. O sistema de cromatografia líquida Shimadzu (Shimadzu Corp., Japão) foi utilizado com duplo sistema de detecção que consistiu em um detector UV-Vis (SPD 10Ai) e um detector de índice de refração (RID-10Ai). A coluna de exclusão de íons Shimadzu Shim-pack SCR-101 H (7,9 mm 9 30 cm) foi operada a temperatura de 50 °C para ácidos e álcoois e

a 30 °C para carboidratos. Solução de ácido perclórico com pH 2,11 foi usada como eluente a taxa de fluxo de 0,6 mL / min. Os ácidos foram detectados por meio de absorbância de UV (210 nm), enquanto álcoois e carboidratos foram detectados por RID. A concentração de carboidratos (glicose, frutose, sacarose), ácidos (acético, láctico, cítrico, málico, tartárico, succínico, ácido oxálico) e etanol foram quantificados com base em curvas padrão dos compostos puros, injetados nas mesmas condições que as amostra.

5.2.4. Determinação de compostos voláteis por GC-MS

Os compostos voláteis das bebidas produzidas foram avaliados nos tempos inicial e final do 14º dia de fermentação para todos os tratamentos, em triplicata. Os compostos voláteis foram analisados com microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS), conforme descrito por Zhang *et al.* (2021) com pequenas modificações. Alíquotas de 2 mL das amostras de cada tratamento foram transferidas para frascos vials âmbar de 10 mL hermeticamente fechados com septo de teflon e tampa de rosca. A SPME foi operada a 60 °C, usando um tempo de equilíbrio de 15 minutos e um tempo de extração de 30 minutos sob agitação constante. Após a extração em fibra de 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), a dessorção térmica no injetor de GC foi realizada a 240 °C por 2 min.

As análises foram realizadas utilizando um sistema GC-MSQP2010 SE (Shimadzu) equipado com coluna DB-WAX (30 m × 0,25 mm id × 0,25 µm) operado a 50 °C por 5 min, aumentado em 3 °C/min até atingir a temperatura de 190 °C, sendo mantida por 10 min. Hélio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste com um fluxo constante de 1,2 mL/min. As injeções foram realizadas usando o modo sem divisão com um tempo de injeção de 2 minutos. Após 3 min, os espectros de massa foram adquiridos continuamente de 45 a 1000 m/z. A temperatura da fonte de íons de elétrons foi de 230 °C e o quadrupolo de 150 °C. Alcanos e 4-nonanol (0,126 mg/mL) foi adicionado junto a algumas amostras para quantificação relativa dos compostos. As análises dos espectros de massa foram utilizando padrões da biblioteca Nist 2011.

5.2.5. Análise de cor instrumental

A cor instrumental das bebidas foi medida através da leitura direta da refletância no sistema de coordenadas retangulares CIElab, usando um colorímetro Konica Minolta® (Modelo CR-400) calibrado de acordo com o sistema CIE (iluminante D65). O sistema CIElab

permite a quantificação de três características da cor: luminosidade (L^*), que varia de preto ($L^* = 0$) a branco ($L^* = 100$); a intensidade da cor vermelha (+) a verde (-) (a^*); e a intensidade do amarelo (+) a azul (-) (b^*). Para avaliar a diferença de cor total (DCT) entre os diferentes tempos de fermentação, foi calculado o índice ΔE^* seguindo a fórmula descrita abaixo.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

A estimativa da diferença de cor entre os tratamentos antes e depois da fermentação pode ser classificada como imperceptível (0–0,5), levemente perceptível (0,5–1,5), perceptível (1,5–3,0), bem visível (3,0–6,0) ou ótimo (>6,0), dependendo do valor de ΔE^* (Vazquez-Cabral et al., 2016; Zou et al., 2021).

5.2.6. Compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante da bebida

5.2.6.1. Polifenóis totais

O teor total de polifenóis (TPC) foi determinado por ensaio espectrofotométrico (UV-VIS Spectrum SP-2000 UV, Biosystems) seguindo a metodologia de Fast-Blue (Medina, 2011). Volume de 50 μ L de extrato (20 μ L da amostra + 1980 μ L de H_2O), 2,5 mL de reagente Fast-Blue (10%) e 2,0 mL de Na_2CO_3 (4% p/v) foram homogeneizados e incubados em ambiente temperatura (25 °C), no escuro por 2 horas. A absorbância das amostras foi medida a 750 nm. As concentrações de fenólicos foram calculados com base na curva padrão de ácido gálico (variando de 10 a 100 μ g/mL) e expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico em 100 mL da amostra (mg GAE / 100 mL). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.6.2. Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelos métodos DPPH e complexo do fosfomolibdênio por Peroxidação de Ácidos Graxos (PCM), de acordo com a modificação descrita por Prieto et al. (1999). Alíquota de 100 μ L do extrato da amostra foi misturada com 3 mL de solução reagente composta por ácido sulfúrico 1,8 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM, e os tubos foram incubados em banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a absorbância do complexo de fosfomolibdênio foi medida a 695 nm. A quantificação foi realizada com base em curva padrão de ácido ascórbico, com a utilização de mistura de metanol 50% e acetona 70% (1:1) como

branco. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por 100 mL de amostra.

5.2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana da bebida

O método utilizado para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) consistiu na diluição das bebidas fermentadas em caldo Mueller-Hinton para obtenção de diferentes concentrações nos poços de microplacas. As concentrações das bebidas fermentadas variaram de 0,78% a 100%. Foram selecionadas quatro bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos, incluindo duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* (EPEC) INCQS 00181 CDC 055 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 564) e duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 8702 e *Bacillus cereus* ATCC 14579). Os inóculos bacterianos foram ajustados para população de 1×10^8 UFC/mL e diluídos 1:100 em caldo Mueller-Hinton para a concentração de 1×10^6 UFC/mL do inóculo. Em seguida, 10 μ L (1×10^4 UFC/mL) desta suspensão foi inoculado em cada poço da placa de microtitulação adicionada de 100 μ L dos líquidos fermentados. Foram realizados controles durante o estudo, incluindo chá e café não fermentados, amostras sem a adição de inóculo bacteriano, bactérias sem a adição de bebida fermentada e ácido acético em diferentes concentrações (variando de 0,012 a 1,5 mg/mL). As microplacas foram incubadas em condições de aerobiose a 35 °C por 24 horas em estufa bacteriológica.

A CMI foi determinada examinando a placa e registrando a menor concentração da bebida capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. A leitura do ensaio foi realizada por meio de método colorimétrico, adicionando-se 20 μ L de corante resazurina sódica (0,01% p/v) a todos os poços da placa. A mudança na cor da resazurina de azul para rosa indica o crescimento microbiano. Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), 10 μ L dos poços com a menor CMI foram retirados e semeados em placa de Petri com ágar Mueller-Hinton. Após 24 horas de incubação a 35 °C, as placas foram lidas. A menor concentração da bebida fermentada que não apresentar crescimento microbiano em placa será considerada bactericida. Por outro lado, será considerado que a concentração testada apresentou ação bacteriostática se os microrganismos apresentarem crescimento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (SANTURIO et al., 2007).

5.2.8. Análise microscópica do SCOBY

A fim de verificar a interação dos microrganismos nos filamentos do SCOBY dos diferentes tratamentos foram feitas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Definição (MEV-HD). O SCOBY formado ao fim do décimo quarto dia de fermentação foi cortado em fatias finas no sentido longitudinal e transversal e lavada com água ultrapura estéril. Os fragmentos de celulose lavados foram centrifugados a 4500 rpm durante 2 min, e o sobrenadante descartado. A centrifugação foi repetida quatro vezes para se livrar do muco aderente.

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2,0 % em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, CaCl_2 0,001 M, pH 7,2) e armazenados a 4°C por no mínimo 24 horas. Após a fixação, foi utilizado o protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura descrita por Bozzola e Russel (1999) com algumas modificações. As amostras foram retiradas do fixador Karnovsky e colocadas em glicerol por 30 minutos. Posteriormente, foram efetuados cortes em nitrogênio líquido (criofatura) seguidos por três lavagens em água destilada e desidratação em gradiente de acetona (25 %, 50 %, 75 %, 90 % uma vez e 100 % por três vezes). Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO_2 e complementação da secagem. As amostras foram montadas em suportes de alumínio (stubs) com fita de carbono sobre película de papel de alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 (Alves *et al.*, 2013). As imagens geradas foram analisadas através do software ImageJ 1.5.

5.2.9. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado e as variáveis foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com $p < 0,05$ de significância, utilizando-se o software de estatística Sisvar 5.8 (Ferreira, 2014).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização microbiológica

A população de bactérias do ácido acético nas amostras das bebidas F100 e F75 foi significativamente menor em comparação com as amostras F25, F50 ($p < 0,05$). O tratamento controle (C100), com 100% de chá verde, apresentou maior número de bactérias do ácido acético (8,4 log UFC/mL), diminuindo proporcionalmente ao aumento das concentrações de café ao longo dos tratamentos. Concomitantemente, a população de bactérias do ácido láctico foi maior (7,5 log UFC/mL) nos tratamentos com maior concentração de café (F100 e F75). Além disso, as amostras não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para população de leveduras entre as bebidas (Tabela 3).

Tabela 3: População de bactérias e leveduras presente em bebida Kombucha e SCOBY após 14 dias de fermentação.

População de Microrganismos (log UFC/mL)	F100		F75		F50		F25		C100	
	Bebida	SCOBY	Bebida	SCOBY	Bebida	SCOBY	Bebida	SCOBY	Bebida	SCOBY
Bactérias do										
Ácido Acético	5,0aA	7,0bB	5,3aA	6,8aB	6,5aB	7,1bB	7,4bB	8,1cC	8,4cC	8,3cC
(GYC)										
Bactérias do										
Ácido Láctico	7,5cB	8,2cC	7,5cB	7,2bB	5,5bA	7,1bB	5,1aA	7,2bB	5,0aA	6,9aB
(MRS)										
Leveduras	6,9bB	6,5aA	7,0bB	6,5aA	7,1aB	6,6aA	7,3bB	6,6aA	7,4bB	6,8aB
(YEPG)										
Microrganismos										
Mesófilos Totais	7,0bB	7,0bB	6,2aA	5,2aA	6,8aB	6,8aB	8,4cC	8,4dC	8,4cC	8,5cC
(AN)										
Enterobactérias	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(EMB)										

CV (%) = 10,6; Contagem SCOBY: CV (%) = 6,8; ND = não detectado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparadas letras minúsculas em colunas e maiúsculas em linhas.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; CV = coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2024).

Este resultado pode indicar que a presença de cafeína e outros componentes do café tenha promovido a proliferação de bactérias do ácido láctico, em detrimento de outras, como as bactérias ácido acéticas. A cafeína, por exemplo, é conhecida por ter propriedades antimicrobianas e pode ter inibido o crescimento de algumas BAA, enquanto os ácidos

clorogênicos podem ter fornecido substrato preferencial para as BAL. Essa hipótese é corroborada por estudos como o de Tran et al. (2020), que demonstraram que a composição do substrato pode influenciar significativamente a comunidade microbiana do kombucha. Além disso, Mo & Liu (2021) relataram que a cafeína pode atuar como um promotor do crescimento de certas BAL. Emiljanowicz & Malinowska-Panczyk (2020) sugerem que as BAL podem inibir o crescimento de BAA por meio de competição. Utoiu *et al.* (2018) após fermentar Kombucha de chá verde com adição de pólen multifloral por 30 dias, observaram que ocorreu a bebida apresentou aumento na contagem de BAL e diminuição de BAA, corroborando com os resultados observados no presente estudo.

Coton et al. (2017) relataram que as espécies *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus nageli* foram mais abundantes do que AAB em meio líquido durante as fermentações de chá verde. Além disso, foi comprovado que a inoculação de espécies de *Lactobacillus* pode aumentar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do chá Kombucha, aumentando a produção de ácido láctico e ácido glucurônico (Cvetkovic et al., 2019; Nguyen et al., 2015). Cardoso *et al.* (2020) também observaram altas contagens de bactérias lácticas, próximo a 10^6 UFC/mL, em Kombuchas de chá verde e chá preto após fermentação a 25 °C por 10 dias. BAL provenientes de Kombucha podem ser considerados potencialmente probióticos porque atendem a maioria dos critérios, como: alta tolerância a sais biliares e capacidade de sobreviver no intestino humano (Bogdan *et al.*, 2018). Embora os cafés fermentados por SCOBY não possam ser rotulados como cafés probióticos (Hill *et al.*, 2014), pesquisas com adição de cepas probióticas para fermentação de café vem sendo realizadas (Chan *et al.*, 2020, 2021). Com isso, investigações acerca do potencial probiótico das cepas de BAL isoladas do próprio Kombucha de café se fazem viáveis.

A população de leveduras variou entre 6,5 e 7,4 log UFC/mL, com aumento significativo para a bebida, em comparação ao SCOBY, para os tratamentos F75 e F100. As leveduras fermentam em anaerobiose, e por consequência, se encontram em maior quantidade na parte líquida onde a disponibilidade de oxigênio é menor. As leveduras mais prevalentes em Kombucha de *Camellia sinensis*, *Zygosaccharomyces* spp., *Brettanomyces* spp. e *Saccharomyces* spp., são todas fermentativas, o que significa que podem crescer anaerobicamente e produzir etanol (Freer, 2002). Marsh *et al.* (2014) encontraram leveduras cultiváveis tanto no SCOBY quanto no líquido com os mesmos gêneros e em populações semelhantes.

As leveduras desempenham papel importante durante a fermentação do Kombucha porque são conhecidas por serem as responsáveis pela produção da invertase (EC 3.2.1.26), enzima que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. Esses produtos podem ser usados por um grande espectro de microrganismos durante a fermentação do Kombucha (Sievers *et al.*, 1995). É possível que os compostos presentes no café tenham estimulado a atividade e o crescimento das leveduras, resultando em maior produção de invertase e, conseqüentemente, maior disponibilidade de açúcares simples para o crescimento de ambos os grupos microbianos. Em geral, a diversidade de leveduras é considerada maior do que a diversidade bacteriana em culturas de Kombucha e contribuem para o desenvolvimento do aroma pela produção de compostos aromáticos como ésteres (Teoh *et al.*, 2004).

