

UNIVERSIDADE DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-graduação em Química

Gabriela Fioravante da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE KOMBUCHAS
COMERCIAIS BRASILEIRAS**

Belo Horizonte
2025

UFMG/ICEX/DQ. 1.679
T. 760

Gabriela Fioravante da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE KOMBUCHAS
COMERCIAIS BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas
da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho

Belo Horizonte

2025

Ficha Catalográfica

S586d
2025
T

Silva, Gabriela Fioravante da.
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para avaliação dos parâmetros de qualidade de kombuchas comerciais brasileiras [manuscrito] / Gabriela Fioravante da Silva. 2025.
156 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 140-150.
Apêndices: f. 151-156.

1. Química analítica – Teses. 2. Bebidas fermentadas – Teses. 3. Bebidas fermentadas – Indústria – Controle de qualidade – Teses. 4. Preparação de amostra (Química) – Teses. 5. Análise cromatográfica – Teses. 6. Espectroscopia de infravermelho – Teses. 7. Alimentos funcionais – Teses. 8. Quimiometria – Teses. I. Botelho, Bruno Gonçalves, Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**"Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos Para Avaliação dos
Parâmetros de Qualidade de Kombuchas Comerciais Brasileiras"**

Gabriela Fioravante da Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Bruno Gonçalves Botelho - Orientador
UFMG

Prof. Marcio Pozzobon Pedroso
UFLA

Profa. Juliana Azevedo Lima Pallone
UNICAMP

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi
UFMG

Belo Horizonte, 21 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 21/08/2025, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Aparecida Takahashi, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2025, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Pozzobon Pedroso, Usuário Externo**, em 22/08/2025, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Azevedo Lima Pallone, Usuário Externo**, em 25/08/2025, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Ramos de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 25/08/2025, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4472832 e o código CRC CE134F68.

**Dedico este trabalho aos meus pais,
meu marido Ricardo, meu filho
Bernardo e aos meus irmãos Isabela
e João Pedro.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar forças e iluminar meu caminho, permitindo que eu conclua mais uma etapa da minha vida. Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por valorizarem minha dedicação aos estudos. Ao meu marido, Ricardo Elias, pelo amor, compreensão, motivação, companheirismo e por me dar o maior presente da minha vida, nosso filho Bernardo.

Aos meus irmãos, Isabela e João Pedro, pelo carinho e convivência repleta de amor. À minha avó (em memória), por acreditar em mim e por me presentear com o café diário...

À minha grande amiga do trabalho, Fabiana, pelo carinho, ajuda e por sempre estar pronta para me ouvir. Às minhas amigas Maria Emília e Sheylla, pela amizade e apoio constante.

Ao Thiago Cunha, por toda ajuda e colaboração. À empresa Tropicália Kombucharia, pelo apoio na disponibilização de amostras e pela oportunidade de conhecer suas instalações.

Ao professor Bruno Gonçalves Botelho, pela oportunidade e orientação no desenvolvimento deste trabalho. A toda a equipe do LAMS, pelo apoio e pela infraestrutura oferecida, com agradecimentos especiais ao Glaucimar, Ludmilla e William.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

O crescente interesse por hábitos saudáveis e por alimentos ditos funcionais tem impulsionado o consumo da Kombucha, uma bebida fermentada obtida a partir da planta *Camellia sinensis*, açúcar e um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras (SCOBY). Originária da China, a Kombucha conquistou o mercado global e, em 2024, movimentou cerca de 2,97 bilhões de dólares, com projeção de crescimento contínuo. Esse cenário destaca a importância do controle de qualidade na produção desta bebida, visando garantir a segurança do consumidor, a conformidade com a legislação e a consistência do produto final. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos aplicáveis ao controle de qualidade de Kombuchas comerciais brasileiras. Foi analisada uma ampla variedade de amostras de 30 marcas diferentes provenientes de várias regiões do Brasil, oferecendo uma visão abrangente da composição dos produtos disponíveis no mercado. As amostras possuíam teor alcoólico declarado de até 0,5% v/v (classificadas como não alcoólicas). Foi desenvolvido e validado um método para a determinação simultânea do teor alcoólico e a acidez volátil de Kombuchas utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID). Os teores de etanol variaram de 0,10 a 1,70 %v/v, sendo que 60% das amostras excederam o limite permitido para bebidas não alcoólicas. A acidez volátil apresentou valores entre 17 e 71 mEq/L, com metade das amostras fora da faixa recomendada (30 a 130 mEq/L). Os teores de açúcares totais foram quantificados por espectrofotometria UV-VIS com o reagente DNS, apresentando variações entre 20 g/L e 84 g/L. Foi desenvolvido também um método para avaliação do perfil de açúcares e edulcorantes (cuja adição não é permitida em Kombuchas no Brasil) utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Não foram encontrados os edulcorantes investigados (eritritol, xilitol e sucralose) em nenhuma das amostras. Os teores de glicose variaram entre 2,5 e 23,9 g/L, enquanto os de frutose ficaram entre 2,5 e 29,8 g/L. Já sacarose foi quantificada em 28 amostras, com concentrações de 3,6 a 29,9 g/L, enquanto as demais estavam acima da faixa de trabalho do método. Além disso, foram desenvolvidos e validados modelos quimiométricos baseados em espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para a quantificação do teor alcoólico, acidez volátil e açúcares. Os modelos apresentaram bom desempenho, com valores de RPD superiores a 2,4 e erros de predição (RMSEP) baixos, permitindo análises rápidas e com mínimo preparo de amostra. A validação confirmou a linearidade e a precisão dos modelos, com desvios inferiores a 5%. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram inconsistências entre as informações de rotulagem e a composição real das Kombuchas analisadas, ressaltando a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa. Os métodos desenvolvidos e validados demonstraram ser alternativas confiáveis e eficientes para a avaliação da conformidade com a legislação vigente, podendo oferecer contribuições significativas aos órgãos de fiscalização.

Palavras-chave: kombuchas; métodos analíticos; modelos quimiométricos; validação; legislação.

ABSTRACT

The growing interest in healthy habits and so-called functional foods has driven the consumption of Kombucha, a fermented beverage made from the *Camellia sinensis* plant, sugar, and a symbiotic consortium of bacteria and yeasts (SCOBY). Originally from China, Kombucha has gained global market presence and, in 2024, generated approximately 2.97 billion dollars, with continued growth projected. This scenario highlights the importance of quality control in the production of this beverage, aiming to ensure consumer safety, compliance with regulations, and consistency of the final product. In this context, the present study aimed to develop and validate analytical methods applicable to the quality control of commercial Brazilian Kombuchas. A wide variety of samples from 30 different brands from various regions of Brazil were analyzed, providing a comprehensive overview of the composition of products available in the market. The samples had a declared alcohol content of up to 0.5% v/v (classified as non-alcoholic). A method was developed and validated for the simultaneous determination of alcohol content and volatile acidity in Kombuchas using gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Ethanol levels ranged from 0.10 to 1.70% v/v, with 60% of the samples exceeding the legal limit for non-alcoholic beverages. Volatile acidity ranged from 17 to 71 mEq/L, with half of the samples falling outside the recommended range (30 to 130 mEq/L). Total sugar content was quantified by UV-VIS spectrophotometry using the DNS reagent, showing variations between 20 g/L and 84 g/L. A method was also developed to evaluate the sugar and sweetener profile (whose addition is not permitted in Kombuchas in Brazil) using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). None of the investigated sweeteners (erythritol, xylitol, or sucralose) were detected in any of the samples. Glucose levels ranged from 2.5 to 23.9 g/L, while fructose ranged from 2.5 to 29.8 g/L. Sucrose was quantified in 28 samples, with concentrations from 3.6 to 29.9 g/L, while the remaining samples were above the method's working range. Additionally, chemometric models based on mid-infrared (MIR) spectroscopy and partial least squares (PLS) regression were developed and validated for the quantification of alcohol content, volatile acidity, and sugars. The models demonstrated good performance, with RPD values above 2.4 and low root mean square error of prediction (RMSEP), enabling rapid analyses with minimal sample preparation. Validation confirmed the linearity and precision of the models, with deviations below 5%. The results obtained in this study revealed inconsistencies between labeling information and the actual composition of the analyzed Kombucha samples, underscoring the need for stricter regulatory oversight. The developed and validated methods proved to be reliable and efficient alternatives for evaluating compliance with current legislation and may offer significant contributions to regulatory agencies.

