

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil:
características físico-químicas e composição microbiana**

TAÍS SUHRE

Porto Alegre, 2020

TAÍS SUHRE

**Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil:
características físico-químicas e composição microbiana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon
Coorientadora: Dr. Michele Bertoni Mann

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Suhre, Taís
Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil:
características físico-químicas e composição
microbiana / Taís Suhre. -- 2020.
64 f.
Orientador: Jeverson Frazzon.

Coorientadora: Michele Bertoni Mann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. KOMBUCHA. 2. FERMENTAÇÃO. 3. BEBIDA. 4. CHÁ VERDE.
5. CHÁ PRETO. I. Frazzon, Jeverson, orient.
II. Bertoni Mann, Michele, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Aos meus pais,
que nunca permitiram
faltar-me alimento,
fosse livro ou comida.*

AGRADECIMENTOS

A todos os seres microscópicos que vieram antes e aos que virão depois das minhas células fenecerem, deixo minha elevada estima. Foi o mistério da vida, em todas as suas formas, que me instigou a querer ser cientista. Da rede simbiótica que se formou no percurso destes dois anos, agradeço principalmente o espaço e incentivo concedidos pelo meu orientador Prof. Dr. Jeverson Frazzon e os ensinamentos da coorientadora Dra. Michele Mann. Pelo apoio e inspiração das colegas Alessandra Lira e Creciana Endrés. Aos dedicados bioinformatas Ícaro Castro e Juliana Severo. Aos parceiros do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Alinne Bernd, Paulo Celso e Arthur Rocha. Aos produtores de kombucha voluntários que doaram amostras, confiando em mim e na ciência. Aos amigos e familiares pelo afeto e paciência, especialmente à Mariana Rau pelas revisões e à Élin Godois pela ilustração. Aos mestres do ICTA que despertaram meu ímpeto pela docência. À banca pela disponibilidade do precioso tempo. À CAPES pelo auxílio financeiro. À UFRGS pelo ensino público gratuito e de qualidade. Deixo registrada aqui minha singela contribuição científica, com o desejo de que essas palavras permeiem as boas mentes e atuem como nutrientes para fermentar novas ideias.

*“Há algo na fermentação que transcende a ciência exata:
ela quer ser integrada ao ritmo da vida.”*
Aaron Vansintjan

RESUMO

A kombucha é uma bebida levemente adocicada e ácida produzida usualmente a partir da fermentação de chá preto ou verde adoçado, realizada por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). Recentemente, por conta de inúmeros benefícios relacionados à saúde relatados pela sabedoria popular e uma revolução alimentar direcionada a produção e aquisição de produtos artesanais, o consumo de kombucha tem se popularizado no Brasil. Nesse contexto, surgiu a preocupação de criar uma legislação específica para definir os padrões de identidade e qualidade da bebida (PIQ). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização físico-química e do microbioma de kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil. Foram analisadas amostras de seis diferentes marcas em três períodos de tempo de armazenagem, para representar as condições em que esse produto chega ao consumidor. As marcas de kombucha foram avaliadas quanto aos parâmetros de teor alcoólico, pH e acidez total titulável. Todas as amostras analisadas através de *Alcolyzer Beer* apresentaram teor alcoólico acima de 0,5%, sendo consideradas bebidas alcoólicas que precisam ser devidamente rotuladas. Além disso, os resultados obtidos na análise de pH e acidez total titulável sugerem que as kombuchas analisadas são seguras para o consumo de seres humanos saudáveis, de acordo com os critérios indicados pela literatura. Por outro lado, as bactérias e fungos presentes nas amostras de diferentes marcas foram identificadas através da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de alto rendimento (HTS), na plataforma *Illumina*, das regiões *16s rRNA* e espaçador interno transcrito (*ITS*). Os dados gerados resultaram em 117 seqüências variantes de amplicons (ASVs) bacterianas e 33 ASVs fúngicas, onde foram identificadas as espécies com maior abundância relativa nas amostras, como as bactérias *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus ruminis*, *Gluconacetobacter intermedius* e *Bacillus flexus* e os fungos *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala* e *Lachancea fermentati*. Assim, as informações obtidas neste trabalho auxiliaram em uma melhor compreensão acerca da composição dos produtos disponibilizados no mercado brasileiro e no desenvolvimento do PIQ da bebida no país.

Palavras-chave: Kombucha, bebida, legislação, fermentação alcoólica, chá verde, chá preto.

ABSTRACT

The kombucha is a slightly sweet and acidic drink normally produced through fermentation of black or green tea, carried out by a Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts (SCOBY). Recently, due to countless health-related benefits described by popular wisdom, and a food revolution orientated to production and acquisition of artisanal products, kombucha consumption has become popular in Brazil. In this context, the concern arose to create specific legislation to define the identity and quality standards for the beverage (SIQ or PIQ). Thus, the present study aimed to performed the physicochemical and microbiome characterization of kombucha produced and commercialized in Brazil. Samples from six different brands and storage in three periods were analyzed to reproduce the conditions in which this product reaches the consumer. The brands were evaluated for alcohol content, pH and total titratable acidity. All samples analyzed through *Alcolyzer Beer Analyzing System* had an alcohol content above 0.5%, thus considered alcoholic beverages that need to be correctly labeled. In addition, the results obtained in pH and total acidity analysis suggested that the kombuchas are safe for healthy human consumption, according to the criteria recommended by literature. On the other hand, bacteria and fungi present in the different brands were identified through polymerase chain reaction (PCR) and high-throughput sequencing (HTS) on the *Illumina* platform of the *16s rRNA* and *ITS* (Internal Transcribed Spacer) regions, respectively. The data generated included 117 bacterial ASV (amplicon sequence variant) and 33 fungal, identified as species with greater relative abundance in the samples, like bacteria *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus ruminis*, *Gluconacetobacter intermedius*, *Bacillus flexus* and the fungus *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala* and *Lachancea fermentati*. Thus, the information acquired in this work supported a better understanding about the composition of the products available in Brazilian market and in the development of the SIQ for the Brazilian kombuchas.

Keywords: Kombucha, beverage, legislation, fermentation alcoholic, black tea, green tea.

LISTA DE SÍMBOLOS

SCOBY – Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras
pH – Potencial Hidrogeniônico
g / L – Grama por Litro
ABV – Álcool por Volume
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PIQ – Padrão de Identidade e Qualidade
RNA – Ácido Ribonucleico
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
16s rRNA – RNA ribossomal 16S
ITS – Espaçador interno transcrito
HTS – sequenciamento de alto rendimento
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
KBI – *Kombucha Brewers Association*
ABKOM – Associação Brasileira de Produtores de Kombucha
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
CO₂ - Dióxido de Carbono
G – Força Centrífuga Relativa
LFDA – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
NaOH – Hidróxido de Sódio
NIR – Espectrômetro de Infravermelho Próximo
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
µL – Microlitro
mM – Milimolar
KCl – Cloreto de Potássio
HCl – Ácido clorídrico
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
kb – Quilobase
ASV – Sequências variantes de amplicons
CG – Cromatografia Gasosa

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E QUADROS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA bacteriano.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA fúngico.

Figura 1. Produção caseira de kombucha. Para a preparação da bebida são necessários chá, açúcar, (a) uma cultura starter SCOBY, (b) uma kombucha previamente fermentada, e (c) um recipiente fermentador. Na (d) água previamente fervida é realizada a (e) infusão do chá e (f) dissolução do açúcar. A solução é transferida para o (g) recipiente fermentador e coberta com um tecido poroso para permitir o contato com o oxigênio. Após 7-10 dias de fermentação em temperatura ambiente, o líquido pode ser transferido para uma (h) garrafa. Nesse estágio, uma nova fonte de açúcar pode ser adicionada para saborizar e carbonatar. Após a segunda fermentação, a bebida pode ser refrigerada e está pronta para o consumo. Fonte: a autora.

Figura 2. Avaliação da acidez total titulável de seis marcas de kombucha em três períodos de armazenamento (dias); T1 = 0; T2 = 30; e T3= 60.

Figura 3. Determinação do pH de seis marcas de kombucha em três períodos de armazenamento (dias); T1 = 0; T2 = 30; e T3= 60.

Figura 4. Diferenças no conteúdo alcoólico de seis marcas de kombucha em três períodos de armazenamento (dias); T1 = 0; T2 = 30; e T3= 60.

Figura 5. Abundância relativa de filos bacterianos predominantes em diferentes marcas de kombucha (K1 a K6).

Figura 6. Abundância relativa de gêneros bacterianos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Figura 7. Abundância relativa de espécies bacterianas predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Figura 8. Abundância relativa de filos fúngicos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Figura 9. Abundância relativa de gêneros fúngicos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Figura 10. Abundância relativa de espécies fúngicas predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Quadro 1. Parâmetros analíticos de kombucha exigidos pela legislação brasileira.

Quadro 2. Espécies bacterianas nas marcas de kombucha com abundância relativa < 1%.

Quadro 3. Espécies fúngicas nas marcas de kombucha com abundância relativa < 1%.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2.2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.2.2 A REVOLUÇÃO AZEDA.....	18
2.2.3 FERMENTAÇÃO E CIVILIZAÇÃO.....	19
2.3 FERMENTAÇÃO NATURAL.....	20
2.4 RÓTULOS LIMPOS.....	21
2.5 ALIMENTOS E BEBIDAS FUNCIONAIS.....	22
2.6 KOMBUCHA.....	23
2.6.1 História	23
2.6.2 Mercado	24
2.6.3 Legislação	25
2.6.4 Composição e modo de preparo	26
2.6.5 Processo fermentativo	27
2.6.6 Teor alcóolico	28
2.6.7 Microbiota	29
2.6.8 Benefícios	30
2.6.9 Segurança	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1.1 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE KOMBUCHA.....	33
3.1.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	33
3.1.3 Pré-processamento das amostras	33
3.1.4 Acidez total titulável	33
3.1.5 pH	34
3.1.6 Grau alcoólico	34
3.1.7 Análise estatística	34

3.1.8	ANÁLISE DO MICROBIOMA.....	34
3.1.9	Preparo das amostras.....	34
3.1.10	Extração e quantificação do DNA.....	35
3.1.11	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
3.1.11.1	Amplificação parcial do gene <i>16S rRNA</i>	35
3.1.11.2	Amplificação da região <i>ITS</i>	35
3.1.11.3	Análise do produto da PCR.....	36
3.1.12	Preparo da biblioteca e sequenciamento.....	36
3.1.13	Análises de bioinformática.....	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	38
4.1.2	Determinação da acidez total titulável.....	38
4.1.3	Avaliação do pH.....	39
4.1.4	Variação do grau alcoólico	40
4.2	ANÁLISE DO MICROBIOMA.....	42
4.2.1	Comunidade bacteriana.....	42
4.2.2	Comunidade fúngica.....	48
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
6.1	SITES.....	55
6.2	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	56
6.3	LIVROS.....	64
6.4	TESES E DISSERTAÇÕES.....	65
6.5	LEGISLAÇÃO.....	65

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, tem-se observado uma preocupação crescente em relação à origem dos alimentos. Além disso, a divulgação de diversos estudos relevantes sobre o impacto dos alimentos no meio ambiente e na saúde, tem estimulado as pessoas a repensarem suas fontes de consumo (HILL *et al.*, 2017; SCHMITT *et al.*, 2017; SELHUB *et al.*, 2014). Nesse contexto, foi observado um aumento na procura de produtos feitos em casa e/ou provenientes de pequenos produtores locais, conhecidos como produtos artesanais. Também há um progressivo interesse nos alimentos e bebidas ditos “funcionais”, que além de suprirem as funções nutricionais básicas, oferecem benefícios à saúde do indivíduo (KAUR & SINGH, 2017).

Da mesma forma, têm-se difundido a produção e o consumo da kombucha. Conhecida popularmente por seus atributos curativos e funcionais, a bebida pode ser facilmente produzida em casa. Levemente ácida e carbonatada, tem-se popularizado como uma alternativa aos refrigerantes. Embora sua produção e consumo seja milenar, a origem desta bebida ainda não foi totalmente elucidada. Porém, acredita-se que tenha surgido no continente asiático (DUFRESNE & FARNWORTH, 2000). Consiste, usualmente, no preparo do chá verde ou preto adoçado, fermentado através da adição de uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias (*SCOBY* – Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts), acomodadas em uma matriz de celulose. Pode ainda ser realizada uma segunda fermentação para carbonatar a kombucha, adicionando-se uma nova fonte de açúcar à bebida (SANTOS, 2016).

Essa tradicional bebida fermentada começou a ser comercializada e ganhou popularidade significativa nos Estados Unidos, nos últimos anos. De acordo com a *Kombucha Brewers International* (2018), o mercado gerado a partir da comercialização da bebida deve atingir US\$ 1,8 bilhão até 2020. No Brasil, gradualmente tem emergido o interesse no produto. Desse modo, por conta de uma rápida expansão no mercado brasileiro, a caracterização da composição da kombucha tornou-se uma preocupação, sobretudo para os consumidores de grupos de risco, como mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos, crianças e condutores de veículos. Ainda considerando a destreza do processo de produção da kombucha, torna-se indispensável conhecer detalhes da composição físico-química, visando evitar fraudes

em sua fabricação, como a adição de componentes que não fazem parte do processo tradicional de produção de kombucha ou não foram produzidos naturalmente através da fermentação.

Com a recente popularização, diversos trabalhos científicos têm investigado as propriedades antioxidantes e probióticas da kombucha. Porém, ainda há poucos estudos em humanos (ALLOULOU *et al.*, 2012; BHATTACHARYA *et al.* 2011; KOZYROVSKA *et al.*, 2012). Essas propriedades parecem ter relação com os polifenóis presentes no chá e com a microbiota da bebida. Nesse contexto, sabe-se que a composição microbiana é variada e pode ser influenciada por fatores como manipulação, temperatura, fonte de nutrientes e o ambiente. Assim, a caracterização da microbiota de kombuchas produzidas em diferentes locais vêm sendo realizada (MARSH *et al.*, 2014; REVA *et al.*, 2015; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COTON *et al.*, 2017; DE FILIPPIS *et al.*, 2018; ANKAN *et al.*, 2020). No entanto, até o momento, não existiam estudos caracterizando a microbiota de kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil.

Como esse mercado é bastante recente e inovador, a composição dos produtos não está completamente elucidada e frequentemente aparecem nas gôndolas produtos com novas composições. Quando tratamos acerca da segurança no consumo de um produto pouco conhecido, apesar da produção ocorrer em um ambiente de fermentação aberta, o pH ácido da kombucha parece impedir o crescimento da maioria dos microrganismos patogênicos (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Desta maneira, para garantir a segurança microbiológica da bebida, o pH após a fermentação não deve ultrapassar a medida de 4,2. Contudo, a manipulação inadequada e falta de higiene no processo ainda podem contribuir com uma eventual contaminação. Outro fator a se considerar é que, para a obtenção de uma bebida sensorialmente agradável e segura, a fermentação deve terminar quando a acidez total atingir o valor ideal de 4 a 5 g/L (VELICANSKI *et al.*, 2014).

Além disso, foi relatado que algumas kombuchas podem apresentar teores de álcool acima de 0,5% ABV (*Alcohol By Volume*) (EBERSOLE *et al.*, 2017). De acordo com a legislação brasileira, isso caracterizaria esses produtos como bebidas alcoólicas. Porém, verificando-se as embalagens de kombuchas disponíveis no mercado brasileiro, não foram encontradas informações nos rótulos quanto ao teor alcoólico dessas bebidas. Nesta circunstância, considerando a fermentação contínua, que pode ocorrer durante o transporte e armazenamento, um aumento no nível de etanol pode ser verificado no produto no momento da compra. Desse modo, é importante que os produtores sigam protocolos mínimos, como a mensuração da acidez total titulável e do pH, para assegurar a segurança e qualidade da bebida.