A adição de 10% de *starter* transfere altas concentrações de microrganismos da cultura antiga para valores próximos à concentração final, neste caso 5 a 8 log.UFC/mL para cada grupo. O grupo de microrganismos mesófilos totais apresentou maior crescimento populacional nos tratamentos F25 e C100, chegando a 8,5 log UFC/mL no SCOBY do tratamento com 100% de chá verde. Não houve diferença significativa entre bebida e SCOBY para este grupo de microrganismos. Zhao *et al.* (2018) mostrou contagens de bactérias mesófilas ($6,93 \times 10^6$ UFC/mL) e leveduras ($7,52 \times 10^5$ UFC/mL) próximas ao encontrado neste estudo após fermentação de chá vermelho a 28 °C durante 10 dias. A biodiversidade microbiana do SCOBY, e conseqüentemente da bebida, varia dependendo de dois fatores principais: (1) condições geográficas e climáticas da região de sua origem: tipos de leveduras e bactérias selvagens que ocorrem localmente; (2) condições de fermentação: temperatura, tempo de fermentação, quantidade de sacarose, tipo de substrato (De Filippis *et al.*, 2018). Não houve crescimento de coliformes termotolerantes nas amostras. Os diferentes morfotipos celulares estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Características macroscópicas das colônias isoladas de SCOBY em diferentes meios de cultivo.

Morfotipos	Meio	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Cor	Brilho	Tamanho	Observações
M1	YEPG	Circular	Convexa	Lobada	Lisa	Branca	Opaca	Médio	
M2	YEPG	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Branca	Opaca	Pequeno	
M3	YEPG	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Branca	Brilhosa	Grande	
M4	YEPG	Irregular	Convexa	Lobada	Rugosa	Branca	Opaca	Grande	
M5	MRS	Circular	Convexa	Denteada	Rugosa	Branca	Brilhosa	Pequeno	Ponto branco no meio
M6	MRS	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Translúcida	Brilhosa	Médio	
M7	MRS	Circular	Convexa	Denteada	Rugosa	Branca	Brilhosa	Grande	Ponto branco no meio
M8	MRS	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Branca	Opaca	Pequeno	
M9	MRS	Irregular	Umbonada	Lobada	Lisa	Branca	Brilhosa	Grande	Semelhante a “ovo frito”
M10	MRS	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Translúcida	Brilhosa	Médio	
M11	GYC	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Branca	Brilhosa	Pequeno	Halo translúcido
M12	GYC	Circular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Brilhosa	Pequeno	Halo translúcido
M13	AN	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Branca	Brilhosa	Pequeno	

Fonte: Do autor (2024).

6.2. Dinâmica da fermentação

Valores de pH e concentração de °Brix do tempo inicial e final e a acidez Titulável do tempo final da fermentação estão na Tabela 5. A adição de 10% de *starter* causou a diminuição do pH inicial em todos os tratamentos, o que pode ser observado quando comparado ao café e chá sem adição da cultura iniciadora (infusões controle). Após a fermentação, o pH final das bebidas diminuiu ainda mais, variando de 3,4 a 4,0 entre os tratamentos, valores considerados ideais para o consumo do Kombucha (Jayabalan *et al.*, 2014; Roussin, 1996). A diminuição do pH proporciona ambiente ácido favorável ao crescimento de microrganismos acidófilos além de aumentar a segurança da bebida, pois inibe o crescimento da maioria dos microrganismos patogênicos, sensíveis a esta faixa de pH (Nummer, 2013, Dutta & Paul, 2019).

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos gerados pela fermentação em bebida Kombucha produzida a partir de diferentes concentrações de café e chá nos tempos inicial e final da fermentação.

Físico-química	Chá	Café	F100		F75		F50		F25		C100	
			Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH	5,9e	5,0d	4,7d	4,0c	4,7d	4,0c	4,7d	3,9c	4,7d	3,6b	4,6d	3,4a
°Brix	7,0c	7,5d	7,5d	6,5c	7,3c	5,3b	7,1c	5,0a	7,0c	5,4b	7,0c	5,0a
Acidez Titulável (%)	-	-	-	0,35a	-	0,38a	-	0,41b	-	0,44c	-	0,45c

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p>0,05$), sendo comparadas em linha.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias.

Fonte: Do autor (2024).

O menor valor de pH foi observado no tratamento contendo 100% de chá verde (3,4), seguido do tratamento com 25% de café arábica + 75% de chá verde (3,6), sendo influenciada pela população microbiana. Os tratamentos com 100, 75 e 50% de café, não apresentaram diferença significativa nos valores finais de pH (4,0, 4,0 e 3,9 respectivamente). Watawana *et al.* (2015) ao fermentar infusão de café (moído e instantâneo) por 7 dias encontraram valores similares ao deste trabalho, onde houve a diminuição do pH de 5,0 para 4,1. Este comportamento era esperado devido à produção de diferentes ácidos orgânicos inerentes ao processo fermentativo e característico do metabolismo do consórcio de bactérias do ácido acético, bactérias do ácido láctico e leveduras (Watawana *et al.*, 2015).

A diminuição do °Brix de $7,0\pm0,5$ para $5,0\pm0,9$ entre todos os tratamentos mostra que houve o consumo de açúcares durante a fermentação. O teor de acidez total titulável (ATT) apresentou diferença significativa entre os tratamentos, variando entre 0,35 e 0,45% (Tabela 5). Cardoso *et al.* (2020) encontraram valores similares ao verificar a acidez total titulável entre Kombuchas de chá verde (0,36%) e chá preto (0,32%). Essa diferença, assim como o pH, provavelmente foi causada pela predominância de diferentes espécies de bactérias do ácido acético e ácido láctico entre os tratamentos, e consequentemente, na variação de produção de ácidos orgânicos (Coton *et al.*, 2017). O pH de Kombucha fermentado de maneira ideal (em termos de sabor) deve estar entre 3,0 e 4,0 enquanto um ATT de ~0,4% produzem uma bebida tradicional de Kombucha de alto valor sensorial (Jayabalan *et al.*, 2014; Roussin, 1996;

Greenwalt *et al.*, 2000). De acordo com a Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019, para ser considerada segura, o pH da Kombucha deverá apresentar valores entre 2,5 e 4,2 sendo teores mínimo e máximo, respectivamente. Com base nas recomendações do FDA Food Code Model, $\text{pH} \leq 4,2$ é considerado o limite crítico e, se o pH não atingir esse valor em 7 dias, a cultura é considerada contaminada e deve ser descartada. Presumindo que um valor de pH seja inferior a 2,5, recomenda-se a adição de chá fresco para atingir níveis adequados para consumo (Nummer, 2013, de Miranda *et al.*, 2022). Isso evidencia que o processo fermentativo em Kombucha a base de café arábica ocorreu adequadamente e similar com os parâmetros físico-químicos da bebida tradicional.

Os resultados da composição química da fermentação das cinco Kombuchas nos tempos inicial e final estão na Tabela 6. Algumas características similares podem ser observadas entre os tratamentos: (1) houve o consumo de sacarose e aumento de frutose e glicose residuais entre todos os tratamentos; (2) a concentração de álcool residual estava dentro do limite da legislação IN ($\leq 0,5$ % v/v) (variou entre 0,05 e 0,09% v/v), e; (3) concentrações de ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético apresentaram concentrações diferentes dependentes dos teores de chá verde e café. Glicerol e metanol não foram identificados em nenhuma amostra.

Tabela 6: Carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos (g/L) presente na bebida Kombucha nos tempos inicial e após 14 dias de fermentação.

	Chá	Café	F100		F75		F50		F25		C100	
			Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Sacarose	63,72c	60,78c	61,36c	38,41b	61,95c	9,92a	62,02c	9,92a	62,58c	20,48a	58,30c	18,59a
Glicose	1,57c	1,22b	0,61a	1,24b	0,43a	0,49a	0,39a	0,58a	0,61a	0,72a	0,56a	0,66a
Frutose	1,42a	1,42a	0,62a	1,17a	0,42a	0,47a	0,35a	0,61a	0,66a	0,74a	0,57a	0,72a
Etanol	0,07a	0,02a	0,35b	ND	0,21b	0,91b	0,10b	0,46b	0,21b	0,77b	0,23b	0,93b
Ácido Cítrico	0,63a	2,82d	2,38d	1,37c	2,73d	1,51c	1,88c	0,65b	1,23c	0,34a	0,53a	0,35a
Ácido Málico	0,88a	2,70b	1,53a	0,67a	0,98a	0,83a	1,26a	0,74a	1,13a	0,40a	0,93a	0,34a
Ácido Succínico	0,37c	0,06a	0,07a	0,25b	0,12b	0,05a	0,17b	0,10b	0,24c	0,12b	0,25c	0,11b
Ácido Láctico	1,44b	0,86a	0,82a	2,93d	0,36a	2,66c	0,23a	2,32c	0,59a	1,54b	0,56a	1,77b
Ácido Acético	0,10a	0,15a	0,23a	1,66b	0,15a	1,93b	0,16a	1,80b	0,14a	2,66b	0,16a	3,66c

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparadas em linha.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias.

Fonte: Do autor (2024).

O consumo de sacarose durante o processo fermentativo foi diferente entre as Kombuchas. Os tratamentos com 50 e 75% de café apresentaram a menor concentração de sacarose (9,9 g/L) ao final da fermentação, seguido do tratamento com 100% de chá verde (18,6 g/L). Este consumo pode estar associado à produção de celulose bacteriana, visto que estes tratamentos apresentaram maior rendimento no peso de SCOBY (sessão 6.4 – Tabela 11).

Houve aumento de 13,9 a 103,3% para glicose e 11,9 a 88,7%, para frutose ao final da fermentação. Isso mostra que ao passo que a sacarose estava sendo hidrolisada em glicose e frutose, parte desses açúcares estavam sendo consumidos durante a fermentação para o crescimento populacional e conversão em etanol e ácidos orgânicos ou utilizados na biossíntese de celulose e outros metabólitos secundários (Jayabalan *et al.*, 2014). As leveduras são essenciais durante a fermentação do Kombucha, pois produzem a enzima invertase responsável pela hidrólise de sacarose em glicose e frutose, que podem ser usados por um grande espectro de microrganismos presentes na bebida e SCOBY (Yildiz *et al.*, 2020). As bactérias do ácido acético utilizam a glicose para produzir celulose e ácido glucônico, e oxidam o etanol gerado durante a glicólise em ácido acético, principal ácido orgânico do Kombucha (Srihari & Satyanarayana, 2012).

Os ácidos acético e lático foram os principais ácidos produzidos em todos os tratamentos, com concentração máxima de ácido acético (3,66 g/L) no C100, com 100% de chá verde e concentração máxima de ácido lático (2,93 g/L) no F100, com 100% de café arábica. Essa maior concentração de ácido acético no tratamento com chá verde provavelmente foi o responsável pela maior acidez em relação aos outros tratamentos. A diferença nos teores de ácido acético e ácido lático é consistente com a diferença nas contagens de bactérias ácido acético e ácido lático entre as diferentes formulações.

Foram observadas diferentes concentrações para os outros ácidos orgânicos testados entre os tratamentos e nos diferentes tempos. O ácido cítrico apresentou diminuição da sua concentração ao final da fermentação. Essa tendência também foi observada para o ácido málico, apesar de não ter apresentado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos nos diferentes tempos. O ácido succínico foi o que apresentou menor concentração (entre 0,06 e 0,37 g/L) e houve bastante variação entre os tratamentos e tempos inicial e final. Variações nos teores de carboidratos e ácidos entre as Kombuchas produzidas a partir de diferentes infusões também foram observadas em outros estudos (Jayabalan *et al.*, 2007; Kallel *et al.*, 2012). Por exemplo, Cardoso *et al.* (2020) encontraram diferentes concentrações no teor de sacarose e ácido glucurônico na composição química entre Kombuchas de chá verde (19,29 g/L e 1,17

g/L, respectivamente) e chá preto (34,97 g/L e 0,47 g/L, respectivamente) fermentadas durante 10 dias à 25 °C. O ácido acético foi o principal ácido produzido em ambos os Kombucha, com concentração próxima a 3 g/L, seguido do ácido lático, com teor de 0,015 e 0,02 g/L para Kombucha de chá verde e preto, respectivamente.

Ao todo, 111 compostos voláteis foram identificados no GC-MS, sendo 1 ácido, 29 álcoois, 13 aldeídos, 22 cetonas, nove ésteres e 37 outros grupos de compostos, como amina, fenol, éter e hidrocarbonetos (Tabela 7). A maioria destes compostos foram provenientes da infusão de café. O aroma característico do café é derivado de mais de 1000 compostos voláteis, como pirazinas, furanos, aldeídos, cetonas e pirróis, que interagem entre si para conferir aromas de nozes, torrados e sulfurosos (Cordoba *et al.*, 2020).

A composição e concentração de compostos voláteis em Kombucha mudaram ao longo da fermentação. Novos compostos foram formados após a fermentação em todos os tratamentos, como palmitato de etila, laurato de etila e octanoato de etila, que conferem aroma frutado à bebida. Alguns álcoois formados estavam presente em todos os tratamentos, como terpineol, lilanol e nonanol, são responsáveis por aromas floral, lavanda, limão, fresco, mental, amêndoas, caramelo e lavanda, contribuindo para a percepção sensorial da bebida. Isso pode ser devido à ação de enzimas microbianas que levam à degradação de polifenóis complexos em moléculas mais simples, resultando em um aumento da atividade antioxidante da bebida em relação ao chá não fermentado.

