

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL
CAMPUS DESCALVADO**

MARA PAULA MAGNO

**ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO
PROCESSO FERMENTATIVO DA KOMBUCHA**

**PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF THE
KOMBUCHA FERMENTATION PROCESS**

Descalvado– SP

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL

MARA PAULA MAGNO

**ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO
PROCESSO FERMENTATIVO DA KOMBUCHA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Prof. Dr. Vando Edésio Soares
Orientador

Descalvado - SP
2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M176a Magno, Mara Paula
Aspectos físico-químicos e microbiológicos do processo fermentativo da Kombucha / Mara Paula Magno. – Descalvado: Universidade Brasil, 2022.
57f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.
Orientador: Prof. Dr. Vando Edésio Soares.

1. Probiótico. 2. Chá verde. 3. Sacarose. 4. Scoby. I. Título.

CDD 663.93



UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

MARA PAULA MAGNO

"ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO PROCESSO
FERMENTATIVO DA KOMBUCHA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Mestrado em Produção Animal** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Vando Edésio Soares (presidente-orientadora)

Profa. Dra. Kathery Brennecke (UNIVERSIDADE BRASIL)

Dra. Luriany Pompeo Ferraz (LABORATÓRIO ORGOLABS)

Descalvado/SP, 16 de dezembro de 2022
Presidente da Banca Prof. Dr. Vando Edésio Soares

Houve alteração do Título: sim () não



UNIVERSIDADE
BRASIL

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO PROCESSO FERMENTATIVO DA KOMBUCHA"

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Autor(es):

Discente: **Mara Paula Magno**

Assinatura: *Mara Paula Magno*

Orientador(a): **Prof. Dr. Vando Edésio Soares**

Assinatura: *Vando Edésio Soares*

Coorientador(a)

Assinatura: X

Data: 16/12/2022

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar o trabalho a todos que estiveram comigo nesse período, que de alguma forma, puderam contribuir para que eu conseguisse concluir mais uma parte da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir vivenciar o dia a dia, e conquistar das mais diferentes maneiras o que tenho até hoje. Sou muito grata, por tudo que Ele tem preparado em minha vida.

Agradeço a empresa Orgolabs Laboratórios Ltda., a qual disponibilizou seu laboratório de microbiologia, laboratório físico-químico, equipamentos e materiais necessários. À Luriany (responsável pelo laboratório), um presente que ganhei pra vida toda, que contribuiu com seus conhecimentos e habilidades para o desenvolvimento da pesquisa, e à Natalia Lima, estagiária (estudante de Medicina Veterinária) que pode nos ajudar no desenvolvimento da parte prática dessa pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Vando Edésio Soares, o qual contribuiu para a pesquisa e auxiliou nos dados estatísticos.

Agradeço, por fim, ao Dr. Hélio Serra, que sempre incentiva o estudo e as pesquisas.

RESUMO

A Kombucha é uma bebida, preparada a partir da fermentação do chá verde e ou chá preto (*Camellia Sinensis*) adoçado, e em processo de Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras (*Simbiotic Culture of Bacteria and Yeast - SCOBY*), em temperatura ambiente ou controlada. É considerada uma bebida probiótica que equilibra a flora intestinal e fortalece o sistema imunológico. Mudanças nos parâmetros físicos e químicos devem-se ser observados durante a fermentação para que se tenha uma melhor concentração e produção. Visando explorar outras áreas de consumo, bem como a área animal, essa pesquisa tem como intuito encontrar a melhor faixa de produção da SCOBY, avaliando a dinâmica e o crescimento SCOBY da simbiose com diferentes concentrações de chá verde e açúcar. O crescimento na nutrição animal fez com que surgisse uma nova geração de produtos para auxiliar no equilíbrio da microbiota dos animais. Foi utilizado como substrato as folhas do chá verde nas concentrações de 0,6%, 0,8% e 1,2% e o açúcar cristal nas concentrações de 6% e 8% resultando em seis tratamentos com quatro repetições de 200 ml cada. Em câmara de germinação tipo BOD, foi incubado em temperatura de 27°C em um período total de 14 dias, partindo do dia 0 de fermentação. Foram avaliados os parâmetros de pH, brix, peso do SCOBY e unidade formadora de colônias (UFC). Deste modo, pode-se concluir que para os parâmetros peso do SCOBY e UFC, a concentração de 1,2% de chá verde e 8,0% de sacarose é a mais indicada, houve interação proporcionando o ganho de peso do SCOBY. Para o parâmetro pH, relacionado com o chá verde a melhor concentração foi de 0,6% e 0,8%, e com o substrato açúcar a melhor concentração foi de 8,0%. Para o parâmetro brix, com mensuração analógica, os valores foram muito homogêneos, não apresentaram variabilidade entre as leituras realizadas nas diferentes concentrações de chá verde e sacarose.

Palavras-chave: Probiótico. Chá Verde. Sacarose. SCOBY.

ABSTRACT

Kombucha is a fermented beverage, prepared from the fermentation of green tea and or sweetened black tea (*Camellia Sinensis*), and in a symbiotic culture process called *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY), at room or controlled temperature. It is considered a probiotic drink that balances the intestinal flora and strengthens the immune system. Changes in physical and chemical parameters must be observed during fermentation in order to have a better concentration and production. Aiming to explore other areas of consumption, as well as the animal area, this research aims to find the best range of production of this SCOBY evaluating the dynamics and growth of SCOBY symbiosis in kombucha with different concentrations of tea and sugar. The growth in animal nutrition has led to the emergence of a new generation of products to help balance the microbiota of animals. Green tea leaves at concentration of 0,6%, 0,8% and 1,2% and crystal sugar at concentration of 6% and 8% were used as substrate resulting in six treatments with four replications of 200 ml each. In a BOD type germination chamber, it was incubated at a temperature of 27°C over a total period of 14 days, starting from day 0 of fermentation. The parameters of pH, brix, SCOBY weight and colony forming unit (UFC) were evaluated. Thus, it can be concluded that for the SCOBY weight parameters and UFC for the concentration of 1,2% of green tea and 8,0% of sucrose is the most indicated, there was interaction providing SCOBY weight again. For the pH parameter, related to green tea the best concentration was 0,6% and 0,8% and with sugar substrate the best concentration was 8,0%. For the Brix parameter, with analog measurement, the values were very homogeneous, showing no variability between the readings taken in the different concentrations of green tea and sucrose.

Keywords: Probiotic. Green Tea. Sucrose. SCOBY.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A Kombucha, bebida fermentada e probiótica, é uma fonte de microrganismos benéficos e funcionais auxiliando na saúde e bem-estar. O crescimento na nutrição animal fez com que surgisse uma nova geração de produtos para auxiliar no equilíbrio da microbiota dos animais, principalmente após as restrições do uso de antimicrobianos. Com o presente estudo pode-se concluir que na maior concentração de chá verde 1,2% e de sacarose 8,0% apresentou o melhor parâmetro produtivo do SCOBY e UFC, visto que o maior consumo de açúcar contribuiu para o menor valor de pH favorecendo a formação do SCOBY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Camellia sinensis</i> – folhas, chá verde.....	21
Figura 2 – Tubo Falcon contendo amostras de Kombucha fermentada, onde é possível observar a presença de gases.....	22
Figura 3 – Aspecto Visual do SCOBY em meio ao chá verde adoçado.....	23
Figura 4 – SCOBY formado após fermentação, com diferentes espessuras.....	24
Figura 5 – SCOBY adicionado ao chá base em recipiente de gargalo largo.....	25
Figura 6 – Fluxograma de preparo da Kombucha artesanal.....	27
Figura 7 – Compostos Químico da Kombucha.....	29
Figura 8 – Principais Microrganismos da Kombucha.....	30
Figura 9 – SCOBY em processo de crescimento da cultura simbiótica.....	37
Figura 10 – Crescimento do Scoby – biofilme.....	38
Figura 11– Preparo das amostras em diferentes concentrações de chá verde e sacarose.....	38
Figura 12 – Formato cilíndrico do SCOBY.....	39
Figura 13 – Medição do pH e brix das amostras.....	41
Figura 14 – Contagem de UFC em placas.....	41
Figura 15 – Esquema seguido no experimento.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de SCOBY, Chá Verde, Sacarose e Volume.....	40
Tabela 2 - Resultados das comparações múltiplas dos potenciais hidrogeniônicos (pH) observados nas diferentes concentrações de açúcar e chá verde nas fases inicial e final mantidos a 27° C. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	45
Tabela 3 - Resultados das comparações dos potenciais hidrogeniônicos (pH) observados nas diferentes concentrações de açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	45
Tabela 4 - Resultados das comparações dos potenciais hidrogeniônicos (pH) observados nas diferentes concentrações de chá verde. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	46
Tabela 5 - Resultados das comparações dos valores de Brix observados nas diferentes concentrações de chá verde e açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	46
Tabela 6 - Resultados das comparações dos pesos de SCOBY observados nas diferentes concentrações de chá verde e açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	47
Tabela 7 - Resultados das comparações dos valores de UFC observados nas diferentes concentrações de chá verde e açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	48
Tabela 8 - Resultados das comparações dos valores de UFC observados nas diferentes concentrações de açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	49

