

## Desenvolvimento e Caracterização de Kombucha Produzida com Ingredientes Orgânicos e Convencionais

Luana Lermen Becchi<sup>1</sup>, Thais Müller<sup>2</sup>, Lucas Lago Bergamaschi<sup>3</sup>,  
Daiane Heidrich<sup>4</sup>, Guilherme Liberato da Silva<sup>5</sup>, Mônica Jachetti Maciel<sup>6</sup>

### Destaques:

- (1) A bebida produzida com ingredientes orgânicos, na segunda formulação, encontrou-se de acordo com os padrões determinados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa.
- (2) As kombuchas orgânica e convencional apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.
- (3) Os tipos de ingredientes utilizados, orgânicos ou convencionais, modificam as propriedades físico-químicas das bebidas, mas não alteram as propriedades antimicrobianas.

### RESUMO

Kombucha é uma bebida fermentada obtida facilmente e com grande potencial terapêutico. O processo de produção da bebida não é padronizado. Apesar disso, deve estar de acordo com o padrão de identidade e qualidade determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Foram relatados estudos sobre suas propriedades e benefícios, mas o produto final dependerá dos parâmetros adotados, os quais podem interferir na atividade biológica da bebida. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e caracterizar kombuchas produzidas com ingredientes orgânicos e convencionais. Foram desenvolvidas duas bebidas com as mesmas condições de produção – uma com ingredientes orgânicos e outra convencional. Para verificar se as kombuchas estavam de acordo com o padrão exigido pelo Mapa, foram analisados pH, graduação alcoólica e acidez volátil de ambas as bebidas em duas formulações. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição, conforme o protocolo da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Utilizou-se bactérias Gram-negativas *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*, Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e levedura *Candida albicans*. A bebida produzida com ingredientes orgânicos, na segunda formulação, encontrou-se de acordo com os padrões determinados pelo Mapa. Ambas apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* na concentração de 500 µL/mL. Todas as outras cepas bacterianas tiveram inibição maior que 80% nesta mesma concentração para as duas bebidas. Já quanto à levedura, as duas kombuchas não apresentaram atividade antifúngica. Com esta pesquisa conclui-se que o tipo de ingredientes, orgânicos ou convencionais, pode modificar as propriedades físico-químicas das bebidas, mas não interfere na propriedade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** bebida funcional; fermentação; *Scoby*.

### DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF KOMBUCHA PRODUCED WITH ORGANIC AND CONVENTIONAL INGREDIENTS

#### ABSTRACT

Kombucha is an easily obtainable fermented beverage with great therapeutic potential. The beverage production process is not standardized. Despite this, it must comply with the identity and quality standard determined by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Mapa). Studies on its properties and benefits have been reported, but the final product will depend on the parameters adopted, which may interfere with the biological activity of the beverage. The objective of this research was to develop and characterize kombuchas produced with organic and conventional ingredients. Two beverages were developed with the same production conditions, one with organic ingredients and the other with conventional ones. To verify if the kombuchas were in accordance with the standard required by Mapa, pH, alcoholic strength, and volatile acidity of both beverages in the two formulations were analyzed. The evaluation of antimicrobial activity was performed using the microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol. Gram-negative bacteria *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli*, Gram-positive *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and yeast *Candida albicans* were used. The beverage produced with organic ingredients, in the second formulation, met the standards determined by Mapa. Both showed antimicrobial activity against *S. aureus* at a concentration of 500 µL/mL. All other bacterial strains had greater than 80% inhibition at the same concentration for both formulations. As for yeast, the two kombuchas did not show antifungal activity. With this research, it is concluded that the type of ingredients, organic or conventional, can modify the physicochemical properties of the beverages, but does not interfere with their antimicrobial properties.

**Keywords:** functional drink; fermentation; *Scoby*.

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Taquari. Lajeado/RS, Brasil. <https://orcid.org/0009-0002-7969-6903>

<sup>2</sup> Universidade do Vale do Taquari. Lajeado/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-7366-9678>

<sup>3</sup> Universidade do Vale do Taquari. Lajeado/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-9008-1072>

<sup>4</sup> Universidade do Vale do Taquari. Lajeado/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-1010-5215>

<sup>5</sup> Universidade do Vale do Taquari. Lajeado/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-6619-6622>

<sup>6</sup> Universidade do Vale do Taquari. Lajeado/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-6863-2181>

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Instrução Normativa (IN) n° 41, de 2019<sup>1</sup>, kombucha é uma bebida fermentada adquirida por meio da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto, pela infusão de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze e açúcares por intermédio do *Scoby* (*Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast*). A composição do *Scoby* se dá principalmente por celulose, bactérias do ácido acético, do ácido lático e leveduras<sup>2</sup>.

A kombucha tem origem chinesa, na região da Manchúria, sendo consumida há mais de dois mil anos. Fabricá-la é simples, não requer muitos equipamentos ou ingredientes de difícil acesso<sup>3,4</sup>. Primeiramente, a *Camellia sinensis* (L.) Kuntze *in natura* e o açúcar são adicionados à água quente, permanecendo em infusão por alguns minutos. Após o resfriamento, o *Scoby* e uma porcentagem da bebida previamente fermentada (*starter*) são adicionados para realizar a fermentação do chá adoçado. Desta forma, a fermentação da kombucha compõe-se de duas porções distintas, uma fase líquida e uma camada de *Scoby*<sup>5</sup>. Esta etapa de fermentação geralmente leva de 7 a 14 dias. Ao final, o *Scoby* é retirado da kombucha junto com uma pequena quantidade de bebida pronta para ser utilizado nas próximas produções<sup>4</sup>. Para a carbonatação e melhoramento do sabor pode ser realizada uma segunda fermentação. Neste processo adiciona-se uma fonte de açúcar junto ao líquido resultante da primeira fermentação<sup>6</sup>.