Por fim, até o momento da redação do projeto desta dissertação, não havia na legislação brasileira, regulamentação específica que tratasse da produção e comercialização da kombucha. Dessa forma, os estudos de caracterização físico-química desta bebida, realizados no presente trabalho, foram importantes contribuintes junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na construção do padrão de identidade e qualidade (PIQ) do produto em território nacional, resultando na Instrução Normativa nº 41/2019 (BRASIL, 2019). Além disso, este é o primeiro estudo caracterizando o microbioma de kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil. O sequenciamento de alto rendimento (HTS) do gene *16s rRNA* e da região *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*) permitiu caracterizar as comunidades bacterianas e fúngicas presentes nas seis marcas de kombucha, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização físico-química e do microbioma de seis marcas de kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Mensurar a concentração alcoólica, pH e acidez total titulável de amostras de três lotes pertencentes a seis marcas de kombucha;
- Comparar valores de grau alcoólico, pH e acidez total entre as marcas ao longo do tempo de armazenamento, com níveis seguros indicados pela literatura;
- Caracterizar a comunidade bacteriana e fúngica presente nas amostras de kombucha;
- Verificar a diversidade e abundância relativa microbiana das amostras de kombucha;
- Disponibilizar informações que auxiliem o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento na construção no PIQ (Padrão de Identidade e Qualidade) de kombucha no Brasil.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A REVOLUÇÃO AZEDA

O ser humano é aquilo que bebe e come. Do ponto de vista sociológico, as escolhas alimentares refletem um modo de ver e interagir com o mundo (LUPTON, 1996). Do ponto de vista biológico, é conhecido que os microrganismos ingeridos através de alimentos fermentados podem até modular o comportamento humano (BORRE *et al.*, 2014; BLASER, 2014; MOLONEY *et al.*, 2014; ERCOLINI & FOGLIANO, 2018;). Além disso, estima-se que existam mais células microbianas do que células próprias no corpo humano (SENDER *et al.*, 2016) e a energia produzida através da digestão dos nutrientes ingeridos, com o auxílio desses microrganismos, é utilizada para todas as funções vitais básicas.

Paralelamente, quando a alimentação é analisada em um contexto macro, compreende-se que comer e beber vêm se tornando cada vez mais atos políticos. Crises no sistema alimentar têm estimulado partidos e movimentos sociais à diversas ações (WARDE, 2016). Enquanto isso, há um crescente reconhecimento de que os próprios valores que sustentam os arranjos contemporâneos de fornecimento de alimentos necessitam de uma revisão crítica (GAZOLLA & SCHNEIDER, 2017).

Diante disso, diversos movimentos fomentaram padrões alternativos de produção e consumo e tomaram força no mundo inteiro (DUELL, 2013). Como por exemplo, o *Slow Food*, criado pelo jornalista italiano Carlo Petrini, na década de 80, que prioriza estruturas corporativas colaborativas (SLOW FOOD INTERNATIONAL, 2018). Esses movimentos surgem com o propósito de diminuir os impactos negativos do atual modelo agroalimentar na sociedade, baseado na maximização da eficiência econômica e da produtividade.

Nesse âmbito, tais ações visam modificar a relação dos produtores e dos consumidores com os alimentos, trazendo uma visão mais humanizada. Também são estimuladas ações de “comércio justo” e há o desejo progressivo na descoberta da origem do que é consumido. Em um novo cenário de interação mais profundo, consumidores e produtores trabalham para construir relacionamentos alimentares novos e práticas eticamente significativas, em uma rede de coprodução (GAZOLLA & SCHNEIDER, 2017).

Dessa forma, o alimento passa a ser mais que uma simples mercadoria, visto que sua produção e consumo estão fortemente relacionados a questões sociais, culturais, históricas, políticas, institucionais e de âmbito pessoal (KNEAFSEY et al., 2008; TENCATI & ZSOLNAI, 2012). Assim, todo o contexto apresentado reflete na aquisição de bens a partir de pequenos produtores locais e na produção artesanal dos próprios alimentos e bebidas (RYTKÖNEN *et al.*, 2018). Dentro desse contexto, difunde-se o resgate de tradições dos antepassados, que utilizavam como forma de conservação e aprimoramento sensorial e nutricional dos alimentos, a fermentação natural. Além disso, essas manifestações visam enaltecer o prazer conectado com a experiência de comer e beber, que está relacionada a fatores complexos e multissensoriais (POLLAN, 2008).

Através dessa visão, quando optam por consumir de forma mais consciente, buscando opções alimentares mais saudáveis e “sustentáveis”, os indivíduos sentem-se parte de uma grande revolução (GAZOLLA & SCHNEIDER, 2017). Por exemplo, quando consomem produtos locais ou produzem em casa algumas de suas bebidas e alimentos fermentados, como a cerveja, o pão, o vinho e a kombucha.

3.2 FERMENTAÇÃO E CIVILIZAÇÃO

Atualmente, compreendemos que o interesse da espécie humana pelo sabor azedo não é recente. Esse sabor que integra a roda sensorial de nossos chucrutes, *kefirs*, cervejas *sour*, pães *sourdough* e kombuchas remete à história de antepassados (KATZ, 2013). No Japão, o *nukadoko*, um farelo de arroz fermentado, é transferido entre gerações e cada um desenvolve seus próprios sabores especiais, os quais possuem microbiotas únicas, capazes de sobreviver apenas através do trabalho diário de avós, mães e filhas (VANSINTJAN, 2019). Do mesmo modo, em diferentes partes do mundo, amigos e vizinhos cultivam e compartilham seus “filhotes” de *levain*, *kefir* e *SCOBY's*, estas culturas simbióticas de bactérias e leveduras produtoras de pães, queijos e kombuchas, respectivamente (KOZYROVSKA *et al.*, 2012).

Porém, para além de gerações antepassadas recentes, os alimentos e bebidas fermentados acompanham desde o início da civilização, mesmo antes de se compreender que os microrganismos eram os responsáveis pela fermentação, tendo um papel importante nas sociedades emergentes. As bebidas fermentadas forneciam não apenas nutrição, mas eram basicamente as únicas fontes de líquidos limpos, não contaminados e, portanto, de valor medicinal (WALTHER *et al.*, 2014). No passado, o processo de transformar matérias-primas em alimentos nutritivos e saborosos era considerado algo divino e mágico (MONEY, 2017).

Posteriormente, mesmo com os avanços das pesquisas científicas, o protagonismo do processo fermentativo ainda não era atribuído aos microrganismos. Até o século XVIII, esse fenômeno era explicado como uma reação espontânea, da qual microrganismos eram meros subprodutos (SCHLENK, 1985).

Foi somente a partir dos estudos de médico e microbiologista Louis Pasteur, em 1861, no famoso experimento do pescoço de cisne, que a teoria da geração espontânea finalmente foi refutada e que as pessoas começaram a acreditar que não era possível que a vida surgisse do nada (MANCHESTER, 1995). Porém, embora o sabor dos produtos fermentados naturalmente fosse por vezes azedo, diversas melhorias na vida dos seres humanos foram surgindo a partir dessa descoberta.

Com base nos estudos de Louis Pasteur e de Emil Christian Hansen, que surgiram a partir de investigações para curar “doenças em bebidas”, os pilares do que mais tarde seria considerada uma das áreas mais importantes nas ciências da saúde, a bioquímica (SCHLENK, 1985). A investigação dos mecanismos celulares e moleculares da levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, o fungo responsável pela produção de diversos alimentos e bebidas amplamente consumidos, auxiliou na compreensão do funcionamento das células humanas, as unidades básicas da vida (SHERMAN, 2002).

Desse modo, enxergar essa parcela da linha do tempo da história da civilização e compreender como a fermentação está integrada à sociedade, serve para ligar todos os indivíduos ao seu passado e presente (BELASCO, 2008) e identificar o quão essencial é continuarmos dedicando esforços aos estudos sobre alimentos e bebidas fermentados (LUPTON, 1996).

3.3 FERMENTAÇÃO NATURAL

A fermentação é uma transformação da matéria devido ao trabalho cooperativo de diversos seres vivos (HEY & KETCHUM, 2018). No contexto da fermentação mista, o processo não é realizado por uma única cepa isolada. O ser humano prepara uma rica fonte de carboidratos e outros nutrientes e disponibiliza para que microrganismos, como bactérias e leveduras, capturem a energia necessária para continuar vivendo e em troca, produzam alimentos e bebidas mais digeríveis, menos tóxicos e com aroma, aparência e sabor diferenciado (CLEARLY, 2019).

Nas fermentações naturais, também conhecidas como espontâneas ou selvagens, o processo ocorre em ambientes abertos (KATZ, 2013). A partir do efeito *cabtree*, determinadas espécies

de leveduras metabolizam carboidratos e produzem etanol, garantindo uma vantagem competitiva para esses microrganismos no meio. Por sua vez, bactérias e algumas leveduras presentes convertem o etanol em ácido acético, produzindo o sabor e aroma azedo. Os microrganismos também irão produzir ácidos orgânicos e outros metabólitos a partir da degradação dos carboidratos presentes (VILELA, 2019).

Assim, cada alimento ou bebida fermentado naturalmente será único - tem o seu *terroir* (CAPOZZI *et al*, 2015). Embora, atualmente, há a possibilidade de utilizar culturas isoladas puras de bactérias e leveduras e controlar a produção de componentes indesejáveis através do monitoramento de alguns parâmetros físico-químicos, na fermentação natural, outros fatores, como a matéria-prima e o ambiente são influenciadores das características organolépticas, que estão além do controle (MONEY, 2017). Isso reflete na dificuldade de padronizar esses produtos.

Desse modo, pensar em fermentação natural significa contabilizar múltiplas espécies e múltiplos sentidos. Esse fenômeno amplia as reflexões dos estudos sobre alimentos, contextualizando as conexões mais do que humanas que estão envolvidas nos processos dos alimentos (HEY & KETCHUM, 2018). Caso o produto biotecnológico resultante não for submetido a processo térmico ou químico de estabilização microbiológica, considera-se que se trata de algo “vivo”. Além disso, dada a sua íntima associação com a podridão, os microrganismos e a fermentação podem até mesmo ajudar a transformar a forma como vida e morte são compreendidas (CLEARLY, 2019).

3.4 RÓTULOS LIMPOS

A fim de compreender as origens alimentares, o interesse dos consumidores em obter mais informações sobre os alimentos e bebidas, aumentou consideravelmente a partir dos anos 1980 e desde então tem-se expandido. Na era das redes sociais, os consumidores, que antes reuniam-se às mesas para suas refeições, tem se aproximado dos alimentos de outra forma. O renascimento dos livros de receitas e dietas autointituladas saudáveis têm proliferado na *internet* (KNEAFSEY, 2008). Apesar disso, os mesmos consumidores são frequentemente acusados pela perda de suas habilidades culinárias e do conhecimento sobre as origens alimentares. Como efeito da globalização, a comida tornou-se abundante, padronizada e muitas vezes barata (WARDE, 2016).

Nesse contexto, como consequência de grandes mudanças econômicas, sociais e tecnológicas, o estilo de vida de muitos consumidores tem sido caracterizado por uma dieta

rica em calorias, com menor consumo de fibras e marcada pelo sedentarismo (POLLAN, 2008). Esse cenário favoreceu a disseminação de várias doenças relacionadas à nutrição, como doenças cardiovasculares e digestivas. Tais doenças têm elevado a preocupação da população em modificar seus hábitos alimentares (WATERS *et al.*, 2013).

Porém se, por um lado, os avanços da ciência e tecnologia trouxeram um maior entendimento sobre as doenças relacionadas à alimentação, por outro, os consumidores se questionam sobre até que ponto os cientistas, processadores, varejistas e governos são confiáveis para contar a história sobre os alimentos (KNEAFEY *et al.*, 2008). Não só existem dúvidas sobre o que está na comida, mas também sobre o que está faltando a partir dela.

E esse cenário, aliado a escândalos constantes de adulterações de alimentos em indústrias, criou uma espécie de fobia quanto a ciência e a tecnologia de alimentos. Onde, muitas vezes, os consumidores optam por boicotar grandes empresas. Do mesmo modo, guiados pelas mídias sociais e/ou pela sabedoria popular, escolhem consumir produtos de origem natural e artesanal. Em resposta a esses comportamentos, os produtores de alimentos têm buscado alternativas para diminuir o uso de ingredientes artificiais e fornecer produtos com embalagens mais “transparentes”, ou seja, a tendência dos “*clean labels*”: rótulos mais simples, com menos formulações complexas, porém, com informações mais detalhadas sobre o produto, o modo de produção e o produtor (ASIOLI *et al.*, 2017).

3.5 ALIMENTOS E BEBIDAS FUNCIONAIS

O uso de suplementos herbáceos e dietéticos é difundido e crescente devido à noção popular de que estes produtos são de origem natural e seguros. Dentro do mercado de produtos com ingredientes “naturais”, há um crescente interesse em pesquisas e no consumo de alimentos e bebidas funcionais. Além de apresentar a função básica relacionada à nutrição, esses produtos também são conhecidos por trazer um ou mais benefícios à saúde comprovados cientificamente (KAUR & SINGH, 2017).

Mediante o exposto, as bebidas, em particular, são mais vantajosas quando comparadas aos alimentos, devido à conveniência e possibilidade de atender às demandas dos consumidores. As vantagens estão relacionadas ao conteúdo, tamanho, forma e aparência dos recipientes, facilidade de distribuição e armazenamento. Ademais, também são mais simples para incorporar nutrientes e compostos bioativos desejáveis (CORBO *et al.*, 2014).

Analisando esse mercado, existem muitas oportunidades potenciais para fabricantes, varejistas e fornecedores no segmento de bebidas funcionais e probióticas, principalmente para

produtos não lácteos. É possível explorar esse mercado mantendo o foco em necessidades específicas de diferentes públicos. Como por exemplo, indivíduos vegetarianos, veganos, com preferência por pouca gordura, baixas calorias, e com reação adversa a alguns alimentos, como intolerância alimentar, má absorção e alergias (ZANNINI *et al.*, 2012).

Nesse contexto, para ser considerado um bom produto, a bebida funcional deve estar disponível localmente, a um preço acessível e ser versátil o suficiente para ser consumida nas mais variadas refeições. Além disso, ainda deve ser segura e atraente para todas as categorias de idade (WATERS *et al.*, 2015).

A kombucha é um desses suplementos consumidos por muitas pessoas que acreditam que a bebida possa trazer diversos benefícios (GEDELA *et al.*, 2016), como por exemplo, desempenhar função probiótica. Por sua vez, os probióticos são definidos como alimentos ou bebidas que contêm microrganismos vivos. Eles são capazes de melhorar ativamente a saúde, através do equilíbrio da microflora intestinal (SHAH, 2007). Porém, devido a variação da microbiota dos produtos, os benefícios probióticos relacionados a kombucha ainda necessitam ser elucidados.

3.6 KOMBUCHA

3.6.1 História

A origem da kombucha é incerta e geralmente é atribuída à China. Durante a dinastia Qin, em 200 AEC, a primeira kombucha teria sido criada para o imperador Qin Shi Huangdi, que acreditava ter encontrado o chá da imortalidade (YOUNG, 2019). No entanto, o nome é associado a existência do Dr. Kombu, que teria levado a bebida produzida a base de chá, da Coreia para o Japão em 414 EC, para curar problemas digestivos do imperador japonês Inyoko (PETRUZELLO, 2017). A bebida tornou-se popular entre os samurais, que a bebiam para aumentar sua força e energia antes de uma batalha (YOUNG, 2019).

Mais tarde, o suposto elixir foi introduzido em países europeus, pelos exploradores portugueses e holandeses, como uma erva medicinal (DUFRESNE & FARNWORTH, 2000). Posteriormente, espalhou-se pelo Extremo Oriente, Pacífico, Índia, Rússia, Alemanha e, eventualmente, para o resto da Europa e África. Mais recentemente, a kombucha foi difundida em todo o mundo, como um popular remédio para diversas doenças (OFORI *et al.*, 2015).