A hidrólise de polifenóis durante a fermentação é provavelmente causada pela tanase, enzima produzida extracelularmente por leveduras e bactérias (Emiljanowicz & Malinowska-Panczyk, 2020). Como resultado da atividade da tanase, epigallocatequina, ácido gálico e glicose são liberados dos epigallocatequina galato, ésteres de ácido gálico e epicatequina galato. Os produtos desta reação enzimática possuem maior capacidade antioxidante do que os compostos não hidrolisados (Baik *et al.*, 2015, de las Rivas *et al.*, 2019). Chan *et al.* (2021) fermentando cafés com lactobacilos probióticos e leveduras, observaram perdas nos aromas endógenos do café. Por exemplo, os níveis de furanos, pirazinas, piridinas e pirróis diminuíram após fermentação com *S. boulardii* CNCM-I745 e *L. rhamnosus* GG. Os níveis de furfural e 5-metilfurfural também diminuíram drasticamente após a fermentação com *L. acidophilus* NCFM, *L. gasseri* LAC-343 e *L. fermentum* PCC isolados ou co-cultivados com *S. boulardii* CNCM-I745 (Chan *et al.*, 2021). As perdas mencionadas nos voláteis endógenos do café podem diminuir a intensidade do aroma na bebida final (Chan & Liu, 2022), embora estudos sensoriais confirmatórios ainda não tenham sido realizados.

Similar ao encontrado neste trabalho, Zhang *et al.* (2021) concluíram que Kombuchas produzidas a partir diferentes infusões (chá preto, chá verde, chá branco, crisântemo, madressilva e hortelã fresca) retém compostos voláteis característicos de seus respectivos substratos, enquanto, ácidos, álcoois e ésteres são produzidos durante o processo de fermentação, contribuindo para um aroma reconhecível de Kombucha. Os autores também verificaram que todos os compostos aumentaram em concentração ao longo dos 13 dias de fermentação.

Tabela 7: Área dos compostos voláteis encontrados por GC-MS nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde.

(Continua)

COMPOSTOS (área)	Chá Verde	Café	F100-I	F75-I	F50-I	F25-I	C100-I	F100-F	F75-F	F50-F	F25-F	C100-F
Álcoois												
<i>.alpha.-Methyl-.alpha.-[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol</i>	26,258	ND	ND	ND	ND	ND	ND	107,484	59,559	33,342	ND	ND
<i>.alpha.-Terpineol</i>	91,084	ND	ND	ND	83,199	111,917	120,216	ND	56,049	71,391	200,433	368,852
<i>1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-</i>	18,06	ND	ND	ND	ND	22,189	15,349	ND	23,283	29,862	72,613	116,972
<i>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-</i>	155,668	58,948	64,611	94,275	147,558	155,975	310,307	51,261	49,469	41,323	289,447	556,681
<i>1-Decanol</i>	ND	5,702	11,548	19,942	26,015	37,162	36,003	49,714	38,821	63,577	164,933	233,278
<i>1-Dodecanol</i>	50,445	49,945	41,925	47,789	67,267	100,527	42,999	63,997	74,852	68,081	154,811	287,317
<i>1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1a-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-</i>	21,467	ND	ND	ND	ND	19,033	12,272	ND	ND	ND	10,397	20,362
<i>1-Hexanol, 2-ethyl-</i>	95,657	ND	ND	ND	ND	ND	389,034	ND	ND	ND	104,123	116,046
<i>1-Nonanol</i>	15,446	ND	ND	27,984	ND	37,708	56,481	ND	17,625	17,345	21,669	ND
<i>1-Octanol</i>	92,982	ND	ND	ND	46,3	72,236	132,95	ND	22,818	20,969	63,357	57,287
<i>2,4-Heptadienal, (E,E)-</i>	216,515	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>2,4-Pentadien-1-ol, 3-ethyl-, (2Z)-</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25,256	ND	ND	ND	ND	ND
<i>2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-</i>	ND	ND	ND	ND	8,955	13,151	ND	139,371	87,004	64,054	130,946	196,226
<i>2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-</i>	128,169	ND	ND	ND	ND	128,026	113,503	ND	ND	ND	ND	ND
<i>2-Furanmethanol</i>	ND	4,450,938	4,577,397	4,007,858	3,546,312	2,165,271	ND	2,196,684	1,013,445	568,711	511,502	ND
<i>2-Furanmethanol, 5-methyl-</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	97,075	59,86	ND	ND	ND
<i>2-Furanmethanol, acetate</i>	ND	1,373,052	419,182	442,548	890,538	343,433	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>2-Methylenecyclohexanol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25,256	ND	ND	ND	ND	ND
<i>3,4-Dimethylbenzyl alcohol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,089	ND	ND	22,178	28,237	28,658
<i>3-Furanmethanol</i>	ND	4,450,938	4,577,397	4,007,858	3,546,312	2,165,271	ND	2,194,307	1,011,025	568,711	511,502	ND
<i>5,9-Undecadien-2-ol, 6,10-dimethyl-</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17,507	13,609	30,894	28,234

Tabela 7: Área dos compostos voláteis encontrados por GC-MS nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde.

(Continuação)

6,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41,347
<i>Benzyl alcohol</i>	62,917	ND	ND	53,082	57,272	82,915	56,416	109,977	78,438	96,232	238,065	277,711
Cyclohexanol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.beta.)-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,475	51,705
Ethanol, 2-(dodecyloxy)-	ND	ND	10,231	9,014	23,633	40,413	ND	17,17	23,528	14,85	24,595	28,727
<i>Geraniol</i>	128,169	68,422	ND	ND	114,835	ND	113,503	293,197	131,531	130,751	264,8	324,042
<i>L-.alpha.-Terpineol</i>	91,084	ND	ND	56,687	83,199	111,917	120,216	91,553	56,049	71,391	200,433	368,852
<i>Phenylethyl Alcohol</i>	160,307	255,364	522,536	578,788	540,956	497,133	310,502	1,882,521	1,224,851	936,187	1,589,931	2,181,194
Ésteres												
<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester</i>	ND	169,567	148,273	187,491	192,471	648,843	104,336	320,458	330,307	164,996	661,835	323,592
Dibutyl adipate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,993	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Dibutyl phthalate</i>	33,728	44,356	37,053	40,288	37,715	57,579	18,003	51,126	71,459	35,411	125,421	63,233
Dodecanoic acid, ethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	141,561	232,097	869,497	1,668,004
E-11-Hexadecenoic acid, ethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24,981
Hexadecanoic acid, ethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10,364	ND	31,218	15,485	66,043	30,033
Octanoic acid, ethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	49,164	2,121,474	8,803,328
<i>Phthalic acid, butyl hexyl ester</i>	33,728	44,356	37,053	40,288	37,715	57,579	18,003	51,126	71,459	35,411	125,421	63,233
<i>Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester</i>	17,071	ND	ND	ND	ND	89,793	ND	ND	ND	ND	22,37	30,015
Ácidos												
<i>n-Hexadecanoic acid</i>	14,05	10,129	14,622	14,781	15,633	16,852	17,645	32,75	16,795	16,423	17,998	21,748
Aldeídos												
<i>1H-Pyrrole, 1-(2-furanylmethyl)-</i>	ND	2,284,420	2,085,873	1,819,410	1,215,377	582,609	ND	394,809	ND	ND	ND	ND
<i>1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde</i>	ND	272,037	331,639	188,283	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde, 1-methyl-</i>	ND	869,093	922,977	930,08	720,359	492,098	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-</i>	ND	8,366,004	7,156,429	2,460,675	4,926,402	3,259,076	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 7: Área dos compostos voláteis encontrados por GC-MS nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde.

(Continuação)

<i>3-Furaldehyde</i>	ND	2,165,522	2,489,149	1,534,717	1,658,391	1,129,876	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-Hydroxymethylfurfural	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	30,356	ND
<i>Benzaldehyde, 3,4-dimethyl-</i>	675,006	1,278,717	1,133,544	1,404,987	1,374,321	2,096,650	1,264,702	1,079,840	1,828,789	699,605	1,159,155	916,917
<i>Benzaldehyde, 4-methoxy-</i>	102,016	47,886	ND	ND	ND	75,837	39,675	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-</i>	ND	82,501	87,9	69,76	43,603	28,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Furfural</i>	ND	2,165,522	2,489,149	1,534,717	1,658,391	1,129,876	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Indole</i>	33,889	283,795	268,411	225,956	134,571	83,633	9,401	27,621	19,822	16,814	27,818	21,205
<i>Isophorone</i>	118,72	ND	ND	ND	ND	ND	155,108	ND	ND	ND	ND	ND
Cetonas												
<i>.alpha.-Ionone</i>	147,242	ND	ND	ND	ND	ND	106,188	ND	ND	ND	ND	ND
<i>1H-Indole, 3-methyl-</i>	13,777	71,08	77,895	64,084	37,899	24,246	ND	77,664	55,823	29,547	30,815	ND
1-Propanone, 1-(2-furanyl)-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	470,22	ND	ND	ND	ND
<i>2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-</i>	9,229	8,162	7,934	13,334	24,068	8,99	21,822	7,676	7,161	9,173	9,39	15,625
<i>2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-</i>	30,255	ND	ND	ND	57,581	82,475	ND	209,553	166,985	191,558	432,702	ND
<i>2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-</i>	30,255	ND	ND	ND	57,581	82,475	41,488	209,553	166,985	191,558	432,702	ND
<i>2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-</i>	268,995	14,411	11,2	69,116	131,237	237,187	191,766	33,111	67,673	93,405	253,513	296,907
<i>3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-</i>	325,187	ND	ND	ND	126,181	187,374	218,585	ND	ND	ND	ND	ND
<i>4-(2,4,4-Trimethyl-cyclohexa-1,5-dienyl)-but-3-en-2-one</i>	49,829	ND	ND	ND	ND	67,452	54,067	ND	9,852	ND	108,987	194,541
<i>4-Hydroxy-3-methylacetophenone</i>	ND	154,496	181,037	121,52	65,949	34,279	ND	84,426	36,874	ND	ND	ND
<i>5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-</i>	ND	75,191	ND	344,56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-</i>	215,283	ND	ND	344,56	108,042	ND	ND	ND	52,834	ND	82,43	ND
<i>6-Methyl-6-(5-methylfuran-2-yl)heptan-2-one</i>	222,499	ND	ND	ND	ND	ND	87,056	ND	ND	ND	ND	ND
<i>D-Carvone</i>	998,767	ND	ND	180,341	321,022	575,69	658,478	ND	ND	ND	49,412	ND
<i>Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-</i>	23,973	467,116	492,895	454,579	288,076	154,961	13,924	786,235	342,058	186,228	176,205	22,485

Tabela 7: Área dos compostos voláteis encontrados por GC-MS nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde.

(Continuação)

<i>Ethanone, 1-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)-</i>	ND	349,478	ND	468,375	ND	ND	ND	385,531	211,693	129,585	112,356	ND
<i>Ethanone, 1-(2-furanyl)-</i>	ND	1,040,869	1,460,146	1,483,396	1,387,566	538,633	ND	819,789	ND	ND	218,441	ND
<i>Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-</i>	ND	154,496	181,037	121,52	65,949	34,279	ND	84,426	36,874	ND	ND	ND
<i>Ethanone, 1-(2-methyl-1-cyclopenten-1-yl)-</i>	195,344	ND	ND	ND	ND	117,544	108,304	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Megastigmatrienone</i>	ND	15,614	17,373	12,694	8,996	6,213	ND	19,783	12,733	6,695	5,77	ND
<i>trans-.beta.-Ionone</i>	325,187	ND	ND	64,83	126,181	187,374	218,585	ND	ND	ND	ND	ND
<i>trans-Furfurylideneacetone</i>	ND	92,717	110,695	81,481	39,862	24,756	ND	49,842	ND	ND	ND	12,503
Outros												
<i>Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-</i>	ND	278.221	275.280	274.085	288.173	277.268	ND	285.023	267.421	265.556	276.983	ND
<i>1,5-Heptadiene, 3,6-dimethyl-</i>	44,726	ND	ND	ND	ND	33,43	37,242	ND	ND	ND	ND	ND
<i>2-Allyl-4-methylphenol</i>	22,91	ND	ND	ND	ND	8,419	23,822	ND	ND	ND	ND	ND
<i>3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-</i>	118,584	ND	ND	ND	ND	ND	105,347	ND	ND	ND	ND	ND
<i>5H-5-Methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine</i>	ND	148,28	180,874	ND	ND	ND	ND	ND	92,612	ND	49,405	ND
<i>Anethole</i>	920,712	366,783	205,514	329,315	356,476	ND	261,164	ND	ND	ND	154,123	ND
<i>Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-</i>	ND	133,898	145,861	109,64	76,524	42,348	ND	129,567	81,574	ND	ND	ND
<i>Caffeine</i>	120,926	319,165	494,676	507,961	163,107	194,942	165,728	160,514	208,32	107,966	277,131	173,762
Cyclodecane	ND	ND	11,548	19,942	26,015	37,162	36,003	52,577	38,821	63,577	164,933	241,259
Ethyl trans-2-decenoate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94,221	164,07
Ethyl trans-4-decenoate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	244,309	337,11
<i>Furan, 2,2'-[oxybis(methylene)]bis-</i>	ND	926,777	1,128,481	838,792	474,91	228,299	ND	1,188,725	664,74	349,97	297,217	ND
Heneicosane	ND	ND	ND	ND	ND	30,413	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Naphthalene</i>	147,709	420,229	420,97	453,574	262,251	178,796	237,951	236,095	512,462	403,296	477,08	286,036
Octadecane	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	174,625	22,756	ND	ND	ND
<i>p-Cresol</i>	ND	52,958	84,251	71,895	31,162	27,209	ND	162,152	71,683	38,898	38,587	ND

Tabela 7: Área dos compostos voláteis encontrados por GC-MS nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde.