O processo de produção da bebida não é padronizado, mas, no Brasil, alguns ingredientes são obrigatórios<sup>1</sup>, como água potável, infusão de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, açúcares e a cultura simbiótica de bactérias e leveduras (*Scoby*). Apesar disso, o produto final dependerá dos parâmetros adotados, como tipo e concentração de chá e açúcar, tempo de fermentação e temperatura<sup>2,7</sup>, e da composição da cultura *starter*<sup>8</sup>. O resultado é uma bebida refrescante, levemente ácida e gaseificada, contendo diversos componentes, como açúcares, etanol, aminoácidos, ácidos orgânicos, polifenóis, enzimas hidrolíticas, micronutrientes e minerais. Essa composição talvez seja a base para alegações de várias propriedades biológicas atribuídas à kombucha<sup>3</sup>.

Alguns gêneros prevalecem na maioria das culturas iniciadoras, como *Komagataeibacter* e *Acetobacter* para bactérias do ácido acético (AAB), e *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* e *Candida* para leveduras<sup>3</sup>. Apesar da importância das bactérias do ácido lático (LAB) para as propriedades probióticas da kombucha, nem sempre esse grupo de bactérias aparece na bebida<sup>9</sup>.

De acordo com a Instrução Normativa (IN) n° 41, de 2019<sup>1</sup>, no Brasil a kombucha não pode ser considerada uma bebida probiótica ou atribuída a alegações funcionais não aprovadas em legislação específica. Para Butler *et al.*<sup>10</sup> (2019), consumi-la pode contribuir para o aumento da microbiota benéfica, bem como desempenhar benefícios à saúde do consumidor.

A bebida tornou-se muito popular devido às suas alegações funcionais, como antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antidiabética, podendo ser usada no tratamento de úlceras gástricas e contra o colesterol alto. Também mostrou-se impactante na resposta imune e na desintoxicação do fígado<sup>4</sup>. Apesar de existirem estudos sobre as propriedades e benefícios da kombucha, não foi encontrado na literatura científica nenhum que distinguisse a bebida produzida com ingredientes orgânicos da convencional.

A kombucha apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas<sup>11</sup>, atribuída principalmente aos ácidos orgânicos, particularmente ácido acético, proteínas abundantes e catequinas, posto que o ácido acético e as catequinas são conhecidas por inibir microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos<sup>3</sup>. Vários estudos já foram relatados para indicar que a kombucha exerce atividade antimicrobiana, como o de Cardoso *et al.*<sup>12</sup> (2020), contra *Staphylococcus*

*epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.

Devido à sua popularidade e alegações funcionais, houve um crescimento significativo em seu mercado de produção<sup>13</sup>. Um maior crescimento ainda é esperado nos próximos anos em razão do aumento da conscientização global sobre seus benefícios de consumo que levam a melhorias no estilo de vida e na saúde<sup>14</sup>.

Com a crescente demanda da produção da kombucha surge a preocupação com a sustentabilidade. Para que possa haver produção sustentável de bebida, o cultivo das plantas/frutas (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, cana-de-açúcar, suco de frutas) e os seus processamentos devem ser realizados em locais isentos de agrotóxicos. Pesticidas são todos os compostos aplicados para destruir ou controlar pragas, incluindo inseticidas, herbicidas e fungicidas<sup>15</sup>. Os resíduos desses produtos nos alimentos configuram preocupação global, pois geram impactos negativos à saúde humana<sup>16</sup> e ao meio ambiente. Já os alimentos orgânicos são cultivados naturalmente, sem pesticidas sintéticos ou fertilizantes químicos – são considerados alimentos saudáveis e ecológicos<sup>17</sup>.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver e caracterizar kombuchas produzidas com ingredientes orgânicos e convencionais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Tipo de pesquisa

Quanto ao modo de abordagem, a pesquisa classifica-se como quantitativa. Em relação ao objetivo geral, a pesquisa é um estudo descritivo, que traz como procedimento técnico o levantamento de dados de forma transversal e também experimental *in vitro*.

### População e amostra de estudo

A amostra de estudo foi a kombucha, bebida fermentada obtida a partir de chá *Camellia sinensis* (L.) Kuntze adoçado e de uma cultura de leveduras e bactérias (*Scoby*). Foram desenvolvidas duas formulações de kombucha com as mesmas quantidades de ingredientes (água, açúcar, chá verde, *starter* e suco de uva), porém o que se diferiu foi que em uma bebida os ingredientes usados foram orgânicos e, na outra, os ingredientes foram convencionais.

Seguindo as normativas brasileiras, o trabalho foi cadastrado junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e possui o cadastro A42F2ED.

## COLETA DOS DADOS

### Formulação da bebida

A amostra convencional de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze utilizada foi chá verde seco disponível em um mercado local que vende artigos a granel, localizado na cidade de Lajeado/RS, assim como o açúcar e o suco. A amostra orgânica de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze empregada foi chá verde seco comercial a granel adquirido pela internet. O açúcar e o suco orgânicos foram adquiridos em um mercado local de Lajeado/RS. Todos os produtos orgânicos utilizados nesta pesquisa tinham selo com certificação de produção orgânica.

As duas kombuchas (a com ingredientes orgânicos e a convencional) foram preparadas simultaneamente e desenvolvidas no Laboratório de Técnicas Dietéticas da Univates. Após análise dos

parâmetros determinados pelo Mapa, verificou-se que as bebidas não estavam de acordo com a legislação e foram reformuladas. Por isso foram desenvolvidas duas formulações.

### Parâmetros analíticos

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 41, de 2019<sup>1</sup>, que dispõe sobre o padrão de identidade e qualidade da Kombucha, ao final da F2 foram analisados pH, graduação alcoólica e acidez volátil.