Durante a Primeira Guerra Mundial, o cientista alemão Dr. Rudolf Sklenar, testemunhou camponeses russos usando kombucha para auxiliar soldados feridos. Retornando para a

Alemanha, teria usado a bebida no tratamento de pacientes com câncer. Por outro lado, durante a Segunda Guerra Mundial, como consequência do racionamento de chá e açúcar, os principais insumos para a produção de kombucha, a tendência da utilização da bebida diminuiu. Na década de 1960, a kombucha voltou ao mercado, quando os *hippies* experimentavam remédios naturais. O retorno de sua utilização também ocorreu, quando após o desastre de Chernobyl em 1986, descobriu-se um grupo de consumidores frequentes de kombucha que sofria menos com os efeitos da radiação (YOUNG, 2019).

Nos Estados Unidos, a kombucha ganhou popularidade durante a epidemia de HIV no final dos anos 80, pois acreditava-se que a bebida pudesse fortalecer o sistema imunológico comprometido (PETRUZELLO, 2017). Contudo, a popularidade da kombucha diminuiu após um estudo de caso publicado, em 1995, que vinculava o produto a dois casos de acidose metabólica grave, um dos quais foi fatal (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995). Ressurgindo no início do século XXI nos EUA, e tornando-se popular também em países como o Canadá e Austrália, e mais recentemente no Brasil, com o retorno do uso de produtos naturais e das crescentes pesquisas na área de alimentos e bebidas funcionais (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018).

3.6.2 Mercado

De acordo com a *Kombucha Brewers International* (KBI,2018), associação comercial sem fins lucrativos comprometida com a promoção e proteção comercial da kombucha no mundo todo, esse é um dos produtos com maior crescimento no setor de bebidas. Nos últimos anos, a comercialização de kombuchas impactou em mais de US\$ 600 milhões, em 2015, com uma projeção de US \$ 1,8 bilhões até 2020. Nos Estados Unidos são mais de 5 mil empregos gerados diretamente pela indústria da kombucha e centenas de marcas regionais produzem e distribuem a bebida localmente.

No Brasil, o mercado que é bastante novo. Em 2018 foi fundada a Associação Brasileira de Kombucha (ABKOM) que já conta com aproximadamente 49 produtores. Um dos objetivos da iniciativa foi regulamentar a bebida, para que todas as marcas sigam um padrão de qualidade. Segundo dados da associação, estima-se que o mercado brasileiro movimentava atualmente cerca de R\$ 11 milhões de faturamento com produção de 500 mil litros mensais (ABKOM, 2020). Além disso, em 2019 foi realizado o primeiro Concurso Brasileiro de Kombucha, com o objetivo de estimular os produtores comerciais em monitorar a qualidade de seus produtos (FAROFA MAGAZINE, 2019).

3.6.3 Legislação

Como o consumo de kombucha tem ganhado popularidade em todo o mundo, muitas pessoas já estão produzindo artesanalmente com pouco ou praticamente nenhum tipo de controle das características físico-químicas e microbiológicas. Além disso, os microrganismos encontrados na kombucha, até o presente momento, não se encontram na lista de probióticos da ANVISA. E, até o momento da redação do projeto, a bebida não se enquadrava em nenhuma categoria alimentícia da RDC nº 12/2001, que estabelece os padrões de controle microbiológico de diversos alimentos (ANVISA, 2018).

Assim, devido ao grande interesse em ampliar o processo de fermentação para atender às demandas da indústria de alimentos, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou para consulta pública, em junho de 2018, as normas que pretendiam estabelecer os padrões de identidade e qualidade das kombuchas produzidas e comercializadas no País (MAPA, 2018). O resultado foi a Instrução Normativa nº 41/2019 (BRASIL, 2019), publicada no Diário Oficial da União em setembro de 2019. Dessa forma, o Brasil se tornou o primeiro país do mundo a possuir uma legislação específica referente a kombucha, exigindo dos fabricantes os parâmetros exibidos no Quadro 1. Além da exigência da declaração do teor alcoólico no rótulo dos produtos (se contiver álcool acima de 0,5% v/v), fica proibido o uso de expressões que atribuam características de qualidades superlativas e propriedades funcionais. A legislação também autoriza o uso de processos tecnológicos adequados para a produção da kombucha, como pasteurização, filtração e ultracentrifugação e veda a adição de microrganismos após o processo de fermentação.

Quadro 1. Parâmetros analíticos de kombucha exigidos pela legislação brasileira.

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

3.6.4 Composição e modo de preparo

A kombucha é uma bebida obtida da fermentação de chá verde ou preto (*Camellia sinensis*) adoçado. No entanto, outros substratos já foram explorados como alternativa para sua produção, como echinacea, segurelha-de-inverno e água de coco (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Para o preparo são necessários uma cultura iniciadora *SCOBY* (Figura 1a), aproximadamente 5 g de chá, 5 – 20 % de sacarose, 10% de uma kombucha previamente fermentada (Figura 1b) que servirá para acidificar o meio e impedir o crescimento de microrganismos patogênicos (JAYABALAN *et al.*, 2014; VINA *et al.*, 2013) e um recipiente fermentador (Figura 1c).

Na água previamente fervida (Figura 1d), ocorre a infusão do chá (Figura 1e) e dissolução do açúcar (Figura 1f). Após o resfriamento até aproximadamente 20 °C, a solução é transferida para o recipiente fermentador (Figura 1g), coberto com um material que permite o contato com o oxigênio (LEAL *et al.*, 2017). A fermentação é realizada, em temperatura ambiente, a partir da cultura iniciadora, conhecida como *SCOBY* (MAY *et al.*, 2019). O *SCOBY* pode ser adquirido a partir de uma fermentação anterior ou comprado. Após essa fermentação, que leva em torno de 7 a 10 dias, o produto resultante pode ser refrigerado e consumido (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Pode, ainda, ser realizada uma segunda fermentação para carbonatar a kombucha, adicionando-se uma fonte de açúcar (sumo, fruta ou sacarose) à bebida já fermentada (Figura 1h). Esta mistura deverá ser armazenada em um recipiente fechado e deixada à temperatura ambiente até a carbonatação desejada (SANTOS, 2016). Após, pode ser refrigerada e consumida. Desse modo, a kombucha pode ser facilmente preparada em casa ou adquirida comercialmente (MARTINI, 2018).

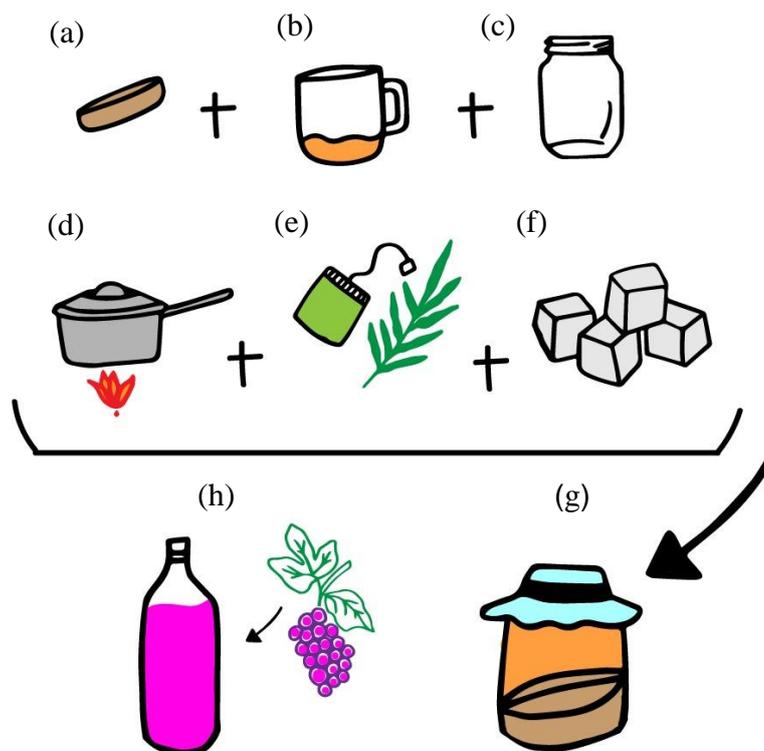


Figura 1. Produção caseira de kombucha. Para a preparação da bebida são necessários chá, açúcar, (a) uma cultura starter SCOBY, (b) uma kombucha previamente fermentada, e (c) um recipiente fermentador. Na (d) água previamente fervida é realizada a (e) infusão do chá e (f) dissolução do açúcar. A solução é transferida para o (g) recipiente fermentador e coberta com um tecido poroso para permitir o contato com o oxigênio. Após 7-10 dias de fermentação em temperatura ambiente, o líquido pode ser transferido para uma (h) garrafa. Nesse estágio, uma nova fonte de açúcar pode ser adicionada para saborizar e carbonatar. Após a segunda fermentação, a bebida pode ser refrigerada e está pronta para o consumo. Fonte: a autora.

3.6.5 Processo fermentativo

A fermentação da kombucha ocorre de forma natural. Em condições aeróbicas, durante um período que pode variar de 3 a 60 dias, enzimas invertase produzidas por algumas leveduras, clivam a sacarose em glicose e frutose. As leveduras, por sua vez, convertem a glicose em etanol e dióxido de carbono. O dióxido de carbono reage com a água formando ácido carbônico (PRIMIANI *et al.*, 2018). Bactérias e algumas leveduras oxidam parte do etanol, produzindo ácido acético. Além disso, enquanto uma quantidade substancial de frutose permanece não fermentada, ácido glucônico é produzido através da oxidação da glicose (MAY *et al.*, 2019).

Assim, durante a fermentação da kombucha, o pH do chá que inicialmente é em torno de 5 diminui, por conta do aumento da concentração de ácido acético e outros ácidos orgânicos

(NUMMER, 2013; AMARASINGHE, 2018). O pH também está ligado ao crescimento bacteriano, impedindo o desenvolvimento da maioria dos microrganismos patogênicos (HUR *et al.*, 2014; VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Na kombucha esse valor não deve ficar abaixo de 3, que é o pH do trato digestivo (LONCAR *et al.*, 2006).

Além do ácido acético e glucônico, diversos outros metabólitos podem ser produzidos durante a fermentação da kombucha, como ácido lático, tartárico e cítrico que contribuem para o sabor azedo característico da bebida e o ácido glicurônico, principal composto relacionado a atividade funcional da bebida. No entanto, a composição metabólica pode variar dependendo da composição microbiana do *SCOBY* (NGUYEN *et al.*, 2015). Adicionalmente, diversos outros fatores podem influenciar na composição e concentração dos metabólitos produzidos durante a fermentação, como a concentração de açúcar e chá (WATAWANA *et al.*, 2015), temperatura de fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2008), quantidade de oxigênio, CO₂ dissolvido, fornecimento de precursores e taxa de cisalhamento do fermentador (MARSH *et al.*, 2014).

O resultado do processo é uma bebida levemente gaseificada, azeda e refrescante, composta por diversos ácidos, aminoácidos, vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas (WATAWANA *et al.*, 2015; VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Embora, tenha sido relatado um aumento na atividade antioxidante com um maior tempo de incubação, a fermentação prolongada não é recomendada devido ao acúmulo de ácidos orgânicos que podem atingir níveis prejudiciais para o consumo humano (CHU & CHEN, 2006).

A seleção do tempo da duração da fermentação também influencia nos atributos sensoriais do produto final. Um período de fermentação entre 6 a 10 dias dará origem a uma bebida refrescante e frutada, enquanto que fermentações mais prolongadas resultam em uma bebida com sabor de vinagre (DUFRESNE, 2000). Assim, para obter uma bebida sensorialmente agradável, a fermentação deve terminar quando a acidez total atingir o valor ideal de 4 a 5 g/L (VELICANSKI *et al.*, 2014).

3.6.6 Teor alcóolico

De acordo com o paradoxo francês, o consumo moderado de álcool tem um efeito protetor contra doenças cardíacas coronárias, aumentando a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (FERRIÈRES, 2004). Sendo assim, pode-se sugerir que o consumo diário de etanol em baixas concentrações, como na kombucha, poderia ter um papel na prevenção dessas doenças (LEAL *et al.*, 2017). Porém, existem poucos estudos abordando a

determinação do teor de álcool em kombuchas e relacionando-o com o efeito protetor (TALEBI *et al.*, 2017).

Em alguns produtos engarrafados já foram encontrados valores superiores a 0,5% ABV (álcool por volume) de álcool. De acordo com a legislação dos EUA, esses valores enquadrariam essas bebidas como alcoólicas, obrigando os produtores a cumprir os regulamentos de rotulagem adequados (NUMMER, 2016). Além desse, outro estudo utilizou a metodologia de cromatografia gasosa com *headspace* para determinação do teor alcoólico de marcas comerciais de kombucha e analisou a influência do tempo e temperatura de armazenamento no aumento do teor alcoólico dessas amostras (TALEBI *et al.* 2017). Todas as amostras analisadas nesse estudo também tiveram o teor alcoólico acima do limite americano federal de 0,5% ABV.

Observa-se ainda que a refrigeração da bebida reduz proporcionalmente a produção de álcool, quando comparado às amostras armazenadas durante o mesmo período de tempo em temperatura ambiente (22°C). Essa constatação indica que é possível que a alta concentração de açúcar e levedura ativa em kombuchas possa levar a uma fermentação contínua, aumentando a concentração de etanol, enquanto os produtos ficam nas prateleiras. Ademais, o aumento do teor de etanol pode estar associado à hidrólise de ésteres etílicos na mistura (TALEBI *et al.*, 2017).

3.6.7 Microbiota

Inicialmente, a fermentação ocorre a partir de microrganismos osmotolerantes e depois é dominada por espécies tolerantes ao ácido. Devido à coexistência de diversas espécies de microrganismos no meio, na kombucha há uma combinação de três tipos de fermentação: alcoólica, láctica e acética (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Foi relatado que a composição microbiana do *SCOBY* pode variar entre as fermentações, de acordo com sua origem, clima, localização geográfica e meio utilizado para o processo de fermentação (WATAWANA *et al.*, 2015; COTON *et al.*, 2017). Apesar disso, há um certo número de espécies que aparece frequentemente na maioria das culturas de kombucha. Um amplo espectro de gêneros de leveduras já foi reportado, como *Zygosaccharomyces* spp, *Candida* spp, *Kloeckera* spp, *Hanseniaspora* spp, *Torulaspora* spp, *Pichia* spp, *Brettanomyces* spp, *Dekkera* spp, *Saccharomyces* spp, *Lachancea* spp, *Saccharomycoides* spp, *Schizosaccharomyces* spp e *Kluyveromyces* spp (COTON *et al.*, 2017; MARSH *et al.*, 2014).

Quanto à composição bacteriana, os gêneros dominantes encontrados na kombucha são as bactérias do ácido acético. Espécies como *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* já foram descritas. Além de cepas do gênero *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp e *Bifidobacterium* spp (JAYABALAN *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2016). Muitos desses microrganismos têm papéis bem estabelecidos na fermentação da kombucha. No entanto, como a composição da microbiota pode variar, muitas espécies e suas interações ainda não estão bem caracterizadas. Do ponto de vista da composição microbiana, a kombucha parece fornecer uma ampla fonte de bactérias probióticas e leveduras, porém mais pesquisas ainda precisam ser realizadas para apoiar esse e outros benefícios relatados pelos consumidores e comprovar os reais benefícios que a kombucha pode trazer para o organismo de seres humanos (NGUYEN *et al.*, 2015; MATEI, 2018).