Key-words: kombuchas; analytical methods; chemometric models; validation; legislation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biofilme celulósico produzido durante a fermentação da Kombucha. Fonte: Autor.....	29
Figura 2. Esquema resumido de preparo da Kombucha. Fonte: Adaptado de referência [36].....	32
Figura 3. Esquema de formação dos principais componentes da Kombucha. Fonte: Adaptado das referências [4,35].....	34
Figura 4: Cromatograma do Padrão Misto (0,6% v/v de Etanol e Ácido Acético) em Matriz (vermelho) e em Solvente (azul) obtido pelo método GC-FID. Fonte: Obtido pelo utilizando o software OriginPro 8.5.....	64
Figura 5. Avaliação da linearidade das curvas do teor alcóolico obtidas pelo método GC-FID. Quadrados pretos representam a curva de calibração com solvente, e círculos vermelhos representam a curva de calibração com matriz correspondente. A/PI significa analito/padrão interno. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software OriginPro 8.5.....	65
Figura 6. Avaliação da linearidade das curvas de acidez volátil obtidas pelo método GC-FID. Quadrados pretos representam a curva de calibração com solvente, e círculos vermelhos representam a curva de calibração com matriz correspondente. A/PI significa analito/padrão interno. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software OriginPro 8.5.....	66
Figura 7: Boxplot do teor alcoólico (% v/v) de amostras comerciais de Kombucha com valores acima do LQ do método GC-FID. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software Origin 8.5.....	70
Figura 8: Boxplot da acidez volátil (mEq/L) de amostras comerciais de Kombucha com valores acima do LQ do método GC-FID. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software Origin 8.5.....	71
Figura 9: Reação de hidrólise da sacarose. Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [4] e [5] utilizando o software ChemSketch.....	74
Figura 10: Avaliação da linearidade das curvas dos teores de açúcares totais utilizando o método espectrofotométrico com DNS. A curva no solvente é representada por quadrados pretos, e a curva na matriz é representada por círculos vermelhos. Fonte: Obtida pelo autor utilizando o software origin 8.5.....	85
Figura 11: Boxplot dos teores de açúcares totais (g/L) em amostras comerciais de Kombucha com valores acima do LQ do método espectrofotométrico com DNS. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software origin 8.5.....	88
Figura 12: Estrutura química dos edulcorantes xilitol, eritritol e sucralose. Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [105,106,107,108] utilizando o software ChemSketch.....	90

Figura 13: Estruturas químicas dos derivatizantes mais utilizados no processo de silição.. Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [114] utilizando o software ChemSketch.....	92
Figura 14: Equilíbrio entre as formas aberta e cíclica da glicose em solução. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software ChemSketch.....	93
Figura 15: Reações de oximação e silição da glicose Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [114] utilizando o software ChemSketch.....	94
Figura 16: Sistema de aquecimento com fluxo de ar e bomba adaptada para a secagem das amostras, visando o preparo posterior para análise por GC-MS. Fonte: Obtida pelo autor.....	98
Figura 17: Espectro de massas da sacarose após derivatização utilizando oximação e silição. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.....	101
Figura 18. . (a) Cromatograma da análise dos padrões de açúcares e edulcorantes preparados em solvente. Identificação dos picos: E = eritritol, X = xilitol, F = frutose, G = glicose, I = inositol, Sa = sacarose e Su = sucralose. A área destacada em vermelho representa a ampliação mostrada em (b), destacando a separação dos isômeros <i>sin</i> e <i>anti</i> da glicose e frutose. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.....	103
Figura 19. Boxplot dos teores de glicose nas amostras de Kombucha que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.....	104
Figura 20. Boxplot dos teores de frutose nas amostras de Kombucha que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.....	105
Figura 21. Boxplot dos teores de sacarose nas amostras de Kombucha que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.....	106
Figura 22. Perfil de açúcares nas amostras de Kombucha com valores que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.....	107
Figura 23: Espectros de infravermelho médio das 96 amostras de Kombucha. Fonte: Espectrofotômetro no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), modelo Frontier, marca PerkinElmer.....	116
Figura 24: Gráfico de valores reais (círculos pretos) versus preditos (triângulos vermelhos) do teor alcóolico (% v/v). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	118
Figura 25. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda para o modelo de determinação de teor alcóolico de Kombuchas.. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	119

Figura 26. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o modelo de determinação de teor alcóolico de Kombuchas. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	119
Figura 27: Gráfico de valores reais versus preditos da acidez (mEq/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	123
Figura 28: Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda para o modelo da acidez (mEq/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	123
Figura 29: Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o modelo da acidez (mEq/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	124
Figura 30: Dímero de ácido carboxílico formado por ligações de hidrogênio. Fonte: Adaptado de referência [134].....	124
Figura 31: Gráfico de valores reais versus preditos dos teores de açúcares totais (g/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	127
Figura 32. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda dos teores de açúcares totais. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	127
Figura 33. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para os teores de açúcares totais. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	128
Figura 34: Gráfico de valores reais versus preditos do teor de glicose (g/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	130
Figura 35. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda do teor de glicose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	131
Figura 36. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o teor de glicose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	131
Figura 37: Gráfico de valores reais versus preditos do teor de frutose (g/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	134
Figura 38. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda do teor de frutose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	135
Figura 39. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o teor de frutose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química geral da Kombucha. Fonte: Adaptada de [4,5].....	27
Tabela 2: Componentes presentes no chá verde e no chá preto. Fonte: Adaptado de referência [35].....	30
Tabela 3: Parâmetros analíticos obrigatórios no controle de qualidade da Kombucha no Brasil. Fonte: Adaptada de referência [3].....	37
Tabela 4: Técnicas analíticas empregadas na determinação do teor alcóolico de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor.....	57
Tabela 5: Técnicas analíticas empregadas na determinação da acidez de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor.....	58
Tabela 6: Parâmetros para avaliação da linearidade das curvas do etanol, tanto em solvente quanto em matriz obtidas pelo método GC-FID. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	67
Tabela 7: : Parâmetros para avaliação da linearidade das curvas de ácido acético, tanto em solvente quanto em matriz obtidas pelo método GC-FID. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	68
Tabela 8: Resumo das figuras de mérito para a validação do método para o etanol e ácido acético. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	69
Tabela 9: Técnicas analíticas para determinação de açúcares em Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor.....	79
Tabela 10 : Parâmetros para avaliação da linearidade das curvas de açúcares totais, tanto em solvente quanto em matriz.. Fonte: Elaborada pelo autor.....	86
Tabela 11: Resumo das figuras de mérito para validação do método para determinação de açúcares totais em Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	87
Tabela 12: Estudos na literatura que empregaram derivatização e quantificação por GC-MS para análise de carboidratos e outros compostos em alimentos e diversas matrizes. Fonte: Elaborada pelo autor.....	95
Tabela 13: Preparo da curva analítica. Fonte: Elaborada pelo autor.....	97
Tabela 14: Métodos quimiométricos na análise da composição química de bebidas fermentadas. Fonte: Elaborada pelo autor.....	112
Tabela 15: Parâmetros do modelo PLS para determinação do teor de alcóolico antes e depois da remoção de outliers. Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.....	118
Tabela 16: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor alcóolico de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	120

Tabela 17: Resultados para o modelo PLS para determinação da acidez de amostras de Kombuchas antes e depois da detecção de outliers. Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.....	122
Tabela 18: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação da acidez de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	125
Tabela 19: Resultados do modelo PLS para a determinação do teor de açúcares totais em Kombuchas antes e depois a remoção de outliers. Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.....	126
Tabela 20: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor de açúcares de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor.....	128
Tabela 21: Resultados do modelo PLS para a determinação do teor de glicose em Kombuchas antes e depois a remoção de outliers. Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.....	130
Tabela 22: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor de glicose de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	132
Tabela 23: Resultados do modelo PLS para a determinação do teor de frutose em Kombuchas antes e depois a remoção de outliers. Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.....	133
Tabela 24: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor de frutose de Kombuchas. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

AOAC – Associação Oficial de Químicos Analíticos (*Association of Official Analytical Chemists*)

ATR – Reflectância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*)

AVO – Inversão quadrática de dados (*Adaptive Quadratic Inversion*)

BPANN – Rede neural de retropropagação (*Backpropagation Artificial Neural Network*)

Cal – Calibração

CV – Coeficiente de Variação

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FID – Detector de ionização de chamas (*Flame Ionization Detector*)

FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GC – Cromatografia a gás (*Gas Chromatography*)

GC-FID – Cromatografia a gás acoplada a detector de ionização de chamas (*Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-RID – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de índice de refração (*High-Performance Liquid Chromatography-Refractive Index Detector*)

HS – Headspace (*Headspace*)

HS-SPME-GC/MS – Microextração em fase sólida acoplada a Headspace e cromatografia a gás com detector de massas (*Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

KBI – Kombucha Brewers International

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIR – Infravermelho médio

MMQO – Método de Mínimos Quadrados Ordinários

NIRS – Espectroscopia no infravermelho próximo (*Near-Infrared Spectroscopy*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise por componentes principais (*Principal Component Analysis*)

PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Regression*)

PLS-DA – Análise discriminante de regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*)

Pred – Predição

RMSEC – Raiz do erro quadrático médio de calibração (*Root Mean Square Error of Calibration*)

RMSEP – Raiz do erro quadrático médio de predição (*Root Mean Square Error of Prediction*)