#### pH

O pH foi medido usando pHmetro previamente calibrado (Qualxtron QX 1500) no Laboratório Didático de Microbiologia da Univates.

#### Grau alcoólico

O grau alcoólico foi analisado no Laboratório Qualistatus (Viamão/RS), certificado pelo Mapa. Realizou-se a separação do álcool por destilação da amostra e, posteriormente, esse foi quantificado de acordo com a densidade relativa do destilado a 20°C, medida com densímetro eletrônico<sup>18,19</sup>. Os resultados foram expressos em percentual de volume (% v/v).

#### Acidez volátil

A acidez volátil foi analisada no Laboratório Qualistatus (Viamão/RS). Realizou-se a titulação com hidróxido de sódio dos ácidos voláteis, separados da amostra por meio de arraste do vapor d'água e retificação dos vapores<sup>18</sup>. Os resultados foram expressos em miliequivalentes por litro (mEq/L).

#### Atividade antimicrobiana

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa causam doenças comuns na população mundial, atuando, principalmente, no trato gastrointestinal. As bebidas empregadas nesta pesquisa, tanto a convencional quanto a produzida com ingredientes orgânicos, são da segunda formulação. Foi realizada dupla filtração das kombuchas, com membrana estéril de 0,22 µm, a fim de que os microrganismos presentes na bebida não competissem com os do estudo. Após, foi realizado controle de crescimento das kombuchas filtradas.

Os microrganismos testados foram cedidos pelo Laboratório Unianálises, da Univates. *Candida albicans* (ATCC 10231) foi incubada em ágar Sabouraud (Sigma) por 24 horas a 35°C. Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados em caldo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Sigma), mais Mops-3-(N-Morfolino) Propane Sulfônico Ácido (LAB Confiança) com 2% de glicose (*Synth*). Para avaliação da atividade antibacteriana foram selecionadas as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) e Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 1087). As cepas bacterianas foram incubadas separadamente em ágar Mueller Hinton (BD) a 37°C por 24 horas. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados em caldo Mueller Hinton (BD). Somente foram usadas amostras que apresentaram bom crescimento e sem contaminação.

O teste de susceptibilidade antimicrobiana aplicado foi baseado no protocolo M27-Ed.4 da *Clinical and Laboratory Standards Institute*<sup>20</sup> para leveduras e nos protocolos M07-A9<sup>21</sup> e M100-2018<sup>22</sup> para bactérias. A concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de uma substância que inibe o crescimento do microrganismo, foi conduzida de acordo com o método de microdiluição em caldo, em placa de 96 poços. Para determinação da CIM foi considerada a menor concentração de kombucha, que inibiu 100% do crescimento do microrganismo comparado ao controle positivo.

Primeiramente, todos os microrganismos foram quantificados, apresentando de  $1$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL para a levedura e de  $0,67$  a  $1,33 \times 10^6$  UFC/mL para as bactérias. Para isso, utilizou-se uma suspensão com  $10$  mL de solução salina (SS)  $0,85\%$  e colônias puras dos microrganismos, que foram ajustadas de acordo com o resultado da leitura da absorbância em espectrofotômetro Genesys™ 10S (Thermo Scientific).

Posteriormente foram preparadas diluições seriadas das duas kombuchas filtradas. As concentrações das amostras testadas foram  $500$ ,  $250$ ,  $125$ ,  $62,5$ ,  $31,25$ ,  $15,6$ ,  $7,8$ ,  $3,9$ ,  $2$  e  $1 \mu\text{L/mL}$ , ou seja, entre  $50\%$  e  $0,1\%$ . Utilizou-se uma placa de  $96$  poços para cada microrganismo e para cada uma das duas kombuchas (a com ingredientes orgânicos e a convencional). Nas colunas  $2$  até  $11$  de cada placa foi adicionado  $100 \mu\text{L}$  de caldo MH para bactérias e  $100 \mu\text{L}$  de RPMI mais Mops e glicose para a levedura na coluna  $12$ ,  $200 \mu\text{L}$ . A kombucha foi acrescentada na concentração de  $500 \mu\text{L/mL}$  ( $50\%$ ) nas colunas  $1$  e  $2$ . Nos poços seguintes foi feita a microdiluição seriada a partir do poço  $2$  até chegar ao poço  $10$ . Posteriormente,  $100 \mu\text{L}$  do inóculo foi inserido em todos os poços, exceto no controle negativo. Nos poços  $11$  e  $12$  foram colocados, respectivamente, o controle positivo e o controle negativo. Para controle positivo, não foi adicionada nenhuma concentração da kombucha e para o controle negativo não foi adicionado o microrganismo. O volume final de cada poço foi de  $200 \mu\text{L}$ . As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por  $24$  horas para *C. albicans* e *B. cereus* e  $37^\circ\text{C}$  por  $20$  horas para *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *E. coli*.

Foi realizado o controle de viabilidade a partir da amostra padronizada com caldo RPMI mais Mops e glicose para a levedura e caldo MH para as bactérias. Adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  deste inóculo final em uma placa de Petri de  $9$  cm de diâmetro contendo ágar Sabouraud para levedura e ágar Mueller Hinton para bactérias. A placa de Petri foi para a estufa junto com a placa de  $96$  poços e permaneceu pelo mesmo tempo. Posteriormente realizou-se a contagem das colônias, sendo necessário que houvesse entre  $50$  e  $250$  colônias por amostra para validar a quantidade de células testadas.

Para a leitura das placas de  $96$  poços utilizou-se o leitor de placas SpectraMax®i3 Platform (Molecular Devices), no mesmo comprimento de onda utilizado no espectrofotômetro,  $625$  nm para bactérias e  $530$  nm para leveduras. Antes da leitura, os poços das placas foram agitados com ponteiros e imediatamente após a agitação a leitura foi realizada. Ao analisar, foram descontados os valores dos poços da média dos valores do controle negativo (branco).