O processo de fermentação leva à formação de um novo biofilme celulósico flutuante na superfície do meio devido à atividade de algumas cepas de bactérias (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). O desenvolvimento do biofilme continuará até a síntese atingir seu limite, crescimento até aprisionar todas as bactérias, que então se tornarão inativas devido ausência de oxigênio (ESA *et al.*, 2014). Dessa forma, as bactérias que permanecerem na fase líquida do meio de cultura estarão em um estado dormente e poderão ser reativadas e usadas como inóculo em uma nova fermentação (RUKA *et al.*, 2012). O material formado possui alta cristalinidade, resistência à tração, maleabilidade e pureza, o que o torna interessante para diversas aplicações biotecnológicas nas áreas médica e de alimentos (KUO *et al.*, 2015; CAMPANO *et al.*, 2016).

3.6.8 Benefícios

Apesar das campanhas de marketing alegarem diversas propriedades funcionais da kombucha como desintoxicação, atividade antioxidante, e anticarcinogênica, ainda há pouca informação sobre a caracterização de seus componentes bioativos, sua evolução durante a fermentação e suas propriedades farmacológicas (COTON *et al.*, 2017). Embora a maioria dos ensaios biológicos no chá de kombucha terem sido realizados *in vitro*, alguns estudos *in vivo*, conduzidos em ratos, mostraram resultados interessantes (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Além disso, considerando que a kombucha é uma bebida produzida a partir da fermentação de chá preto ou verde, estudos prévios têm demonstrado que os polifenóis presentes no chá possuem grande potencial de proteção contra o desenvolvimento de diversos

tipos de câncer, inibindo enzimas e interrompendo processos associados ao crescimento de células cancerosas (LEAL *et al.*, 2017).

O chá verde também parece auxiliar na desintoxicação do fígado de xenobióticos. O processo de desintoxicação necessita do tripeptídeo glutatona, um antioxidante que atua conjugado com enzimas glutatona-S-transferases. Essas enzimas são super expressas devido aos polifenóis presentes no chá verde (GONZÁLEZ, 2003; LEAL *et al.*, 2017).

Do ponto de vista da composição microbiana, relata-se popularmente que a kombucha fornece uma ampla fonte de bactérias e leveduras probióticas. Além disso, fornece componentes prebióticos que auxiliam na nutrição e crescimento desses microrganismos úteis para o trato digestivo (KORYROVSKA *et al.*, 2012). Porém, mais pesquisas ainda precisam ser realizadas, para apoiar esses e outros benefícios relatados pelos consumidores e comprovar os reais benefícios que a bebida pode trazer para o organismo de seres humanos (NGUYEN *et al.*, 2015; MATEI, 2018).

3.6.9 Segurança

Como relatado anteriormente, a produção de etanol e ácido acético previne o crescimento de bactérias patogênicas na kombucha (DUFRENSE & FARNWORTH, 2000). Contudo, é extremamente importante usar utensílios higienizados e trabalhar em áreas limpas para a produção da bebida, a fim de ter controle sobre o crescimento de microrganismos e prevenir a contaminação indesejada (WATAWANA *et al.*, 2015; SADIADI, 1998). *Bacillus anthracis* já foi reportado como contaminante no chá de kombucha fermentado em condições anti-higiênicas, reforçando a importância da implementação de medidas de higiene e biossegurança na produção (SADIADI, 1998).

Apesar das propriedades curativas ou benéficas amplamente relatadas pela sabedoria popular, alguns casos de toxicidade já foram relacionados à kombucha. Alguns indivíduos relataram tontura e náusea após consumirem kombuchas e dois casos de “doença grave inexplicável” também foram reportados (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995).

Além disso, efeitos colaterais como reações alérgicas, icterícia, náuseas, vômitos, dor de cabeça e pescoço foram relatados em quatro pacientes que consumiam kombucha regularmente (SRINIVASAN *et al.*, 1997). Como os casos de toxicidade foram isolados e incluindo poucos indivíduos, não há evidências substanciais para confirmar a toxicidade pelo consumo de kombucha (JAYABALAN *et al.*, 2014).

No que se refere a concentração de minerais, traços de chumbo (0,005 µg / mL) foram detectados em amostras de kombucha. De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), níveis de chumbo acima de 0,2 µg / mL são tóxicos para adultos e 0,1 µg / mL para crianças. Nesse contexto, apesar dos níveis desse mineral encontrados não apresentarem um risco potencial para a saúde, é aconselhável que as crianças, que são mais suscetíveis ao envenenamento através da exposição crônica, evitem o consumo da bebida regularmente (LEAL *et al.*, 2018).

Na literatura, foi reportado um caso de insuficiência renal aguda com acidose láctica e hipertermia, em um adulto soropositivo após a ingestão de kombucha (SUNGHEE KOLE *et al.*, 2009). Portanto, é importante controlar os níveis de pH durante a fermentação da kombucha, e de preferência parar esse processo quando um nível de pH de 4,2 é alcançado. A superprodução de ácido pode não ser segura para o consumo e pode gerar características sensoriais desagradáveis (KOVACEVIC *et al.*, 2014). Outros métodos de segurança alimentar incluem a pasteurização do produto, para evitar o excesso de produção de álcool e dióxido de carbono, a adição de 0,1% de benzoato de sódio e 0,1% de sorbato de potássio como conservante de alimentos, ou ainda, o armazenamento e transporte da bebida sob refrigeração (WATAWANA *et al.*, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE KOMBUCHA

Amostras de kombucha provenientes de seis diferentes marcas produzidas e comercializadas no Brasil foram analisadas a partir de suas embalagens originais. Cada lote das marcas analisadas continha três garrafas, e cada garrafa do lote foi armazenada durante um período de tempo diferente, totalizando cinquenta e quatro amostras. As amostras foram gentilmente cedidas pelos fabricantes e transportadas até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (ICTA/UFRGS), onde foram mantidas sob refrigeração (4° C) até o preparo para as análises. Para preservar a identidade dos fabricantes, as marcas foram identificadas como K1, K2, K3, K4, K5 e K6.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Pré-processamento das amostras

Amostras foram analisadas em três tempos de armazenamento do produto: imediatamente ao receber o produto (T= 1) 30 dias (T=2) e 60 dias (T=3) após fabricação, mantidos sob refrigeração durante esse período. Com isso, foi representado um tempo total de validade de 60 dias. As garrafas foram abertas cuidadosamente e o líquido foi dispensado em tubos *Falcon* estéreis. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos, a 5000G e 4° C. Após, o sobrenadante coletado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em ultrafreezer (-80 °C) até a realização das análises físico-químicas no Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos (LFDA-RS/MAPA). Para a realização dessas análises, as kombuchas foram descongeladas e descarbonatadas em banho ultrassônico durante 60 minutos.

4.2.2 Acidez total titulável

A determinação da acidez total titulável das amostras de kombucha foi realizada de acordo com metodologia descrita pelo MAPA (BRASIL, 2003). Uma alíquota de 10 mL de kombucha foi titulada com NaOH (0,1 N) e o ponto final foi determinado pelo ponto de viragem da fenolftaleína (pH 8,2). A acidez total titulável foi expressa como g de ácido acético por 100 mL de amostra.

4.2.3 pH

A determinação do pH das amostras de kombucha foi realizada através de leitura em potenciômetro digital, de acordo com metodologia descrita pelo MAPA (BRASIL, 2003)

4.2.4 Grau alcoólico

A determinação do grau alcoólico de três lotes de cada marca foi realizada em duplicata, através de densímetro eletrônico acoplado a espectrofotômetro NIR (*Near Infra-red*) Anton Paar DMA 4500M *Alcolyzer ME*, pelo método *Alcolyzer Beer*, para bebidas de baixo grau alcoólico, com tolerância de até 0,3%. Os resultados do grau alcoólico foram expressos em porcentagem de etanol.

4.2.5 Análise estatística

Cada experimento foi conduzido para as seis marcas, três lotes e três períodos de armazenamento, sendo os dados relatados como Média \pm Desvio Padrão. Comparações entre médias dos diferentes períodos de armazenamento foram realizadas e a significância foi avaliada por um fator de análise de variância (ANOVA) utilizando Microsoft Excel (2013). Valor de significância de $p < 0,05$ foi utilizado como critério para diferenças significativas.

4.3 ANÁLISE DO MICROBIOMA

4.3.1 Preparo das amostras

As amostras de kombucha foram retiradas da refrigeração, homogeneizadas e 50 mL de cada amostra foram centrifugados a 4000 rpm por 40 minutos. Os sobrenadantes foram

descartados e os pellets formados foram agrupados em *pools* por marca e submetidos à extração de DNA total.

4.3.2 Extração e quantificação do DNA

Para caracterização bacteriana, o DNA total foi extraído utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Hilden, Germany). Enquanto que, para a caracterização fúngica, DNA total foi extraído utilizando o *E.Z.N.A.® Stool DNA Kit* (Omega Bio-tek). O DNAs extraídos foram quantificados através de fluorímetro *Qubit® 3.0* (INVITROGEN, Califórnia, EUA), e utilizados para a amplificação parcial do gene *16S rRNA* e da região ITS por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.3.1 Amplificação parcial do gene *16S rRNA*

O domínio V4 do gene *16S rRNA* foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1, acrescidos de uma região adaptadora do *Illumina*, como descrito por CAPORASO *et al.* (2010):

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA bacteriano

Primer	TA (° C)	Tamanho (pb)	Sequência (5'-3')
515 (F)	55	350	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
806 (R)	55	350	GGGACTACHVGGGTWTCTAAT

A reação de amplificação do DNA foi realizada em um volume de 50 µL contendo 1X *Buffer*, 1mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, 2U *Platinum Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN, Califórnia, EUA) e 12,5 ng de DNA total. A reação foi realizada no termociclador (modelo 170-9703, *MyCycler Thermal Cycler*, *Bio-Rad*) com desnaturação inicial por 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 30 segundos a 72 °C, extensão final de 5 minutos a 72 °C.

4.3.3.2 Amplificação da região ITS

A sequência da região intergênica ITS (ITS1-ITS2) foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 2, determinados a partir do trabalho de WHITE *et al.* (1990), ambos contendo uma região adaptadora do *Illumina*.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA fúngico

Primer	TA (° C)	Tamanho (pb)	Sequência (5'-3')
ITS1 (F)	56	340	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2 (R)	56	340	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

A reação de amplificação foi realizada em um volume de 50 µL contendo 1X *Buffer*, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,16 µM de cada *primer*, 1U *Platinum Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN, Califórnia, EUA) e 12,5 ng de DNA total. A reação foi conduzida no termociclador (modelo 170-9703, *MyCycler Thermal Cycler*, *Bio-Rad*) nas seguintes condições: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 56 °C e 1 minuto a 72° C, e extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4.3.3.3 Análise do produto da PCR

Os produtos da amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio. Os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta e o tamanho estimado em comparação ao marcador de peso molecular 1 kb (PROMEGA, Wisconsin, EUA).

4.3.4 Preparo da biblioteca e sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados utilizando *Agencourt AMPure XP beads* (BECKMAN COUTER, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram utilizados na confecção das bibliotecas, as quais foram quantificadas usando *Qubit*® 3.0 (INVITROGEN, Califórnia, EUA). O sequenciamento foi realizado no equipamento *Illumina MiSeq*™ com o kit de reagentes *MiSeq v2*, 500 ciclos.

4.3.5 Análises de bioinformática

Os amplicons *16s rRNA* e *ITS* foram analisados utilizando *QIIME 2* versão 2019.7 (BOLYEN *et al.*, 2018). Dados brutos das sequências foram filtrados baseados na qualidade, remoção de ruídos e quimeras utilizando o plugin *q2-dada2* e o pipeline *DADA2* (CALLAHAN *et al.*, 2016). Para sequências *16S rRNA*, as *reads* com erros esperados acima de 2 foram descartadas, e uma filtragem por comprimento de *reads* também foi aplicada. As *reads* foram arranjadas, em primeira instância, a partir de um índice de qualidade menor ou igual a 2. As *reads* resultantes foram truncadas no comprimento de 240 pb. A remoção de quimeras foi realizada a partir do método de consenso. As variantes de sequências dos amplicons (ASVs) obtidas por *DADA2* foram alinhadas com *MAFFT*, a partir do *q2-alignment* (KATOH *et al.*, 2002) e utilizadas para construir a filogenia com *fasttree2*, a partir do *q2-phylogeny* (PRICE *et al.*, 2010). A taxonomia foi atribuída as ASVs utilizando o classificador *q2-feature-classifier* (BOKULICH *et al.*, 2018). O classificador foi treinado usando sequências de referência extraídas do banco de dados *Greengenes* (DE SANTIS *et al.*, 2006) com 99% de similaridade das regiões *16S rRNA* (V4). Para sequências da região *ITS*, as *reads* foram truncadas com base em um índice de qualidade menor ou igual a 10. A remoção de quimeras também foi realizada a partir do método de consenso. As *reads* resultantes foram truncadas no comprimento de 210 pb. O corte nas sequências direta e reversa foi baseado no gráfico de qualidade *QIIME 2* gerado usando *q2-demux-resume* (RAI *et al.*, 2019). Para sequências *ITS* (ITS1-ITS2), o classificador de taxonomia *Naïve Bayes* foi treinado usando sequências de referência extraídas do banco de dados *UNITE* (ABARENKOV *et al.*, 2010). Os gráficos de barras de taxonomia foram obtidos por *q2-taxa-barplot* para visualização dos níveis de taxonomia por amostra (KEHRMANN *et al.*, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.1 Determinação da acidez total titulável

Resultados da acidez total titulável das amostras de kombucha estão expressos em g de ácido acético por mL de amostra (Figura 2). Alterações dos resultados ao longo do tempo não são estatisticamente significativas. Desvios padrões indicam a variação das medidas entre os lotes.

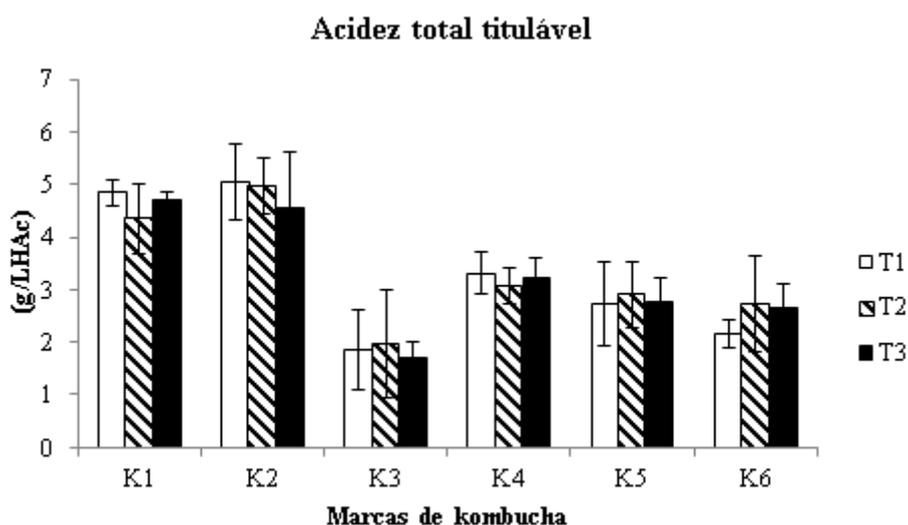


Figura 2. Avaliação da acidez total titulável de seis marcas de kombucha (K1 a K6) a partir de três períodos de armazenamento (dias). T1 = 0; T = 30; e T3 = 60.

Durante a fermentação da kombucha, o pH do chá, que inicialmente é em torno de 5, diminui devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos produzidos durante o processo (NUMMER, 2013; AMARASINGHE, 2018). Grande parte dos benefícios à saúde associados à kombucha fazem referência à presença destes componentes na bebida. No entanto, a presença de ácido acético pode estimular a produção de etanol pelas leveduras (CHEN & LIU, 2010). A concentração e composição dos diferentes ácidos orgânicos, especialmente a proporção de ácido acético para ácido glucônico, é determinante no sabor e aroma dos produtos. Enquanto o

ácido acético produzirá uma bebida com sabor mais ácida e adstringente, o sabor produzido pelo ácido glucônico é suave (CHEN & LIU, 2010). Dessa forma, para obter uma bebida sensorialmente agradável a fermentação deve terminar quando a acidez total atingir o valor ideal de 4 a 5 g/L (VELICANSKI *et al.*, 2014).