Tabela 9 - Resultados das comparações dos valores de UFC observados nas diferentes concentrações de chá verde. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH	Potencial Hidrogeniônico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
FOS	Frutooligossacarídeo
p/p	Peso por peso
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ppm	Parte por milhão
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
[]	Concentração
SCOBY	Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
Mm	Milímetros
Brix (°Bx)	Escala numérica que mede o teor de açúcar
BOD	Demanda biológica de oxigênio
G	Gramas
L	Litro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
g/L	Gramas por Litro
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies reativas do oxigênio
DSL	Ácido D-sacárico, 1-4 lactona
AAB	Bactérias Ácido Acético
LAB	Bactérias Ácido Lático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 KOMBUCHA	19
3.2 MICRORGANISMOS.....	19
3.3 FONTES DE SUBSTRATOS PARA A KOMBUCHA	20
3.3.1 CHÁ (<i>CAMELLIA SINENSIS</i>)	20
3.3.2 AÇÚCAR COMO FONTE DE SCARAOSE	22
3.3.3 SCOPY.....	23
3.3.4 PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA	24
3.3 CARACTERÍSTICAS DA KOMBUCHA	28
3.3.1 FÍSICO-QUÍMICA	28
3.3.2 MICROBIOLÓGICA.....	30
3.3.3 PROPRIEDADES	31
3.4 SIMBIÓTICO	32
3.4.1 PROBIÓTICO.....	33
3.4.2 PREBIÓTICO	34
3.5 USO DE PROBIÓTICO E PREBIOTICO NA DIETA EM ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 LOCAL	36
4.2 PREPARO DA KOMBUCHA EXPERIMENTAL	36
4.3 CHÁ VERDE E SACAROSE	39
4.4 DELINIAMENTO EXPERIMENTAL	40
4.5 AFERIÇÕES DOS PARÂMETROS	42
4.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1 pH	44
5.2 Brix.....	46
5.3 Peso do SCOPY.....	47

5.4 UFC.....	48
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A procura por produtos naturais, saudáveis e que promovem o bem-estar e a saúde, e que visam uma melhor qualidade de vida, está cada vez mais desafiadora no mercado para atender as necessidades nutricionais, seja na alimentação humana ou animal. A indústria alimentícia que produz alimentos funcionais tem crescido exponencialmente nos últimos anos. Para a satisfação dos consumidores, bactérias e levedura com ação probióticas estão sendo inseridas em uma variedade de alimentos que fazem parte da dieta e proporcionam benefícios à saúde (BURGAIN *et al.*, 2011).

Usualmente, a definição mais aceita para probióticos, é que eles são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003).

A Kombucha é uma bebida fermentada obtida através do chá verde açucarado (*Camellia sinensis*), por associação de bactérias e leveduras. A palavra kombucha é derivada das palavras japonesas “alga” (kombu) e “chá” (chá) (AMARASINGHE *et al.*, 2018). O chá verde açucarado é adicionado a chamada “mãe da kombucha” que será responsável pelo processo fermentativo de uma associação simbiótica de bactérias (primordialmente por bactérias acéticas) e leveduras, onde se forma uma película, um biofilme chamado SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*), que realizam várias reações bioquímicas durante sua fermentação. (CHEN, LIU, 2000).

Buscando melhor eficiência na produção animal, aliando ao fato que os setores da agroindústria tornam cada vez mais competitivos, e um mercado cada vez mais exigente com a qualidade, saúde e bem-estar, o desenvolvimento de novos produtos incentiva cada vez mais esse setor a inovar (PENA *et al.*, 2018). Deste modo, os produtos constituídos por microrganismos vivos têm sido usados com finalidades terapêuticas, e como promotores de crescimento em animais de produção, promovendo uma melhor qualidade de vida.

Com isso justifica-se o presente estudo, que tem como objetivo comparar diferentes concentrações de chá verde e sacarose no desenvolvimento da cultura simbiótica SCOBY na kombucha, observando os parâmetros pH, Brix, peso do SCOBY e UFC durante o período de fermentação.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação das diferentes concentrações do chá verde e da sacarose sobre o desenvolvimento da cultura simbiótica - SCOBY na kombucha, encontrando a melhor faixa e condições de crescimento dos microrganismos para a possibilidade de ser inserida na dieta animal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Objetivo específico 1

Comparar os valores de pH, Brix, peso do SCOBY e UFC durante o processo de fermentação, nas diferentes concentrações de chá verde 0,6%, 0,8% e 1,2% e sacarose 6% e 8% nos dias 0, 7 e 14

- Objetivo específico 2

Avaliar a melhor concentração obtida entre a sacarose e o chá verde, dos parâmetros físico-químicos da Kombucha, visando estabelecer as melhores condições de produção em uma escala industrial.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 KOMBUCHA

A Kombucha é uma bebida probiótica que tem sido consumida no mundo todo, de forma caseira ou comercializada por empresas, sendo um alimento que está dentro das tendências atuais pelas suas propriedades e podendo ser usada para diversos tratamentos, como fins preventivos e curativos, e que vem se tornando conhecida no Brasil. Originalmente, é uma bebida tradicional asiática, preparada a partir da fermentação da infusão das folhas de *Camellia sinensis*, chá verde ou chá preto, com adição de sacarose. Para o preparo, é utilizado como inóculo, o chamado “SCOBY”, uma colônia de cultura simbiótica de bactérias (primordialmente bactérias acéticas) e leveduras. A bebida é semelhante a um espumante, com sabor ácido e refrescante, similar à cidra de maçã (MEDEIROS *et al.*, 2019).

O tempo de fermentação do chá de Kombucha é geralmente de 7 a 10 dias e, se esse tempo for muito prolongado, desenvolve-se um sabor avinagrado mais intenso, e podendo ser aproveitado na culinária. No processo de fermentação, é também produzido gás carbônico, que acaba deixando a bebida Kombucha gaseificada, similar a um refrigerante. Uma vez feito esse processo de fermentação, o produto final não apresenta açúcar, resultando em uma bebida benéfica para a saúde, podendo até ser substituída por outras bebidas com teor alcoólico (SANTOS, 2016).

Vários estudos e comprovações da Kombucha apontam as propriedades benéficas que podem contribuir com a saúde e bem-estar, tais como os microrganismos, os antioxidantes, baixo valor calórico, e está sendo considerado um produto inovador.

A diferença entre fermentações pode estar relacionada com alguns fatores como o tipo de chá, açúcar, concentração e tempo, levando em consideração o local de produção dos substratos utilizados que podem diferir entre regiões (VALIYAN *et al.*, 2021).

3.2 MICRORGANISMOS

Estudos buscam identificar os microrganismos na Kombucha, e podem apresentar certa dificuldade, visto que algumas espécies podem ser difíceis de

isolar, e outros apresentam características exclusivas levando a erros de identificação (MOURA, 2019).

Dentre os microrganismos identificados na Kombucha as bactérias acéticas são predominantes. As principais são *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter acetie* e *Acetobacter pasteurianus*. *Acetobacter xylinum* é a espécie mais recorrente, e tem a capacidade de sintetizar uma rede de celulose flutuante (SCOBY) que melhora a associação formada entre bactérias e fungos (BALENTINE *et al.*, 1997).

Todos os microrganismos presentes na kombucha encontram-se tanto no líquido quanto na “mãe kombucha”, também conhecida como SCOBY. O SCOBY é uma película gelatinosa que se forma na superfície do líquido e, a cada fermentação, são formadas novas camadas de película na parte superior que está em contato com o ar, sendo sempre essa a mais recente, e essa matriz de celulose acomoda as bactérias e leveduras responsáveis pela fermentação (JARRELL *et al.*, 2000).

Na simbiose, têm-se diversos gêneros de leveduras, tais como: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorula* e *Mycoderma*. (BATTIKH *et al.*, 2012; MAYSER *et al.*, 1995).

3.3 FONTES DE SUBSTRATOS PARA A KOMBUCHA

3.3.1 CHÁ (*CAMELLIA SINENSIS*)

O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinenses* é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo. O chá é utilizado na China, há aproximadamente três mil anos e considerado pelos orientais uma bebida saudável, tendo sua maior produção no Sudeste asiático, incluindo China, Índia, Japão, Tailândia, Sri Lanka e Indonésia (RIETVELD *et al.*, 2003; TANAKA *et al.*, 2008).

Os chás de *Camellia sinenses* são classificados em três tipos básicos: preto, verde e oolong, sendo diferenciados pelo beneficiamento das suas folhas. O chá preto é derivado de folhas envelhecidas pela oxidação aeróbica das catequinas (composto fenólico), ocorrendo à fermentação. O chá verde (Figura 1) é produzido a partir de folhas frescas da planta, as quais são apenas escaldadas

e fervidas, ocorrendo rápida inativação da enzima polifenol oxidase, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas e compostos com atividades funcionais. Por sua vez, o chá oolong é considerado intermediário ou nível de oxidação parcial entre os outros dois tipos (CABRERA *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2003).

Figura 1 – *Camellia sinensis* - folhas, chá verde.



Fonte: Autoria própria, 2021.

A atividade antioxidante é uma das propriedades mais conhecidas do chá verde e está relacionada à estrutura química das catequinas, sendo apontada como o principal fator contribuinte na prevenção de doenças cardiovasculares. Também possui cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos, micronutrientes como vitaminas B, E e C e minerais como cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro (BALENTINE *et al.*, 1997; RIETVELD *et al.*, 2003; YANAGIMOTO *et al.*, 2003).

Outras fontes de substratos podem ser utilizadas na produção da kombucha, substituindo o chá verde e chá preto, tais como o chá de Hibiscus e o chá de erva mate (MOURA 2019).

3.3.2 AÇÚCAR COMO FONTE DE SACAROSE

O açúcar é essencial na produção da Kombucha, visto que é o substrato para a simbiose de bactérias e leveduras que o transformarão nas substâncias que a caracterizam. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 271 de 22 de setembro de 2005, o açúcar é definido como a sacarose obtida do caldo de cana de açúcar ou de beterraba (BRASIL, 2005).

Segundo Reiss (2014), o açúcar é considerado o melhor substrato para o processo de fermentação da kombucha, e quando outras fontes de sacarose forem utilizadas, o processo fermentativo deverá ser menor, em função da produção de ácidos. Durante o processo de fermentação, a sacarose é degradada por meio de enzimas produzidas por leveduras presentes no biofilme SCOBY, e convertida em glicose e frutose, transformando a glicose em dióxido de carbono (CO_2) e álcool etílico, que são as principais fontes para a produção de ácidos responsáveis pelas características sensoriais do produto. Na Figura 2 é possível observar a presença de gases em amostras da Kombucha.