	(Conclusão)											
<i>Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-</i>	360,201	723,886	576,893	678,212	546,31	1,142,155	761,139	521,557	983,356	778,923	634,407	717,218
<i>Phenol, 2-methoxy-</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	323,99	153,928	ND	ND	ND
<i>Phenol, 2-methyl-</i>	ND	52,958	84,251	71,895	31,162	27,209	ND	162,152	71,683	38,898	38,587	ND
<i>Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-</i>	74,623	ND	ND	ND	ND	45,849	44,964	ND	ND	ND	ND	57,446
<i>Phenol, 3,4-dimethyl-</i>	ND	51,015	65,741	57,397	42,542	34,126	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Phenol, 4-ethyl-</i>	21,518	55,769	294,788	327,559	190,729	310,915	88,482	3,261,194	3,256,608	2,724,038	3,922,924	3,084,938
<i>Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-</i>	ND	284,491	3,208,094	3,595,054	1,303,801	942,459	ND	16,347,644	9,994,296	5,576,935	6,777,298	2,290,940
<i>Precocene I</i>	356,659	ND	ND	ND	141,335	198,466	209,931	ND	ND	ND	ND	78,864
<i>Pyrazine, (1-methylethenyl)-</i>	ND	ND	216,085	ND	ND	ND	ND	237,871	119,662	69,056	33,271	ND
<i>Pyrazine, 2,5-dimethyl-</i>	ND	879,004	1,122,465	1,270,314	292,181	ND	ND	ND	399,58	459,965	ND	ND
<i>Pyrazine, 2,6-dimethyl-</i>	ND	ND	1,170,417	865,872	ND	703,642	ND	1,392,025	505,058	200,834	ND	ND
<i>Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-</i>	ND	544,571	680,313	586,751	480,983	ND	ND	456,472	256,209	162,587	131,975	ND
<i>Pyrazine, 2-ethyl-3-methyl-</i>	ND	ND	ND	ND	ND	110,857	ND	170,709	78,315	ND	35,479	ND
<i>Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-</i>	ND	ND	1,243,329	571,601	ND	ND	ND	509,54	527,228	ND	317,066	ND
<i>Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl-</i>	ND	ND	413,493	766,904	343,717	413,368	ND	ND	328,334	ND	165,847	ND
<i>Pyrazine, 2-methyl-6-(1-propenyl)-, (E)-</i>	ND	117,177	124,619	103,384	ND	ND	ND	156,703	68,745	42,579	ND	ND
<i>Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-</i>	ND	1,288,802	1,255,571	1,408,342	1,087,075	703,866	ND	1,052,069	551,444	407,902	277,195	ND
<i>Pyrazine, trimethyl-</i>	ND	253,39	ND	406,855	ND	ND	ND	147,867	190,587	142,342	ND	ND
<i>Pyridine</i>	ND	ND	51,081	41,002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pyrimidine, 4,6-dimethyl-</i>	ND	879,004	1,115,270	ND	527,877	ND	ND	ND	398,892	ND	ND	ND
<i>Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-</i>	316,689	365,583	382,843	414,366	ND	757,987	346,467	ND	453,547	ND	388,31	379,97

Legenda: ND = não detectado; F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; I = Tempo Inicial; F = Tempo final após 14 dias de fermentação; compostos gerados após fermentação estão destacados em negrito.

Fonte: Do autor (2024).

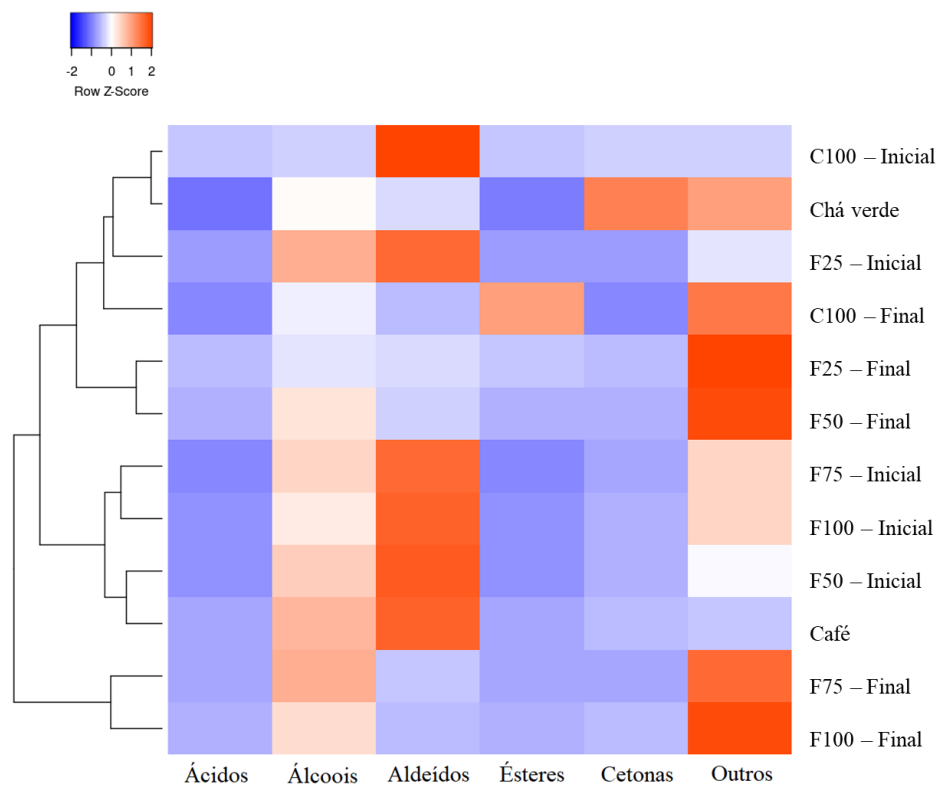
A formação de ésteres, como palmitato de etila, laurato de etila e octanoato de etila, nos kombuchas fermentados com café, indica a ocorrência de reações de esterificação durante a fermentação, catalisadas por enzimas produzidas pelas leveduras e bactérias. Esses ésteres contribuem para o aroma frutado e doce da bebida, conferindo um perfil sensorial distinto ao kombucha de café. Dos nove compostos detectados do grupo dos ésteres, oito foram do tratamento de 100% de chá verde fermentado. Essa maior diversidade de ésteres observada no tratamento C100 pode ser atribuída à maior diversidade de leveduras nesse tratamento, como observado por Marsh et al. (2014) em kombuchas tradicionais. Outros ésteres que estavam presentes em todos os tratamentos (Ex: laurato de etila, ftalato de diisobutil) apresentam compostos aromáticos de vinagre, frutado, ácido, azedo, e picante, responsáveis pelo aroma característico do Kombucha.

A diminuição da concentração de aldeídos após a fermentação, observada em todos os tratamentos, pode ser explicada pela volatilidade desses compostos e pela sua conversão em outros compostos durante o processo fermentativo. Adicionalmente, a presença de cafeína no café pode ter inibido a produção de alguns aldeídos, como demonstrado por Chan et al. (2021) em cafés fermentados com lactobacilos probióticos e leveduras. A redução dos aldeídos pode ter implicações no aroma final do kombucha de café, tornando-o menos intenso e mais suave em comparação com o kombucha tradicional. Os compostos do grupo dos aldeídos que se mantiveram após a fermentação (3,4-Dimethylbenzaldehyde e Indol) foram provenientes da infusão de chá verde. Estes compostos conferem aromas de cereja e baunilha e aroma floral em baixas concentrações, respectivamente (Zhang *et al.*, 2021).

Heatmap (Figura 4) foi construído com base na área dos compostos voláteis em cada tipo de Kombucha nos tempos inicial e final. Conforme mostrado no *heatmap*, houve uma relação entre os compostos voláteis dos tratamentos com 100, 75 e 50% de café arábica, grande parte vinda da infusão do próprio café. A diminuição da concentração de aldeídos após a fermentação foi observada em todos os tratamentos. Houve aumento na concentração de ésteres no tratamento com 100% de chá verde após a fermentação, que podem contribuir para um aroma característico de Kombucha.

A área dos compostos no tratamento com 50% de café diminuiu no final da fermentação, provavelmente devido ao metabolismo dos voláteis de cetonas e aldeídos do café a níveis baixos ou indetectáveis, com formação de novos compostos aromáticos, como ésteres e álcoois. O número de compostos voláteis aumentou em todas as amostras de Kombucha após a fermentação (Figura 5).

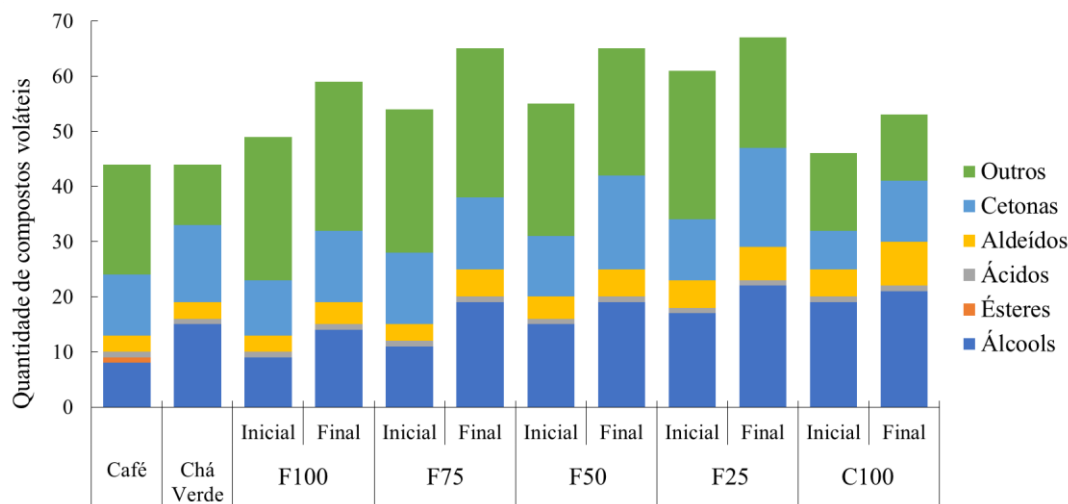
Figura 4: Heatmap da área dos compostos voláteis nos tempos inicial e final de fermentação em Kombuchas de café arábica e chá verde.



Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias.

Fonte: Do autor (2024).

Figura 5: Quantidade de compostos voláteis em bebida Kombucha nos tempos inicial e após 14 dias de fermentação.



Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias.

Fonte: Do autor (2024).

Durante o processo de fermentação do Kombucha, as leveduras primeiro metabolizam o açúcar para produzir álcoois e, em seguida, as bactérias do ácido acético usam álcoois para produzir ácidos (Tran *et al.*, 2020). Álcoois e ésteres são produzidos durante o processo de fermentação, contribuindo para um aroma reconhecível de Kombucha, similar com o observado nesta pesquisa (Tu *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2021, Zou *et al.*, 2021). O principal fator responsável por determinar o perfil bioquímico da bebida de Kombucha é a composição microbiológica do SCOBY. A proporção e diversidade de bactérias e levedura determinam o consumo de sacarose e a produção de monossacarídeos, ácidos orgânicos e etanol, todos os quais impactam no perfil de sabor e aroma do Kombucha (St-Pierre, 2019).

Além do aroma e sabor, a cor é um dos principais fatores avaliados pelos consumidores na escolha e aceitação de bebidas. A cor é um importante parâmetro sensorial que pode fornecer informações sobre a qualidade e estabilidade de bebidas fermentadas. A cor pode ser influenciada por diversos fatores, como os ingredientes utilizados, a presença de impurezas e a oxidação, bem como pelo substrato utilizado e pelo processo de fermentação empregado. Para avaliar a cor de uma bebida, são utilizados parâmetros como as coordenadas de cor L^* , a^* e b^* , que indicam respectivamente a luminosidade, a tonalidade vermelha-verde e a tonalidade amarelo-azul (Robinson *et al.*, 2011, Kaewkod *et al.*, 2019).

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas coordenadas de cor L^* , a^* e b^* entre os diferentes tempos de fermentação. No entanto, foi observada a tendência de mudança na cor das bebidas após o processo fermentativo. A amostra F100 foi a única que apresentou redução (-4,2%) no parâmetro de luminosidade (L^*) após fermentação. Os outros tratamentos aumentaram entre 2,9 e 17,2% de luminosidade. Observa-se que houve redução nos valores da coordenada a^* para todos os tratamentos, que ao longo da fermentação, passaram a valores negativos (entre -1,67 e -49,6%), reduzindo da tonalidade vermelho para verde-alaranjado. A coordenada b^* apresentou variação entre todas as amostras, com valores positivos para F75 e F50 (25,7 e 13%, respectivamente) e valores negativos para F100, F25 e C100 (-3,5, -3,6 e -21,6%, respectivamente).

A diferença total de cor (DTC) entre os tempos inicial e final da fermentação foi estatisticamente significativa em todos os tratamentos, como evidenciado pela variação na escala de diferença de cor (ΔE^*). Valores de ΔE^* entre 0-0,5 indicam que a diferença de cor foi imperceptível ao olho humano, enquanto valores entre 0,5-1,5 são levemente perceptíveis, 1,5-3,0 perceptível, entre 3,0 e 6,0 bem visível e maior que 6,0 indica percepção ótima na DTC (Vazquez-Cabral *et al.*, 2016). O tratamento F100 foi o que apresentou menor valor de ΔE^*

(2,28), resultando em uma mudança na DTC considerada perceptível ao olho humano. Todos os outros tratamentos apresentaram valores de ΔE^* acima de 6,0, demonstrando mudança na DTC considerada ótima. O tratamento com 50% de café e 50% de chá verde apresentou o maior valor de ΔE^* (16,15), sugerindo que a variação nas concentrações de café utilizadas na produção da bebida, bem como outros fatores envolvidos no processo de fermentação, tais como temperatura e umidade, influenciaram significativamente a cor da bebida final. Adicionalmente, a presença de microrganismos diferentes pode ter afetado a cor da bebida de forma distinta em cada tratamento.