Os resultados sugerem que todos os produtos analisados foram obtidos através do processo de fermentação e que há presença de ácidos orgânicos em níveis adequados. A ampla variação dos valores de acidez total (1,2 – 5,82 g/L) entre as amostras analisadas sugere alta sensibilidade na padronização no processo de fabricação, bem como diferenças nas características organolépticas dos produtos. Na kombucha, os ácidos orgânicos são geralmente obtidos através do processo fermentativo, realizado pela simbiose de bactérias e leveduras. Como a composição da comunidade microbiana e outros parâmetros da fermentação podem variar, isso pode refletir em uma variação dos valores de acidez total. Além disso, os resultados da mensuração de acidez total titulável podem ser influenciados pela adição de componentes na fermentação secundária, como frutas e especiarias, que também possuem a matriz bastante variável. No caso das amostras analisadas nesse trabalho, K2 e K6 tiveram adição de uva na segunda fermentação, enquanto as amostras das marcas K1, K3, K4 e K5 não foram saborizadas pelos fabricantes.

5.1.2 Avaliação do pH

Os resultados da avaliação do pH das amostras de kombucha são mostrados na Figura 3. Todos os valores de pH encontrados, que possuem variação mínima de 2,5 e máxima de 3,5, indicam que as amostras analisadas podem ser consideradas seguras do ponto de vista microbiológico. Valores de pH abaixo de 4,2 indicam a produção de ácidos, os quais interrompem e inibem a proliferação da maioria dos microrganismos patogênicos. Além disso, o pH das kombuchas analisadas não ultrapassou o limite inferior de 2, ideal para evitar problemas dentários e gastrointestinais nos consumidores e garantir uma bebida sensorialmente agradável (NUMMER, 2013).

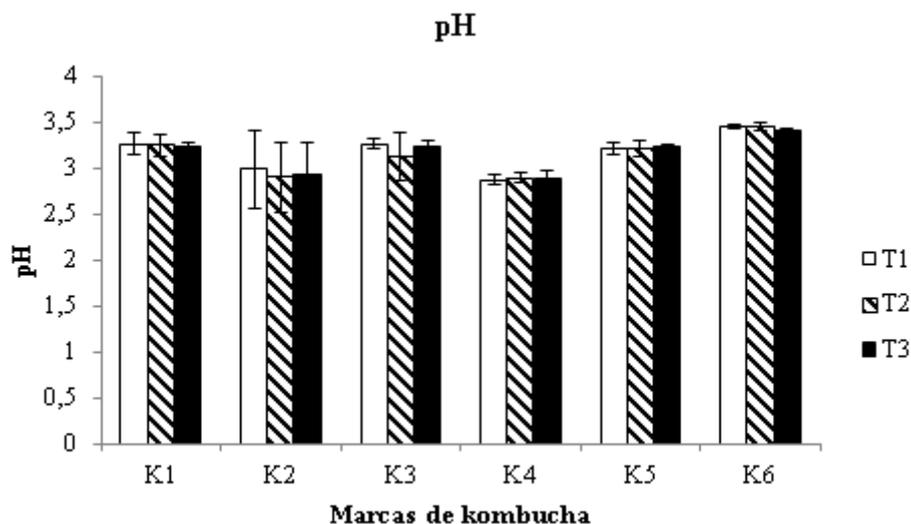


Figura 3. Determinação do pH de seis marcas de kombucha (K1 a K6) em três períodos de armazenamento (dias); T1 = 0; T2 = 30; e T3= 60.

É importante ressaltar que embora alimentos e bebidas acidificados sejam geralmente considerados seguros, falhas no processo e matérias-primas contaminadas podem resultar em surtos de intoxicação alimentar. Por isso, a verificação do pH é fundamental para garantir a segurança dessas bebidas, determinar o final da fermentação e garantir que este processo ocorreu corretamente (NEFFE-SKOCINSKA *et al.*, 2017). Por fim, apesar da ampla variação encontrada para a acidez total titulável, não houve uma variação significativa dos valores de pH encontrados. Esse resultado pode estar associado a um possível efeito tampão, proveniente dos ácidos orgânicos fracos e seus sais (NEFFE-SKOCINSKA *et al.*, 2017).

5.1.3 Variação do grau alcoólico

Os resultados da determinação do grau alcoólico das amostras de diferentes marcas de kombucha e alterações nos valores ao longo do tempo são mostrados na Figura. 4.

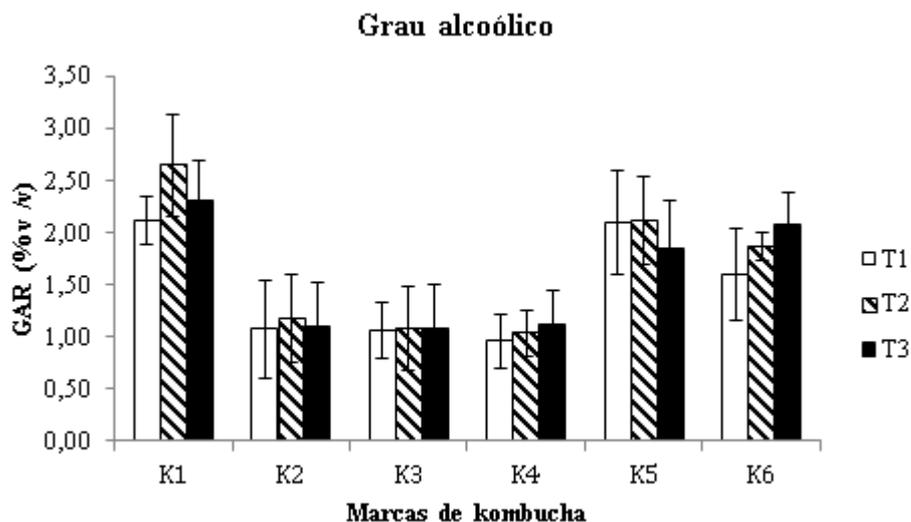


Figura 4. Diferenças no conteúdo alcoólico de seis marcas de kombucha (K1 a K6) em três períodos de armazenamento (dias). T1 = 0; T2 = 30; e T3 = 60.

A faixa de etanol verificada neste estudo mostrou uma variação de 0,58 – 3,02 % (v/v), excedendo assim o limite regulamentar do Brasil de 0,5 % (v/v) para bebidas não alcoólicas e indicando a necessidade de rotulagem adequada. No Brasil, as kombuchas são conhecidas como chás, sucos ou “refrigerantes naturais” e não possuem indicação do teor alcoólico no rótulo, como encontrado em todas as amostras analisadas neste estudo. De maneira semelhante, valores de etanol na faixa de 1,12- 2,00% (v / v) foram encontrados em um estudo envolvendo 18 kombuchas comercialmente disponíveis no mercado dos *EUA* (TALEBI *et al.*, 2017).

Na produção de kombucha, assim como em todos os alimentos e bebidas fermentados, também ocorre a formação de etanol. Porém, como a produção da bebida ocorre em um ambiente com presença de oxigênio, a maior parte do etanol é oxidado por bactérias em ácido acético (MAY *et al.*, 2019). O etanol produzido durante a fermentação possui várias funções importantes, como a atividade antimicrobiana, atuando como solvente para nutrientes extras, e como um meio para facilitar a absorção de nutrientes para o consumidor (KOMBUCHA BREWERS INTERNATIONAL, 2019).

A concentração de etanol determinada nas diferentes marcas de kombucha diferiu devido a diferentes procedimentos de fabricação incluindo a concentração do chá e do açúcar, insumos utilizados na saborização, parâmetros da fermentação e composição microbiológica do *SCOBY* (REVA *et al.*, 2015; TALEBI *et al.*, 2017). Além disso, as condições de armazenamento também podem influenciar na evolução do grau alcoólico do produto engarrafado (TALEBI *et al.*, 2017). Conforme indicado na Figura 4, a concentração de etanol

durante o intervalo de tempo analisado (60 dias) não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Esse resultado indica que a produção de etanol na fermentação secundária da kombucha parece estabilizar sob armazenamento refrigerado (4° C).

O aumento do teor de etanol das kombuchas engarrafadas, relatado na literatura, pode estar associado à alta concentração de açúcar e levedura ativa nas bebidas, bem como à hidrólise de ésteres etílicos na mistura (TALEBI *et al.*, 2017). No mercado internacional, as kombuchas rotuladas com teor alcoólico acima de 4%, têm sido frequentemente denominadas de “*hard kombucha*” e as leis para o que é rotulado como bebida alcoólica variam de acordo com o país.

Uma vez que, como a população de microrganismos ativa e as condições de fermentação e armazenamento de kombuchas produzidas em escala industrial podem variar muito, métodos analíticos rápidos devem ser utilizados para analisar o teor alcoólico dessas bebidas, favorecendo assim o controle do seu consumo por consumidores com restrição alcoólica. Em relação à metodologia utilizada para examinar o teor alcóolico, a AlcoLyzer, empregado nesse estudo, pode ser considerado uma tecnologia adequada, acessível e com menores tempos de medição, com resultados compatíveis aos obtidos por Cromatografia Gasosa (CG) (PAAR, 2018). Além disso, este é um equipamento usualmente utilizado nas rotinas de fiscalização de bebidas alcoólicas realizadas pelo MAPA.

5.2 ANÁLISE DO MICROBIOMA

5.2.1 Comunidade bacteriana

A partir do sequenciamento do gene *16S rRNA* foram obtidas 62137 sequências, as quais foram agrupadas em 117 ASVs. A classificação taxonômica resultou em 9 filos, 17 classes, 29 ordens, 51 famílias, 61 gêneros e 43 espécies. Para cada nível taxonômico, a composição da comunidade amostral foi calculada e foram considerados microrganismos com abundância relativa $\geq 1,0\%$.

A abundância relativa dos filos bacterianos nas seis marcas de kombucha analisadas é mostrada na Figura 5. O filo Firmicutes foi predominante nas marcas K1 (98,02%), K2 (74,52%), K3 (85,64%), K4 (96,96%) e K6 (93,59%). Na amostra K5, Proteobacteria foi o filo predominante (94,72%). Além de Firmicutes e Proteobacteria outras ASVs com abundâncias relativas $< 1\%$ foram identificadas, representando os filos Bacteroidetes, Cyanobacteria, Tenericutes, Actinobacteria, Thermi, Verrucomicrobia e Nitrospirae.

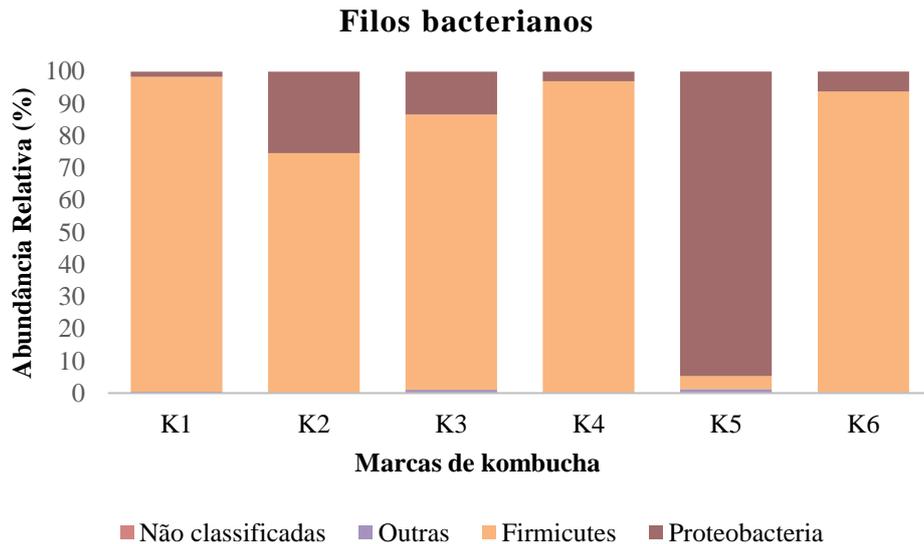


Figura 5. Abundância relativa de filos bacterianos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Em relação a taxonomia a nível de gênero, *Bacillus* spp, *Paenibacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Oenococcus* spp, *Acetobacter* spp, *Gluconacetobacter* spp, *Gluconobacter* spp e *Enterobacter* spp apresentaram abundâncias relativas $\geq 1,0\%$ (Figura 6). Bactérias do gênero *Lactobacillus* spp foram predominantes nas marcas K2 (63,01%), K4 (84,12%) e K6 (92,35%). Enquanto que *Oenococcus* spp foi o gênero predominante nas marcas K1 (97,97%) e K3 (75,44%). Na marca K5 a maior abundância relativa (73,92%) foi representada por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* spp

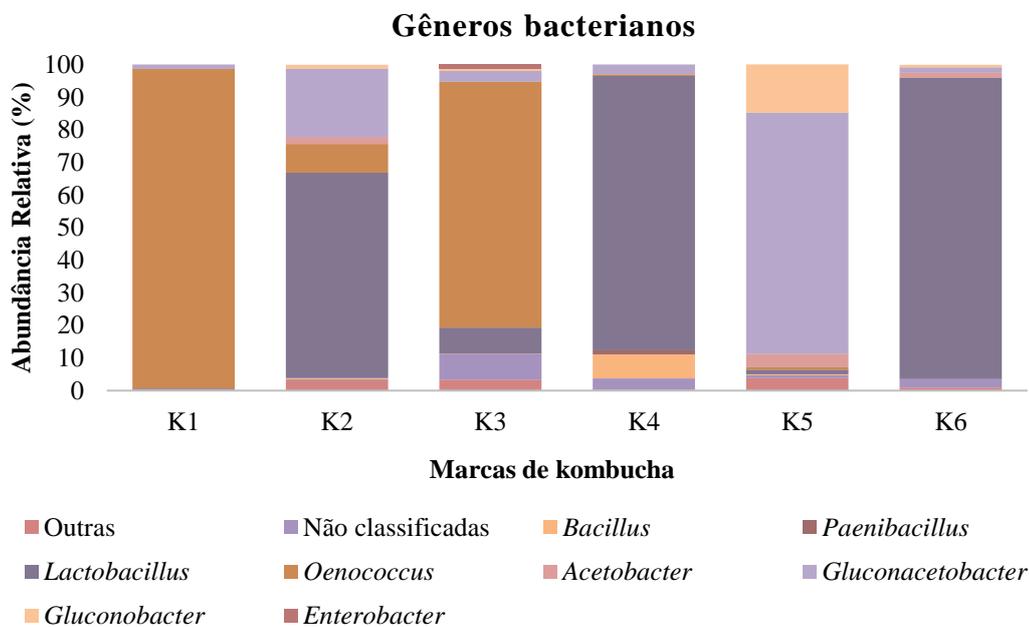


Figura 6. Abundância relativa de gêneros bacterianos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Além disso, outros gêneros bacterianos foram identificados com abundâncias relativas < 1% como: *Shigella* spp, *Streptococcus* spp, *Bacteroides* spp, *Pseudomonas* spp, *Anoxybacillus* spp, *Acinetobacter* spp, *Tanticharoenia* spp, *Sporolactobacillus* spp, *Sphingomonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Faecalibacterium* spp, *Blautia* spp, *Brevibacillus* spp, *Bordetella* spp, *Aerococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Alistipes* spp, *Stenotrophomonas* spp, *Turicibacter* spp, *Sphingobacterium* spp, *Corynebacterium* spp, *Ruminococcus* spp, *Butyricimonas* spp, *Parabacteroides* spp, *Salinispora* spp, *Methylobacterium* spp, *Brevundimonas* spp, *Deinococcus* spp, *Rhizobium* spp, *Flavobacterium* spp, *Magnetospirillum* spp, *Caulobacter* spp, *Coprobacillus* spp, *Hespellia* spp, *Bifidobacterium* spp, *Actinomyces* spp, *Enhydrobacter* spp, *Anaerococcus* spp, *Chryseobacterium* spp, *Barnesiella* spp, *Dysgonomonas* spp, *Rothia* spp, *Kocuria* spp, *Leucobacter* spp, *Erythrobacter* spp, *Rhodovarius* spp, *Ancylobacter* spp, *Aquamicrobium* spp, *Clostridium* spp, *Ruminococcus* spp, *Alloiococcus* spp, *Spirosoma* spp e *Odoribacter* spp

No que se refere a espécies, *Bacillus flexus*, *Lactobacillus ruminis*, *Oenococcus oeni* e *Gluconacetobacter intermedius* foram as principais bactérias identificadas nas amostras (Figura 7).