### Análise dos dados

A análise estatística para atividade antimicrobiana foi realizada usando o Jamovi (Version 2.3) Computer Software (2022). O Teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. As comparações das kombuchas convencional e orgânica nas diferentes concentrações testadas ( $500$ ,  $250$ ,  $125$ ,  $62,5$ ,  $31,25$ ,  $15,6$ ,  $7,8$ ,  $3,9$ ,  $2$  e  $1 \mu\text{L/mL}$ ) foram submetidos à análise de variância (Anova) e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias por meio do programa estatístico Bioestat versão 5.3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Formulação da bebida

Inicialmente realizou-se uma busca na literatura científica para estabelecer a formulação das bebidas. Essa formulação foi adaptada para que houvesse uma melhor aceitabilidade sensorial.

A fermentação das bebidas produzidas com ingredientes orgânicos e a convencional foram feitas em um frasco de vidro de  $3$  L. Na primeira formulação realizou-se a infusão de  $10$  g de chá verde de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze e  $2,2$  L de água, na temperatura de  $70^\circ\text{C}$ , com  $180$  g de sacarose pelo tempo de até  $15$  min. Após o resfriamento foram adicionados  $600$  mL da bebida já fermentada (*starter*) e o

*Scoby* para o substrato da fermentação 1 (F1). Na segunda formulação realizou-se a infusão de 22 g de chá verde de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze e 2,2 L de água, na temperatura de 70°C, com 110 g de sacarose pelo tempo de até 15 min. Após o resfriamento foram adicionados 220 mL da bebida já fermentada (*starter*) e o *Scoby* para o substrato da F1. Posteriormente os frascos de vidro foram cobertos com papel toalha descartável, e as soluções permaneceram em temperatura ambiente (25°C) fermentando por 7 dias. Para a carbonatação e melhoramento do sabor foi necessária uma segunda fermentação (F2). Para a F2 fez-se o uso de 750 mL de suco de uva e 2,2 L da F1 nas duas formulações, tanto para kombucha com ingredientes orgânicos quanto para a convencional. A bebida permaneceu fermentando em garrafas de vidro em temperatura ambiente (25 °C) por mais 3 dias. As análises foram realizadas ao final da segunda fermentação na bebida produzida com ingredientes orgânicos e na convencional.

### Parâmetros analíticos

Na Tabela 1 são encontrados os resultados obtidos da primeira e da segunda formulação ante ao pH, graduação alcoólica e acidez volátil. A kombucha produzida com ingredientes orgânicos (KO) e a convencional (KC) ficaram praticamente iguais em relação ao pH ( $p>0,05$ ) após fermentarem em temperatura ambiente (25°C) por 10 dias, nas duas formulações (Tabela 1). Ao final da fermentação, na primeira formulação a KO e a KC apresentaram os valores de pH 3,2 e 3,4, respectivamente, e na segunda formulação 3,1 e 3,2, nesta ordem. Esses valores estão dentro do padrão de identidade e de qualidade da kombucha, que varia de 2,5 a 4,2<sup>1</sup>.

Tabela 1 – Parâmetros analíticos, determinados pelo Mapa e os resultados da primeira e segunda formulação

Parâmetro	Padrão determinado pelo Mapa		1ª formulação		2ª formulação	
	Mín.	Máx.	KC	KO	KC	KO
pH	2,5	4,2	3,2*	3,4*	3,3*	3,4*
Acidez volátil (mEq/L)	30	130	11,4	14,5	26,5	35,4
Grad. alcoólica (% v/v) kombucha c/ álcool	0,6	8	1,9	1,8	1,3	2,3
Grad. alcoólica (% v/v) kombucha s/ álcool	-	0,5	-	-	-	-

Fonte: Os autores (2022), com base nos dados coletados na pesquisa. Média dos parâmetros analíticos da kombucha convencional (KC) e da Kombucha orgânica (KO) na primeira e na segunda formulação; \*  $p>0,05$ .

Durante a fermentação a acidez da bebida aumenta devido à produção de ácidos orgânicos, responsáveis pela diminuição do pH. Os alimentos ácidos (pH < 4,0) são microbiologicamente seguros, pois os microrganismos patogênicos dificilmente desenvolvem-se nessas condições. Por outro lado, valores abaixo de pH 2,5 apresentam alta concentração de ácido acético, representando risco à saúde dos consumidores<sup>12</sup>.

A KO demonstrou uma acidez maior em relação à acidez da KC nas duas formulações (Tabela 1). Essa acidez foi ainda maior na segunda formulação. Além disso, na primeira formulação a acidez ficou abaixo do padrão determinado na legislação<sup>1</sup> nas duas kombuchas. Já na segunda formulação a KO ficou dentro do esperado e a KC ficou próxima. Essa diferença de acidez entre as duas bebidas provavelmente está relacionada à quantidade de espécies de bactérias acéticas e lácticas produzidas durante a fermentação das duas kombuchas e à conseqüente variação na produção de ácidos orgânicos. Como as kombuchas avaliadas neste estudo diferem-se em relação aos ingredientes orgânicos e convencionais, possivelmente os resíduos de pesticidas presentes nos ingredientes convencionais podem estar interferindo nas propriedades físico-químicas da bebida convencional e, conseqüentemente, no produto final. Outros fatores, como a concentração de açúcar, tempo e temperatura do processo de fermentação<sup>7</sup>, bem como os microrganismos presentes no *Scoby*<sup>8</sup>, também alteram a produção de acidez nas kombuchas.