As bactérias acéticas se alimentam da sacarose como fonte de carbono para produzirem uma rede de celulose como metabólito secundário da fermentação, dando origem a um novo SCOBY, principalmente as bactérias do gênero *Acetobacter xylinum* (JAYABALAN, 2014).

Figura 2 - Tubo Falcon contendo amostra da Kombucha fermentada, onde é possível observar a presença de gases.



Fonte: MOURA, A. B., (2019).

3.3.3 SCOPY

O SCOPY (Figura 3) corresponde ao biofilme sobrenadante, composto pela associação de bactérias e leveduras usada como *starter* para fermentação do chá, sendo conhecido por várias nomeações, como “elixir de vida longa”, “cogumelo milagroso”, “bactérias do chá vermelho”, “kombucha de esponja do chá”, “cogumelo medicinal”, “tesouro do mar”, “cogumelo japonês”, “algas do rio Nilo”, “gota de água-viva”, “esponja da Manchúria”, “fungo de vinho indiano” e “cogumelo do herói” (SANTOS, 2016).

Figura 3 - Aspecto Visual do SCOPY em meio ao chá verde adoçado



Fonte: Autoria própria, 2021.

Todos os microrganismos que compõem o kombucha encontram-se tanto no líquido, quanto no SCOPY. O SCOPY pode adquirir entre 6 e 12mm de espessura, e sempre formando uma nova película (Figura 4) a cada fermentação (PALUDO, 2017).

Figura 4 - SCOBY formado após fermentação, com diferentes espessuras.



Fonte: Autoria própria, 2021.

Estes microrganismos diferem devido às condições climáticas da região, pela disponibilidade das bactérias e leveduras que podem crescer juntas, condições de temperaturas, tempo de fermentação, qualidade e concentração do chá verde e açúcar. Portanto, demonstram composição diferente de região para região que pode afetar quantitativa e qualitativamente a composição do consórcio microbiano (JAYABALAN & WAISUNDARA, 2019).

Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006) observaram a ausência de catequinas na erva-mate e diferentes tipos de catequinas em amostras de chá verde, o que poderia explicar a ausência e diminuição de atividade antimicrobiana da Kombucha.

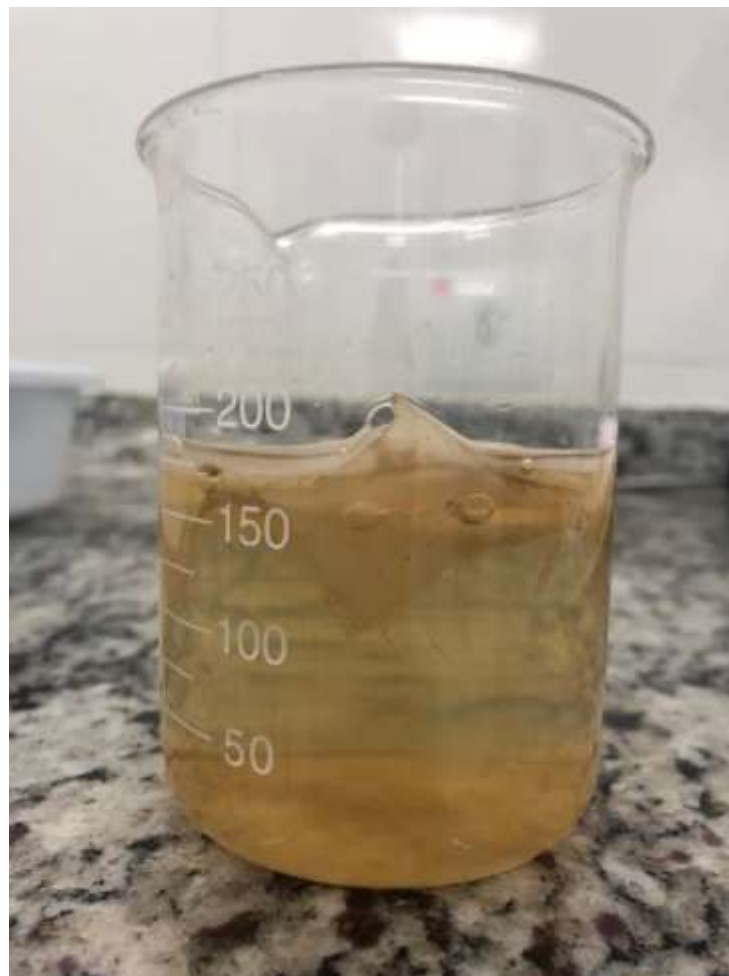
3.3.4 PREPARAÇÃO DA KOMBUCHA

Tradicionalmente, o chá preto e o chá verde são os mais utilizados para o preparo da kombucha, seja por meio da combinação de ambos ou isoladamente. Geralmente, 20 g de sacarose são dissolvidos em 1 litro de água potável fervente

e adiciona-se à esta mistura, 10 g de folhas de chá e um tempo de 5 a 10 minutos de infusão (PURE *et al.*, 2016).

Posteriormente à infusão, o arrefecimento prévio do chá é necessário para a inserção da cultura starter, chá inicial já colonizado, para fermentação do SCOBY. Em escala artesanal, SCOBY é adicionado ao chá base em recipiente de gargalo largo (Figura 5), de modo a permitir fácil acesso e área de superfície suficiente para a troca de ar com o ambiente (JAYABALAN *et al.*, 2019).

Figura 5 – SCOBY adicionado ao chá base, em recipiente de gargalo largo



Fonte: Autoria própria, 2021.

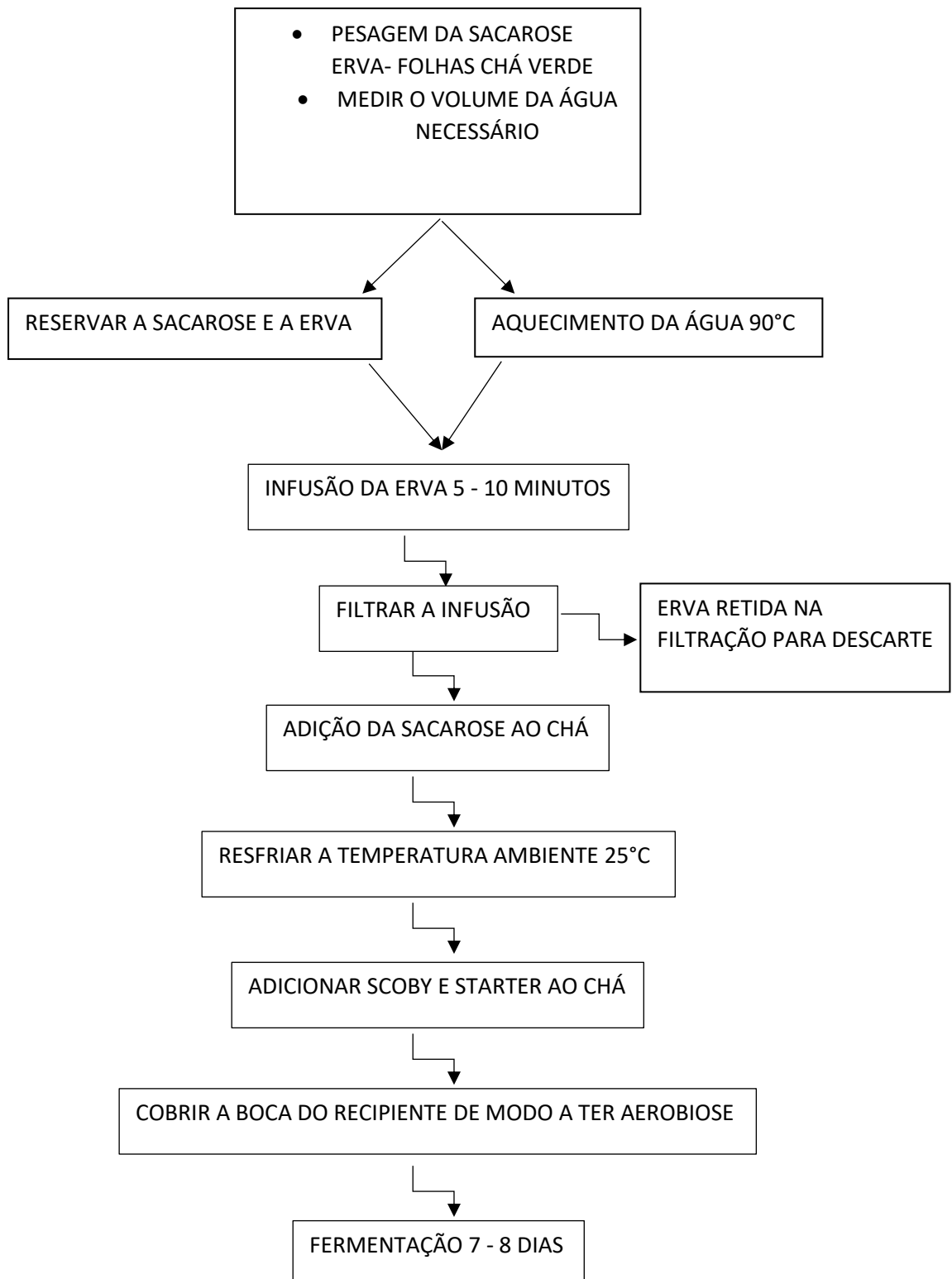
Devido ao baixo pH, alguns materiais como latão, ferro fundido e alumínio devem ser evitados, sendo os mais adequados para uso o aço inox, plástico e vidro (JAYABALAN *et al.*, 2019).

A primeira fermentação da kombucha em um período de, aproximadamente, 7 a 8 dias, exige condições aeróbias parciais e liberação

suficiente de CO₂ para que se tenha um bom início de processo. Estes cuidados são imprescindíveis para que haja a produção dos ácidos e metabólitos característicos (SOARES, 2021).