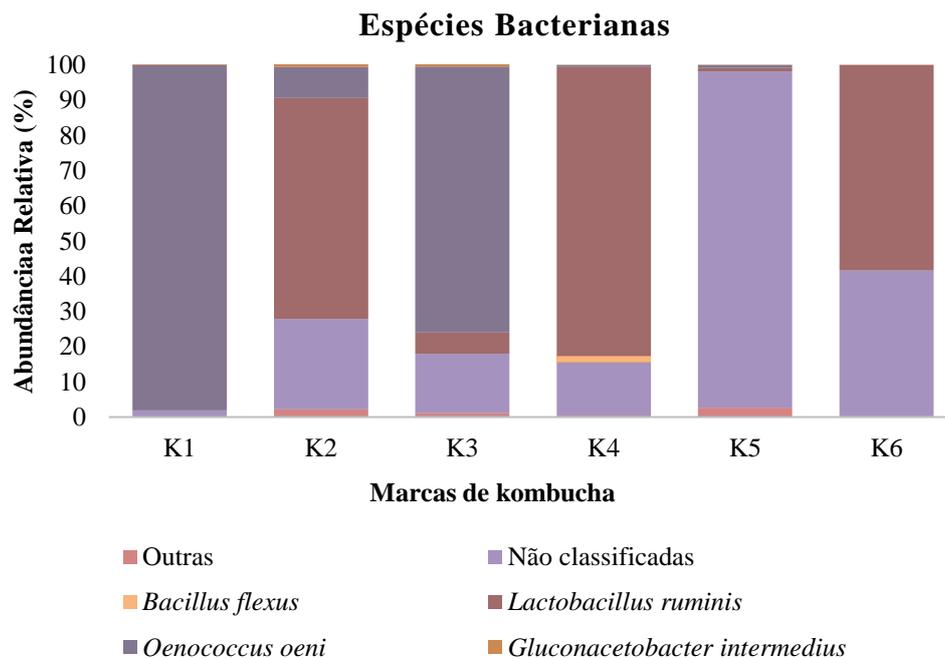


Figura 7. Abundância relativa de espécies bacterianas predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

A partir dos dados obtidos no sequenciamento, verificou-se que *O. oeni* é a espécie bacteriana predominante nas amostras das marcas K1 (97,97%) e K3 (75,46%). Enquanto que

L. ruminis predomina nas marcas K2 (62,77%), K4 (82,13%) e K6 (58,31%). Por outro lado, não foi possível identificar a nível de espécie as bactérias que predominam na amostra da marca K5.

Lactobacillus ruminis foi a espécie com maior abundância relativa encontrada na maioria das amostras deste trabalho e está presente em todas as marcas analisadas. A espécie foi identificada como a bactéria láctica predominante do trato gastrointestinal de porcos e é uma das principais bactérias autóctones do trato gastrointestinal de seres humanos (AL JASSIM, 2003). *L. ruminis* parece desempenhar um papel importante na manutenção da função normal do sistema digestivo e contribui para a saúde e o bem-estar de seus diferentes hospedeiros. Nesse estudo, pode-se observar uma correlação entre as marcas K2 e K4, nas quais foi verificado menor teor alcoólico, pH semelhante e mostraram uma maior abundância relativa da espécie. Por outro lado, as marcas com maior teor alcoólico (K1 e K5) demonstraram uma menor abundância relativa, indicando uma possível sensibilidade da espécie a concentrações mais elevadas de etanol.

Alguns estudos, têm demonstrado que *L. ruminis* possui propriedades imunomoduladoras, bem como um possível papel na supressão de patógenos resistentes a antibióticos (TAWEECHOTIPATR *et al.*, 2009). Além dessas características, a capacidade de sobreviver ao estresse gástrico e industrial investigada para algumas cepas e a falta de genes de resistência a antibióticos, apresentam a bactéria como um potencial probiótico (O' DONNELL *et al.*, 2015). Na kombucha, a manipulação constante na produção artesanal da bebida e o pH semelhante ao do trato digestivo humano podem ter ocasionado a adaptação e proliferação dessa espécie a esse ambiente. No entanto, a presença de *L. ruminis* na kombucha parece não ter sido descrita na literatura científica, até o momento e pode abrir espaço na discussão sobre as propriedades probióticas atribuídas à essa bebida.

Oenococcus oeni foi a espécie com maior frequência relativa em duas marcas estudadas neste trabalho (K1 e K3) e é uma das três espécies do gênero *Oenococcus* spp descritas até o momento. Frequentemente relatada na literatura da enologia, é a principal bactéria do ácido láctico responsável pela fermentação malolática (LORENTZEN *et al.*, 2019). A bactéria converte L-malato em L-lactato e dióxido de carbono. Assim, a acidez do vinho diminui e o sabor torna-se mais suave. Ainda, *O. oeni* metaboliza outros ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, precursores de aroma e compostos diversos, aumentando a complexidade aromática e auxiliando na estabilidade microbiológica do vinho. Isso ocorre a partir da remoção de potenciais substratos onde microrganismos deteriorantes poderiam crescer (LORENTZEN & LUCAS, 2019).

Além disso, *O. oeni* é frequentemente descrita na sidra de maçã, contribuindo na fermentação malolática. Apesar disso, sua abundância é menor no ambiente natural, onde é superada pela presença de outras espécies. A razão da rápida evolução e adaptação a esses ambientes específicos parece estar relacionada a uma hipermutabilidade rara no genoma desta bactéria, consequência da ausência do sistema *MutSL* (LORENTZEN *et al.*, 2019). Como as três bebidas fermentadas (vinho, sidra e kombucha) possuem características comuns, como pH baixo e a presença de etanol, isso justifica a presença desta espécie na maioria das amostras analisadas. No entanto, quando o pH excede 3,4-3,6, *O. oeni* é desafiado por *Lactobacillus* spp, que crescem mais rapidamente e podem se tornar predominantes na fermentação malolática (LORENTZEN & LUCAS, 2019).

Estudos prévios evidenciaram que o ambiente da kombucha é tão favorável para a espécie quanto o vinho e a sidra (COTON *et al.*, 2017; LORENTZEN & LUCAS, 2019). Apesar da escassez de informação acerca de kombuchas produzidas em escala industrial, *O. oeni* foi detectado em todos os tanques de fermentação e também apareceu como a principal bactéria do ácido láctico presente nas kombuchas francesas (COTON *et al.*, 2017). Além disso, isolados de *O. oeni* foram obtidos a partir de diferentes amostras de kombucha, em um estudo que indicou que cepas presentes em vinho, sidra e kombucha podem ser filogeneticamente distintas. Essa diferença pode estar relacionada com a adaptação da espécie para cada um dos produtos (LORENTZEN & LUCAS, 2019). Sendo assim, sugere-se que *O. oeni* possui papel importante na fermentação da kombucha, ainda que o produto possa ser produzido mesmo na ausência deste microrganismo. A contribuição metabólica de *O. oeni* ainda não está esclarecida. Dada a variedade de kombuchas no Brasil, é possível que o microrganismo não esteja presente em todas, como evidenciado pela análise da marca K6 deste estudo.

Por outro lado, embora com uma abundância relativa menor, a presença de *G. intermedius* foi detectada em todas as amostras de kombucha analisadas. Anteriormente identificada como *Acetobacter intermedius*, sabe-se que a presença dessa bactéria em kombucha também já foi relatada em outros trabalhos (BOESCH *et al.*, 1998; TYAGI *et al.*, 2016; COTON *et al.*, 2017) e que a espécie foi identificada como produtora de celulose (TYAGI *et al.*, 2016). Diante disso, podemos inferir que *G. intermedius* pode estar associada à formação da rede celulósica flutuante do *SCOBY*.

Bactérias do gênero *Gluconacetobacter* spp estão também associadas na oxidação de etanol em ácido acético e acetato em CO₂. Nos estudos em tecnologia de alimentos, essas bactérias são amplamente relatadas na produção de nata de coco e vinagre (NGUYEN *et al.*,

2015). Na kombucha, observou-se que a espécie *G. intermedius* realiza uma co-fermentação em sinergia com *Dekkera bruxellensis*, onde ocorre a produção de ácido glicurônico. Esse metabólito é um ácido carboxílico e atua como agente desintoxicante para remover substâncias químicas exógenas do corpo humano (VINA *et al.*, 2013). Em associação com algumas espécies de *Lactobacillus*, a produção de ácido glicurônico parece ser ainda mais eficiente (NGUYEN *et al.*, 2015).

Por fim, a bactéria *Bacillus flexus* foi detectada em apenas uma das marcas analisadas (K4). Essa espécie foi isolada a partir do solo e tem sido associada à fixação de nitrogênio e promoção do crescimento de plantas (LIU *et al.*, 2019). Na literatura, foi comprovado que o microrganismo não apenas é resistente ao arsênico, como também desenvolveu ativamente mecanismos bioquímicos para explorar o composto como fonte de energia (JABELI *et al.*, 2017). Assim, apresenta-se como uma potencial candidata para o uso na biorremediação de solos, águas e bebidas.

Diversos pesquisadores têm utilizado a biomassa celulósica da kombucha eficientemente como biossorbente para remover poluentes metálicos das águas residuais (JAYABALAN *et al.*, 2014). Até o momento, as cargas possuídas pelas bactérias e leveduras presentes na biomassa de celulose foram correlacionadas com a capacidade absorvente. Ainda, o efeito protetor da kombucha contra a peroxidação proteica induzida por arsênico tem sido associado a propriedades antioxidantes, que até o momento não foram relacionadas a presença de *B. flexus* (OFORI *et al.*, 2015). Além disso, também relacionado à atividade antioxidante da kombucha, especula-se que a bebida pode diminuir a atividade imunossupressora do cromo e auxiliar na excreção do metal dos tecidos do corpo (RAM *et al.*, 2000). Logo, essas especulações podem ser associadas à presença de bactérias como *B. flexus* e sua capacidade em adsorver tais metais pesados. Ademais, a nível de espécie também foram identificadas bactérias com abundância relativa <1%, representadas no Quadro 1.

Quadro 2. Espécies bacterianas nas marcas de kombucha com abundância relativa < 1%.

Espécie bacteriana	K1	K2	K3	K4	K5	K6
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>		■			■	
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>		■				
<i>Acetobacter aceti</i>					■	
<i>Tanticharoenia sakaeratensis</i>		■				
<i>Staphylococcus equorum</i>		■				
<i>Bacteroides uniformis</i>					■	

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>						
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>						
<i>Bacillus safensis</i>						
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>						
<i>Brevibacillus invocatus</i>						
<i>Sphingomonas wittichii</i>						
<i>Alistipes onderdonkii</i>						
<i>Sphingobacterium multivorum</i>						
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>						
<i>Salinispora tropica</i>						
<i>Brevundimonas vesicularis</i>						
<i>Flavobacterium gelidilacus</i>						
<i>Stenotrophomonas geniculata</i>						
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>						
<i>Caulobacter vibrioides</i>						
<i>Hespellia porcina</i>						
<i>Lactobacillus vaginalis</i>						
<i>Actinomyces europaeus</i>						
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>						
<i>Sphingomonas mali</i>						
<i>Barnesiella intestinihominis</i>						
<i>Rothia dentocariosa</i>						
<i>Rhodovarius lipocyclicus</i>						
<i>Ancylobacter abiegnus</i>						
<i>Rhizobium daejeonense</i>						
<i>Aquamicrobium aerolatum</i>						
<i>Clostridium saccharogumia</i>						
<i>Ruminococcus lactaris</i>						
<i>Lactobacillus coleohominis</i>						
<i>Enterococcus cecorum</i>						
<i>Alistipes indistinctus</i>						
<i>Alistipes finegoldii</i>						
<i>Bacteroides ovatus</i>						

5.2.2 Comunidade fúngica

O sequenciamento da região *ITS* resultou em 272340 sequências, as quais foram agrupadas em 33 ASVs. A diversidade de fungos (33 ASVs) foi menor que a diversidade bacteriana (117 ASVs). A classificação taxonômica resultou em 2 filos, 8 classes, 11 ordens, 15 famílias, 20 gêneros e 20 espécies. Os resultados referentes a abundância relativa dos filos fúngicos em amostras de kombucha são mostrados na Figura 8. Os dados obtidos baixa diferenciação na composição da comunidade fúngica ao nível de filo, entre as diferentes marcas. Ascomycota foi o filo predominante em todas as marcas K1 (97,21%), K2 (99,99%), K3 (99,86%), K4 (100%), K5 (99,35%) e K6 (99,89%).

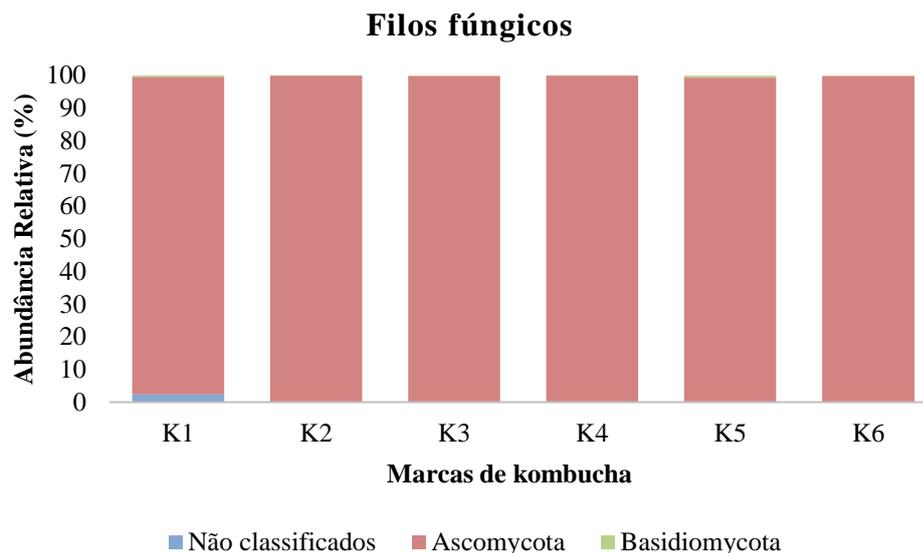


Figura 8. Abundância relativa de filos fúngicos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

No que se refere aos gêneros fúngicos, apesar de terem sido identificados 20 gêneros nas amostras, apenas *Dekkera* spp e *Lanchancea* spp apresentaram abundâncias relativas $\geq 1,0\%$ (Figura 9). A análise revelou que o gênero *Dekkera* spp está presente em todas as marcas estudadas, sendo predominante nas marcas K1 (77,02%), K3 (73,25%), K4 (59,01%) e K5 (97,30%). Nas marcas K2 e K6, a maioria dos fungos encontrados não foram classificados quanto ao gênero.