Em relação ao teor alcoólico, a KC reduziu de 1,9% v/v para 1,3% v/v, e a acidez volátil aumentou de 11,4 mEq/L para 26,5 mEq/L. Já na KO o teor alcoólico aumentou de 1,8% v/v para 2,3% v/v e a acidez volátil aumentou de 14,5 mEq/L para 35,4 mEq/L. A quantidade de açúcar estava reduzida na segunda formulação, e a KO não transformou o etanol em ácido acético no tempo esperado.

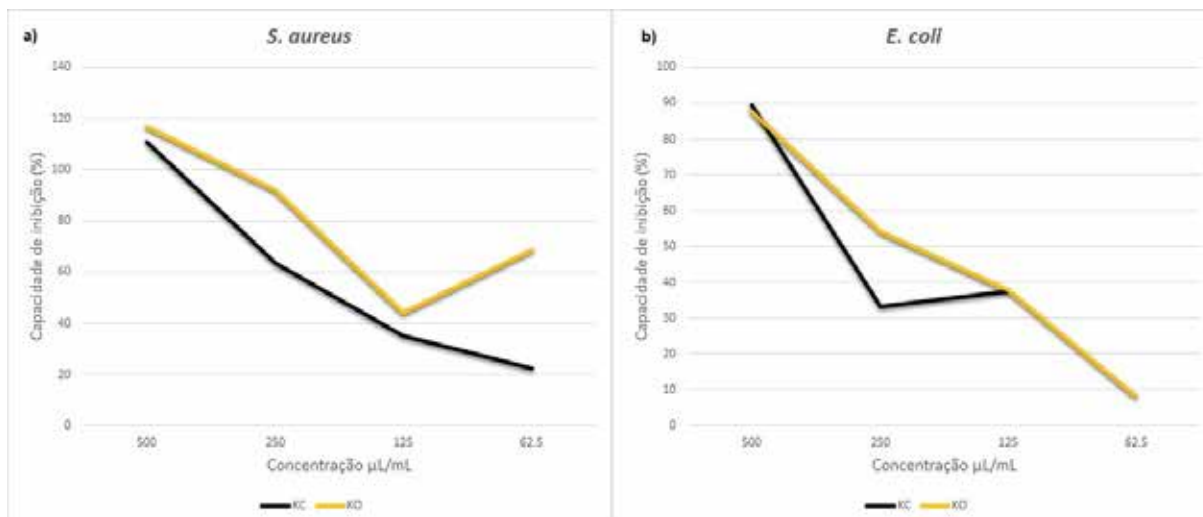
Isso ocorreu, provavelmente, em virtude da diminuição do volume da cultura *starter* adicionada na segunda formulação, na qual uma menor concentração de bactérias que realizam essa transformação por meio da fermentação acética estava presente. Isso também pode ser explicado pela produção de dióxido de carbono, principalmente na fermentação secundária que ocorre após o engarrafamento da bebida. Durante a fermentação da kombucha a sacarose é convertida em glicose e frutose para produzir etanol e dióxido de carbono. O acúmulo de dióxido de carbono inibe a conversão de etanol em ácido acético no caso de recipientes fechados<sup>23</sup>. É importante ressaltar, no entanto, que a oscilação destes compostos entre as duas bebidas possivelmente está associada ao tipo de substrato (orgânicos e convencionais) devido aos resíduos de pesticidas presentes na kombucha convencional, que podem estar eliminando parte dos microrganismos que realizam esse processo de fermentação alcoólica para acética.

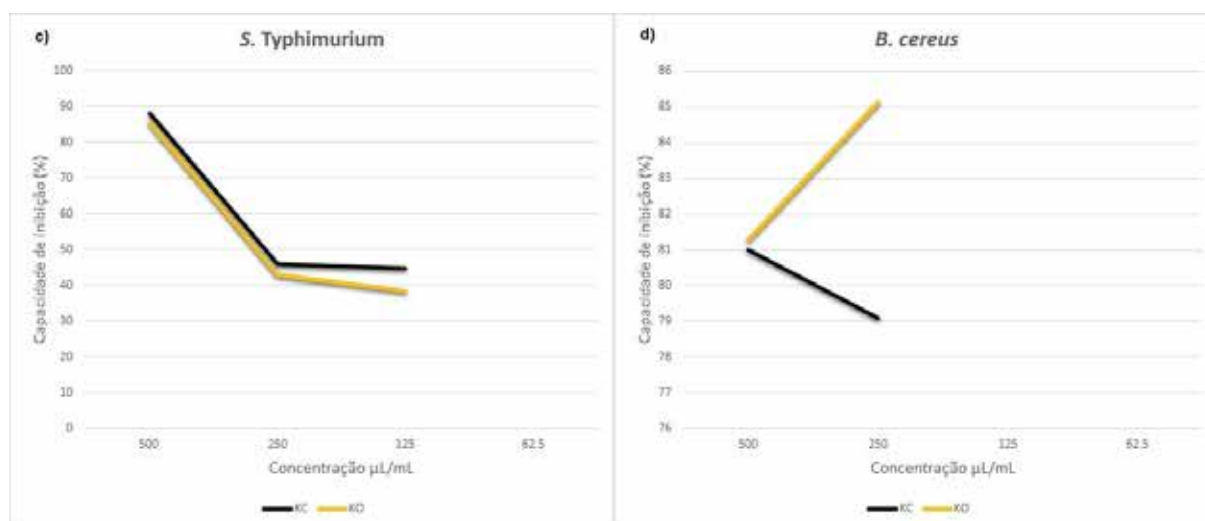
No estudo de Talebi *et al.*<sup>24</sup> (2017) os autores avaliaram o conteúdo de etanol em kombuchas comerciais fabricadas com diferentes substratos, inclusive uma com chá verde, nas quais foram realizadas análises nos dias 7, 14 e 21. O teor alcoólico encontrado nas 18 bebidas variou entre 1,12% e 2,00% (v/v), todos superiores ao limite legal estipulado no Brasil de 0,5% (v/v) para uma classificação como bebida não alcoólica. De acordo com Miranda *et al.*<sup>25</sup> (2022), o etanol tem sido foco de atenção nos resultados relatados na literatura científica. Muitas kombuchas têm apresentado teor de etanol acima de 0,5% (v/v), sendo consideradas bebidas alcoólicas.