Na Figura 6, é possível observar o fluxograma de preparo da Kombucha artesal.

Figura 6 - Fluxograma de preparo da Kombucha artesanal.



Fonte: Autoria própria, 2021.

Após a primeira fermentação, pode ser realizada a segunda fermentação em recipiente fechado para facilitar a formação de gás carbônico, adicionando sucos ou pedaços de fruta e/ou ervas, agregando características à bebida e melhorando seu aspecto sensorial e devendo ser mantida em ambiente refrigerado (DUTTA & PAUL, 2019).

3.3 CARACTERÍSTICAS DA KOMBUCHA

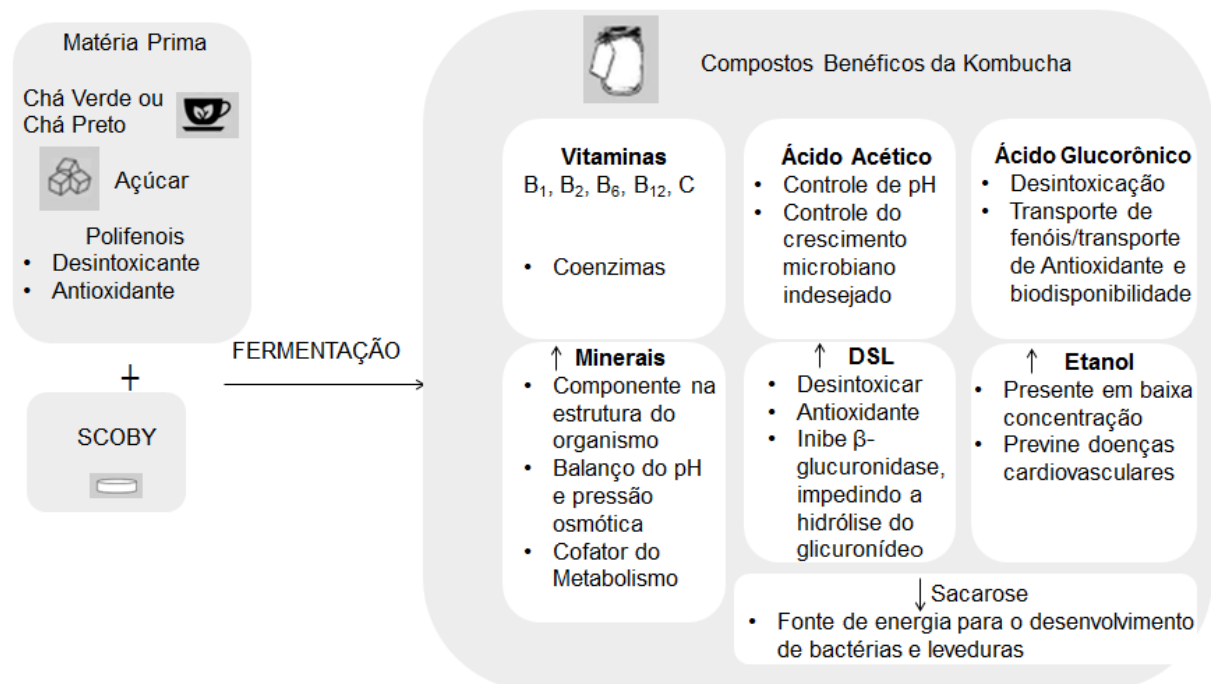
3.3.1 FÍSICO-QUÍMICA

A composição química da Kombucha é muito variável, pois depende de diversos fatores como a duração da fermentação, o tipo de microrganismos presentes no SCOBY selecionado e das características do chá escolhido como substrato (água, concentração de chá e de açúcar) (SANTOS, 2016).

O ácido glucurônico presente na kombucha é um dos mais importantes para a saúde, resultando no processo microbiológico de oxidação da glicose. No corpo humano, este ácido é produzido pelo fígado e apresenta efeitos desintoxicante e também é precursor na biossíntese de vitamina C (JAYABALAN *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2015).

A propriedade quelante dos antioxidantes no chá, ou seja, sua combinação com metais livres diminui a probabilidade de moléculas vitais danosas que participam de reações dos processos fisiológicos. Além disso, os polifenóis do chá demonstraram grande potencial de proteção contra o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, exibindo enzimas e interrompendo processos que resultam no crescimento de células cancerígenas. Dentre os compostos químicos da Kombucha, destaca-se uma variedade de compostos (Figura 7), tais como vitaminas, aminoácidos, minerais, microrganismos, ácidos orgânicos e enzimas, mas dependendo sempre da cultura simbiótica utilizada para produção (LEAL *et al.*, 2018).

Figura 7 - Compostos Químico da Kombucha.



Fonte: Adaptado, LEAL *et al.*, (2018).

O etanol, componente produzido pelas leveduras auxiliam as bactérias acéticas na produção do ácido acético, que por sua vez, estimula as leveduras na produção do etanol (GREENWALT *et al.*, 2000).

O etanol atinge o pico de concentração por volta do 6º dia de fermentação, e então, ocorre seu declínio pelo consumo das bactérias para que haja a produção do ácido acético. Esse declínio na concentração do etanol, também é justificado pela diminuição da sua produção por leveduras, uma vez que o pH e a concentração de açúcar tendem a diminuir (CHEN; LIU, 2000).

Segundo Villarreal *et al.*; (2018), o pH é um dos mais importantes parâmetros que afetam a fermentação da Kombucha, pois os ácidos formados, como acético e glucônico, têm sido atribuídos como responsáveis pelas atividades funcionais das bebidas resultantes. Também está intimamente relacionado com o crescimento microbiano e as alterações estruturais dos compostos que apresentam atividade antioxidante.

No início da fermentação, uma pequena porção do caldo starter, pode ser adicionado ao novo chá para diminuir o pH, a fim de impedir o crescimento de microrganismos indesejáveis. A queda do pH acontece devido à formação de ácidos e por ser um consórcio de microrganismos, cada um deles têm uma faixa típica de

pH dentro da qual o seu crescimento é favorecido. Portanto, o pH é atribuído como um dos fatores de grande importância no crescimento microbiano e na síntese de celulose bacteriana (VILLARREAL *et al.*, 2018).

Outro fator importante é que esse parâmetro pode determinar o controle e o fim do processo produtivo, que se encerra quando o pH atinge 2,5 (Jayabalan *et al.*, 2014).

3.3.2 MICROBIOLÓGICA

Segundo Watawana *et al.*; (2015), a cultura simbiótica presente na kombucha denominada SCOBY, é composta por uma composição microbiológica abundante que pertencem aos gêneros de bactérias acéticas, e além disso, essa cultura apresenta uma quantidade de diferentes espécies de leveduras, sendo necessário mais estudos para comprovação das espécies de microrganismos presentes.

As bactérias e leveduras (Figura 8) presente na fermentação da Kombucha, são responsáveis pelo crescimento do SCOBY, o fungo do chá, cujo nome científico é *Medusomyces gisevii*. A massa de bactérias e leveduras SCOBY, adere o biofilme formando uma membrana gelatinosa e dando origem a novas colônias (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Figura 8 - Principais microrganismos da Kombucha.

Bacteria	Levedura
<i>Acetobacter xylinum e xylinoides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae,</i>
<i>Bacterium gluconicum,</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii,</i>
<i>Acetobacter aceti e</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe,</i>
<i>pasteurianus and Gluconobacter</i>	<i>Saccharomyces ludwigii,</i>
<i>oxydans, Lactobacillus sp.,</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii,</i>
<i>Lactococcus sp., Leuconostoc sp.,</i>	<i>Toruslapora delbrueckii,</i>
<i>Bifidobacterium sp., Thermus sp.,</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<i>Allobaculum sp.,</i>	<i>Brettanomyces lambicus</i>
<i>Ruminococcaceae Incerate Sedis,</i>	<i>Brettanomyces custerii, Candida sp.,</i>
<i>Propionilbacterium sp.,</i>	<i>Pichia membranaefaciens, Kloeckera</i>
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>apiculata and Torulopsis sp.</i>

Fonte: Adaptado, LEAL *et al.*, 2018.

As bactérias do ácido acético desempenham papel importante na indústria de alimentos e bebidas fermentadas, e são encontradas em alimentos açucarados e ácidos. As bactérias do ácido láctico (LAB) contribuem sabor acentuado aos alimentos e benefícios à saúde. (WANG *et al.*, 2022).

As bactérias do ácido láctico, durante a fermentação aumentam a produção de ácido D-sacárico, 1,4 lactona (DSL) e ácido glucônico, que contribui para atividade antioxidante (YANG *et al.*, 2010).

As leveduras, há tempos, usada para fermentação de alimentos e bebidas, também é um dos microrganismos presente na Kombucha por possuir capacidade de hidrolisar diferentes substratos presentes em fermentados (BUZZINI *et al.*, 2017)

Segundo Wang *et al.*, (2022), muitos estudos já apresentaram a identificação fenotípica dos microrganismos presentes na Kombucha, mas técnicas moleculares como o (PCR), podem fornecer melhores identificações de AAB e levedura.

3.3.3 PROPRIEDADES

A maioria das propriedades e benefícios da Kombucha foi baseada em observações pessoais e depoimentos, e vem ganhando embasamento com pesquisas científicas. Diante dos benefícios descritos para a Kombucha, a propriedade antioxidante tem sido um aliado para o organismo, correlacionada com aumento da imunidade, alívio de inflamações e artrites, protegendo as células do estresse oxidativo que é o acúmulo de radicais livres que tem como consequência várias doenças e até mesmo o envelhecimento. A vitamina C é um composto bem característico presente no substrato da bebida, que tem o papel de combater esses radicais livres e espécies reativas do oxigênio (ROS) (VITTAS *et al.*, 2013).