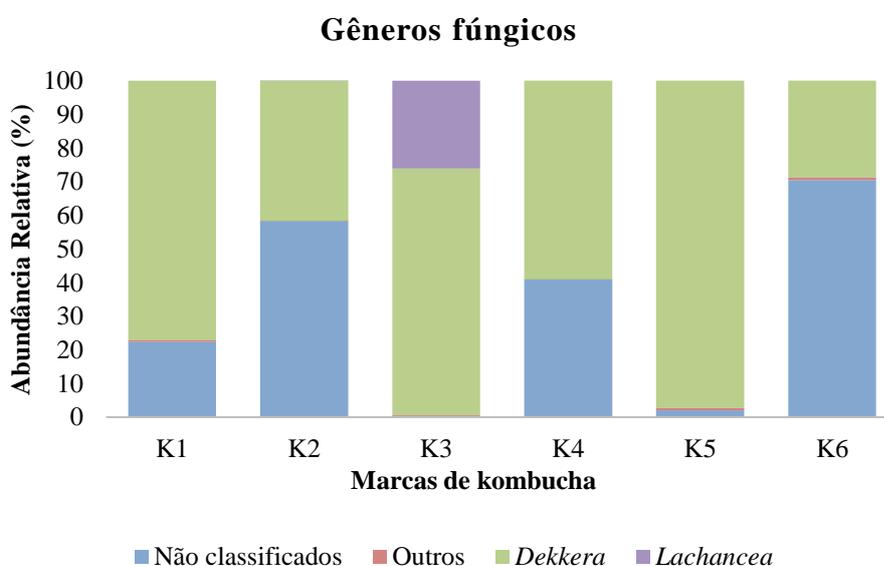


Figura 9. Abundância relativa de gêneros fúngicos predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Outros gêneros como *Wallemia* spp, *Rhodospiridiobolus* spp, *Candida* spp, *Rhodotorula* spp, *Zygosaccharomyces* spp, *Aspergillus* spp, *Naganishia* spp, *Starmerella* spp, *Cyberlindnera* spp, *Filobasidium* spp, *Papiliotrema* spp, *Setophoma* spp, *Malassezia* spp, *Kloeckera* spp, *Bullera* spp, *Pichia* spp, *Hymenochaete* spp e *Meyerozyma* spp, também foram identificados, porém em menor abundância (< 1%).

A nível de espécie, os fungos predominantes foram *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis* e *Lachancea fermentati* (Figura 10). A espécie *D. bruxellensis* está presente em todas as marcas, porém predominante em K1 (76,56%), K4 (58,63%) e K5 (69,26%), enquanto que *D. anomala*, apesar de estar presente em K2, K4 e K5, é predominante na marca K3 (71,57%). As espécies predominantes nas marcas K2 e K6 não foram identificadas.

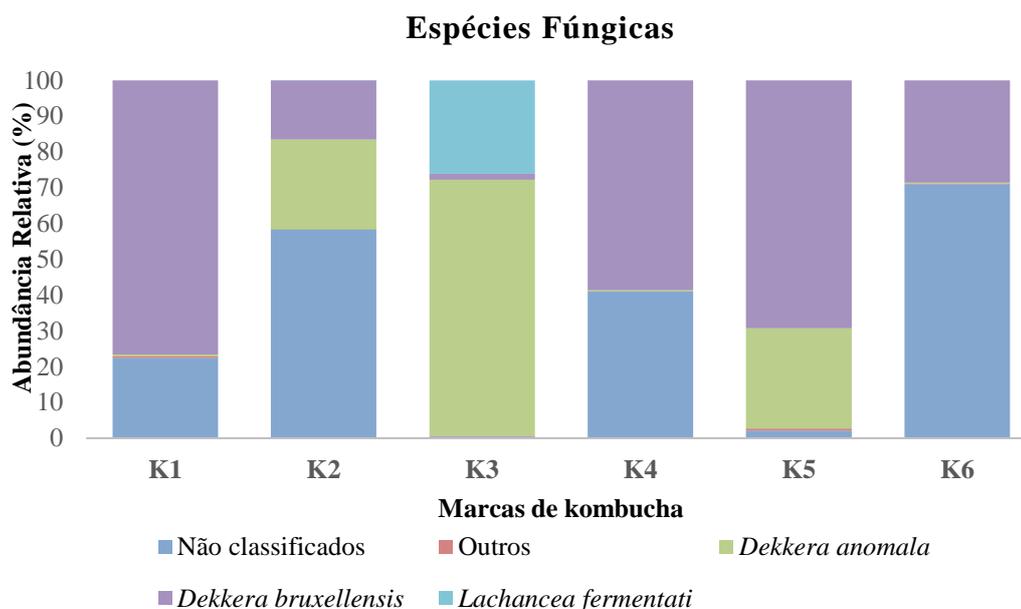


Figura 10. Abundância relativa de espécies fúngicas predominantes em seis marcas de kombucha (K1 a K6).

Dekkera bruxellensis e *D. anomala* são espécies de leveduras acidotolerantes, conhecidas por seu importante papel durante a fermentação das cervejas belgas *Lambic e* contribuem positivamente no sabor através da produção de ácido acético (DEQUIN *et al.*, 2003). Além disso, a fermentação natural realizada a partir dessas leveduras, produz compostos fenólicos, com descritores sensoriais de aromas típicos como plástico queimado, suor de cavalo e estábulo. Análises prévias demonstraram que essas leveduras produzem etanol sob aerobiose e têm capacidade de crescer sem oxigênio (RENOUF *et al.*, 2006). No vinho, *D. bruxellensis* é considerada um dos principais microrganismos deteriorantes, sendo também perfil de aroma

característico de alguns produtos, como os franceses *Château de Beaucastel* (SCHIFFERDECKER *et al.*, 2014).

Dekkera anomala também foi identificada em outras bebidas como vinho Jerez (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 2001; IBEAS *et al.*, 1996), tequila (LACHANCE, 1995), sidra (COTON *et al.*, 2006) e kefir (MIGUEL *et al.*, 2013). Além disso, a presença predominante dessas espécies na kombucha já foi relatada em diversos trabalhos (MAYSER *et al.*, 1995; TEOH *et al.*, 2004; COTON *et al.*, 2017) e parece desempenhar um importante papel na fermentação da bebida, na produção de etanol e de ácido acético. As duas espécies adaptam-se a condições ambientais estressantes, como altas concentrações de etanol e baixos valores de pH. Na fermentação alcoólica do vinho, foi demonstrada a maior taxa de adaptação de *D. bruxellensis* do que de outras leveduras selvagens podendo sobreviver no mosto durante o processo (RENOUF *et al.*, 2006). Assim, considerando as condições semelhantes dos dois ambientes, essa informação pode explicar também a predominância das espécies na maioria das kombuchas analisadas neste trabalho.

Em relação à *L. fermentati*, essa foi detectada na marca K3 e, com frequência relativa < 1%, na marca K2. O gênero *Lachancea* spp tem sido identificado com frequência na composição fúngica da kombucha em outros trabalhos (BELLUT *et al.*, 2019, VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Um aspecto interessante dessa espécie está em sua característica metabólica incomum, ou seja, sua capacidade de produzir ácido lático durante a fermentação alcoólica. Essa espécie vem sendo investigada quanto à sua utilização para reduzir o pH e aumentar a acidez total na produção de vinhos (COMITINI *et al.*, 2011; PORTER *et al.*, 2019), e para produzir cervejas de baixo teor alcoólico (BELLUT *et al.*, 2019). A *L. fermentati* também tem sido empregado na produção de cervejas *sour*, para produzir bebidas sem o uso de bactérias ou adição do reagente ácido lático. Embora *L. fermentati* seja considerada não patogênica, existe um relato de um caso de fungemia em um paciente imunocomprometido, relacionado a essa espécie (LEUCK *et al.*, 2014). Ainda, espécies fúngicas com abundância relativa < 1% foram identificadas e são descritas do Quadro 2.

Quadro 3. Espécies fúngicas identificadas nas marcas de kombucha

Espécie fúngica	K1	K2	K3	K4	K5	K6
<i>Wallemia muriae</i>			■		■	
<i>Candida tropicalis</i>	■		■			
<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	■		■			

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	■		■			
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	■					
<i>Naganishia diffluens</i>			■			
<i>Cyberlindnera rhodanensis</i>						
<i>Papiliotrema baii</i>		■				
<i>Setophoma vernoniae</i>	■					
<i>Naganishia albida</i>			■		■	
<i>Kloeckera lindneri</i>		■				
<i>Candida orthopsilosis</i>					■	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>			■			
<i>Bullera alba</i>						■
<i>Cyberlindnera jadinii</i>						
<i>Hymenochaete luteobadia</i>			■			
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>						■

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com a variação dos resultados obtidos na avaliação dos parâmetros físico-químicos e do microbioma das amostras desse trabalho, é possível observar uma aparente diversidade das kombuchas presentes no mercado brasileiro. Atualmente, existem aproximadamente 40 empresas de pequeno porte que comercializam seus produtos, sendo assim os dados gerados representam um mapeamento inicial que no entendimento da composição das kombuchas.

O Brasil foi o primeiro país a criar uma legislação específica para a kombucha e os dados e pesquisas bibliográficas gerados a partir deste trabalho contribuíram para as discussões acerca da construção do padrão de identidade e qualidade da bebida. Visto que a produção de kombucha deixou de ser uma atividade exclusivamente do ambiente doméstico e tornou-se uma atividade comercial, o desenvolvimento da legislação no país tem a finalidade de proteger os produtores de possíveis fraudes, bem como permitirá fornecer aos consumidores maiores informações sobre os produtos adquiridos/consumidos.

A utilização de metodologias simples para a caracterização físico-química das amostras, utilizadas nesse trabalho, foi útil para indicar um caminho no controle de qualidade rápido e eficiente desta bebida. Valores de pH encontrados neste estudo indicam que as bebidas encontradas no mercado são seguras, do ponto de vista microbiológico, para o consumo por seres humanos saudáveis. Em adição, os valores de acidez titulável total corroboraram com os níveis indicados pela literatura para obtenção de bebidas sensorialmente agradáveis e seguras. Em relação ao teor alcoólico, os resultados encontrados foram superiores a 0,5%, reforçando a

importância de uma adequação da rotulagem, bem como do desenvolvimento e utilização de metodologias para controlar a qualidade desses produtos.

Além de ressaltar a importância das análises físico-químicas, este foi o primeiro estudo de caracterização do microbioma de Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil, utilizando o sequenciamento de alto desempenho. Seis marcas de kombucha brasileiras foram submetidas à identificação taxonômica dos microrganismos encontrados, a nível de filo, gênero e espécies com abundâncias relativas $\geq 1,0\%$. Apesar disso, as contribuições desses microrganismos no processo fermentativo e nas características organolépticas da kombucha ainda necessitam ser elucidados.

Em complemento, a diferença na composição microbiana encontrada entre as marcas pode estar associada à utilização de diferentes matrizes na preparação das kombuchas, diversas origens de aquisição do SCOBY, além das condições de fermentação e manipulação. Nesse contexto, seria interessante realizar o sequenciamento individual das kombuchas incluindo a avaliação de diferentes lotes dentro de uma mesma marca. Dessa forma, seria possível verificar se a abundância relativa dos microrganismos é constante ou se é alterada ao longo das produções. Bem como, verificar se alterações na abundância relativa dos microrganismos refletem nas características físico-químicas e sensoriais da bebida.

Por fim, é importante ressaltar que a maioria dos microrganismos identificados neste trabalho não representa riscos para seres humanos saudáveis, e alguns inclusive apresentam benefícios. Porém, dentre as espécies identificadas, algumas são relatadas na literatura como patógenos oportunistas. Portanto, dependendo da composição bacteriana do produto, pode-se desaconselhar o consumo de kombucha para indivíduos imunocomprometidos.

Ainda, devido à complexidade da comunidade simbiótica e diversidade dos microrganismos, pode-se concluir que a qualidade final desta bebida, produzida no método tradicional, é difícil de reproduzir e prever. Dessa maneira, os dados gerados nesse trabalho estimulam discussões e investigações científicas adicionais acerca da kombucha.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1 SITES

ABKOM (2020). Disponível em: <https://www.abkom.org.br/>. Acesso em 31 de março de 2020. Acesso em 04 de agosto de 2018.

Anton Paar (2018). Determination of the alcohol content in kombucha with AlcoLyzer M/ME. Disponível em: <https://www.anton-paar.com/corp-en/service-support/document-finder/application-reports/determination-of-the-alcohol-content-in-kombucha-with-alcolyzer-m-me/>. Acesso em 31 de março de 2020.

ANVISA (2018). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 04 de agosto de 2018.

Farofa Magazine (2019). Disponível em: <https://www.farofamagazine.com.br/materia/editorial/conheca-as-kombuchas-vencedoras-do-primeiro-concurso-sensorial-da-bebida>. Acesso em 31 de março de 2020.

Kombucha Brewers International. Disponível em: <https://kombuchabrewers.org/> Acesso em 04 de agosto de 2018.

Petruzzello (2017). Kombucha. Disponível em: <https://www.britannica.com/topic/kombucha>. Acesso em 31 de março de 2020.

Slow Food International. Disponível em: <http://www.slowfood.com/>. Acesso em 19 de julho de 2018.

Vansintjan, A (2019). Fermentation is back: how will living organisms reshape your plate? Disponível em: <https://www.theguardian.com/food/2019/jan/18/fermentation-food-how-to-process-et-hics>. Acesso em 28 de agosto de 2019.

Young, S. P (2019). Kombucha: Revered For Millennia, But Is It Really A Life Saving Brew? Disponível em: <https://www.ancient-origins.net/myths-legends-asia/kombucha-0011948>. Acesso em 31 de março de 2020

7.2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Abarenkov, K.; Henrik, N. R.; Larsson, K. H.; Alexander, I. J.; Eberhardt, U.; Erland, S.; Sen, R. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. **New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 281-285, 2010.

Al Jassim, R. A. M. Lactobacillus ruminis is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig. **Letters in Applied Microbiology**, n. 37, p. 213 – 217, 2003.

Aloulou, A.; Hamden, K.; Elloumi, D.; Ali, M. B.; Hargafi, K.; Jaouadi, B.; Ayadi, F.; Elfeki, A.; Ammar, E. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 63, p. 1472- 6882, 2012.

Amarasinghe, H., Weerakkody, N. S., Waisundara, V. Y. Evaluation of 257 physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during 258 extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.

Ankan, M.; Mitchell, Alex, L.; Finn, R. D.; Gürel, F. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 455-464, 2020.

Asioli, D.; Aschemann-Witzel, J.; Caputo, V.; Vecchio, R.; Annunziata, A.; Næs, T.; Varela P. Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, n. 1, p. 58-71, 2017.

Bellut, K.; Michel, M.; Hutzler, M.; Zamkow, M.; Jacob, F.; De Schutter, D. P; Daenen, L.; Lynch, K. M.; Zannini, E.; Arendt, E. K. Investigation into the Potential of *Lachancea fermentati* Strain KBI 12.1 for Low Alcohol Beer Brewing, **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, p. 157-169, 2019.

Bhattacharya, S.; Manna, P.; Gachhui, R.; Sil, P.C. Protective effect of kombucha tea against tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 7, p. 511-24, 2011.

Blaser, M. J. The microbiome revolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4162-5, 2014.

Boesch, C.; Trcek, J.; Sievers, M.; Teuber, M. Acetobacter itermedius, sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 220-229, 1998.

Bokulich, N. A.; Kaehler, B. D.; Rideout, J. R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R. Optimizing taxonomic classification of market-gene amplicon sequences with QIIME 2’s q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 2018.

Bolyen, E.; Rideout, J. R.; Dillon, M. R.; Bokulich, N. A.; Abnet, C.; Al-Ghalith, G. A.; Alexander, H. QIIME 2: Reproducible, Interactive, Scalable, and Extensible Microbiome Data Science. **PeerJ Preprint** 6, v. 1, e2729, 2018.

Borre, Y. E.; Moloney, R. D.; Clarke, G.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F. The impact of microbiota on brain and behavior: mechanism & therapeutic potential. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 817, p. 373-403, 2014.