RNAs – Redes neurais artificiais (*Artificial Neural Networks*)

RPD – Relação de Desempenho do Desvio (*Residual Predictive Deviation*)

SDV – Desvio Padrão da Validação (*Standard Deviation of Validation*)

SSA – Análise espectral singular (*Singular Spectrum Analysis*)

UPLC-RID – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de índice de refração (*Ultra Performance Liquid Chromatography-Refractive Index Detector*)

UV/Vis – Espectroscopia no ultravioleta visível (*Ultraviolet-Visible Spectroscopy*)

VIP escores – Importância dos Vetores na Projeção dos escores (*Variable Importance in Projection Scores*)

WOA – Algoritmo de otimização de baleia (*Whale Optimization Algorithm*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	23
1.3 OBJETIVOS.....	24
1.3.1 Objetivo Geral.....	24
1.3.2 Objetivos Específicos.....	25
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 A KOMBUCHA.....	26
2.1.1 Ingredientes para a produção da Kombucha.....	28
2.1.2 Produção da Kombucha.....	30
2.1.3 Processo fermentativo da Kombucha.....	32
2.1.4 Mercado consumidor da Kombucha.....	35
2.1.5 Regulamentação nacional da Kombucha.....	36
2.2 CROMATOGRAFIA À GÁS COM DETERCTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (GC-FID).....	38
2.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPCTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS).....	40
2.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	41
2.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO.....	42
2.6 QUIMIOMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	43
2.6.1 Calibração pelo método de regressão por mínimos quadrados parciais, Partial Least Squares (PLS).....	46
2.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	47
2.7.1 Seletividade.....	48
2.7.2 Efeito de matriz.....	48
2.7.3 Linearidade/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade.....	48
2.7.4 Limite de Detecção (LD).....	49
2.7.5 Limite de Quantificação (LQ).....	50

2.7.6 Tendência/Recuperação.....	50
2.7.7 Precisão.....	51
2.8 VALIDAÇÃO ANALÍTICA MULTIVARIADA.....	52
3 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DO TEOR ALCOÓLICO E ACIDEZ VOLÁTIL DE AMOSTRAS DE KOMBUCHA POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS.....	55
3.1 OBJETIVOS.....	59
3.2 AMOSTRAS.....	59
3.3 MATERIAIS E REAGENTES.....	59
3.4 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	60
3.5 PREPARO GERAL DE AMOSTRAS.....	60
3.6 PREPARO DE AMOSTRAS PARA O MÉTODO GC-FID.....	61
3.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	61
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	61
3.8.1 Linearidade/Faixa linear de trabalho.....	62
3.8.2 Efeito de matriz.....	62
3.8.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	62
3.8.4 Recuperação/Tendência.....	63
3.8.5 Precisão.....	63
3.9 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
3.9.1 Análise cromatográfica.....	63
3.9.2 Validação do método.....	64
3.9.3 Aplicação do método validado para a determinação do teor alcoólico e a acidez volátil de amostras de Kombucha por GC-FID.....	70
3.10 CONCLUSÕES.....	72
4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM KOMBUCHAS.....	74
4.1 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM DNS (ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO) PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS EM KOMBUCHAS.....	77

4.1.1 OBJETIVOS.....	80
4.1.2 EQUIPAMENTOS.....	80
4.1.3 MATERIAIS E REAGENTES.....	80
4.1.3.1Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1% <i>m/v</i>	80
4.1.4 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	81
4.1.5 PREPARO DE AMOSTRAS.....	81
4.1.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS.....	82
4.1.6.1 Hidrólise ácida.....	82
4.1.6.2 Método espectrofotométrico com DNS.....	82
4.1.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	83
4.1.7.1 Linearidade/Faixa linear de trabalho.....	83
4.1.7.2 Efeito de matriz.....	83
4.1.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	84
4.1.7.4 Recuperação.....	84
4.1.7.5 Precisão.....	84
4.1.8 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	85
4.8.1.1 Validação do método.....	85
4.8.1.2 Aplicação do método validado para a determinação do teor de açúcares totais.....	88
4.2 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE AÇÚCARES E EDULCORANTES EM KOMBUCHAS POR GC-MS.....	90
4.2.1 OBJETIVOS.....	96
4.2.2 MATERIAIS E REAGENTES.....	96
4.2.2.1Preparo da solução Cloridrato de O-metil-hidroxilamina(30mg/mL).....	96
4.2.2.2 Preparo da solução de padrão interno inositol (5 mg/mL).....	97

4.2.3 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	97
4.2.4 PREPARO DE AMOSTRAS.....	99
4.2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	99
4.2.6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	100
4.2.6.1 Validação parcial do método GC-MS.....	100
4.2.6.2 Análise cromatográfica.....	100
4.2.6.3 Aplicação do método para determinação do perfil de açúcares e edulcorantes em Kombuchas por GC-MS.....	104
4.3 CONCLUSÕES.....	109
5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE EM KOMBUCHAS.....	110
5.1 OBJETIVOS.....	114
5.2 EQUIPAMENTOS.....	114
5.3 PREPARO DE AMOSTRAS.....	114
5.4 TRATAMENTO DOS DADOS.....	114
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	115
5.5.1 Espectros de transmitância no infravermelho obtidos por FTIR.....	115
5.5.2 Modelo PLS para determinação do teor alcoólico de Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio.....	116
5.5.3 Modelo PLS para determinação da acidez volátil de Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio.....	121
5.5.4 Modelo PLS para determinação do teor de açúcares totais de Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio.....	126
5.5.5 Modelo PLS para determinação do teor de glicose em Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio.....	129
5.5.6 Modelo PLS para determinação do teor de frutose em Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio.....	133
5.6 CONCLUSÕES.....	136

6	CONCLUSÕES GERAIS.....	138
	REFERÊNCIAS.....	140
	APÊNDICE A – Informações complementares ao capítulo 4.....	151

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, observa-se um crescente interesse da população por hábitos mais saudáveis e pelo consumo de alimentos considerados funcionais, capazes não apenas de nutrir, mas também de promover benefícios à saúde [1]. Nesse contexto, a Kombucha tem ganhado destaque como uma alternativa ao consumo de refrigerantes e bebidas lácteas fermentadas, especialmente para indivíduos com intolerância à lactose. Sua popularidade crescente reflete não apenas uma tendência social, mas também o aumento do interesse comercial em disponibilizar bebidas gaseificadas mais saudáveis [2].

A Kombucha é uma bebida fermentada obtida a partir da infusão ou do extrato da planta *Camellia sinensis*, com adição de açúcares e um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras, conhecido como SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) [3,4]. Tradicionalmente, o chá preto e o chá verde são os tipos mais utilizados na sua produção, ambos derivados da planta *Camellia sinensis*, diferenciando-se pelo grau de oxidação das folhas [5].

Acredita-se que a Kombucha tenha se originado na região da Manchúria, na China, há mais de 2000 anos, embora existam registros históricos do seu consumo em países como Alemanha, Rússia e Oriente Médio [6]. Na década de 1960, o consumo de bebidas fermentadas aumentou em toda a Europa, ampliando ainda mais a popularidade da Kombucha. Atualmente, a bebida é comercializada em diversos países, com um mercado em constante expansão, especialmente no Brasil, impulsionado pelas estratégias de marketing digital das empresas produtoras [5,7].

Embora seja uma bebida fermentada, o sabor do chá da Kombucha é considerado satisfatório, levemente ácido e levemente alcoólico, semelhante ao sabor da cidra de maçã, isso se dá principalmente pela presença de compostos voláteis como álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas e ésteres [6,8]. A incorporação de ingredientes, como limão, gengibre, frutas, café e embalagens inovadores tendem a aumentar a demanda de consumo, além das melhorias e otimização do processo de produção, reduzindo as ineficiências observadas durante a fermentação [7].

A Kombucha é conhecida mundialmente como um alimento funcional com uma ampla variedade de benefícios terapêuticos. Alguns estudos da literatura

atribuem à bebida propriedades como a prevenção de doenças, redução da pressão arterial, efeito hipoglicemiante e ação antioxidante, devido aos polifenóis. Além de apresentar atividade desintoxicante, graças ao ácido glucurônico, atividade antimicrobiana, associada aos ácidos orgânicos, especialmente o ácido acético. Também são descritas propriedades probióticas, associadas à presença de microrganismos vivos que auxiliam no equilíbrio da flora intestinal [6,8,9,10]. No entanto, no Brasil, a bebida ainda não é oficialmente classificada como probiótica e os estudos disponíveis ainda não são suficientes para confirmar essa classificação [3].