Outra propriedade relacionada à kombucha é a capacidade desintoxicante e energizante (DUFRESNE *et al.*, 2000). Essa habilidade energética pode ser explicada pela formação do ferro e do complexo quelante sintetizado com ácido glucônico, que aumenta o nível de hemoglobina no sangue, melhora o fornecimento de oxigênio aos tecidos e estimula a síntese de ATP, aumentando a absorção do ferro não heme e a vitamina C (ADRIANI, 2011).

A formação do ácido acético na composição da kombucha tem propriedade antimicrobiana, e identificando algumas bactérias lácticas que promove seu caráter probiótico, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e gerando benefícios a saúde (KOZYROVSKA *et al.*, 2012).

Battikh *et al.* (2013) estudaram a atividade antimicrobiana da kombucha preparada com chá preto e com chá verde, e verificaram que, apesar de ambas inibirem o crescimento da maior parte dos microrganismos, a de chá verde obteve maior potencial antimicrobiano. Contudo, apesar dos depoimentos dos consumidores alegando os benefícios do consumo da Kombucha, vale ressaltar que muitos ainda não são comprovados cientificamente, sendo necessárias mais pesquisas para avaliar tais benefícios.

A atividade antioxidante e desintoxicante no fígado foram ligadas a função hepatoprotetora oferecida pela Kombucha, pela presença do ácido D-sacárico, 1,4 lactona (DSL), um antioxidante de grande potencial desenvolvido no chá sintetizado pelas leveduras, e a presença de polifenóis no chá está ligada as propriedades anticancerígenas (VIEIRA *et al.*, 2021).

3.4 SIMBIÓTICO

A combinação de prebiótico e probiótico caracteriza os simbióticos, os quais exercem papel fundamental para a sobrevivência e a atividade das cepas no trato intestinal, gerando efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (NATH A *et al.*, 2018).

Este consórcio de bactérias e leveduras na kombucha induz o crescimento de novas membranas mais grossas e aumenta o efeito simbiótico. A membrana de celulose mantém os microrganismos na superfície (o novo biofilme), fornecendo oxigênio suficiente e disponibilidade para o seu desenvolvimento (SUHARTATIK *et al.*, 2011).

Simbióticos são considerados inovação tecnológica projetada para potencializar os efeitos de cada um de seus compostos (SWANSON *et al.*, 2020).

De acordo com Kolida e Gibson (2011), os produtos simbióticos podem atuar de duas maneiras distintas, a simbiótica complementar que é realizada quando o prebiótico selecionado atua estimulando seletivamente as concentrações dos componentes benéficos da microbiota, ou seja, pode promover indiretamente o crescimento e a atividade do probiótico, e a simbiose sinérgica é realizada quando o prebiótico escolhido estimula o crescimento e a atividade exclusivamente do probiótico administrado em conjunto.

3.4.1 PROBIÓTICO

De origem grega, o termo probiótico, significa “para a vida” ou “a favor da vida”, foi inicialmente utilizado como antônimo de antibiótico, referindo-se a substâncias capazes de estimular o crescimento de bactérias benéficas (SALGADO, 2017).

Guarner *et al.*, (2005) designaram o termo “probiótica” como substâncias ativas que são essenciais para saúde e desenvolvimento da vida.

Parker (1974) definiu os probióticos como “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal”, tornando obsoleta a definição de substâncias. Fuller (1989) referiu-se como um suplemento alimentar microbiano vivo, benéfico ao hospedeiro.

Os probióticos, para produzirem efeitos benéficos, não precisam necessariamente colonizar o órgão alvo, mas devem chegar vivos em quantidade suficiente para afetar a microbiologia e metabolismo (POMAR *et al.*, 2018).

As espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as que mais se destacam quando utilizadas como probióticos, porém encontram-se outras opções, como o *Bacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e o fermento *Saccharomyces* (NOGUEIRA *et al.*, 2011)

Os mecanismos de ação dos probióticos ainda que benéficos, não estão totalmente esclarecidos, principalmente porque os estudos são desenvolvidos em modelos animais ou são *in vitro*, limitando assim a extrapolação dos resultados para humanos, porém é muito bem aceito pelas pesquisas e pessoas que já fazem o uso com resultados positivos (PIMENTEL, 2019).

A legislação recomenda que o produto com alegações probióticas, apresente a faixa de 10^8 a 10^9 unidade formadora de colônia (UFC) na ingestão diária (ANVISA, 2012).

3.4.2 PREBIÓTICO

Definido como carboidratos não digeríveis, os prebióticos estimulam o crescimento e/ou atividade de um grupo de bactérias, promovendo benefícios ao hospedeiro, sendo utilizado como substrato para a microbiota (NATH A et al., 2018).

Adicionalmente, podem inibir a multiplicação de patógenos por terem efeito bifidogênico, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Os prebióticos podem incluir féculas, fibras dietéticas, outros açúcares não absorvíveis, álcoois do açúcar, inulina e oligossacarídeos, sendo o último encontrado como componente natural de vários alimentos, como frutas, vegetais, leite e mel. Entre os oligossacarídeos naturais, os frutooligosacarídeo (FOS) são os mais conhecidos e utilizados em alimentos, aos quais permitem aplicação em diversos produtos. As principais fontes de FOS são: trigo, cebola, banana, alcachofra, alho e raízes de chicória (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

3.5 USO DE PROBIÓTICO E PREBIOTICO NA DIETA EM ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO

A nutrição é um dos alicerces de qualquer sistema de criação animal, e o incentivo e a procura por novos produtos relacionados à alimentação sem causar prejuízo ao desempenho, está cada vez mais sendo aceito e bem definido no conceito dos produtores (PENA *et al.*, 2018).

Para a saúde intestinal e a ótima eficiência zootécnica do animal, uma ferramenta importante é a utilização de aditivos na dieta (ARAÚJO *et al.*, 2007).

De acordo com a portaria SARC (Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo) nº 013 de 30/11/2000, os aditivos destinados à alimentação animal são substâncias, microrganismos ou produto formulado, que quando adicionados na dieta melhoram o desempenho do animal, as necessidades nutritivas e a qualidade física dos alimentos.

Uma preocupação que têm definido as dietas atuais é o bem-estar dos animais, incluindo os novos critérios de saúde intestinal, o uso de produtos integrados ao modelo de sustentabilidade ambiental e a simplificação dos sistemas de alimentação. Com a restrição por antibióticos como promotores de crescimento na criação animal, houve demanda por produtos alternativos que pudessem

substituí-los sem causar prejuízos econômicos e, nesse sentido, os aditivos têm sido cada vez mais utilizados (NOIA, 2018).

Deste modo, os produtos constituídos por microrganismos vivos e antimicrobianos têm sido usados, com finalidades terapêuticas e como promotores de crescimento em animais de produção (PENA *et al.*, 2018)

O principal interesse no uso de probióticos tem sido a prevenção e o tratamento de infecções gastrointestinais e doenças diarreicas em animais associadas a antibióticos (AHASAN *et al.*, 2015).

O equilíbrio da microbiota intestinal, ou seja, em eubiose, impede o crescimento de microrganismos patogênicos, não benéficos à saúde do hospedeiro caracterizando uma disbiose. Esse equilíbrio da microbiota é influenciado pelos probióticos que agem de forma benéfica (BADARÓ *et al.*, 2008)

O termo simbiótico se refere ao conjunto de aditivos, associação de microrganismos benéficos, que favorece o animal através da dieta. Para os bovinos, destaca-se o rúmen, que apresenta microrganismos e que precisam de proteínas e carboidratos para crescer e multiplicar, que depois de consumido esses substrato a microbiota produz metabólitos resultantes da sua fermentação (proteínas microbianas e ácidos graxos de cadeia curta), sendo a principal fonte de energia e proteínas para bovinos. Outro fator importante da atuação desses microrganismos para os bovinos, é reduzir a concentração do ácido lático no rúmen, ajudando a manter o pH adequado à microbiota criando um ambiente ruminal mais estável (MENEGON, 2020).

Um dos primeiros estudos foi testado a Kombucha como probiótico em animais foi para doenças hepáticas, onde induziram danos nas células hepáticas, depois estes ratos foram tratados com Kombucha e perceberam uma capacidade protetora e regenerativa dos hepatócitos (células do fígado) dos ratos estudados (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Murugesan *et al.* (2005) estudaram a utilização do SCOBY como suplemento na alimentação de aves e verificaram que uma concentração de 15 % (p/p) de película em ração, provocou um aumento do consumo de ração e água, do peso e do fator de produção das aves, sem ter sido observado nenhuma anormalidade.

Para as aves, a utilização de bactérias probióticas favorece uma condição de equilíbrio da flora saudável, impedindo o desenvolvimento de *Escherichia coli*, *Clostridium sp*, *Salmonella sp*, entre outros, o que leva ao crescimento de bactérias

benéficas, as quais produzem ácidos orgânicos como láctico, acético e butírico (Garcia e Gomes, 2019).

A utilização de probióticos nas rações de coelhos, no intestino delgado tem efeitos positivos sobre a mucosa intestinal, pois promove um aumento tanto nas alturas das vilosidades, que aumenta a área de absorção, como na relação vilosidade cripta, interferindo para melhor aproveitamento dos nutrientes, conseqüentemente na produção de carne e de deposição de gordura na carcaça (NÓIA, 2018)

Huaynate *et al.*; (2006) realizaram um experimento com suínos onde constataram que o tratamento de leitões suplementados com probióticos em uma quantidade de 200 ppm, a incidência de diarreia foi de 12% enquanto no grupo controle (0 ppm) obteve-se uma ocorrência de 31%, e a inclusão de 12% de probiótico melhorou o consumo e a digestibilidade da ração.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL

O experimento foi conduzido no Laboratório Microbiológico e Físico-químico, da Empresa Orgolabs Laboratórios LTDA, localizada na cidade de Descalvado – SP, e o estudo foi desenvolvido em parceria entre a empresa e a Universidade Brasil, Departamento de Mestrado Profissional em Produção Animal.