### Atividade antimicrobiana

Todas as cepas bacterianas utilizadas nesta pesquisa, a partir de amostras filtradas da segunda formulação, demonstraram sensibilidade às duas kombuchas produzidas neste estudo (com ingredientes orgânicos e convencionais) (Gráfico 1). Ambas inibiram 100% de *Staphylococcus aureus*, e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi na maior concentração testada (500 µL/mL) (Gráfico 1a). Nesta mesma concentração as duas bebidas apresentaram capacidade de inibição superior a 80% ante as demais cepas bacterianas testadas (Gráficos 1b, 1c e 1d).

Gráfico 1 – Capacidade de inibição (expresso em %) das KC e KO ante as cepas bacterianas testadas e Concentração Inibitória Mínima (CIM)





Fonte: Os autores (2022), com base nos dados coletados na pesquisa. (a) Capacidade de inibição (%) das KC e KO e Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *S. aureus* ( $p < 0,05$  entre 500 e 62,5 µL/mL); (b) Capacidade de inibição (%) das KC e KO e Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *E. coli* ( $p < 0,05$  entre 500 e 62,5 µL/mL); (c) Capacidade de inibição (%) das KC e KO e Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *S. Typhimurium* ( $p < 0,05$ ); (d) Capacidade de inibição (%) das KC e KO e Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *B. cereus* ( $p < 0,05$  entre 500 e 62,5 µL/mL).

Este resultado assemelha-se a outros artigos científicos encontrados na literatura, como o de Cardoso *et al.*<sup>12</sup> (2020), no qual foram testadas *E. coli*, *Salmonella sp.* e *S. aureus* ante a kombucha produzida com chá verde e chá preto, fermentada por dez dias, mas sem adição de outra fonte de açúcar, e a CIM foi medida de acordo com o protocolo da CLSI (2017)<sup>20</sup> em microplacas de 96 poços. A kombucha produzida com chá verde apresentou CIM com 250 µL/mL para todas as bactérias testadas. O crescimento bacteriano neste estudo, porém, foi detectado visualmente pela ausência de turbidez. Mizuta *et al.*<sup>26</sup> (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana da kombucha preparada com chá verde em dois tempos de fermentação, com 7 e 14 dias, sem carbonatação, contra espécies do gênero *Alicyclobacillus*. A CIM foi determinada usando a técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços de acordo com o protocolo CLSI. Os autores relatam que a kombucha fermentada em diferentes tempos mostrou atividades inibitórias e bactericidas efetivas contra todas as espécies de *Alicyclobacillus* avaliadas e que a kombucha fermentada por mais tempo apresentou maior atividade antimicrobiana. Deghrigue *et al.*<sup>27</sup> (2013) avaliaram a atividade antibacteriana da kombucha com chá verde fermentado por 12 dias, sem adição de outra fonte de açúcar, mas pelo método de difusão em ágar. Eles também obtiveram menor CIM para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *S. aureus* em relação a essa pesquisa.

Ao comparar os efeitos das KO e KC sobre patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Gráfico 1), os resultados mostram que entre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* foi a mais suscetível. Entre, todavia, as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *S. Typhimurium* demonstraram a mesma suscetibilidade.

As amostras de KC e KO não apresentaram atividade antifúngica contra a levedura testada. A amostra de KC inibiu somente 9% a cepa *C. albicans* na maior concentração (500 µL/mL) e não teve nenhuma inibição para KO. Isso indica que a levedura testada não é sensível às kombuchas nesta formulação tanto para a bebida com ingredientes orgânicos quanto para os convencionais. Esse resultado corrobora o estudo de Silva *et al.*<sup>28</sup> (2021), que revelaram o mesmo para este microrganismo.

Utilizando-se a análise de variância (Anova – 1 critério) é possível constatar que as kombuchas convencional e orgânica, nas mesmas concentrações avaliadas, não se diferem em relação à porcentagem de inibição dos isolados testados ( $p > 0,05$ ). Diante da *S. Typhimurium*, no entanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações testadas, e ante a *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus* houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre as maiores e menores concentrações de inibição (entre 500 e 62,5 µL/mL).



Muitos estudos comprovam que a kombucha exerce atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos<sup>12,26</sup>. Isso ocorre devido aos compostos presentes nos substratos e aos metabólitos produzidos pelas bactérias e leveduras presentes no *SCOBY*, os quais inibem o crescimento de microrganismos com potencial patogenicidade<sup>24</sup>. Os compostos químicos presentes na kombucha são produzidos pelas bactérias e leveduras e têm origem no próprio substrato. A bebida pode ter sua estrutura modificada, transformando novos compostos durante a fermentação. A rota exata de biotransformação de todos os metabólitos identificados na kombucha e os microrganismos envolvidos precisam ser mais estudados<sup>25</sup>. Apesar disso, várias propriedades nutricionais e benefícios relacionados ao potencial bioativo da bebida já foram relatados<sup>13</sup>.

A partir deste estudo é possível constatar que as duas kombuchas nesta formulação apresentam atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e importante atividade inibitória ante as cepas *E. coli*, *S. Typhimurium* e *B. cereus*. Em contrapartida, as duas kombuchas apresentaram atividade antifúngica nula perante a levedura *C. albicans*.