Tabela 8: Parâmetros cromáticos em amostras de kombucha de café comparadas entre tempo inicial e final de fermentação.

Tratamento	Coordenadas	Tempo Inicial	Tempo Final
F100	L*	28,85±0,8aA	27,64±1,1aA
	a*	35,58±0,1cA	34,59±1,9cA
	b*	47,7±1,2bA	46,04±4,1bA
	ΔE^*	2,28	
F75	L*	31,26±1,8aA	40,33±5,3aA
	a*	33,83±0,1cA	32,26±3,1cA
	b*	51,61±3,1cA	64,88±5,8cA
	ΔE^*	16,15	
F50	L*	39,66±4,3aA	46,49±5,3aA
	a*	29,86±0,8cA	29,36±2,9cA
	b*	63,16±5,9cA	71,37±4,7cA
	ΔE^*	10,69	
F25	L*	52,72±2,7bA	57,41±1,5bA
	a*	21,31±1,0bA	18,2±1,0bA
	b*	67,47±0,5cA	65,06±2,3cA
	ΔE^*	6,12	
C100	L*	72,25±0,7cA	83,91±3,5cA
	a*	4,35±0,4aA	2,19±0,2aA
	b*	42,81±1,6aA	33,56±2,9aA
	ΔE^*	15,04	
Chá	L*	71,79±1,5c	ΔE^*
	a*	8,55±0,6a	
	b*	60,55±1,0c	
Café	L*	23,01±0,9a	60,21
	a*	35,63±2,3c	
	b*	37,91±1,1a	

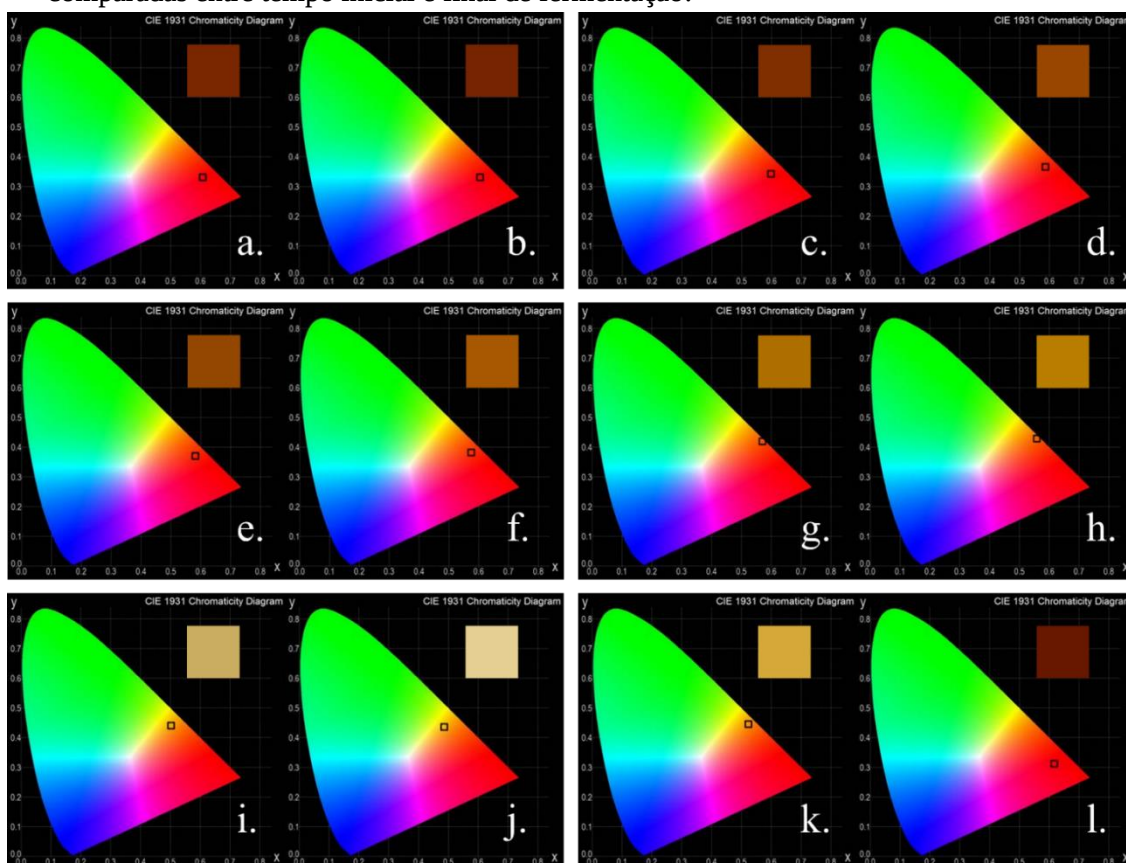
Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparadas letras minúsculas em colunas e maiúsculas em linhas.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias.

Fonte: Do autor (2024).

A variação nas cores das bebidas kombucha pode estar relacionada aos processos de biotransformação dos compostos fenólicos, em que ocorre o processo de polimerização (união de moléculas) ou despolimerização (degradação). Esse processo pode aumentar ou diminuir o teor de compostos fenólicos e acabar modificando a cor da bebida final (Watawana, Jayawardena & Waisundara, 2015), o que pode ser explicado pelo fato de que o kombucha é um alimento altamente fermentado. A oxidação enzimática desempenha um papel na alteração do conteúdo do composto de tanino para aflavina e arubigina que pode alterar a cor do chá preparado. A redução de b^* , amarelo para azul, pode ser devido à degradação dos compostos polifenólicos do café ao longo do tempo. Os polifenóis sofrem variações no ambiente ácido do kombucha causadas pelas enzimas liberadas por bactérias e leveduras (Martínez Leal, Valenzuela Suárez, Jayabalan, Huerta Oros, & Escalante-Aburto, 2018). A representação visual das diferenças de cor entre os tratamentos e tempos de fermentação é possibilitada pela transformação dos valores de $L^*a^*b^*$ em RGB (*red, green, blue*) na Figura 6.

Figura 6: Representação visual em RGB dos parâmetros cromáticos em amostras de kombucha de café comparadas entre tempo inicial e final de fermentação.



Legenda: a., b. F100, tempos inicial e final, respectivamente.; c., d. F75, tempos inicial e final, respectivamente; e., f. F50, tempos inicial e final, respectivamente; g., h. F25, tempos inicial e final, respectivamente; i., j. C100, tempos inicial e final, respectivamente; k. chá verde, l. café.

Fonte: Do autor (2024).

Em síntese, os resultados indicam que, embora os fatores de luminosidade e cor não tenham apresentado diferenças significativas após a fermentação, a variação de cor na bebida fermentada foi perceptível ao olho humano. Além disso, a utilização de diferentes concentrações de café gerou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Esses resultados são relevantes para compreender como diferentes fatores podem afetar a coloração de uma bebida e para garantir a qualidade e consistência dos produtos, uma vez que a cor é um dos primeiros atributos de qualidade considerado pelos consumidores na escolha de bebidas fermentadas (Vazquez-Cabral et al., 2016). O método utilizado permitiu a obtenção de medidas precisas e quantitativas da cor das amostras, fornecendo informações importantes sobre sua aparência e visualização (São José & Vanetti, 2015).

6.3 Atividade biológica

6.3.1 Compostos bioativos e atividade antioxidante

Compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo vegetal e possuem alta capacidade antioxidante, pois são capazes de neutralizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio. No kombucha, a atividade antioxidante está associada à presença desses compostos no substrato utilizado para a fermentação (Liu, 2013; Jayabalan et al., 2008; Malbasa et al., 2011). A amostra de infusão de chá verde exibiu o maior valor para o teste Fast-blue, com concentração de 131,04 mg GAE / 100 mL (Tabela 9).

Tabela 9: Conteúdo de fenólicos totais em amostras de kombucha pelos métodos de Fast Blue.

(Continua)

Tratamento	Fenólicos totais (mg GAE / 100 mL)	
	Tempo Inicial	Tempo Final
F100	66,16±4,6aB	78,88±3,2aA
F75	58,95±3,7aB	97,47±4,7aA
F50	53,95±3,8aB	119,56±5,3aA
F25	35,40±2,9aB	126,45±4,2aA

Tabela 9: Conteúdo de fenólicos totais em amostras de kombucha pelos métodos de Fast Blue.

		(Conclusão)
C100	21,81±1,4aB	117,22±4,9aA
Chá	131,04±7,1b	-
Café	110,56±5,9b	-

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparadas letras minúsculas em colunas e maiúsculas em linhas.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias.

Fonte: Do autor (2024).

Observou-se aumento na concentração de compostos fenólicos em todos os tratamentos após a fermentação. Isso pode ser explicado pelo fato de que o processo de fermentação de kombucha é caracterizado por um equilíbrio dinâmico entre os componentes envolvidos, incluindo os microrganismos, os componentes do substrato e os fenólicos produzidos, mostrando que a composição fenólica do chá é bastante constante, apesar do processamento do chá. Dessa forma, mesmo que haja variações no nível de fenólicos ao longo do tempo, elas podem ser compensadas por outros componentes do sistema, resultando em níveis estáveis de fenólicos totais (Chu & Chen, 2006).

A amostra C100 apresentou o maior aumento na concentração de compostos fenólicos após a fermentação, com aumento de 437,4%. Os resultados para esse teste também revelaram a tendência de diminuição na concentração de compostos fenólicos à medida que se aumentava a concentração de café nas amostras, com valores de aumento de 257,2%, 121,6%, 65,3% e 19,2% para as amostras F25, F50, F75 e F100, respectivamente. A variação nos níveis de fenólicos totais durante a fermentação de kombucha pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a natureza do substrato utilizado e condições de fermentação. Os compostos fenólicos em formas complexadas podem ser decompostos em moléculas mais simples ou em formas reduzidas em decorrência das condições ácidas e da ação de enzimas liberadas por bactérias e leveduras presentes na cultura simbiótica do kombucha, o que pode resultar no aumento do teor total de polifenóis. Além disso, as técnicas de extração e análise dos fenólicos podem influenciar nos resultados obtidos. (Bhattacharya et al., 2016; Gamboa-Gómez et al., 2016; Jayabalan et al., 2008; Silva et al., 2021).

Ao comparar os diferentes tratamentos de kombucha, é possível observar que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de fenólicos totais em ambos os testes. Isso pode

ser atribuído à utilização das concentrações diferentes de café e de chá para a elaboração da kombucha, que podem afetar a quantidade e a composição dos fenólicos presentes na bebida final. Os compostos fenólicos fazem parte dos compostos bioativos mais importantes do café (como ácidos clorogênicos e derivados), além dos alcaloides do grupo das metilxantinas (cafeína), ácido nicotínico (vitamina B3) e seus precursores trigonelina, magnésio e potássio. Os principais grupos de compostos fenólicos nos extratos de grãos de café são os ácidos clorogênicos (CGA), que são ésteres do ácido quínico e do ácido trans-hidroxycinâmico (Ludwig et al., 2014).

Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir, prevenir ou atrasar o dano celular causado por radicais livres e moléculas instáveis presentes nas células humanas, (Buatong et al., 2022). A amostra F100 registrou o maior valor no teste de DPPH (86,05), com acréscimo de 4,4% em sua capacidade antioxidante após fermentação. No teste do complexo fosfomolibdênio, a amostra F50 apresentou a maior capacidade antioxidante (3,02 mg/100 mL), com aumento de 17,1% após fermentação. Adicionalmente, a amostra F75 também exibiu aumento notável de 18,7% em sua capacidade antioxidante após fermentação. Apesar dessa tendência de aumento da atividade antioxidante após a fermentação, a variação não foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10: Atividade antioxidante em amostras de kombucha pelos métodos de DPPH e Fosfomolibdênio.

Tratamento	Antioxidantes			
	%DPPH		Fosfomolibdênio (mg AAE / 100 mL)	
	Tempo Inicial	Tempo Final	Tempo Inicial	Tempo Final
F100	82,44±8,6bA	86,05±3,2aA	2,38±0,7aA	2,54±0,6aA
F75	82,76±7,3bA	82,95±5,8aA	2,51±0,3aA	2,98±0,3aA
F50	85,81±3,7bA	84,59±5,3aA	2,58±0,3aA	3,02±0,9aA
F25	88,78±4,1bA	90,32±3,1bA	2,52±0,5aA	2,91±0,6aA
C100	92,24±0,9bA	82,69±5,7aA	2,39±0,4aA	2,35±0,6aA
Chá	90,90±1,0b	-	2,83±0,6a	-
Café	73,19±1,2a	-	3,87±0,5b	-

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparadas letras minúsculas em colunas e maiúsculas em linhas.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde; Inicial = Tempo 0; Final = 14 dias. AAE = ácido ascórbico.

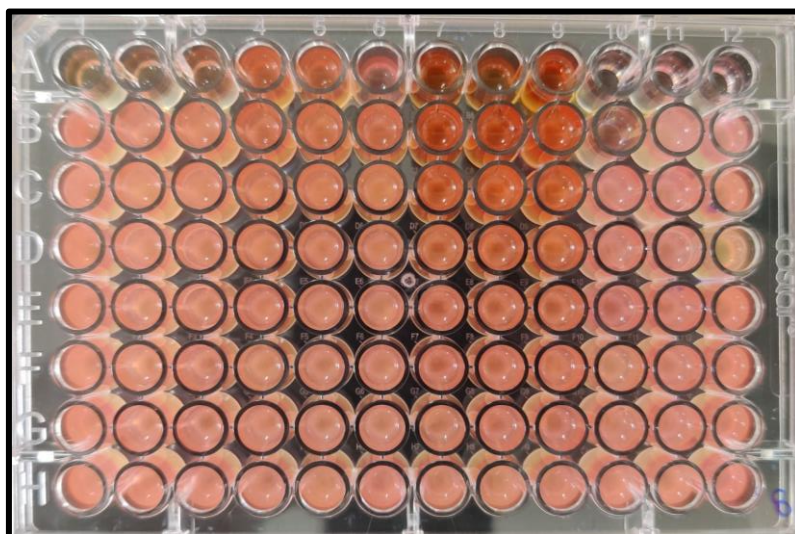
Fonte: Do autor (2024).