A empresa Orgolabs é uma fábrica de Minerais Orgânicos - Minerais Quelatados, e que atua em três segmentos fornecendo matéria primas, para linha humana, linha agrícola e linha veterinária.

4.2 PREPARO DA KOMBUCHA EXPERIMENTAL

A cultura simbiótica utilizada “SCOBY” foi doada por um produtor artesanal da cidade, com um tamanho de aproximadamente 10 cm de diâmetro.

Para o experimento, foram utilizados 8 g de chá verde e 80 g de açúcar cristal comercial para cada litro de água mineral. Foi mantido o SCOBY em bandeja plástica com aproximadamente 3 litros de chá verde adoçado com açúcar cristal para o crescimento da cultura simbiótica durante um período de aproximadamente 30 dias (Figura 9).

Figura 9 – SCOBY em processo de crescimento da cultura simbiótica



Fonte: Autoria própria, 2021.

Após esse período de crescimento do biofilme (Figura 10), iniciou-se o preparo das amostras em diferentes concentrações de chá verde e sacarose atribuída à pesquisa (Figura 11).

Figura 10 – Crescimento do SCOBY – biofilme



Fonte: Autoria própria, 2021.

Figura 11 – Preparo das amostras em diferentes concentrações de chá verde e sacarose



Fonte: Autoria própria, 2022.

4.3 CHÁ VERDE E SACAROSE

Foi utilizado no experimento a erva *Camellia sinensis* - chá verde (folhas), adquirido na Florian, na cidade de Piracicaba - SP, e o açúcar cristal comercial como fonte de sacarose da marca União, ambos como substrato para produção e desenvolvimento do experimento.

A erva foi adicionada em um béquer contendo água mineral fervida, na concentração de 6, 8 e 12 g/L durante 5 minutos para infusão. Após o tempo, a infusão com a erva foi coada em peneira, adicionado sacarose (açúcar cristal) na concentração de 60 e 80 g/L e agitada até a sua completa dissolução. Esperou-se o substrato atingir a temperatura em torno de 25°C, para então, adicionar 100 mL de chá starter e 5% da colônia de SCOBY com formato cilíndrico (Figura 12).

Figura 12 – Formato cilíndrico do SCOBY



Fonte: Autoria própria, 2022.

4.4 DELINIAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi estabelecido nas concentrações de 0,6%, 0,8% e 1,2% de chá verde, nas concentrações de 6% e 8% de sacarose, e 5% do SCOBY, com quatro repetições para cada, na temperatura de 27°C, totalizando 24 amostras, num volume total de 200ml cada, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações de SCOBY, chá verde, sacarose e volume.

Scoby [%]	Chá [%]	Sacarose [%]	Repetições	Volume total [ml]
5	0,6	6	4	200
5		8	4	200
5	0,8	6	4	200
5		8	4	200
5	1,2	6	4	200
5		8	4	200

Fonte: Autoria própria, 2022.

Os SCOBYs foram pesados em balança semi-analítica da marca Quimis modelo BK300, tiveram os pesos registrados e colocados no meio fermentativo (Figura 13). Logo após, no dia 0 (tempo zero), foi aferido pH com pHmetro da marca Kasvi, brix com o refratômetro portátil analógico (sem precisão de resultados) da marca Akso modelo RHBO-90 e amostras de 4 mL foram coletadas para inoculação e contagem de UFC (Figura 14). Foi incubado câmara do tipo BOD da marca Fugitec por 7 dias na temperatura de 27°C, podendo variar $\pm 2^\circ\text{C}$, para ser aferido novamente. Foi repetido o procedimento de aferição e coleta de amostras no último tempo de 14 dias de fermentação.

Figura 13 – Medição de pH e brix das amostras



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 14 – Contagem de UFC em placas



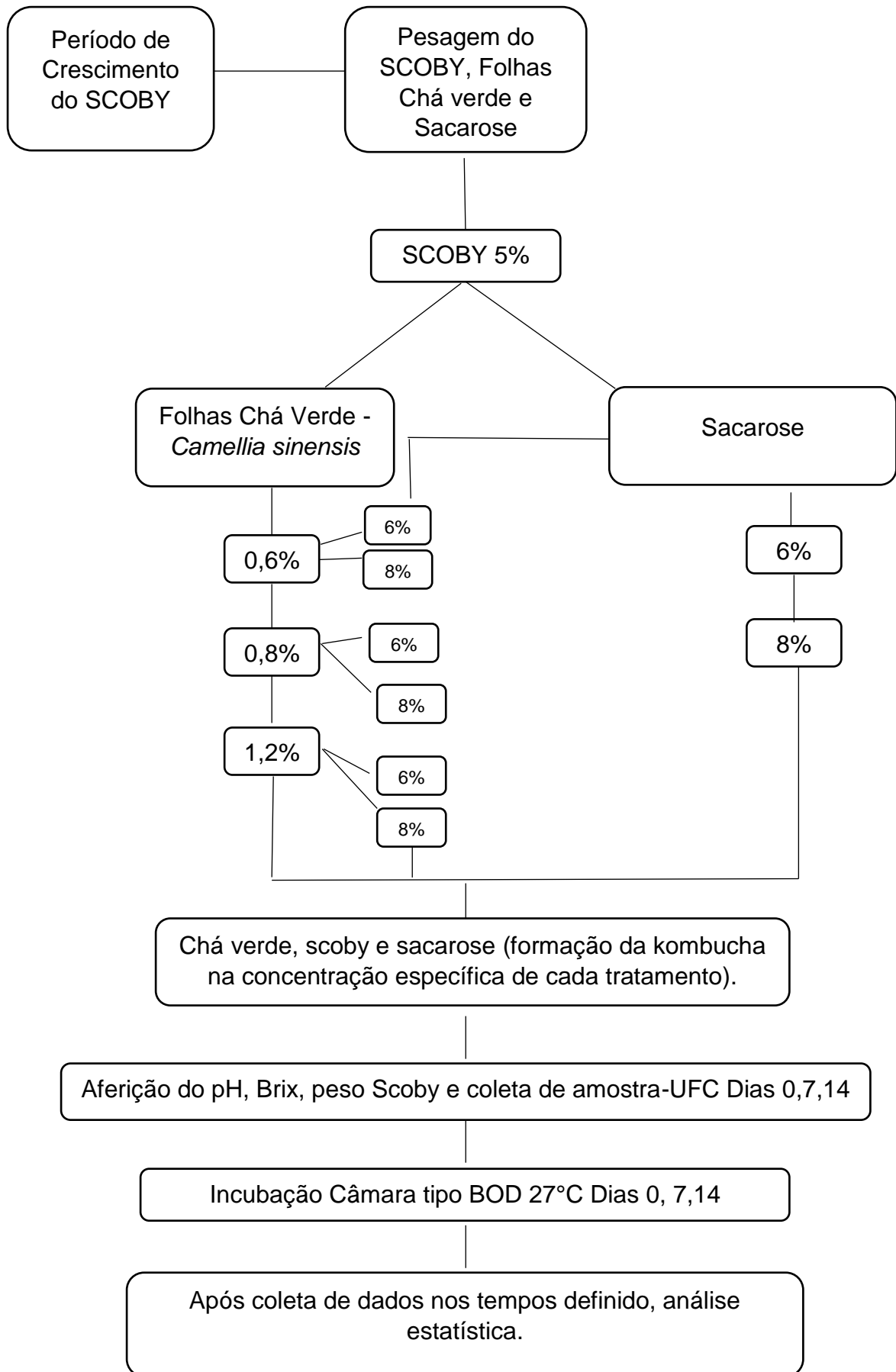
Fonte: Autoria própria, 2021.

4.5 AFERIÇÕES DOS PARÂMETROS

Passados sete dias, novas aferições de brix, pH, peso do SCOBY e coleta para inoculação foram realizadas.

Após os parâmetros aferidos, as amostras foram levadas novamente a BOD por mais sete dias, e assim o processo foi repetido completando o ciclo de 14 dias de experimento. Portanto, foi possível obter: os valores pH, brix, peso do SCOBY e contagem de unidade formadora de colônia (UFC) inicial e final dos parâmetros. A Figura 15 apresenta o esquema seguido no experimento.

Figura 15 - Esquema seguido no experimento



Fonte: Autoria Própria, 2022.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados experimentais atenderam as prerrogativas de normalidade, homogeneidade de variâncias e análise de resíduos sendo analisados em um delineamento inteiramente casualizado e as médias obtidas nas diferentes concentrações foram confrontadas pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade. O processamento dos dados foi efetuado utilizando o software Statistica, versão 12 (StatSoft, Inc., 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de pH, brix, peso do SCOBY e UFC serão discutidos de acordo com as tabelas apresentadas.

5.1 pH

Na tabela 2 é possível observar que após sete dias de fermentação houve diferença estatística entre as concentrações de açúcar e chá verde em relação aos valores de pH. A concentração de 8% de açúcar e 0,6% e 0,8% de chá verde apresentaram melhores resultados com valores de pH mais ácido sendo 2,558 para 0,6% e 2,563 para 0,8%, diferindo dos demais tratamentos. Com relação ao décimo quarto dia, encontra-se diferença estatística entre os tratamentos, em ambas as concentrações de chá verde e açúcar. Porém encontram-se resultados satisfatórios no sétimo dia, não havendo necessidade para seguir com a fermentação até o décimo quarto dia.

De acordo com Jayabalan *et al.*, (2014) através das medições de pH, parâmetro de grande importância na produção de kombucha, pode ser utilizado para determinar o controle e o fim do processo produtivo, que se encerra quando o pH atinge 2,5.

A queda dos valores de pH acontece devido a produção de ácidos, favorecendo o crescimento do consórcio de microrganismos benéficos que se desenvolve em faixa de pH mais baixa (VILLARREAL *et al.*, 2018).