### Potencial antibacteriano

A cepa *S. aureus* teve atividade bactericida na maior concentração testada e ainda teve atividade inibitória de 22% na KC e 69% na KO na concentração de 62,5 µL/mL (Gráfico 1a). As duas kombuchas também inibiram mais de 80% às demais cepas bacterianas na maior concentração testada. Na KO a cepa *E. coli* apresentou atividade inibitória até a concentração de 62,5 µL/mL, e na concentração de 125 µL/mL houve a mesma inibição de 37% tanto para KC quanto KO (Gráfico 1b). *S. Typhimurium* teve atividade inibitória em ambas até a concentração de 125 µL/mL, sendo 45% na KC e 39% na KO (Gráfico 1c). Da mesma forma para *B. cereus*, que teve inibição até a concentração 250 µL/mL, na qual a KC inibiu 79% e a KO 85% (Gráfico 1d).

Os resultados obtidos no presente trabalho divergem dos encontrados por Silva *et al.*<sup>28</sup> (2021), quando a CIM foi também determinada de acordo com o protocolo da CLSI (2017)<sup>20</sup> em microplacas de 96 poços, em kombucha produzida com chá verde, fermentada por 14 dias, mas sem carbonatação. Os autores relatam que a kombucha não teve inibição contra nenhuma das bactérias testadas (*E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*).

A diferença nos resultados da atividade antibacteriana da kombucha entre os estudos pode ser explicada pelo uso de diferentes métodos para estimar a CIM e por distintos parâmetros utilizados na produção da kombucha, como a concentração de açúcar, origem do *Scoby* e tempo de fermentação e temperatura. Isso pode modificar as concentrações dos principais compostos antibacterianos presentes na kombucha, como ácido acético e compostos fenólicos. Além disso, outros compostos biologicamente ativos, como proteínas, bacteriocinas e enzimas também podem contribuir para a atividade antimicrobiana da kombucha. Quaisquer alterações nas condições de produção, portanto, podem interferir na atividade biológica das bebidas<sup>14,11</sup>.

As duas kombuchas produzidas nesta pesquisa apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* na maior concentração testada. Nesta mesma concentração as KO e KC também foram ativas contra *E. coli*, *S. Typhimurium* e *B. cereus*, produzindo algum efeito bacteriostático e possivelmente bactericida. A respeito disso, ambas mostraram-se potenciais eficientes antibacterianos.

## CONCLUSÃO

Foi possível elaborar uma bebida fermentada dentro do padrão de identidade e qualidade da kombucha<sup>1</sup> para a bebida produzida com ingredientes orgânicos, mas não para a convencional. As duas kombuchas, porém, apresentaram teor alcoólico acima de 0,5 (% v/v), e não podem ser consideradas

bebidas funcionais ou terapêuticas. Assim, conclui-se que o tipo de ingredientes pode modificar as propriedades físico-químicas das bebidas.

As kombuchas produzidas com ingredientes orgânicos e convencionais, nas mesmas concentrações avaliadas, tiveram atividade inibitória muito semelhante para os microrganismos utilizados nesta pesquisa. As duas bebidas inibiram em mais de 80% todas as bactérias testadas em concentrações semelhantes. Ambas também apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, inibindo 100% a cepa na mesma concentração. O mesmo pode-se relatar para a levedura, a qual não apresentou atividade antifúngica, bem como inibição em nenhuma das duas bebidas. Assim, o tipo de ingredientes utilizados na produção da kombucha não interfere na propriedade antimicrobiana das mesmas.

Este é o primeiro trabalho que relata a diferença entre kombucha produzida com ingredientes orgânicos e convencionais com a mesma formulação e sob as mesmas condições de produção. Outro aspecto importante é que poucos estudos avaliam a kombucha saborizada, realizada por meio de duas fermentações. Esta pesquisa sobre a atividade antimicrobiana não obteve diferenças significativas entre as duas bebidas testadas. São necessários mais estudos sobre a atividade antimicrobiana de kombuchas, dentre eles estudos com outras formulações, incluindo a kombucha saborizada, e testá-los *in vivo* ante os microrganismos testados e perante mais bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos patogênicos, para identificar qual é o mecanismo de inibição executado.

Em busca de sustentabilidade e soluções saudáveis, é importante avaliar a atividade antimicrobiana de diversas substâncias naturais a fim de substituir os produtos químicos utilizados no mercado atual. Este estudo apresentou uma prospecção inicial, indicando possibilidades de uso de compostos com ação antimicrobiana mais naturais.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Brasília, Diário Oficial da União. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha.
- <sup>2</sup> Filippis F, Troise AD, Vitaglione P, Ercolini D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. Food Microbiology [Internet]. 2018 [citado 2022 Out. 13];73:11-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>
- <sup>3</sup> Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety [Internet]. 2014 [citado 2022 Nov. 2];13(2):538-550. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- <sup>4</sup> Júnior JC, Mafaldo IM, Brito IL, Cordeiro AM. Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. Current Research in Food Science [Internet]. 2022 [citado 2022 Out. 11];5:360-365. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>
- <sup>5</sup> Coelho RM, Almeida AL, Amaral RQ, Mota RN, Sousa PH. Kombucha: Review. International Journal of Gastronomy and Food Science [Internet]. 2020 [citado 2022 Out. 14];2020:100272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- <sup>6</sup> Santos MJ. Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. Lisboa. Tese [Mestrado] – Universidade NOVA de Lisboa; 2016. 119 p.
- <sup>7</sup> Tran T, Grandvalet C, Verdier F, Martin A, Alexandre H, Tourdot-Maréchal R. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety [Internet]. 2020 [citado 2022 Out. 30];19(4):2.050-2.070. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>
- <sup>8</sup> Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard J, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. Journal of Food Science [Internet]. 2018 [citado 2022 Out. 10];83(3):580-588. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