Para garantir a segurança no consumo da Kombucha é necessário um controle de qualidade apropriado. Apesar do aumento da produção industrial dessa bebida, ela ainda é frequentemente fabricada de forma artesanal. Isso exige cuidados, pois durante o processo de fabricação, a Kombucha pode ser contaminada por microrganismos indesejados até que atinja um $\text{pH} \leq 4,2$, o que inibe a proliferação desses microrganismos [4,6]. Por isso, é fundamental garantir boas práticas de higiene e preparo da bebida, a fim de evitar riscos à saúde decorrentes da ingestão de produtos contaminados. Além disso, alguns efeitos adversos, como dores de cabeça, náuseas e tonturas, foram reportados após o consumo da bebida, o que requer investigação mais detalhada [4,5].

1.2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Diante do crescente aumento da comercialização e consumo de Kombucha no Brasil, torna-se essencial o desenvolvimento de metodologias analíticas confiáveis, simples e rápidas para garantir o controle de qualidade dessa bebida.

Segundo um relatório da Mordor Intelligence (2024), o mercado mundial de Kombucha movimentou aproximadamente 2,97 bilhões de dólares em 2024, com uma previsão de crescimento anual composto (CAGR) de 9,48% até 2029 [11].

No Brasil, a produção de Kombucha também tem aumentado significativamente. O Anuário de Bebidas Não Alcoólicas (2024), publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), relatou um crescimento de 923,5% no número de fábricas de Kombucha no período entre 2019 e 2023 [12].

A preferência do consumidor por bebidas ditas funcionais impulsiona esse crescimento, com empresas investindo cada vez mais em marketing e variedade de sabores [13,14,15].

Nesse contexto, é fundamental que os consumidores tenham acesso transparente à composição real dos produtos para fazerem escolhas conscientes, especialmente diante de alegações sobre os benefícios da Kombucha e sua substituição aos refrigerantes. Essas propriedades funcionais devem ser respaldadas por evidências científicas e aprovadas pelos órgãos regulatórios. Este estudo tem o potencial de oferecer contribuições significativas aos órgãos de fiscalização, auxiliando na garantia da segurança do consumo dessa bebida.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para a avaliação dos parâmetros de qualidade de Kombuchas comerciais brasileiras. Para isso, foram empregadas técnicas analíticas, como Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC-FID), Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS), Espectroscopia UV-VIS e Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR), combinadas com modelos quimiométricos.

1.3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método para quantificação simultânea do teor alcoólico e acidez volátil de amostras de Kombuchas por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chamas (GC-FID);

- Validar e aplicar um método para a quantificação de açúcares totais em Kombucha por espectrofotometria UV-VIS com o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico);
- Desenvolver e validar um método para avaliação do perfil de açúcares e edulcorantes em amostras de Kombuchas utilizando Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)
- Desenvolver e validar modelos quimiométricos utilizando espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e regressão por mínimos quadrados parciais, *Partial Least Squares* (PLS), para quantificar o teor alcóolico, a acidez volátil, os açúcares totais, o teor de glicose e de frutose de Kombuchas;
- Avaliar a conformidade dos resultados obtidos com a legislação brasileira e com os estudos presentes na literatura.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A KOMBUCHA

A Kombucha é uma bebida levemente adocicada e ácida, tradicionalmente obtida por meio da fermentação do chá de *Camellia sinensis*, adicionado de açúcar, utilizando uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) [3,4]. Este consórcio microbiano misto é composto por diversas cepas bacterianas e leveduras que desempenham um papel fundamental na fermentação da bebida [5]. A origem da Kombucha remonta à China, durante a dinastia Tsin, por volta de 220 a.C., e desde então sua popularidade tem se espalhado por diversas regiões do mundo, incluindo Coréia, Japão, Rússia, Europa e América do Norte. Atualmente, a Kombucha é consumida em todo o mundo [5].

Diante do crescente interesse na bebida e das suas potenciais aplicações, os principais temas de pesquisa relacionados à Kombucha incluem a análise da sua composição química. Os pesquisadores estão investigando os compostos presentes em diferentes estágios de fermentação, o que envolve a identificação e a quantificação de ácidos orgânicos, polifenóis, vitaminas, enzimas, etanol entre outros constituintes essenciais. Embora as alterações nas condições de fermentação possam afetar o produto, os principais componentes presentes na Kombucha podem ser observados na Tabela 1 [4,5].

Tabela 1: Composição química geral da Kombucha

Componente	Concentração		Tempo de fermentação (dias)	Referência
	Chá preto	Chá verde		
Ácido acético	8,0 g/L	5,4 g/L	15	[16]
Etanol	0,3 %v/v	0,2 %v/v		
Fenólicos totais	1,12 g GAE/L	1,08 g GAE/L		
Ácido acético	9,18 g/L	7,65 g/L	14	[17]
Etanol	0,58 %v/v	0,4 %v/v		
Fenólicos totais	67,20 mg GAE/g	64,20 mg GAE/g		
Ácido acético	6 a 15 g/L	N/A	21	[9]
Etanol	1,4 %v/v	N/A		
Fenólicos totais	36 a 221mg GAE/g	N/A		
Ácido acético	3,6 g/L	3,2 g/L	10	[18]
Ácido glucurônico	1,17 g/L	0,47 g/L		
Ácido láctico	0,015 g/L	0,02 g/L		
Etanol	0,49 %v/v	0,70 %v/v		
Fenólicos totais	1,09 mg GAE/mL	0,70 mg GAE/mL		
Ácido acético	9,08 g/L	9,14 g/L	14	[19]
Ácido acético	N/A	11,15 g/L	15	[20]
Vitamina C	N/A	0,61 g/L		
Ácido acético	1,55 g/L	N/A	7	[21]
Ácido tartárico	0,23 g/L	N/A		
Ácido cítrico	0,05 g/L	N/A		
Ferro	0,31 mg/L	N/A		
Manganês	1,57 mg/L	N/A		
Zinco	0,53 mg/L	N/A		
Fenólicos totais	412 mg GAE/L	N/A		
Proteínas	N/A	3 mg/mL	20	[22]
Minerais (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn)	N/A	0,1 a 0,4 µg/mL	15	[23]
Vitaminas (B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C)	N/A	0,52 a 25 mg/mL		
Ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , SO ₄ ²⁻)	N/A	0,04 a 3,20 mg/g	7	[24]

Fonte: Adaptada de [4,5] Observações: N/A – Não se aplica; GAE/mL corresponde a equivalente de ácido gálico por mL de extrato.

Outros trabalhos têm se dedicado à identificação e caracterização dos microrganismos presentes na Kombucha, [25, 26]. A compreensão da microbiota durante o processo de fermentação é importante para otimizar a produção e garantir a qualidade da bebida. Além disso, há pesquisas que abordam os fatores que influenciam a cinética da fermentação [27, 28].

Alguns estudos sugerem que a Kombucha pode melhorar a função hepática [29], fortalecer o sistema imunológico e promover a saúde gastrointestinal [30, 31]. Além disso, possui propriedades desintoxicantes e anti-inflamatórias [32], bem como pode ajudar a reduzir os níveis de colesterol e pressão arterial [33]. Esses benefícios são atribuídos em parte à atividade antioxidante da Kombucha, que é explicada pelo alto teor de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, presentes nos substratos utilizados na sua produção [33]. Evidências sugerem que essa capacidade antioxidante pode justificar os potenciais efeitos antidiabéticos e anticancerígenos da Kombucha [33,34].

Apesar dos diversos benefícios atribuídos à Kombucha, a maioria das evidências disponíveis é baseada em estudos realizados em animais ou em culturas de células, havendo ainda uma carência de comprovações conclusivas sobre seus efeitos na saúde humana [9]. Além disso, o consumo da bebida é contraindicado para certos grupos, como gestantes, lactantes, crianças, pacientes com insuficiência renal e indivíduos imunocomprometidos. Essa restrição se deve à possibilidade da bebida apresentar acidez elevada e teor alcoólico superior a 0,5% v/v, especialmente quando preparada de maneira caseira, sem o controle adequado durante a produção, o que pode acarretar efeitos adversos principalmente para esses grupos [4,5].

2.1.1 Ingredientes para a produção da Kombucha

De acordo com a Instrução Normativa nº 41/2019, os ingredientes obrigatórios na produção da Kombucha incluem água potável, infusão ou extrato aquoso de *Camellia sinensis* e açúcares (conforme a RDC nº 271/2005), sendo a sacarose mais frequentemente utilizada. Além disso, é necessária a cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY), que deve ser adequada para fermentação alcoólica e acética, desde que sua inocuidade à saúde humana seja garantida [3].

A cultura simbiótica pode estar presente tanto no biofilme celulósico característico formado durante a fermentação da Kombucha quanto no líquido fermentado. Um exemplo desse biofilme está disponível na Figura 1.



Figura 1: Biofilme celulósico produzido durante a fermentação da Kombucha. Fonte: Autor.

Durante o processo de fermentação, os microrganismos podem permanecer na bebida final; no entanto, é proibida a adição de novos microrganismos após a etapa de fermentação. Por outro lado, o uso de processos tecnológicos, como pasteurização, filtração e ultracentrifugação, é permitido [3].