Os resultados indicaram que a amostra F25 apresentou maior aumento ($p < 0,05$) na capacidade antioxidante medida pelo ensaio do DPPH após a fermentação (90,32), quando comparada com os demais tratamentos. De acordo com estudo realizado por Essawet et al. (2015), a atividade antioxidante de amostras de kombucha enriquecidas com café aumentou significativamente durante o processo fermentativo, tendo o ácido cafeico sido apontado como o principal responsável pela atividade antioxidante e de remoção de radicais livres observada. Em outra pesquisa, Miranda et al. (2023) avaliaram amostras de kombucha fermentadas com adição de diferentes concentrações de café (10, 5 e 2%), não tendo encontrado diferenças significativas no teor de fenólicos totais nem na atividade antioxidante medida pelo ensaio do DPPH, em nenhum dos tempos de fermentação ou tratamentos.

6.3.2 Atividade antimicrobiana

Não foi verificada atividade antimicrobiana em nenhum dos tratamentos após o período fermentação frente os microrganismos testados (Figura 7).

Figura 7: Resultado colorimétrico em microplaca referente ao teste de atividade antimicrobiana, onde a coloração rósea indica que houve crescimento microbiano.



Fonte: Do autor (2024).

Apesar dos diversos benefícios à saúde relacionados ao consumo de kombucha, a atividade antimicrobiana na kombucha pode ser afetada pela interação entre os compostos presentes na bebida e as bactérias e leveduras presentes na cultura simbiótica. A presença de compostos antimicrobianos na bebida é influenciada pela composição do substrato e pela dinâmica da fermentação, além da combinação e proporção de compostos produzidos pelos microrganismos envolvidos no processo. A presença de determinados compostos antimicrobianos, como o ácido acético e os ácidos graxos, pode ser afetada por fatores, como temperatura, pH, tempo de fermentação e condições de armazenamento. Além disso, a avaliação da atividade antimicrobiana da kombucha pode ser influenciada pela sensibilidade dos microrganismos aos compostos presentes na bebida, bem como a concentração da amostra e metodologia testada.

Vários estudos têm relatado as propriedades antimicrobianas do kombucha, as quais podem estar associadas à composição química dos ingredientes utilizados e ao processo de fermentação. Durante o processo de fermentação do kombucha, muitos compostos bioativos com potencial antibacteriano são produzidos (Al-Mohammadi et al. 2021; Battikh, Bakhrouf e Ammar 2012; Costa et al. 2021). Alguns desses compostos incluem ácidos orgânicos, como o ácido acético, e catequinas, uma família de polifenóis reconhecidos por suas características antimicrobianas, que inibem o crescimento celular pela acidificação citoplasmática. Outros compostos presentes no kombucha, como tearubiginas, teaflavinas, ácido gálico, cafeína e compostos antibióticos, também têm atividades antibacterianas e antifúngicas (Ivanisova et al., 2020; Nyiew, Kwong e Yow 2022; Watawana et al. 2017). Bactérias patogênicas e formadoras de esporos podem ser inibidas com 1 mg/L de ácido acético por acidificação citoplasmática (Velicanski et al. 2014).

O café verde contém compostos bioativos com potencial atividade antimicrobiana, como o ácido cafeico, trigonelina, cafeína, ácidos clorogênicos e ácido protocatecuico, que demonstraram eficácia contra várias cepas de enterobactérias, incluindo *Salmonella enterica*. Mecanismos sugeridos para sua ação antimicrobiana incluem alterações na estrutura e função da membrana citoplasmática, interrupção do transporte ativo e do fluxo de prótons e elétrons, além da inibição de enzimas por compostos oxidantes (Almeida et al., 2006). Além disso, compostos formados durante o processo de torrefação do café, principalmente as melanoidinas, têm sido identificados como os principais contribuintes para a atividade antimicrobiana do café (Mueller et al., 2011; Daglia et al., 2007). A ação antimicrobiana das melanoidinas do café ainda é pouco compreendida, visto que os mecanismos envolvidos não foram completamente

elucidados. Desse modo, é necessária uma investigação mais aprofundada para identificar os principais compostos e mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana do café. A falta de compreensão desses mecanismos também dificulta a correlação da atividade antimicrobiana com outros produtos à base de café. (Miranda et al., 2023).

Faz-se necessário o desenvolvimento de estudos adicionais que investiguem a atividade antimicrobiana presente em Kombuchas preparados com diferentes matérias-primas na infusão da bebida. A falta de informações a respeito dessa atividade justifica a necessidade de novas pesquisas, tendo em vista que tais produtos podem representar uma alternativa promissora para o tratamento de patógenos microbianos.

6.4 Celulose bacteriana - SCOBY

O maior peso úmido e rendimento de SCOBY foram nos tratamentos com 100% e 75% de café, seguido dos tratamentos com 50 e 25% de café e 100% de chá verde, respectivamente (Tabela 11). A aparência macroscópica dos SCOBY está apresentada na Figura 8. A microscopia eletrônica de varredura foi conduzida para verificar a estrutura dos microfilamentos de celulose produzidos (Figura 9) e os diferentes tipos celulares presentes nesse microambiente de SCOBY (Figura 10).

Tabela 11: Avaliação da produção de celulose bacteriana entre os diferentes tratamentos de Kombucha após 14 dias de fermentação.

Celulose Bacteriana - SCOBY	F100	F75	F50	F25	C100
Peso úmido (g/mL)	161,3d	166,7d	148,2c	140,9b	89,3a
Rendimento (%)	32,3d	33,3d	29,6c	28,2b	17,9a
Espessura filamentos (mm)	0,077b	0,066a	0,069a	0,066a	0,081b
Distância entre filamentos (mm)	0,886b	0,795b	1,246c	0,328a	0,308a

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo comparadas letras minúsculas em linhas.

Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde.

Fonte: Do autor (2024).

Figura 8: Aspecto macroscópico dos SCOBY em diferentes concentrações de café arábica e chá verde após 14 dias de fermentação.



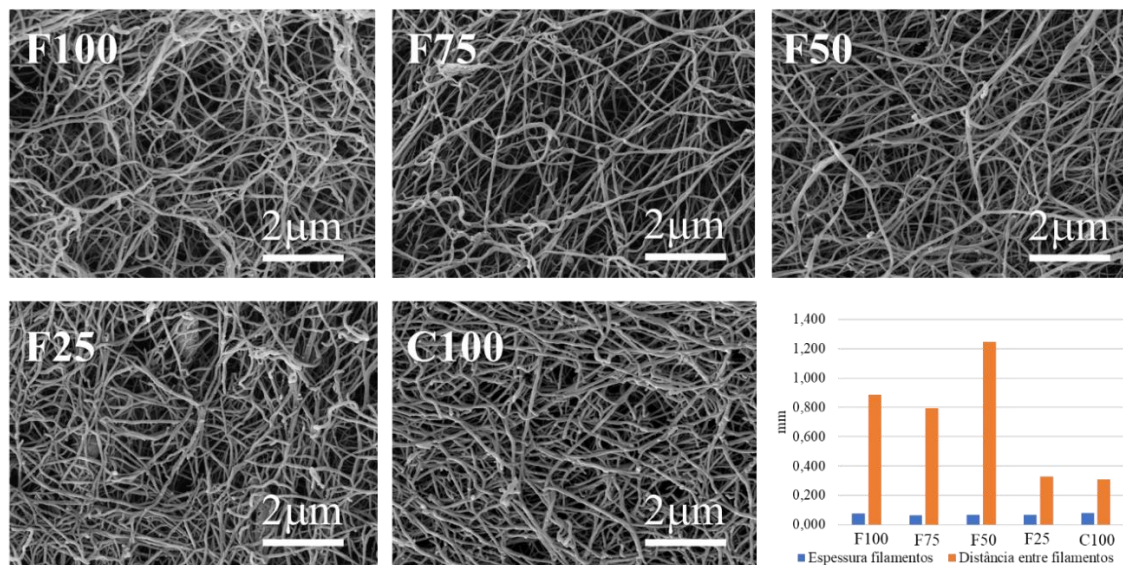
Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde.

Fonte: Do autor (2024).

Os filamentos de celulose não apresentaram diferença significativa em sua espessura entre os tratamentos, porém houve diferença significativa na distância entre os filamentos de celulose. A maior distância encontrada foi no tratamento com 50% de café (1,25 mm), seguido dos tratamentos com 100% e 75% de café, respectivamente. Isso pode justificar o maior peso úmido e rendimento dos SCOBY, pela maior absorção de líquido entre os filamentos de celulose, devido os filamentos estarem menos compactados.

A cafeína age como estimulador da produção de celulose impedindo que monofosfato cíclico de guanosina (c-di-GMP) entre no ciclo de síntese de celulose por bactérias, o que também pode ter auxiliado para maior rendimento de celulose nos tratamentos contendo infusão de café (Sharma & Bhardwaj, 2019). Os biofilmes obtidos após a fermentação nos diferentes tratamentos apresentaram superfícies homogêneas com matriz porosa contínua, composta por nanofibras em forma de fita, comprovando que o uso de infusão de café para fermentação de Kombucha não afeta na estrutura da celulose produzida pelas bactérias do ácido acético.

Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura dos microfilamentos de celulose na superfície de SCOBY após 14 dias de fermentação.

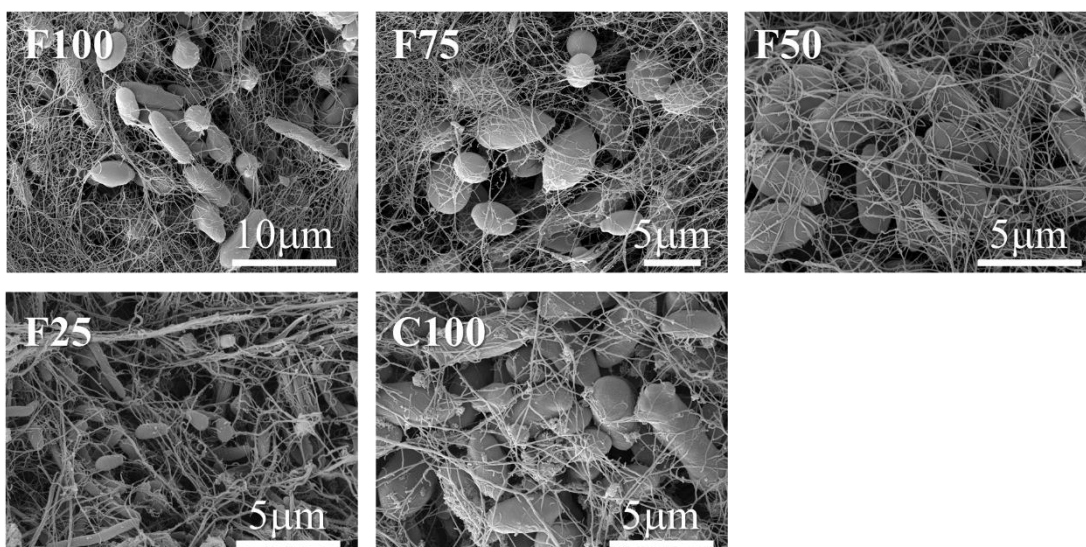


Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde.

Fonte: Do autor (2024).

Vários agrupamentos de células foram observados (Figura 10) em que grandes quantidades de bactérias e leveduras estavam fixadas ou incorporadas ao biofilme, confirmando a bioatividade do SCOBY. Isso pode permitir que as células, principalmente as BAA aeróbicas, a estarem próximas da superfície onde têm maior contato com oxigênio (Varela *et al.*, 2017).

Figura 10: Diversidade celular de microrganismos fixos em microfilamentos de celulose do SCOBY de Kombucha.

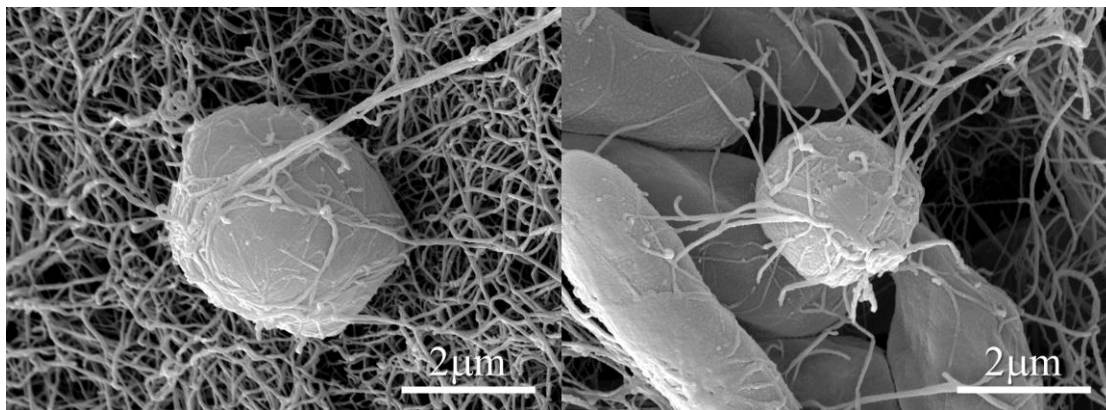


Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde.

Fonte: Do autor (2024).

Também foi possível verificar a possível produção de microfilamentos de celulose bacteriana por bactérias do ácido acético, onde amaranhados de nanofibras de celulose envolviam as células (Figura 11).

Figura 11: Possível produção de microfilamentos de celulose bacteriana por BAA.