- <sup>9</sup> Laureys D, Britton SJ, Clippeleer J. Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [Internet]. 2020 [citado 2022 Out. 25];78(3),165-174. DOI: <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- <sup>10</sup> Butler MI, Mörkl S, Sandhu KV, Cryan JF, Dinan TG. The Gut Microbiome and Mental Health: What Should We Tell Our Patients? *O Jornal Canadense de Psiquiatria* [Internet]. 2019 [citado 2022 Out. 15];64(11):747-760. DOI: <https://doi.org/10.1177/0706743719874168>
- <sup>11</sup> Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard J, Renard T, Rollan S, Taillandier P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry* [Internet]. 2019 [citado 2022 Nov. 2];83:44-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>
- <sup>12</sup> Cardoso RR, Oliveira NR, Santos CT, Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L, Martino HS, Cameron LC, Ferreira MS, Barros FA. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* [Internet]. 2020 [citado 2022 Out. 28];2020:108.782. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- <sup>13</sup> Dutta H, Paul S. 8- Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. *Production and Management of Beverages*. 2019;259-288. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00008-0>
- <sup>14</sup> Jayabalan R, Waisundara VY. 12 – Kombucha as a Functional Beverage. *Functional and Medicinal Beverages*. 2019;413-446. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00012-1>
- <sup>15</sup> Shenashen MA, Emran MY, Sabagh AE, Selim MM, Elmarakbi A, El-Safty SA. Progress in sensory devices of pesticides, pathogens, coronavirus, and chemical additives and hazards in food assessment: Food safety concerns. *Progress in Materials Science* [Internet]. 2022 [citado 2022 Out. 25];2022:100866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2021.100866>
- <sup>16</sup> Mir SA, Dar BN, Mir MM, Sofi SA, Shah MA, Sidiq T, Sunooj KV, Hamdani AM, Khaneghah AM. Current strategies for the reduction of pesticide residues in food products. *Journal of Food Composition and Analysis* [Internet]. 2022 [citado 2022 Out. 24];2022:104.274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104274>
- <sup>17</sup> Ashaolu TJ, Ashaolu JO. Perspectives on the trends, challenges and benefits of green, smart and organic (GSO) foods. *International Journal of Gastronomy and Food Science* [Internet]. 2020 [citado 2022 Out. 12];2020:100273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100273>
- <sup>18</sup> Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005. Brasília, Diário Oficial da União. Manual Operacional de Bebidas e Vinagres.
- <sup>19</sup> Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), descrito no Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis (OIV-MA-AS312-01A:R2016). Disponível em: <https://www.oiv.int/public/medias/5158/oiv-ma-as312-01a.pdf>. Acesso em: 10 out. 2022.
- <sup>20</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th Edition, 2017. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>. Acesso em: 2 nov. 2021.
- <sup>21</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th Edition, 2018a. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- <sup>22</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition, 2018b. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/companion/m100-plus/>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- <sup>23</sup> Nummer BA. Special Report: Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. *Journal of Environmental Health* [Internet]. 2013 [citado 2022 Nov. 13];76(4):8-11. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/26329709>
- <sup>24</sup> Talebi M, Frink LA, Patil RA, Armstrong DW. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Analytical Methods* [Internet]. 2017 [citado 2022 Nov. 2];10(12):4.062-4.067. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0980-5>
- <sup>25</sup> Miranda JF, Ruiz LF, Silva CB, Uekane TM, Silva KA, Gonzalez AG, Fernandes FF, Lima AR. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science* [Internet]. 2022 [citado 2022 Nov. 13];87(2):503-527. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- <sup>26</sup> Mizuta AG, Menezes JL, Dutra TV, Ferreira TV, Castro JC, Silva CA, Pilau EJ, Junior MM, Abreu BA. Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. *LWT* [Internet]. 2020 [citado 2022 Nov. 16];2020:109.641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109641>

- <sup>27</sup> Deghrigue M, Chriaa J, Battikh H, Abid K, Bakhrouf A. Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. Afr. J. Microbiol. Res. [Internet]. 2013 [citado 2022 Nov. 1];7(27):3.466-3.470. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/C49B0D012007>
- <sup>28</sup> Silva KA, Uekane TM, Miranda JF, Ruiz LF, Motta JC, Silva CB, Pitangui NS, Alice Gonzalez GM, Fernandes FF, Lima AR. Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology [Internet]. 2021 [citado 2022 Out. 25];2021:102.032. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032>

Submetido em: 17/2/2023

Aceito em: 13/6/2023

**Contribuições dos autores:**

**Concepção e desenho do estudo:**

Luana Lermen Becchi

Mônica Jachetti Maciel

**Revisão de literatura:**

Luana Lermen Becchi

Lucas Lago Bergamaschi

**Aquisição de dados:**

Luana Lermen Becchi

Lucas Lago Bergamaschi

Mônica Jachetti Maciel

**Análise e interpretação de dados:**

Thais Müller

Daiane Heidrich

Guilherme Liberato da Silva

Mônica Jachetti Maciel

**Elaboração do manuscrito:**

Luana Lermen Becchi

Thais Müller

Lucas Lago Bergamaschi

Daiane Heidrich

Guilherme Liberato da Silva

Mônica Jachetti Maciel

**Revisão intelectual do manuscrito:**

Thais Müller

Daiane Heidrich

Guilherme Liberato da Silva

Mônica Jachetti Maciel

**Todos os autores aprovaram a versão final do texto.**

**Conflito de interesse: Não há conflito de interesse.**

**Autor correspondente:**

Thais Müller

Universidade do Vale do Taquari

Av. Avelino Talini, 171 – Universitário, Lajeado/RS, Brasil. CEP 95914-014

E-mail: [mthais@universo.univates.br](mailto:mthais@universo.univates.br)

**EDITORES**

Editor associado: Dr. Giuseppe Potrick Stefani

Editora-chefe: Dra. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz

Todo conteúdo da Revista Contexto & Saúde  
está sob Licença Creative Commons CC – By 4.0.