Além dos ingredientes obrigatórios, a produção de Kombucha pode contar com ingredientes opcionais, como infusões de espécies vegetais ou seus extratos (RDC nº 267/2005 e nº 219/2006), frutas, especiarias (RDC nº 276/2005), mel, melado e outros açúcares de origem vegetal, gás carbônico (CO₂) de qualidade industrial, fibras, vitaminas, sais minerais e outros nutrientes (RDC nº 54/2012 - quando se trata de Kombucha não alcoólica) [3].

Comumente, utiliza-se o chá verde ou o chá preto, ambos derivados das folhas da planta *Camellia sinensis*. A principal diferença entre esses dois tipos de chá está no método de processamento das folhas. O chá preto é produzido pela exposição das folhas esmagadas a alta umidade, promovendo a oxidação dos

polifenóis pela ação da enzima polifenol oxidase. Já o chá verde é obtido por vaporização das folhas frescas antes da secagem, processo que inativa as enzimas e impede a oxidação. Esses chás apresentam uma composição diversificada de polifenóis, além de cafeína, conforme mostrado na Tabela 2 [35]. Os benefícios à saúde associados aos chás estão principalmente relacionados às catequinas derivadas dos polifenóis presentes nas folhas, cuja estrutura e composição podem variar conforme o processo de oxidação [35].

Na literatura, são descritos estudos que exploram o uso de outros substratos na produção de Kombucha. Esses estudos evidenciam a utilização de uma variedade de ingredientes, como flores de malva, café, folhas de carvalho, eucalipto, louro, sucos de frutas, leite e derivados de soja [5].

Tabela 2: Componentes presentes no chá verde e no chá preto.

Compostos	Chá verde (extrato seco mg/g)	Chá preto (extrato seco mg/g)
Catequinas	105,85 ± 35,69	10,18 ± 6,68
Epicatequina	13,44 ± 10,58	0,31 ± 0,31
Epigallocatequina	50,29 ± 13,88	3,46 ± 1,86
Galato de epicatequina	5,78 ± 4,18	1,21 ± 1,29
Galato de epigallocatequina	18,10–35,46	5,52–9,18
Teaflavinas	5,37 ± 1,73	0,52 ± 0,77
Cafeína	34,86 ± 4,32	28,54 ± 3,68

Fonte: Adaptado de referência [35].

2.1.2 Produção da Kombucha

Na fabricação da Kombucha, são necessários chá, açúcar, um recipiente fermentador e uma cultura starter (SCOBY), que pode ser obtida a partir do biofilme celulósico ou do próprio líquido de uma Kombucha previamente fermentada.

De acordo com um estudo de revisão conduzido por Miranda em 2022 [5], que compilou trabalhos sobre o preparo e a fermentação da Kombucha, as infusões de chá verde ou preto podem ser preparadas em uma ampla faixa de concentração. Podendo variar de 1,0 a 100 g/L, sendo a concentração mais comum de cerca de 10 g/L, em água previamente fervida. Quanto à adição de açúcar (sacarose), ela pode

ocorrer em concentrações que variam de 10 a 200 g/L, sendo mais frequente encontrar faixas de 50 a 100 g/L [5].

Após a preparação da mistura de chá e açúcar, ela é filtrada e transferida para o recipiente fermentador. Em seguida, adiciona-se a cultura iniciadora (SCOBY), composta pelo biofilme celulósico, em concentrações de 2,5 a 100 g/L. É indicado que se adicione também uma porção de Kombucha previamente fermentada, em quantidades entre 30 e 300 g/L [5,35,36,37,38]. Ambos podem ser provenientes de uma fermentação anterior ou adquiridos comercialmente. O recipiente então é coberto com um tecido poroso para permitir a fermentação aeróbia.

O processo fermentativo ocorre a uma temperatura próxima a 25 °C, em um período ideal de 7 a 15 dias. Durante esse tempo, um novo biofilme se desenvolve na superfície da bebida. Após esse período, o líquido pode ser filtrado e transferido para uma garrafa e refrigerado.

Neste estágio, ainda é possível realizar uma segunda fermentação anaeróbia para carbonatar e saborizar a Kombucha, adicionando-se uma fonte extra de açúcar, como polpa de frutas, sucos ou a própria sacarose. A mistura deve ser armazenada em um recipiente fechado e deixada à temperatura ambiente por cerca de 2 a 3 dias até que a carbonatação ocorra [5, 35, 36, 37, 38].

Após a produção, a Kombucha deve ser armazenada em ambiente refrigerado a 4 °C para melhorar seu aspecto sensorial e reduzir a velocidade de fermentação, pois as bactérias e leveduras ainda são ativas na bebida. Outro fator muito importante a ser considerado no preparo é o uso de utensílios higienizados, além de se trabalhar em áreas limpas e seguir as boas práticas de fabricação, a fim de evitar contaminações indesejadas [5, 35,36,37,38]. Na Figura 2 é apresentado um exemplo de preparo da Kombucha.

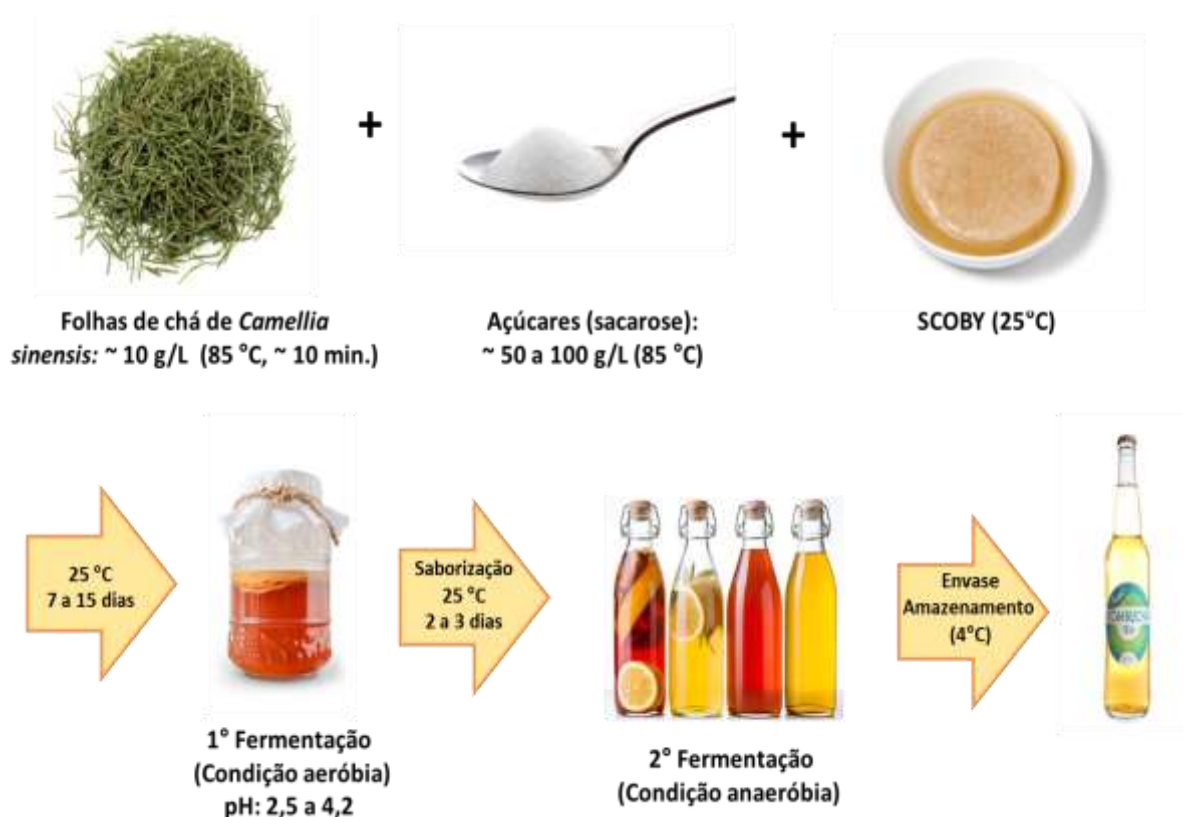


Figura 2. Esquema resumido de preparo da Kombucha. Fonte: Adaptado de referência [36].

2.1.3 Processo fermentativo da Kombucha

Diversos fatores podem influenciar a fermentação da Kombucha, como temperatura, pH, oxigênio, substrato, concentração de açúcar, microbiota presente no SCOBY, tamanho do recipiente e tempo de fermentação. Alterações nesses fatores podem afetar as características sensoriais, propriedades químicas e qualidade nutricional da bebida, bem como influenciar suas atividades biológicas [4].