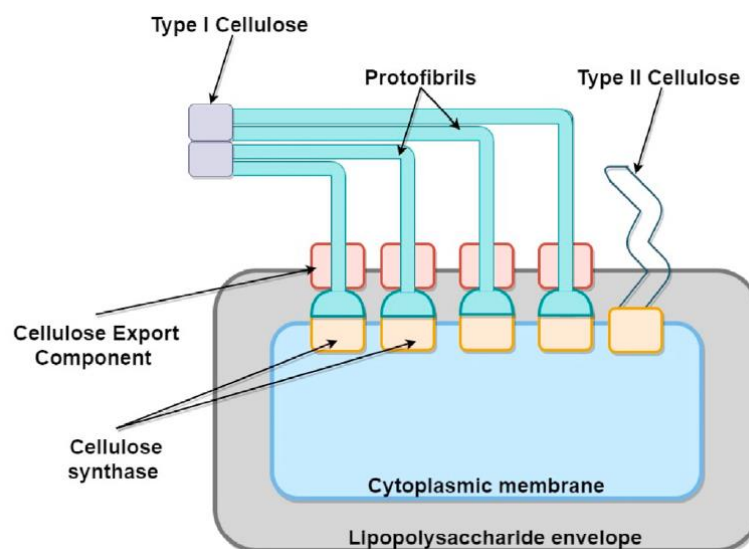


Legenda: F100 = 100% café; F75 = 75% café + 25% chá verde; F50 = 50% café + 50% chá verde; F25 = 25% café + 75% chá verde; C100 = 100% chá verde.

Fonte: Do autor (2024).

Micrografias eletrônicas mostraram que existem 50-80 poros de 3,5 nm de diâmetro, presentes na superfície da célula, chamados de terminais complexos ou “componente de exportação de celulose” que auxiliam na extrusão dessas protofibrilas. As fibrilas são então organizadas em um feixe para formar uma fita de microfibrila de celulose com dimensões de aproximadamente 80x4 nm (Iguchi *et al.*, 2000). As protofibrilas das cadeias de glucano que têm aproximadamente 2-4 nm de diâmetro são formadas fora do citoplasma e são secretadas para fora da parede celular da bactéria através dos poros presentes na superfície. Essas microfibrilas se entrelaçam para formar uma rede tridimensional (Figura 12).

Figura 12: Esquema da produção de celulose bacteriana.



Fonte: Laavanya *et al.* (2021).

A celulose bacteriana (CB) é um metabólito extracelular de muitas espécies bacterianas (Picheth *et al.* 2017). Este biopolímero possui propriedades materiais excepcionais, por exemplo, ausência de impurezas como pectina, lignina ou hemicelulose, alta resistência à tração, alta elasticidade, alta durabilidade e grande capacidade de absorção de água – podendo reter até 200 vezes mais água do que seu peso seco (Semjonovs *et al.*, 2017; Villarreal-Soto *et al.*, 2018). A estabilidade térmica da CB decorre de sua alta cristalinidade. Essa propriedade permite a esterilização do CB a 121 °C e isso faz com que ele tenha superioridade sobre outros polímeros que normalmente alteram suas propriedades acima de 100 °C (Cacicedo *et al.*, 2016).

Apesar de suas vantagens, propriedades únicas e abrangência de aplicações, a CB raramente é comercialmente produzida devido ao seu preço. Métodos que levem a produção de CB mais barata e eficiente estão sendo procurados e meios alternativos, como sucos de frutas ou resíduos, estão sendo testados (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2020). A adição de suco de maçã à cultura estática de um meio Hestrin–Schramm inoculado com *K. rhaeticus* (P1463) isolado de Kombucha permitiu a produção de celulose com alto rendimento (Semjonovs *et al.*, 2017). A adição de manitol ao meio Hestrin-Schramm levou à produção de CB mais eficiente por *K. xylinus*, enquanto a sacarose de grau alimentício e xarope de tâmaras não apresentam rendimento de celulose satisfatório (Mohammadkazemi *et al.*, 2015). Ainda há poucos dados disponíveis na literatura sobre as propriedades da CB obtidas durante a produção de bebidas de Kombucha.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, sugestões para melhor compreensão da fermentação de kombucha utilizando infusão de café arábica são apresentadas como perspectivas futuras:

- Análise das propriedades funcionais do Kombucha de café, como a atividade anti-inflamatória e propriedades imunomoduladoras;
- Estudos sensoriais para avaliar a aceitação do Kombucha de café pela população;
- Identificação microbiana completa para compreender a interação dos microrganismos presentes no Kombucha de café;
- Desenvolvimento de novos sabores de Kombucha a partir de diferentes infusões, como por exemplo, infusão de diferentes tipos de café;
- Análise da estabilidade e conservação do Kombucha de café ao longo do tempo;
- Verificação do potencial de aplicação do Kombucha de café como fonte de probióticos e pós-bióticos;
- Estudo da interação entre o Kombucha de café e outros componentes, como por exemplo, adição de frutas ou ervas;
- Verificação da influência da temperatura e do tempo de fermentação na produção de Kombucha de café;
- Investigação da viabilidade comercial de produção de Kombucha de café como alternativa ao Kombucha tradicional;
- Investigação sobre a aplicabilidade da celulose bacteriana produzida a partir de café e seus resíduos em diferentes setores industriais, como farmacêutico, cosmético e alimentício.

8 CONCLUSÕES

- A substituição parcial ou total do chá de *Camellia sinensis* pela infusão de café arábica é viável para a primeira fermentação do Kombucha, pois resulta em uma bebida com características físico-químicas, cromatográficas e microbiológicas semelhantes à bebida tradicional e em conformidade com a regulamentação brasileira;
- As análises cromatográficas demonstraram perfis semelhantes entre todos os tratamentos, independentemente do substrato utilizado, sendo que a infusão do café arábica trouxe características aromáticas específicas à bebida final.
- A concentração de café arábica exerceu influência direta sobre a população microbiana da bebida, onde a população de bactérias ácido lácticas (BAL) dominou o processo de fermentação em F100 e foi inversamente proporcional à população de bactérias acéticas (BAA) em todos os tratamentos testados;
- A produção de CB em fermentados com infusão de café apresentou maior peso úmido e rendimento, com estrutura similar à CB produzida em chá verde;
- Os resultados deste estudo apontam para o potencial de preparações baseadas em café arábica como alternativa aos Kombuchas tradicionais, produzindo bebidas com perfis aromáticos distintos;
- Além disso, este trabalho recomenda a realização de estudos adicionais para avaliar as propriedades funcionais, sensoriais e identificação microbiana do Kombucha de café, bem como para a produção de novos sabores de Kombucha a partir de diferentes infusões, cujas propriedades aromáticas e nutracêuticas podem ser aprimoradas através do processo de fermentação.

REFERÊNCIAS

- AKBARIRAD, H., *et al.* **Employing of the different fruit juices substrates in vinegar kombucha preparation.** Current Nutrition & Food Science, v. 13, n. 4, p. 303-308, 2017.
- ALEXOPOULOS C.J., MIMS C.W. & BLACKWELL M. **Introductory mycology.** John Wiley & Sons. Inc. New York, 1996.
- ALOULOU A., *et al.* **Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats.** BMC complementary and alternative medicine, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2012.
- AYED L., BEN ABID S. & HAMDI M. **Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium.** Annals of microbiology, v. 67, p. 111-121, 2017.
- BAIK J.H., *et al.* **Biotransformation of catechin and extraction of active polysaccharide from green tea leaves via simultaneous treatment with tannase and pectinase.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 95, n. 11, p. 2337-2344, 2015.
- BANERJEE D., *et al.* **Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action.** Food & function, v. 1, n. 3, p. 284-293, 2010.
- BARREA L., *et al.* **Coffee consumption, health benefits and side effects: a narrative review and update for dietitians and nutritionists.** Critical reviews in food science and nutrition, v. 63, n. 9, p. 1238-1261, 2023.
- BATTIKH H., BAKHROUF A. & AMMAR E. **Antimicrobial effect of Kombucha analogues.** LWT-Food Science and Technology, v. 47, n. 1, p. 71-77, 2012.
- BATTIKH H., *et al.* **Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas.** Journal of Food Biochemistry, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.
- BEVERAGE DAILY. **Starbucks & Nestlé launch new coffees for 2020: Cold brew, golden turmeric and essential vitamins.** 2020. Disponível em: <https://www.beveragedaily.com/Article/2020/01/15/New-Starbucks-Nestle-coffee-cold-brew-turmeric-essential-vitamins>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.
- BHATTACHARYA S., GACHHUI R. & SIL P.C. **Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats.** Food and chemical toxicology, v. 60, p. 328-340, 2013.
- BLANC P.J. **Characterization of the tea fungus metabolites.** Biotechnology letters, v. 18, p. 139-142, 1996.
- BOGDAN M., *et al.* **Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect.** Romanian Biotechnological Letters, v. 23, n. 3, p. 13592-13598, 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), **Instrução Normativa N° 41, de 17 de setembro de 2019**. 2019. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/09/2019&jornal=515&pagina=13>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

BUENO F., CHOULJENKO A. & SATHIVEL S. **Development of coffee kombucha containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*: Gastrointestinal simulations and DNA microbial analysis**. LWT, v. 142, p. 110980, 2021.

CACICEDO, M.L., *et al.* **Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications**. Bioresource technology, v. 213, p. 172-180, 2016.

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.

CENTERS FOR DISEASE C. & PREVENTION. **Unexplained severe illness possibly associated with consumption of Kombucha tea--Iowa**. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, v. 44, n. 48, p. 892-900, 1995.

CETOJEVIC-SIMIN D.D., *et al.* **Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha**. J. BUON, v. 13, n. 3, p. 395-401, 2008.

CHAKRAVORTY S, *et al.* **Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics**. International journal of food microbiology, v. 220, p. 63-72, 2016.

CHAN C. & LIU B.Y. **Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation**. Journal of applied microbiology, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000.

CHAN M.Z.A. & LIU S.Q. **Coffee brews as food matrices for delivering probiotics: Opportunities, challenges, and potential health benefits**. Trends in Food Science & Technology, v. 119, p. 227-242, 2022.

CHAN M.Z.A., TOH M. & LIU S.Q. **Growth, survival, and metabolic activities of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM-I745 in fermented coffee brews**. International Journal of Food Microbiology, v. 350, p. 109229, 2021.

CHANDRAKALA S.K., LOBO R.O. & DIAS F.O. **Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life?** Nutrients in beverages. Academic Press, 2019. p. 591-616.

COBAN H.B. **Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions**. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 43, n. 4, p. 569-591, 2020.

CORDOBA N., *et al.* **Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews**. Trends in Food Science & Technology, v. 96, p. 45-60, 2020.

COSTA, B.D.R. **Brazilian specialty coffee scenario**. In: **Coffee consumption and industry strategies in Brazil**. Woodhead Publishing, p. 51-64, 2020.

COTON M, *et al.* **Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods.** FEMS microbiology ecology, v. 93, n. 5, p. fix048, 2017.

CRUM H. & LAGORY A. **The big book of kombucha: brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea.** Storey Publishing, 2016.

CZAJA W., *et al.* **Microbial cellulose--the natural power to heal wounds.** Biomaterials, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

DA SILVA N., *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** Editora Blucher, 2017.

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.

DE LAS RIVAS B., *et al.* **Bacterial tannases: classification and biochemical properties.** Applied microbiology and biotechnology, v. 103, p. 603-623, 2019.

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

DE OLIVEIRA BARUD H.G., *et al.* **A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose.** Carbohydrate Polymers, v. 153, p. 406-420, 2016.

DE ROOS J. & DE VUYST L. **Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages.** Current opinion in biotechnology, v. 49, p. 115-119, 2018.

DE SÃO JOSÉ, J.F.B. & VANETTI, M.C.D. **Application of ultrasound and chemical sanitizers to watercress, parsley and strawberry: Microbiological and physicochemical quality.** LWT-Food Science and Technology, v. 63, n. 2, p. 946-952, 2015.

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

DUTTA D. & GACHHUI R. **Novel nitrogen-fixing Acetobacter nitrogenifigens sp. nov., isolated from Kombucha tea.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 56, n. 8, p. 1899-1903, 2006.

DUTTA D. & GACHHUI R. **Nitrogen-fixing and cellulose-producing Gluconacetobacter kombuchae sp. nov., isolated from Kombucha tea.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 57, n. 2, p. 353-357, 2007.

DUTTA H. & PAUL S.K. **Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects.** Production and management of beverages. Woodhead Publishing, p. 259-288, 2019.

EMILJANOWICZ K.E. & MALINOWSKA-PANCZYK E. **Kombucha from alternative raw materials - The review.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 60, n. 19, p. 3185-3194, 2020.

ERNST E. **Kombucha: a systematic review of the clinical evidence.** Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde/Research in Complementary and Classical Natural Medicine, v. 10, n. 2, p. 85-87, 2003.

ESSAWET N.A., *et al.* **Polyphenols and antioxidant activities of Kombucha beverage enriched with Coffeeberry® extract.** Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, v. 21, n. 3, p. 399-409, 2015.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Coffee shops in the “New Normal”.** 2021. Disponível em: <https://www-portal-euromonitor-com.libproxy1.nus.edu.sg/portal/analysis/tab>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

KOMBUCHA - STATISTICS & FACTS. **Vol. 2020** p.^pp. 2015.

FERREIRA D.F. **Sisvar: a computer statistical analysis system.** Ciência e agrotecnologia, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FRANK G. **Kombucha-Healthy Beverage and Natural Remedy from the far east 8th Ed.** Publishing House Ennsthaler, 1995.

FREER S.N. **Acetic acid production by Dekkera/Brettanomyces yeasts.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 18, p. 271-275, 2002.

GAMBOA-GÓMEZ, C.I., *et al.* **Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Eucalyptus camaldulensis and Litsea glaucescens infusions fermented with kombucha consortium.** Food Technology and Biotechnology, v. 54, n. 3, p. 367, 2016.

GOH W., *et al.* **Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose.** International Food Research Journal, v. 19, n. 1, 2012.

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.