Campano C.; Balea A.; Blanco A.; Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, p. 57–91, 2016.

Callahab, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. K.; Han, A. W. Johnson, A. J A; Holmes, S. P. DADA2:high-resolution sampçe interference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581, 2016.

Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D; Lozupone, C. A.; Turnbaugh, P. J.; Fierer, N.; Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample.**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 1, p 4516-4522, 2011.

Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.; Grieco, F.; Spano, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. **Microbiological Research**, v. 185, p. 75-83, 2015.

Centers for Disease Control and Prevention. Unexplained severe illness possibly associated with consumption of kombucha tea—Iowa. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, n. 48, p. 892–900, 1995.

Chakravorty, S.; Bhattacharya, S.; Chatzinotas, A.; Chakraborty, W.; Bhattacharya, D.; Gachhui, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63– 72, 2016.

Chu, S.; D.; Chen, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502-507, 2006.

Clearly, L. Fermenting uncertainty: re-imagining leisure under liquid modernity. **Annals of Leisure Research**, v. 1, n. 18, p. 2159-6816, 2019.

Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. **Food Microbiology**, v. 28, p. 873-882, 2011.

Corbo, M., R.; Bevilacqua, A.; Petruzzi, L.; Casanova, F., P.; Sinigaglia, M. Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6. p. 1192-1206, 2014.

Coton, E.; Coton, M.; Levert, D.; Casaregola, S.; Sohier, D. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 130, 2006.

Coton, M.; Pawtowski, A.; Taminau, B.; Burgaud, G.; Deniel, F.; Coulloume-Labarthe, L.; Fall, A.; Daube, G.; Coton, E. Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, 2017.

DeFilippis, F.; Parente, E.; Ercolini, D. Metagenomics insights into food fermentations. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 91–102, 2017.

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K.; Andersen, G. L. Greengenes, a chimera-checked *16S rRNA* gene database and workbench compatible with ARB. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

Duell, R. Is 'local food' sustainable? Localism, social justice, equity and sustainable food futures. **New Zealand Sociology**, v. 28, n. 4, p. 123, 2013.

Dufresne, C.; Farnworth, E.. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**. v. 33, p. 409-421, 2000.

Ebersole, B.; Liu, Y.; Schmidt, R.; Eckert, M.; Brown, P. N.; Determination of Ethanol in Kombucha Products: Single-Laboratory Validation, First Action 2016.12. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 732-736, 2017.

Ercolini, D.; Fogliano, V. Food design to feed the human gut microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 15, p. 3754- 3758, 2018.

Esa, F., Tasirin, S.M.; Rahman, N.A. Overview of bacterial cellulose production and application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113-119, 2014.

Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Tora, M. J.; Garcia-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2056-2061, 2001.

Ferrières, J. The French paradox: Lessons for other countries. **Heart**, v. 90, p. 107–111, 2004.

Gedela, M.; Potu, K. C.; Gali, V. L.; Alyamany, K.; Jha, L. K. A Case of Hepatotoxicity Related to Kombucha Tea Consumption. **South Dakota Journal of Medicine**, v. 69, n. 1, p.:26-8, 2016.

González, E. The chemo-preventive effect of tea and its components. **Archivos Latinoamericanos De Nutrición**, v. 53, p. 111–118, 2003.

Hey, M; Ketchum, A. Fermentation as engagement: one more-than-human connections and materiality. **The Journal of Canadian Food Cultures**, v. 9, n. 1, 2018.

Hill , D.; Sugrue , I.; Arendt , E.; Hill ,C.; Stanton ,C.; Ross, R. P. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. **F1000 Research**, v. 6, p. 751, 2017.

Hur, S. J.; Lee, S. Y.; Kim, Y. C.; Choi, I.; Kim, G. B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

Ibeas, J. I.; Lozano, I; Perdigones, F.; Jimenez, J. Dynamics of flor yeast populations during the biological aging of sherry wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, p. 75–79, 1997.

Jabeli, M. A.; Maleki, A.; Amoozegar, M. A.; Kalantar, E.; Izanloo, H.; Gharibi, F. *Bacillus flexus* strain As-12, a new arsenic transformer bacterium isolated from contaminated water resources. **Chemosphere**, v. 169, p. 636-641, 2017.

Jayabalan, R.; Malbaša, R.V.; Lončar, E. S.; Vitas, J. S.; Sathishkumar, M. A review on kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 538–550, 2014.

Katoh, K; Misawa, K; Ki, K.; Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleis acids research**, v. 30, n. 14, p. 30590-66, 2002.

Kaur, N., & Singh, P. D. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167–187, 2017.

Kehrmann, J.; Veckollari, B.; Schmidt, D.; Schildgen, O.; Schildgen, V.; Wagner, N.; Zeschnigk, M.; Klein-hitpass, L.; Witzke, O.; Buer, J.; Steinmann, J. The lung microbiome in patients with pneumocystosis. **BMC pulmonary medicine**, v. 17, n. 170, 2017.

Kneafsey, M; Cox, R; Holloway, L; Dowler, E; Venn, L; Tuomainen, H. Reconnecting consumers, producers and food. Nova York: **Berg Publishers**, 2008.

Kovacevic, Z.; Davidovic, G.; Vuckovic-Filipovic, J.; Janicijevic-Petrovic, M. A.; Janicijevic, K.; Popovic, A. A Toxic Hepatitis Caused the Kombucha Tea – Case Report. **Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 128-131, 2014.

Kozyrovska, N. O.; Reva, O. M.; Goginyan, V. B.; Vera, J. P. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, v. 28, n. 2, p. 103–113, 2012.

Kuo, C.H.; Chen, J. H.; Liou, B. K.; Lee, C.K. Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 98–103, 2015.

Leal, J. M.; Suárez, L. V.; Jayabalan, R.; Oros, H. J.; Anayansi, E. A.; A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

Leuck, A.M.; Meghan, K.; Green, J. S. Fungemia due to *Lachancea fermentati*: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 4, p. 250, 2014.

Liu, J.; Cui, X.; Liu, Z.; Guo, Z.; Yu, Z.; Yao, Q.; Jin, J.; Liu, X.; Wang, G. The Diversity and Geographic Distribution of Cultivable *Bacillus*-Like Bacteria Across Black Soils of Northeast China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1424, 2019.

Loncar, E.; Djuric, M.; Malbasa, R.; Kolarov, L. K.; Klasnja, M. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. C3, p. 186–192, 2006.

Lorentzen, M. P. G.; Campbell-Sills, H.; Jorgensen, T. S.; Nielsen, T. K.; Coton, M.; Coton, E.; Hansen, L.; Lucas, P. M. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. **BMC Genomics**, v. 20, n. 330, 2019.

Lorentzen, M. P. G.; Lucas, P. M. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 2937-2845, 2019.

Manchester, K. L. Louis Pasteur (1822–1895) — chance and the prepared mind. **Trends Biotechnology**, v. 13, p. 511–515, 1995.

Marsh, A. J.; O'Sullivan, O.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (*tea fungus*) samples. **Food Microbiology**, V. 38, p. 171-8, 2014.

Martini, N. Potion or Poison? Kombucha. **Journal of Primary Health Care**, v. 10, n. 1, p. 93-94, 2018.

Matei, B.; Salzat, J.; Diguta, C. F.; Cornea, C. P.; Lutã, G.; Utoiu, E. R.; Florentina, M. Lactic acid bacteria strains isolated from kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 3, 2018.

May, A.; Narayanan, S.; Alcock, J.; Varsani, A.; Maley, C.; Aktipis, A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, e7565, 2019.

Mayser, P.; Fromme, S.; Leitzmann, C.; Grunder, K. The yeast spectrum of the 'tea fungus kombucha'. **Mycoses**, v. 38, n. 7, p. 289-95, 1995.

Miguel, M. G. C. P.; Cardoso, P. G.; Magalhães-Guedes, K. T.; Schwan, R. F. Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 113-118, 2013.

Moloney, R. D.; Desbonnet, L.; Clarke, G.; Dinan, T. G.; Cryan, J. E. The microbiome: stress, health and disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 1, p. 77-89, 2014.

Neffe-Skocinska, K., Sionek, B., Scibisz, I., Kolozyn-Krajewska, D. Acid contents 289 and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, 290 microbiological and sensory properties. **Journal of Food**, v.15, n. 4, p. 601-607, 2017.

Nguyen, N. K.; Nguyen, P. B.; Nguyen, H. T.; Le, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149-1155, 2015.

Nummer, B. A. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model 292 Food Code: risk analysis and processing guidance. **Journal of environmental health**, v. 76, n. 4, p. 8-11, 2013.

O'Donnell, M. M.; Harris, H. M. B.; Lynch, D. B.; Ross, R. P.; O'Toole, P. W. *Lactobacillus ruminis* strains cluster according to their mammalian gut source. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 80, p. 015-0403, 2015.

Ofori, J. A.; Ocloo, A.; Ofori, M.; Dorleku, W.P.; Gbewonyo, W.S.K.; Kombucha protects against arsenic-induced protein peroxidation in rats. **Journal of Ghana Science Association**, v. 16, n. 2, 2015.

Paxson H, Helmreich S. The perils and promises of microbial abundance: novel natures and model ecosystems, from artisanal cheese to alien seas. **Social Studies of Science**, v. 44, n. 2, p. 165-93, 2014.

Porter, T. J.; Divol, B.; Setati, M. E. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. **Food Research International**, v. 119, p. 378-389, 2019.

Primiani, C. N., Pujati, Mumtahanah, M., Ardhi, W. Kombucha fermentation test used 295 for various types of herbal tea. **Journal of Physics: conference series**, Semarang, Indonesia, 2018.

Price, M. N.; Dehal, P. A.; Arkin, A. P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS one**, v. 5, v. 3, e9490, 2010.

Rai, S. N.; Qian, C.; Pan, J.; Rai, J. P.; Song, M.; Bagaitkar, J.; Merchant, M.; Cave, M.; Egilmez, N. K.; McClain, C. J. Microbiome Data Analysis with an Application to a Pre-clinical Study Using QIIME2: Statistical Considerations. **Genes & Diseases**, 2019.

Ram, M. S.; Anju, B.; Pauline, T.; Prasad, D.; Kain, A. K.; Mongia, S. S.; Sharma, S. K.; Singh, B.; Singh, R; Illavazhagan, G; Kumar, D.; Selvamurthy, W. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p.235-240, 2000.

Renouf, V.; Falcou, M.; Miot-Sertier, C.; Perello, M. C.; De Revel, G.; Lonvaud-Funel, A. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1208-19, 2006.

Reva, O. N., Zets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharenko, O. E., Shpvlova, S. P., Podolich, O. V., Vera, J. P., Kozvorovska, N. O. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in diferente microenvironments. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 214, 2015.

Ruka, D. R.; Simon, G. P.; Dean, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 613-622, 2012.

Rytkönen, P.; Bonow, M.; Girard, C.; Tunón, H. Bringing the Consumer Back in—The Motives, Perceptions, and Values behind Consumers and Rural Tourists' Decision to Buy Local and Localized Artisan Food—A Swedish Example. **Agriculture**, v. 8, n. 4, p. 58, 2018.

Sadjadi, J. Cutaneous Anthrax Associated With the Kombucha "Mushroom" in Iran. **JAMA**, v.280. n. 18. p. 1567–1568, 1998.

Schifferdecker, A. J.; Dashko, S.; Ishchuk, O. P.; Piskur, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323-332, 2014.

Schlenk, F. Early research on fermentation - a story of missed opportunities. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 252- 254, 1985.

Schmitt, E.; Galli, F.; Menozzi, D.; Maye, D.; Touzard, J. M.; Marescotti, A.; Six, J.; Brunori, G. Comparing the sustainability of local and global food products in Europe. **Journal of Cleaner Production**, v. 165, p. 346-359, 2017.

Selhub, E. M.; Logan, A. C.; Bested, A. C. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 33, n. 2, p. 1180- 6805, 2014.

Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

Shah, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262–1277, 2007.

Sherman, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, n. 3, p. 3- 41, 2002.
Srinivasan, R.; Smolinske, S.; Greenbaum, D; Probable gastrointestinal toxicity of kombucha tea. **Journal of General Internal Medicine**, v. 12, p. 643-644, 1997.

SungHee Kole, A.; Jones, H. D.; Christensen, R.; Gladstein, J. A case of kombucha tea toxicity. **Journal Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 3, p. 205- 7, 2009.

Talebi, M., Frink, L. A., Patil, R. A., Armstrong, D. W. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 4062-4067, 2017.

Taweechotipatr, M.; Iyer, C.; Spinler, J. K.; Versalovic, J.; Tumwasom, S. *Lactobacillus saerimneri* and *Lactobacillus ruminis*: novel human-derived probiotic strains with immunomodulatory activities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, n. 1, p. 65-72, 2009.

Tencati, A.; Zsolnai, L. Collaborative Enterprise and Sustainability: The Case of Slow Food. **Journal of Business Ethics**, v. 110, n. 3, p. 345–354, 2012.

Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. Yeast ecology of kombucha fermentation. **306 International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, 119-126, 2004.

Tyagi, N.; Suresh, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, n.1, p. 71-80, 2016.

Velicanski, A. S.; Cvetkovic, D. D.; Markov, S. L.; Saponjac, V. T. T.; Vulic, J. J. Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. **Food Technology Biotechnology**, v. 52, 420-429, 2014.

Vilela, A. The Importance of Yeasts on Fermentation Quality and Human Health Promoting Compounds. **Fermentation**, v. 5, n. 46, 2019.

Villarreal-Soto, S. A.; Beaufort, S.; Bouajila, J.; Souchard, J.; Taillandier, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.

Vīna, I.; Semjonovs, P., Linde, R.; Patetko, A. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. **International Journal of Recent Research and Applied Studies**, v. 14, p. 17–25, 2013.

Walther, A.; Hesselbart, A.; Wendland, J. Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 5, p. 783-793, 2015.

Watawana, M. I.; Jayawardena, N.; Gunawardhana, C. B.; Waisundara, V. Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, 2015.

Waters, D.M.; Mauch, A.; Coffey, A.; Arendt, E., K., Zannini, E. Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 503-520, 2015.

White, T. K.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.; Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, p. 315- 322, 1990.

Zannini, E.; Pontonio, E.; Waters, D.; Arendt, E. Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2. p. 473–485, 2012.

7.3 LIVROS

Belasco, W. Food: The key concepts. Nova York: **Berg Publishers**, 2008.

Boekhout T, Robert V. Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects. Hamburgo: **Behr's Verlag**, 2003.

Gazolla, M; Schneider, S. Cadeias curtas e redes agroalimentares alternativas: negócios e mercados da agricultura familiar. Porto Alegre: **Editora UFRGS**, 2017.

Katz, S. E. A arte da fermentação. São Paulo: **Editora Sesi**, 2013.

Kneafsey, M; Cox, R; Holloway, L; Dowler, E; Venn, L; Tuomainen, H. Reconnecting consumers, producers and food. Nova York: **Berg Publishers**, 2008.

Lupton, D. Food, the body and the self. Londres: **Sage Publications**, 1996.

Money, N. The rise of yeast. Nova York: **Oxford University Press**, 2017

Pollan, M. In defense of food: An eater's manifesto. Nova York, NY: **The Penguin Press**, 2008

Warde, A. The practice of eat. Crambridge: **Polity Press**, 2016

7.4 TESES E DISSERTAÇÕES

Santos, M. J. Kombucha: Caracterização da Microbiota e Desenvolvimento de Kombucha: Caracterização da Microbiota e Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares Para Uso em Restauração. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Superior de Agronomia, **Universidade de Lisboa**, 2016.

7.5 LEGISLAÇÃO

Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre (Portaria nº 76, de 26 de novembro de 1986). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2005.

Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo território nacional (Instrução Normativa nº 268 41/2019, de 17 de setembro de 2019). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2019.