O tempo de fermentação da Kombucha pode variar entre 7 a 60 dias, no entanto, estudos indicam que os melhores resultados em relação ao sabor e aos níveis desejados de acidez, são geralmente obtidos em torno de 7 a 15 dias de fermentação. Durante esse processo, as atividades biológicas dentro do chá podem aumentar, resultando em uma diversidade de compostos e características sensoriais. É importante notar que embora as atividades antioxidantes aumentem com o tempo de incubação, a fermentação prolongada não é recomendada devido

ao acúmulo de ácidos orgânicos, que podem atingir níveis prejudiciais para o consumo direto. Além disso, o acúmulo de CO_2 pode ocorrer na interface entre o biofilme e o caldo, dificultando a transferência de nutrientes e criando um ambiente desfavorável para o crescimento microbiano [4, 38].

A temperatura desempenha um papel crucial no processo de fermentação. Manter a temperatura ideal ao longo de todo o processo resulta em um melhor crescimento microbiano e atividade enzimática, o que melhora os benefícios da fermentação. Estudos indicam que a faixa ideal de temperatura para a fermentação da Kombucha varia entre 22 °C e 30 °C. No entanto, pesquisas também mostraram que temperaturas mais altas podem resultar em maiores quantidades de ácidos e metabólitos, bem como de vitamina C, nas amostras fermentadas [4,38].

O pH é outro parâmetro importante que influencia significativamente a fermentação da Kombucha. Ácidos como o acético e o glucônico, formados durante o processo de fermentação, têm um impacto direto nas propriedades biológicas e sensoriais da bebida resultante. O pH ideal para a Kombucha situa-se na faixa de 4 a 5, visando evitar a multiplicação de microrganismos indesejados. É recomendado manter o pH da Kombucha acima de 3, considerando que este se assemelha ao pH do trato digestivo humano (normalmente entre 1,5 e 3,5). Valores de pH inferiores a 3 podem prejudicar o sistema digestivo devido à acidez excessiva, levando a possíveis irritações na mucosa gástrica, aumento do risco de úlceras e interferência na absorção adequada de nutrientes pelo organismo [4,38,39].

A transferência de oxigênio é essencial para os processos aeróbios de fermentação. A oxidação da glicose e do etanol durante a fermentação requer a presença de oxigênio, que deve ser fornecido em quantidades adequadas para satisfazer as demandas metabólicas dos microrganismos envolvidos no processo de fermentação. Estudos mostram que a taxa de fermentação da Kombucha é afetada pela área de contato entre o líquido e o oxigênio disponível. Recipientes mais largos favorecem um maior contato entre os microrganismos no biofilme celulósico e o oxigênio, otimizando esse processo [4].

Durante a fermentação, as leveduras, por meio da enzima invertase, catalisam a hidrólise da sacarose em frutose e glicose, produzindo etanol por via glicolítica. As bactérias acéticas, por sua vez, oxidam o etanol para produzir ácido acético e também podem converter glicose em ácido glucônico e ácido glucurônico

[5], enquanto as bactérias lácticas geram ácido láctico. A concentração final de açúcar pode variar de uma fermentação para outra, indicando que as vias metabólicas não ocorrem da mesma forma em todos os processos [4]. O resultado da fermentação é uma bebida levemente gaseificada, ácida e refrescante, composta por diversos ácidos, aminoácidos, vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas [4,40]. Na Figura 3 está exemplificado um esquema de formação dos principais componentes da Kombucha.

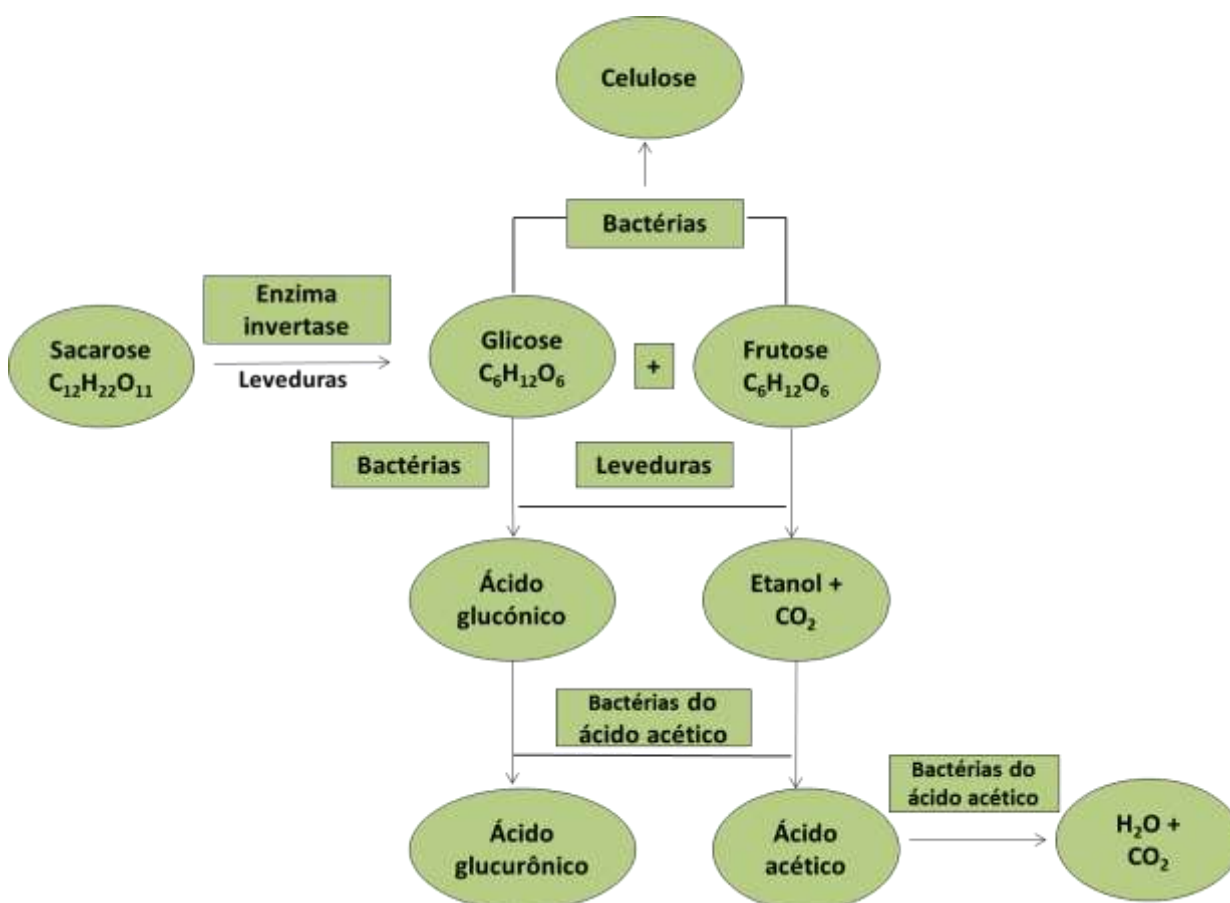


Figura 3. Esquema de formação dos principais componentes da Kombucha. Fonte: Adaptado das referências [4,35].

A composição microbiológica do SCOBY pode variar entre fermentações, mas geralmente inclui uma variedade de leveduras e bactérias. As bactérias predominantes são as *Acetobacter*, que são bactérias aeróbias capazes de usar o álcool como substrato para formar ácido acético. Dentre as bactérias presentes podem se citar: *Komagataeibacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Gluconobacter*

oxydans, *Gluconacetobacter hansenii*, *Oenococcus oeni*, *Komagataeibacter europaeus* [4,36, 39, 40, 41,42].

A maioria das espécies de leveduras pode fermentar açúcar em etanol, mas muitos processos modernos de fermentação alcoólica são iniciados por uma única cultura starter, sendo comumente *Saccharomyces cerevisiae* devido a sua alta eficiência. Existem muitos gêneros e espécies de leveduras no SCOBY, incluindo *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces* [4,36, 39, 40, 41, 42].

A produção de biofilme de celulose durante a fermentação é realizada por bactérias como *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Salmonella* e *Gluconacetobacter*, predominando a *Acetobacter xylinum* (renomeada para *Komagataeibacter xylinus*), que polimerizam glicose para formar fibrilas de celulose extracelularmente. A celulose microbiana é produzida a partir de uma variedade de fontes de carbono, incluindo glicose, etanol, sacarose e glicerol [4].

2.1.4 Mercado consumidor da Kombucha

De acordo com a *Kombucha Brewers International* (KBI), uma associação comercial sem fins lucrativos, dedicada à promoção e proteção do comércio de Kombucha em todo o mundo, essa bebida é uma das que mais cresce no setor de bebidas [13]. Segundo um relatório da Mordor Intelligence (2024), o mercado mundial de Kombucha movimentou aproximadamente 2,97 bilhões de dólares em 2024, com uma previsão de crescimento anual composto (CAGR) de 9,48% até 2029 [11].