GUERCIO, V. **Coffee consumption and its impact on health.** Nutrition Guide for Physicians and Related Healthcare Professions, p. 297-301, 2022.

HILL C., *et al.* **The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.** Nature reviews Gastroenterology & hepatology, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HOLZAPFEL, W. **Use of starter cultures in fermentation on a household scale.** Food control, v. 8, n. 5-6, p. 241-258, 1997.

HORWITZ W. **Official methods of analysis of the AOAC.** Association of Official Analytical Chemists, 2000.

IGUCHI M., YAMANAKA S., & BUDHIONO A. **Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts.** Journal of materials science, v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

INSIGHTS. **Fortune Business Insights Kombucha Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, by Type (Natural and Flavored), Distribution Channel (Supermarkets/Hypermarkets, Convenience Stores, Health Stores, and Online Retail), and Regional Forecast, 2020–2027.** 2020. Disponível em: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/kombucha-market-100230>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

JAYABALAN R. & WAISUNDARA V.Y. **Kombucha as a Functional Beverage.** Functional and medicinal beverages. Academic Press, p. 413-446, 2019.

JAYABALAN R., *et al.* **Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin.** Indian Journal of Biotechnology, v. 10, p. 75-82, 2011.

JAYABALAN R., MALBAŠA R.V. & SATHISHKUMAR M. **Kombucha Tea: Metabolites.** Fungal metabolites, p. 965, 2017.

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.

JAYABALAN R., MARIMUTHU S. & SWAMINATHAN K. **Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation.** Food chemistry, v. 102, n. 1, p. 392-398, 2007.

JAYABALAN R., *et al.* **Preservation of kombucha tea-effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 56, n. 19, p. 9064-9071, 2008.

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

KAPP J.M. & SUMNER W. **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. 15, 2020.

KOH L.W., *et al.* **Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 58, n. 1, p. 148-154, 2010.

KOŁACZKOWSKA M., *et al.* **Assessment of the usefulness of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* E25 as a new biological implant.** Materials Science and Engineering: C, v. 97, p. 302-312, 2019.

LAAVANYA D., SHIRKOLE S. & BALASUBRAMANIAN P. **Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation.** Journal of Cleaner Production, v. 295, p. 126454, 2021.

LAUREYS D., BRITTON S.J. & DE CLIPPELEER J. **Kombucha Tea Fermentation: A Review.** Journal of the American Society of Brewing Chemists, v. 78, n. 3, p. 165-174, 2020.

LIAMKAEW R., CHATTRAWANIT J. & DANVIRUTAI P. **Kombucha production by combinations of black tea and apple juice.** Progress in Applied Science and Technology, Thailand, v. 6, n. 2, p. 139–146, 2016.

LIU L., *et al.* **Protective effects of tea polyphenols on exhaustive exercise-induced fatigue, inflammation and tissue damage.** Food & nutrition research, v. 61, n. 1, p. 1333390, 2017.

LONČAR E., MALBASA R. & KOLAROV L.A. **Metabolic activity of tea fungus on molasses as a source of carbon.** Acta periodica technologica, n. 32, p. 21-26, 2001.

LONČAR, E., *et al.* **Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea.** Food and bioproducts processing, v. 84, n. 3, p. 186-192, 2006.

LUDWIG, I.A., *et al.* **Coffee: biochemistry and potential impact on health.** Food & function, v. 5, n. 8, p. 1695-1717, 2014.

MAGALHÃES-GUEDES K., ANUNCIAÇÃO T. & SCHWAN R.F. **Kombucha and Kefir are Foods of the 21st Century: A Opinion.** Biotechnology, v. 17, p. 322-327, 2019.

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

MALBAŠA R.V., *et al.* **Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage.** Food chemistry, v. 127, n. 4, p. 1727-1731, 2011.

MAMISAHEBEI S, *et al.* **Removal of arsenic from an aqueous solution by pretreated waste tea fungal biomass.** Journal of Environmental Health Science & Engineering, v. 4, n. 2, p. 85-92, 2007.

MANDAL, M.D. & MANDAL S. **Honey: its medicinal property and antibacterial activity.** Asian Pacific journal of tropical biomedicine, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2011.

MARCO M.L., *et al.* **Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond.** Current opinion in biotechnology, v. 44, p. 94-102, 2017.

MARSH A.J., *et al.* **Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives.** Trends in food science & technology, v. 38, n. 2, p. 113-124, 2014.

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

MARTÍNEZ LEAL J., *et al.* **A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites.** CyTA-Journal of Food, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

MAY, A.N., *et al.* **Kombucha as a model system for multispecies microbial cooperation: theoretical promise, methodological challenges and new solutions ‘in solution’**. bioRxiv, p. 214478, 2017.

MIRANDA, J.F., *et al.* **Arabic coffee infusion based kombucha: Characterization and biological activity during fermentation, and in vivo toxicity**. Food Chemistry, v. 412, p. 135556, 2023.

MOHAMMADKAZEMI F., AZIN M. & ASHORI A. **Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media**. Carbohydrate polymers, v. 117, p. 518-523, 2015.

MOLAN P.C. & COOPER R.A. **Honey and sugar as a dressing for wounds and ulcers**. Tropical doctor, v. 30, n. 4, p. 249-250, 2000.

MORDOR INTELLIGENCE. **Functional coffee market- growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)**. 2021. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/functional-coffee-market>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

MORENO-JIMÉNEZ, M.R., *et al.* **Polyphenolic profile, sugar consumption and organic acids generation along fermentation of infusions from guava (*Pisidium guajava*) by the kombucha consortium**. Recent Research in Science and Technology, v. 10, p. 16-22, 2018.

MURUGESAN G.S., *et al.* **Hepatoprotective and curative properties of Kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity**. Journal of microbiology and biotechnology, v. 19, n. 4, p. 397-402, 2009.

NGUYEN N.K., *et al.* **Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha**. SpringerPlus, v. 4, p. 91, 2015.

NUMMER, B.A. **Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: risk analysis and processing guidance**. Journal of environmental health, v. 76, n. 4, p. 8-11, 2013.

NURYASTUTI T., *et al.* **Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis***. Applied and environmental microbiology, v. 75, n. 21, p. 6850-6855, 2009.

NYHAN L.M., *et al.* **Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review**. Applied Microbiology, v. 2, n. 1, p. 73-103, 2022.

OBÓN J.M., *et al.* **Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems**. Journal of food engineering, v. 90, n. 4, p. 471-479, 2009.

PETROVIC S.E., *et al.* **Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus**. Nahrung, v. 44, p. 138-139, 2000.

PICHETH G.F., *et al.* **Bacterial cellulose in biomedical applications: A review.** International journal of biological macromolecules, v. 104, p. 97-106, 2017.

POOLE R., *et al.* **Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes.** *bmj*, v. 359, 2017.

PUERARI C., MAGALHÃES K.T. & SCHWAN R.F. **New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis.** Food Research International, v. 48(2), p. 634-640, 2012.

PURE A.E. & PURE M.E. **Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions.** Applied Food Biotechnology, v. 3(2), p. 125-130, 2016.

RAZMOVSKI R. & ŠĆIBAN M. **Biosorption of Cr (VI) and Cu (II) by waste tea fungal biomass.** Ecological engineering, v. 34, p. 179-186, 2008.

REVA O.N., *et al.* **Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments.** AMB Express, v. 5, p. 1-8, 2015.

ROBINSON A.L., *et al.* **Influence of yeast strain, canopy management, and site on the volatile composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines from Western Australia.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 59, n. 7, p. 3273-3284, 2011.

ROUSSIN M. **Analyses of kombucha ferments.** Salt Lake City: Information Resources, LC. 1996. Disponível em: <https://research.kombuchabrewers.org/wp-content/uploads/kk-research-files/analyses-of-kombucha-ferments.pdf>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

SAI RAM M., *et al.* **Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats.** Journal of ethnopharmacology, v. 71, n. 1-2, p. 235-240, 2000.

SCA BSCA. **O que são cafés especiais.** Brazilian Specialty Coffee Association Vol. 2020 p.^pp, 2019.

SEMJONOV P., *et al.* **Cellulose synthesis by Komagataeibacter rhaeticus strain P 1463 isolated from Kombucha.** Applied microbiology and biotechnology, v. 101, p. 1003-1012, 2017.

SHAHBAZI M., MAJZOBI M. & FARAHNAKY A. **Physical modification of starch by high-pressure homogenization for improving functional properties of κ-carrageenan/starch blend film.** Food Hydrocolloids, v. 85, p. 204-214, 2018.

SHARMA C. & BHARDWAJ N.K. **Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms.** International journal of biological macromolecules, v. 132, p. 166-177, 2019.

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.

SILVA K.A., *et al.* **Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 34, p. 102032, 2021.

SINIR G.Ö., TAMER C.E. & SUNA S. **Kombucha Tea: A Promising Fermented Functional Beverage.** Fermented beverages. Woodhead Publishing, 2019. p. 401-432.

SREERAMULU G., ZHU Y. & KNOL W. **Kombucha fermentation and its antimicrobial activity.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 48, n. 6, p. 2589-2594, 2000.

SRIHARI T. & SATYANARAYANA U. **Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation.** Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 4, n. 11, p. 1978-1981, 2012.

ST-PIERRE D.L. **Microbial diversity of the symbiotic colony of bacteria and yeast (SCOBY) and its impact on the organoleptic properties of kombucha.** The University of Maine, 2019.

SUN T.Y., LI J.S. & CHEN C. **Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage.** Journal of food and drug analysis, v. 23, n. 4, p. 709-718, 2015.

TALAWAT S., *et al.* **Efficacy of fermented teas in antibacterial activity.** Agriculture and Natural Resources, v. 40, n. 4, p. 925-933, 2006.

TANAKA T. & KOUNO I. **Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism.** Food Science and Technology Research, v. 9, n. 2, p. 128-133, 2003.

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.

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.

TREATT. **Supplier of Flavour, Fragrance Ingredients.** 2022. Disponível em: <https://www.treatt.com>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

TROITINO C. **Kombucha 101: Demystifying the past, present and future of the fermented tea drink.** Forbes, 2017. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-pastpresent-and-future-of-the-fermented-tea-drink>. Acesso em: 27 de jun. de 2022.

TU C., *et al.* **Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage.** Journal of Functional Foods 52: 81-89, 2019.

UTOIU E., *et al.* **Bee Collected Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium.** Nutrients, v. 10, n. 10, p. 1365, 2018.

VALENZUELA B. **El consumo té y la salud: Características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria.** Revista chilena de nutrición, v. 31, n. 2, p. 72-82, 2004.

VARELA J.A., *et al.* **Applications of Kluyveromyces marxianus in biotechnology.** Yeast diversity in human welfare, p. 439-453, 2017.

VAZQUEZ-CABRAL B.D., *et al.* **Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes.** Chemico-Biological Interactions, v. 272, p. 1-9, 2017.

VELIĆANSKI A.S., CVETKOVIĆ D. & MARKOV S. **Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family.** Romanian Biotechnological Letters, v. 18, n. 1, p. 8034-8042, 2013.

VELIĆANSKI A.S., *et al.* **Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm Kombucha.** Acta periodica technologica, n. 38, p. 165-172, 2007.

VILLARREAL-MORALES S.L., *et al.* **Metagenomics of Traditional Beverages.** Advances in Biotechnology for Food Industry. Academic Press, p. 301-326, 2018.

VILLARREAL-SOTO S.A., *et al.* **Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review.** Journal of food science, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.

VINA I., *et al.* **Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage.** Journal of medicinal food, v. 17, n. 2, p. 179-188, 2014.

VITAS J.S., **Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow.** Journal of functional foods, v. 44, p. 95-102, 2018.

WATAWANA M.I., JAYAWARDENA N. & WAISUNDARA V.Y. **Enhancement of the Functional Properties of Coffee Through Fermentation by “Tea Fungus” (Kombucha).** Journal of Food Processing and Preservation, v. 39, n. 6, p. 2596-2603, 2015.

WATAWANA M.I., *et al.* **Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha.** Journal of Chemistry, v. 2015, n. 1, p. 591869, 2015.

WATAWANA M.I., *et al.* **Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (Cocos nuciferavar. aurantiaca) by fermentation with kombucha ‘tea fungus’.** International Journal of Food Science & Technology, v. 51, n. 2, p. 490-498, 2016.

WATAWANA M.I., *et al.* **Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha.** Journal of Food Processing and Preservation, v. 41, n. 1, p. e12752, 2017.

WATERHOUSE A. **Determination of total phenolics.** Current protocols in food analytical chemistry, v. 6, n. 1, p. I1. 1.1-I1. 1.8, 2002.

WILLETT W., *et al.* **Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems.** The lancet, v. 393, n. 10170, p. 447-492, 2019.

YANG Z., *et al.* **Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function.** Applied biochemistry and biotechnology, v. 160, p. 446-455, 2010.

YILDIZ E., GULDAS M. & GURBUZ O. **Determination of in-vitro phenolics, antioxidant capacity and bio-accessibility of Kombucha tea produced from black carrot varieties grown in Turkey.** Food Science and Technology, v. 41, n. 1, p. 180-187, 2020.

ZHANG J., *et al.* **The chemistry and sensory characteristics of new herbal tea-based kombuchas.** Journal of Food Science, v. 86, n. 3, p. 740-748, 2021.

ZHAO Z-J., *et al.* **Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea.** Emirates Journal of Food and Agriculture, v. 30, n. 9, p. 732-741, 2018.

ZOFIA N.L., *et al.* **Effect of Fermentation Time on Antioxidant and Anti-Ageing Properties of Green Coffee Kombucha Ferments.** Molecules, v. 25, n. 22, p. 5394, 2020.

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

ZUBAIDAH E., *et al.* **Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit Kombucha, black tea Kombucha and metformin.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 17, p. 465-469, 2019.

ZUBAIDAH E., *et al.* **Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars.** Nutrition & Food Science, v. 49, n. 2, p. 333-343, 2019.