Tabela 2 - Resultados das comparações múltiplas dos potenciais hidrogeniônicos (pH) observados nas diferentes concentrações de açúcar e chá verde nas fases inicial e final mantidos a 27° C. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Açúcar (%)	Chá (%)	Dias / Médias e Desvios Padrões *			
		7		14	
6	0,6	2,643 ±	0,028 BC	2,420 ±	0,042 A
6	0,8	2,695 ±	0,031 C	2,483 ±	0,022 AB
6	1,2	2,683 ±	0,046 B	2,450 ±	0,062 AB
8	0,6	2,558 ±	0,041 A	2,500 ±	0,028 B
8	0,8	2,563 ±	0,054 A	2,520 ±	0,033 B
8	1,2	2,630 ±	0,022 B	2,470 ±	0,034 AB

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

A tabela 3 se refere aos resultados de análise com efeito simples do parâmetro açúcar. É possível observar os valores de pH nas concentrações de 6% e 8% de açúcar no período de sete e quatorze dias. Houve diferença estatística entre os tratamentos, e pode-se observar o melhor resultado em sete dias na concentração de 8,0% e em quatorze dias na concentração de 6,0%.

Tabela 3 - Resultados das comparações dos potenciais hidrogeniônicos (pH) observados nas diferentes concentrações de açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Açúcar (%)	Dias / Médias e Desvios Padrões *			
	7		14	
6	2,67 ±	0,04 B	2,42 ±	0,04 A
8	2,58 ±	0,05 A	2,53 ±	0,03 B

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$)

Com base nos resultados da tabela 4, que se refere aos resultados de análise com efeito simples do parâmetro chá verde, foi possível observar as diferentes concentrações de chá verde 0,6%, 0,8% e 1,2% no período de sete dias que a concentração de 0,6% e 0,8% foram as melhores, não diferindo entre si. Para o décimo quarto dia não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 4 - Resultados das comparações dos potenciais hidrogeniônicos (pH) observados nas diferentes concentrações de chá verde. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Chá (%)	Dias / Médias e Desvios Padrões *			
	7		14	
0,6	2,60 ±	0,06 A	2,48 ±	0,07 A
0,8	2,63 ±	0,08 AB	2,48 ±	0,08 A
1,2	2,66 ±	0,04 B	2,46 ±	0,07 A

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$)

5.2 Brix

Na tabela 5, estão representadas as concentrações de chá verde e açúcar para o parâmetro brix, e é possível observar que os resultados encontrados não apresentaram variabilidade dos dados através do equipamento utilizado para leitura, não sendo possível a conclusão dos cálculos estatísticos. Fazendo uma análise simples, pode-se observar que, em ambos os dias nos tratamentos de concentração de 6% de açúcar e 0,6%, 0,8% e 1,2% chá verde houve um menor valor de brix ocorrendo um maior consumo de açúcar.

Por ser um equipamento analógico de baixa precisão não foi possível variabilidade entre os valores, o desvio tem como resultado zero.

Tabela 5 - Resultados das comparações dos valores de brix observados nas diferentes concentrações de chá e açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Açúcar (%)	Chá (%)	Dias / Médias e Desvios Padrões			
		7		14	
6	0,6	5,05 ±	0,10	4,88 ±	0,48
6	0,8	5,05 ±	0,10	4,63 ±	0,48
6	1,2	5,00 ±	0,16	4,63 ±	0,75
8	0,6	6,95 ±	0,10	5,63 ±	0,48
8	0,8	7,00 ±	0,00	5,25 ±	0,29
8	1,2	6,25 ±	0,29	5,13 ±	0,25

5.3 Peso do SCOBY

De acordo com a Tabela 6, foi analisado o peso do SCOBY nos diferentes tratamentos. Houve diferença estatística entre os tratamentos em ambos os dias, tendo destaque para o tratamento na concentração de 8,0% de açúcar e 1,2% de chá, onde encontra-se um maior peso do SCOBY.

A interação significativa entre chá verde 1,2% e açúcar 8% proporcionou um ganho de peso do SCOBY. Quanto maior a concentração de açúcar, menor o pH e consequentemente, maior a formação da cultura simbiótica.

O açúcar é considerado o melhor substrato para o processo de fermentação da Kombucha. Durante o processo a sacarose é consumida por bactérias e leveduras presentes no biofilme SCOBY, que se alimentam da sacarose como fonte de carbono para produzirem uma rede de celulose como metabólito secundário da fermentação, dando origem a um novo SCOBY (REISS, 2014).

Segundo Villarreal *et al.*, (2018), conforme o avanço no processo de fermentação, o SCOBY se amplia formando novas camadas que se acumulam umas sobre as outras; o que é demonstrado na Tabela 6 em ambos os tempos de fermentação na maior concentração de chá verde e açúcar apresentou maior peso.

Tabela 6 - Resultados das comparações dos pesos de SCOBY observados nas diferentes concentrações de chá e açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Açúcar (%)	Chá (%)	Dias / Médias e Desvios Padrões *			
		7		14	
6	0,6	16,06 ±	0,75 E	19,11 ±	1,30 C
6	0,8	21,84 ±	0,89 B	26,16 ±	3,76 B
6	1,2	24,19 ±	1,27 B	27,66 ±	2,15 B
8	0,6	18,51 ±	1,51 D	20,81 ±	1,79 C
8	0,8	21,24 ±	1,67 C	22,30 ±	2,40 C
8	1,2	26,81 ±	0,18 A	32,96 ±	2,20 A

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

5.4 UFC

Na Tabela 7, está representada a unidade formadora de colônia (UFC). Pode-se observar que na concentração de 8,0% de açúcar e 1,2% de chá, no sétimo dia apresentou um maior crescimento de microrganismos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Para o décimo quarto dia, a concentração de 8% de açúcar e 1,2% de chá apresentou um menor crescimento de microrganismos. Isso demonstra que à medida que o tempo avança, a quantidade de substrato diminui e, conseqüentemente a formação da cultura tende a diminuir.

Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006) observaram a ausência de catequinas na erva-mate e diferentes tipos de catequinas em amostras de chá verde, o que poderia explicar a ausência e diminuição de atividade antimicrobiana da Kombucha.

A diferença de resultados encontrados pode estar relacionada com alguns fatores como o tipo de chá, açúcar, concentração e tempo de fermentação, e levar em consideração o local de produção dos substratos utilizados que podem diferir entre regiões (VALIYAN *et al.*, 2021).

Tabela 7 - Resultados das comparações dos valores de UFC observados nas diferentes concentrações de chá e açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Açúcar (%)	Chá (%)	Dias / UFC/Médias e Desvios Padrões *			
		7		14	
6	0,6	2,85 ±	0,17 D	3,78 ±	0,35 A
6	0,8	2,93 ±	0,20 D	3,82 ±	0,24 A
6	1,2	3,93 ±	0,16 C	3,77 ±	0,17 A
8	0,6	4,15 ±	0,10 B	3,72 ±	0,28 A
8	0,8	3,70 ±	0,28 C	3,66 ±	0,13 A
8	1,2	4,30 ±	0,33 A	3,25 ±	0,17 B

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

A Tabela 8 se refere aos resultados de análise com efeito simples do parâmetro açúcar. É possível observar que no sétimo dia, a concentração de 8% de açúcar obteve maior UFC comparado com a concentração de 6% de açúcar. No décimo quarto dia, ocorre o inverso, com 6% de açúcar observa-se o maior valor de UFC.

Tabela 8 - Resultados das comparações dos valores de UFC observados nas diferentes concentrações de açúcares. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Açúcar (%)	Dias / UFC/Médias e Desvios Padrões *			
	7		14	
6	3,24 ±	0,55 B	3,79 ±	0,24 A
8	4,05 ±	0,35 A	3,54 ±	0,29 B

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

A Tabela 9 se refere aos resultados de análise com efeito simples do parâmetro chá. No sétimo dia, a concentração de 1,2% de chá verde, teve maior número de UFC, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Para o décimo quarto dia, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 9 - Resultados das comparações dos valores de UFC observados nas diferentes concentrações de chá. Universidade Brasil, Campus Descalvado, SP, Brasil, 2022.

Chá (%)	Dias / UFC/Médias e Desvios Padrões *			
	7		14	
0,6	3,50 ±	0,70 B	3,75 ±	0,29 A
0,8	3,32 ±	0,47 B	3,74 ±	0,20 A
1,2	4,11 ±	0,36 A	3,51 ±	0,32 A

*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$)

6 CONCLUSÃO

No presente experimento pode-se concluir que

- A melhor concentração de sacarose em relação ao pH (uma vez que, quanto menor o valor melhor foi a fermentação), pode-se observar a melhor concentração de 8,0% de açúcar.
- A melhor concentração de chá em relação ao pH, foi de 0,6% e 0,8%.
- Para o crescimento de microrganismos (UFC) e peso do SCOBY, pode-se concluir os melhores resultados na concentração de 1,2% de chá e 8,0% de sacarose.
- Com sete dias de fermentação, apresentaram-se os melhores resultados dentre os tratamentos testados, não sendo necessário dar continuidade até o décimo quarto dia de fermentação.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. Estudo do poder antioxidante em infusões de ervas utilizadas como chás. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2013.

ADRIANI, L. et al. The effect of feeding fermented kombucha tea on HLD, LDL and total cholesterol levels in the duck bloods. *Biotechnology in Animal Husbandry*, Zemun, v. 27, n. 4, p. 1749-1755, 2011.

AHSAN, A.S.M.L.; AGAZZI, A.; INVERNIZZI, G.; BONTEMPO, V.; SAVOINI, G. The beneficial role of Probiotics in monogastric animal nutrition and health. *J Dairy Vet Anim Res.* 2015; 2 (4):116-132. DOI: 10.15406/jdvar.2015.02.0004

AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, NS, & WAISUNDARA, VY (2018). Avaliação das propriedades físico-químicas e atividades antioxidantes do kombucha “Tea Fungus” durante longos períodos de fermentação. *Food Science & Nutrition*, 6(3), 659-665. doi :10.1002/fsn3.605

ANDRIGUETTO, Jose Milton; PERLY, Luimar. *Nutrição animal: bases e fundamentos*. NBL Editora, 1994.

ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária. *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos*, 2012.

ARAÚJO, J. A; SILVA, J. H. V. AMÂNCIO, A. L. L; LIMA, M. R. LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.1, n.3, p. 69-77, 2007.

BADARÓ ACL, Guttierrez APM, Rezende AVC, Stringheta PC. Alimentos probióticos : aplicações como promotores da saúde.humana – parte 1. *Nutrir* 2008;2(3).

BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, England & Wales, v. 37, n. 8, p.693-704, 1997.

BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT – Food Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 71-77, Jun. 2012.

BATTIKH, H. et al. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.

BRASIL. RDC nº 271, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar. ANVISA: Brasília, 2005. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0271_22_09_2005.html#:~:text=A%20Diretoria%20Colegiada%20da%20Ag%C3%Aancia,%2C%20c%2Fc%20do%20Art. Acesso em: 10 agosto 2022

BROOME T. 2015. Kombucha: The Tea of Immortality em *Fifth Season Gardening*. Disponível em: <https://fifthseasongardening.com/kombucha-the-tea-of-immortality>. Acesso em 18 de fevereiro de 2022.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, v. 104, p. 467–483, 2011.

BUZZINI, P.; LACHANCE, M.-A.; YURKOV, A. *Leveduras em Ecossistemas Naturais: Diversidade*; Springer: Cham, Suíça, 2017.

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

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

DUFRESNE, C., & Farnworth, E. Tea, Kombucha, and health. A review. *Food Research International*, v 33, p.409-421, 2000.

DUTTA, H. & Paul, S. Kombucha Drink. Production, quality, and safety aspects. *Production and Management of Beverages*, p. 259-288, (2019) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00008-0>

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, n. 5, p.365-378, 1989.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Revista Food Ingredients Brasil. São Paulo, n. 17, p. 58-65, 2011. Disponível em: Acesso em: 29 agosto 2022.

GUARNER, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko, and L. Morelli. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? Br. J. Nutr. 93:783–786.

GREENWALT, C J; STEINKRAUS, K H; A, Ledford R. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. Journal Of Food Protection, Ithaca, v. 63, n. 7, p.976-981, fev. 2000.

HUAYNATE, R et al. Uso de probiótico em dietas de suínos: incidência de diarreia, desempenho zootécnico e digestibilidade de rações. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 664-673, 2006.

IBRAHEM, A. A., Al-Shawi, S. G. and Al-Temimi, W. K. A.The antagonistic activity of the synbiotic containing Lactobacillus acidophilus and pineapple residue FOS against pathogenic bacteria. Brazilian Journal of Biology [online]. 2024, v. 84. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258277> Acesso em: 27 de Setembro de 2022

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

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

JAYABALAN, R. & WAISUNDARA, V. Y. Kombucha as a functional beverage. Functional and Medicinal Beverages, 413-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00012-1>, (2019).

KO, S. Y., et al. Comparison of the Effect of Green Tea By-product and Green Tea Probiotics on the Growth Performance, Meat Quality, and Immune Response of Finishing Pigs. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, Seoul, v. 21, n. 10, p. 1486-1494, 2008.

KOLIDA, S; GIBSON, G. R. Synbiotics in Health and Disease. Annual Reviews of Food Science and Technology, v. 2, p. 373-393, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-food022510-133739>

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

MATSUBARA, S.; Rodriguez-Amaya, D. B. Teores de catequinas e teafloavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* p. 401-407, 2006.

MARTÍNEZ Leal, J., VALENZUELA Suárez, L., JAYABALAN, R., Huerta Oros, J., & Escalante-Aburto, A. (2018). *A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. CyTA - Journal of Food*, 16(1), 390–399.

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

MOURA, B. A.; Monitoramento do Processo Fermentativo da Kombucha de Chá Mate. Dissertação (Do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco), 2019.

MEDEIROS, S.C.G.; ZANCHETTI, C.C.C. Kombucha: efeitos in vitro e in vivo. *Infarma – Ciências Farmacêuticas*, Porto Alegre v. 31, n. 2, p. 73-79, 2019.

MENEGON, G. Probióticos na nutrição de bovinos. COAGRIL - Cooperativa Agricola Rio Grande do Sul. 2020. Disponível em: < <https://nutrinews.com/pt-br/probioticos-e-prebioticos-para-producao-de-bovinos-quando-e-como-usar/>>. Acesso em: agosto 2022.

MURUGESAN G.S., Sathishkumar M., Swaminathan K. 2005. Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. *Bioresource Technology*, 96(16):1743-8.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE et al. *Nutrient requirements of beef cattle (NRC)*, 2016.

NATH A, Haktanirlar G, Varga Á, Molnár MA, Albert K, Galambos I, et al. Biological activities of lactose-derived prebiotics and symbiotic with probiotics on gastrointestinal system. *Med.* 2018; 54(2).

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

NOGUEIRA, Janaína Cândida Rodrigues et al. Probióticos- Revisão da Literatura. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, [S. L.], v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

NOIA, I. Z. Desempenho e características qualitativas da carne de coelhos alimentados com dietas contendo aditivos. Dissertação de Graduação (Faculdade de Ciências Agrárias), Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS, 2018.

OLIVEIRA, H.F; SANTOS, J.S; CUNHA, F.S.A. Utilização de alimentos alternativos na alimentação de codornas. Nutritime Revista eletrônica.v.11, n05, p.3683–3690.

PARKER, R. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Animal Nutrition and Health, 29(4): 8, 1974.

PALUDO, NATALIA. Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir do chá verde e extrato de erva mate: processo artesanal e escala laboratorial. 2017. 47f. Dissertação de Graduação (Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2017.

PENA, T. R.; NÓIA, I. Z.; JESUS, L.; SILVA, N.; PEREIRA, T. L.; GABRIEL, A.; OLIVEIRA, E. Desempenho produtivo de coelhos suplementados com quitosana ou probiótico nas dietas. In: Anais... 55ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia - Goiás, 2018.

PIMENTEL, Carolina Vieira de Mello Barros et al. Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos. Barueri -SP: Editora Manole Ltda., 2019

POMAR, M.; ARNAIZ, E. Papel de los prebióticos y los probióticos em la funcionalidad de la microbiota el paciente com nutrición enteral. Nutricion Hospitalaria, Madrid, v.35, n.2, p.18-26, 2018.

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

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

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

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.*, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003

SALGADO, Joicelem. Alimentos funcionais. São Paulo: Oficinas de Texto, 2017.

SANTOS, J. M. KOMBUCHA: Caracterização da Microbiota e Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares para Uso em Restauração 2016. (Dissertação da faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa). Março 2016.

SOARES, MARCELO G. PROPRIEDADES EMERGENTES, APLICAÇÕES E USO TERAPÊUTICO DO KOMBUCHA E SEU SCOBY: UMA REVISÃO. Dissertação de Graduação (Faculdade de Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas - MG, 2021.

STÜRMER, E. S; CASASOLA, S.; GALL, M.C.; GALL, M.C. A IMPORTÂNCIA DOS PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA. *Revista Brasileira da Nutrição Clínica*, v. 27, n. 4, p. 264-272, out./dez. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Silmara-Mastroeni/publication/271853189_Estado_nutricional_e_diabetes_mellitus_gestacional/links/54d5385e0cf25013d02abc3d/Estado-nutricional-e-diabetes-mellitus-gestacional.pdf#page=60. Acesso em 12 agosto 2022.

SUHARTATIK, N; KARYANTINA, M; MARSONO, Y; RAHAYU, E.S; KUSWANTO, K.R.; Kombucha as anti hypercholesterolemic agent (in Vitro 53 Study using SD rats). Proceedings of the 3rd International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid Bacteria (3rd ICISLAB): Better Life with Lactic Acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Lactic Acid Bacteria, Yogyakarta, Indonesia. 2011.

SWANSON, K. S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 17, p. 687-701, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>

TANAKA, T.; KOUNO, I. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. **Food Science Technology Research**, [s. l.], v. 9, p. 128-133, 2003.

VALIYAN, F.; KOOHSARI, H.; FADAVI, A. Use of response surface methodology to investigate the effect of several fermentation conditions on the antibacterial Brazilian Journal of Food Research, Campo Mourão, v. 11 n. 4, p. 1-14, out./dez. 2020. Página | 14 activity of several kombucha beverages. *Journal of Food Science Technology*, v. 58, p. 1877-1891, 2021.

VIEIRA, P. E.; PINTO, G.O.; MORAIS, K.C.; SANTANA, E. S.; Análise da Ação da Kombucha e suas Propriedades. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.18 n.38; p. 64 2021.

VILLARREAL,Soto; S. A, BEAUFORT; S., BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; RENARD, T.; ROLLAN, S. & TAINLLANDIER, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>

VILLARREAL-SOTO, S.A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.P.; TAILLANDIER, P. Entendendo a fermentação do chá de Kombucha: uma revisão. *Journal of Food Science*, v. 83, n. 3, 2018.

VITAS, J. S. et al. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*, v. 44, n. February 2017, p. 95- 102, 2018.

WANG, B.; RUTHERFURD-MARKWICH, K.; Zhang X.; MUTUKUMIRA, Anthony N. Kombucha: Production and Microbiological Research. *Journal Foods*, v. 11, n. 21, 2022.

YANG, Z.; ZHOU, F.; JI, B.; LI, B.; LUO, Y.; YANG, L.; LI, T. Simbiose entre microorganismos de kombucha e kefir: significado potencial para o aprimoramento da função de kombucha. *Appl. Bioquim. Biotecnologia*. 2010, 160, 446-455.