No Brasil, o mercado ainda é relativamente novo. Em 2018, foi fundada a Associação Brasileira de Kombucha (ABKOM), que atualmente reúne cerca de 30 produtores. Um dos principais objetivos dessa iniciativa é regulamentar a bebida, assegurando que todas as marcas sigam um padrão de qualidade. Além disso, em 2019, ocorreu o primeiro Concurso Brasileiro de Kombucha, com a proposta de incentivar os produtores comerciais a monitorar a qualidade de seus produtos [12]. De acordo com o Anuário de Bebidas Não Alcoólicas (2024), publicado pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o número de fábricas de Kombucha no país aumentou 923,5%, no período entre 2019 e 2023 [12].

A crescente preferência dos consumidores por bebidas funcionais, em detrimento de refrigerantes e sucos, deve impulsionar o crescimento desse setor. As empresas têm investido cada vez mais no marketing de Kombucha por meio das redes sociais, o que tem gerado maior interesse nos consumidores. Inovações nas embalagens e uma diversificação de sabores, como limão, gengibre, frutas, café e outros, também são esperadas para aumentar ainda mais a demanda [14].

2.1.5 Regulamentação nacional da Kombucha

No Brasil, a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41 DE 17 DE SETEMBRO DE 2019 estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. Essa regulamentação define critérios específicos relacionados aos ingredientes, processo de produção, características físico-químicas e microbiológicas, além dos requisitos de rotulagem e comercialização da bebida. Essas diretrizes se aplicam exclusivamente à Kombucha submetida a processos industriais tecnologicamente adequados e destinada ao consumo humano como bebida [3].

As Kombuchas podem ser classificadas em três categorias: não alcoólicas, zero álcool e alcoólicas, sendo obrigatória a declaração do teor alcoólico no rótulo. Para as Kombuchas não alcoólicas, o teor de álcool deve ser de até 0,5% v/v, com uma tolerância de 0,1% v/v. Também é permitido usar a frase de advertência: "Pode conter álcool em até 0,5% v/v." Já as expressões "zero álcool", "zero % álcool", "0,0%" ou similares só podem ser utilizadas em produtos com teor alcoólico de até 0,05% v/v. Para as Kombuchas alcoólicas, o teor de álcool pode variar entre 0,6% e 8,0% v/v. A Kombucha não alcoólica elaborada somente com os ingredientes obrigatórios, ou seja, isenta de quaisquer ingredientes opcionais, poderá ser designada KOMBUCHA ORIGINAL [3].

A normativa proíbe alegações funcionais e de saúde não autorizadas pela legislação específica da ANVISA. O uso de expressões como "artesanal", "caseira", "familiar", "bebida viva", "bebida probiótica", "bebida milenar", "elixir", "energizante", "revigorante", "especial", "premium", entre outras que atribuam características de

qualidades superlativas e propriedades funcionais não aprovadas em legislação específica, também são vedadas nos rótulos [3].

Os parâmetros analíticos exigidos pela IN nº41//2019 incluem o pH, graduação alcoólica, acidez volátil e pressão na Kombucha adicionada de CO₂. Os limites para esses parâmetros estão disponíveis na Tabela 3 [3].

Tabela 3: Parâmetros analíticos obrigatórios no controle de qualidade da Kombucha no Brasil

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

Fonte: Adaptada de referência [3].

Com o objetivo de facilitar a compreensão das informações nutricionais presentes nos rótulos dos alimentos e assim auxiliar o consumidor a realizar escolhas alimentares mais conscientes, a Anvisa publicou novas normas sobre rotulagem nutricional, por meio da RDC nº429/2020, que entraram em vigor em 9 outubro de 2022. O calendário de implementação foi gradual, levando em consideração o porte da empresa e o tipo de alimento. Os pequenos produtores e microempreendedores individuais, que muitas vezes adotam métodos mais artesanais, como é comum na produção de Kombuchas, tiveram até outubro de 2024 para se adequarem às novas normas [43].

A RDC nº429/20 estabelece mudanças na legibilidade, no conteúdo e na apresentação das informações na tabela nutricional de alimentos embalados, incluindo bebidas. Uma das inovações é a introdução da rotulagem nutricional frontal, que visa destacar informações importantes para os consumidores. A resolução determina a obrigatoriedade da declaração do valor energético, carboidratos, açúcares totais, açúcares adicionados, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibras alimentares, sódio, entre outros componentes [43].

É necessário que as empresas alimentícias estejam em conformidade com os requisitos estabelecidos pela legislação para garantir a segurança e a confiança dos consumidores em relação aos produtos que comercializam.

Como o mercado de Kombucha é relativamente novo, a composição dos produtos nem sempre está completamente esclarecida no rótulo, e frequentemente são lançados produtos com novas formulações. Nesse cenário, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias analíticas confiáveis, simples e rápidas para garantir o controle de qualidade dessa bebida.

Nas seções seguintes, serão apresentadas as técnicas analíticas empregadas neste trabalho para o desenvolvimento de métodos voltados para esse controle. Entre elas estão a cromatografia a gás com detector de ionização de chamas, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a espectrofotometria UV-VIS e a espectroscopia no infravermelho médio. Também foi utilizada a calibração multivariada associada à espectroscopia no infravermelho médio para a construção de modelos preditivos robustos, visando à determinação dos parâmetros essenciais no controle de qualidade da Kombucha.

Além disso, serão abordados os parâmetros de validação analítica, como precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, que são fundamentais para assegurar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos.

2.2 CROMATOGRAFIA À GÁS COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (GC-FID)

A cromatografia é uma técnica amplamente utilizada para separar os componentes de uma mistura com base nas diferentes velocidades de transporte através de uma fase estacionária e uma fase móvel líquida ou gasosa. A fase estacionária pode estar imobilizada em uma coluna ou em uma superfície plana [44,45,46].

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados devido à sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Durante a separação, a

amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica, onde a eluição ocorre por meio de um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Gases como hélio, argônio, nitrogênio e hidrogênio são comumente empregados. A fase móvel não interage com as moléculas do analito; sua função é apenas transportar o analito através da coluna. Existem dois tipos de cromatografia gasosa: cromatografia gás-líquido e cromatografia gás-sólido [47].

Na cromatografia gás-líquido, a separação é baseada na partição do analito entre a fase móvel gasosa e uma fase líquida imobilizada. Já na cromatografia gás-sólido, a separação ocorre devido à adsorção dos analitos em uma fase estacionária sólida. Embora a cromatografia gás-líquido seja amplamente utilizada em diversas áreas da ciência, a cromatografia gás-sólido tem aplicação limitada devido à retenção semipermanente de moléculas polares e ao efeito de cauda nos picos de eluição [47].

O controle preciso da temperatura da coluna é essencial para resultados confiáveis na cromatografia gasosa. Geralmente, a coluna é mantida em um forno termostaticado, que permite controlar a temperatura com precisão de poucos décimos de grau Celsius. A resolução ótima é alcançada em temperaturas mais baixas, mas reduzir a temperatura pode prolongar o tempo de eluição, o que deve ser balanceado com a resolução desejada e o tempo de análise [44,45,46].

O detector de ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*) é o mais utilizado em aplicações de cromatografia gasosa. A detecção envolve a monitorização da corrente gerada pela coleta de íons e elétrons, produzidos quando compostos orgânicos entram em combustão em uma chama ar/hidrogênio. O detector responde ao número de átomos de carbono que entram por unidade de tempo, sendo sensível à massa em vez da concentração. Este tipo de detector apresenta alta sensibilidade, ampla faixa linear de resposta e baixo ruído, mas destrói a amostra durante a combustão [47].

A abordagem mais comum para quantificar analitos em análises cromatográficas é a calibração externa, que envolve a preparação de uma série de soluções padrão com composição semelhante à da amostra. Pode-se também usar um padrão interno para corrigir possíveis variações instrumentais e melhorar a precisão dos resultados. Os cromatogramas dos padrões são registrados e as

alturas dos picos ou suas áreas são plotadas em um gráfico em relação à concentração, gerando assim uma curva analítica [47].

2.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) combina as vantagens da separação eficiente dos componentes da amostra por cromatografia gasosa com a capacidade analítica e sensibilidade da espectrometria de massas [48]. Nesse método, os analitos são primeiro separados na coluna cromatográfica, onde passam por uma fase móvel gasosa inerte, e depois introduzido no espectrômetro de massas, onde são ionizados e fragmentados [47].

O espectrômetro de massas permite a identificação e quantificação dos componentes da amostra com base nas massas e nas intensidades dos íons detectados. O processo começa com a ionização dos compostos, que pode ocorrer por técnicas como ionização por impacto eletrônico (IE) ou ionização química (CI), dependendo da aplicação. Após a ionização, os íons gerados são analisados em um analisador de massas, que os separa conforme suas razões massa/carga (m/z), proporcionando um espectro de massas que caracteriza os compostos presentes na amostra [49].

Existem vários tipos de analisadores, sendo que o quadrupolo é um dos tipos mais comuns utilizados em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Ele é composto por quatro barras eletrodas dispostas em forma de quadrado, que geram campos elétricos alternados. Esse arranjo permite a seleção de íons com uma relação massa/carga específica, permitindo que apenas os íons com a massa desejada passem através do quadrupolo, enquanto os outros são filtrados [47].

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas oferece alta sensibilidade, resolução e seletividade, tornando-a uma técnica poderosa para a análise de compostos voláteis e semi-voláteis em uma variedade de matrizes, como alimentos, ar e produtos farmacêuticos. Além disso, o GC-MS permite a análise

qualitativa e quantitativa simultânea, fornecendo informações sobre a estrutura dos compostos e suas concentrações com grande precisão [48].

2.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

A espectrofotometria UV-Vis (Ultravioleta-Visível) é uma técnica analítica amplamente utilizada para determinar a concentração de substâncias químicas, identificar compostos e estudar suas propriedades eletrônicas. Ela se baseia na interação da radiação eletromagnética com a matéria nas faixas do ultravioleta e do visível do espectro eletromagnético. A região do ultravioleta abrange aproximadamente de 200 a 400 nm, enquanto a do visível vai de 400 a 800 nm [50,51].

Quando uma amostra é exposta à radiação eletromagnética, parte da luz incidente é absorvida, promovendo as moléculas do analito a estados eletronicamente excitados. A absorção é medida em função do comprimento de onda, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra [47].

A relação entre a absorção da luz e a concentração da espécie absorvente é descrita pela Lei de Beer-Lambert (equação 1). De acordo com essa lei, a absorbância (A) de uma solução é proporcional à concentração do analito (c) e ao caminho óptico (b), com a constante de proporcionalidade sendo a absorvidade molar (ϵ), quando a concentração está expressa em mol/L e o caminho óptico em centímetros [47].

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{equação 1})$$

Essa técnica é especialmente sensível à presença de ligações duplas conjugadas, grupos funcionais específicos e cromóforos. Para garantir a precisão das medições, a amostra deve ser preparada em solventes adequados que permitam a passagem da luz na faixa espectral desejada. Além disso, a calibração

do espectrofotômetro com soluções padrão é essencial para assegurar a confiabilidade dos resultados [50,51].

2.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO

A espectroscopia investiga a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, sendo seu objetivo principal o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Geralmente, as transições eletrônicas ocorrem na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais no infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas, e ocasionalmente também na região do infravermelho distante [52].

A faixa do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho está entre aproximadamente 14290 e 200 cm^{-1} . O infravermelho médio, abrangendo a faixa de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, é frequentemente empregado pelos químicos orgânicos [52].

Para que uma espécie química absorva radiação infravermelha, é necessário que ocorra uma variação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Moléculas homonucleares, que não possuem essa variação no momento dipolo durante a vibração ou rotação, não absorvem radiação infravermelha [47].

As posições das bandas no espectro de infravermelho são expressas em número de onda ou comprimento de onda. A aparência do espectro pode variar dependendo se a escala é linear em número de onda ou comprimento de onda. As intensidades das bandas podem ser indicadas como transmitância (T) ou absorbância (A). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida pela amostra e a energia incidente, enquanto a absorbância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância ($A = \log_{10}(1/T)$) [47, 52].

Os espectrofotômetros com transformada de Fourier (FTIR) são amplamente utilizados por sua rapidez, confiabilidade e excelente relação sinal/ruído. Nos equipamentos de FTIR, a radiação que contém todos os comprimentos de onda de interesse é dividida em dois feixes. Um feixe permanece fixo, enquanto o outro é refletido por um espelho móvel. A variação na distância percorrida por esses feixes resulta em interferências construtivas e destrutivas, gerando um interferograma, que é uma variação na intensidade da radiação recebida pelo detector. Uma

transformada de Fourier converte esse interferograma, obtendo o espectro infravermelho. Esse método permite a passagem simultânea de toda a faixa de radiação pela amostra, sem a necessidade de monocromadores, facilitando a manipulação dos resultados devido à conversão analógico-digital [53].

A obtenção clássica de espectros no infravermelho é feita por transmissão, onde parte da radiação passa através da amostra e parte é absorvida por ela. As amostras são colocadas em células com janelas transparentes na região do infravermelho. Atualmente, as técnicas de obtenção de espectros por reflectância estão se tornando mais comuns [52].

As técnicas de reflectância possibilitam a obtenção de espectros de infravermelho de amostras difíceis de manipular, como sólidos pouco solúveis, pós, pastas, filmes e adesivos, líquidos e soluções com mínimo preparo das amostras. A reflectância total atenuada (ATR) é especialmente destacada e amplamente utilizada, permitindo a aquisição rápida de espectros e facilitando a limpeza do acessório. Nessa técnica, um feixe de radiação é refletido na interface entre um cristal ATR e a amostra, gerando o espectro por meio da atenuação da radiação evanescente. Os cristais mais comuns utilizados são seleneto de zinco, germânio e diamante [47, 53].

2.6 QUIMIOMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A quimiometria utiliza métodos matemáticos e estatísticos para extrair informações valiosas de dados químicos. Esses métodos são aplicáveis em várias áreas, incluindo análise de dados, identificação de padrões, otimização de experimentos e calibração multivariada. Na calibração multivariada, é estabelecida uma relação matemática entre as respostas do instrumento e as características das amostras, permitindo a determinação simultânea de múltiplas propriedades, mesmo em presença de diversas espécies e correlações entre os dados. Esse método é especialmente útil na análise por infravermelho, onde todo o espectro é considerado, e variáveis relevantes são selecionadas por tratamentos estatísticos [54, 55].

No modelo de calibração multivariada usando dados espectroscópicos, são obtidos n espectros em p comprimentos de onda, formando assim uma matriz espectral $\mathbf{X}_{n \times p}$. Da mesma forma, os valores de referência podem ser representados como um vetor $n \times 1$, quando se avalia apenas uma propriedade. A matriz $\mathbf{X}$ e o vetor $\mathbf{y}$ podem ser relacionados pela equação 2. O modelo multivariado é empregado para calcular um vetor de previsão p de dimensão $n \times 1$ que solucione a equação 2 [56].

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}^t + \mathbf{e} \quad (\text{equação 2})$$

onde $\mathbf{X}^t$ é a transposta da matriz $\mathbf{X}$. O vetor $\mathbf{e}$ contém as diferenças entre os valores de referência $\mathbf{y}$ e os valores previstos, $\hat{\mathbf{y}}$.

Após a elaboração do modelo de calibração que estabelece uma relação matemática entre $\mathbf{X}$ e $\mathbf{y}$, é essencial realizar a validação para verificar seu desempenho na predição dos valores de $\mathbf{y}$. O objetivo é avaliar a reprodutibilidade da calibração, a capacidade preditiva do modelo em comparação com os valores de referência, além da robustez do modelo, testando sua estabilidade frente a variações nas condições experimentais ou nos dados [57]. Nesta etapa, o modelo de calibração é aplicado a outro conjunto de amostras (conjunto de validação) com valores conhecidos das variáveis independentes. Em seguida, os valores de $\mathbf{y}$ previstos pelo modelo são comparados aos valores de referência. A validação do modelo de calibração multivariada é um procedimento crucial antes de sua utilização em ensaios de rotina [57].

O conjunto de calibração deve ser o mais abrangente possível, incluindo todos os possíveis interferentes em diferentes concentrações, e cobrindo toda a faixa da propriedade de interesse. Por outro lado, o conjunto de validação deve ser completamente independente, sem qualquer sobreposição de amostras utilizadas no conjunto de calibração, garantindo assim a imparcialidade na avaliação do desempenho do modelo de calibração [58].

Os dados experimentais podem não apresentar uma distribuição adequada para análise, o que pode dificultar a extração de informações úteis. Por isso, muitas vezes é necessário pré-processar os dados antes de aplicá-los à ferramenta quimiométrica selecionada. O pré-processamento envolve o tratamento dos dados,

que podem estar em diferentes unidades e apresentar variâncias distintas entre as variáveis [59].

Uma abordagem comum é a centralização dos dados em torno da média, que consiste em subtrair a média de cada variável de seus valores individuais, tornando os dados com média zero e preservando a variância original. Além disso, há o autoescalamento que é um processo que envolve a centralização pela média, seguida pela divisão de cada coluna (variável) pelo desvio padrão correspondente da coluna, ajustando a variabilidade de cada variável de forma que todas tenham a mesma unidade de medida, ou seja, variância igual a 1. Ele é eficaz para corrigir diferenças de escala e unidades entre as variáveis, especialmente quando a principal fonte de variação em cada variável é o sinal e não o ruído [59].

Outra técnica importante é o alisamento (*smoothing*), que reduz o ruído aleatório nos espectros, preservando as informações essenciais. Isso pode ser realizado por meio de filtros digitais, como o filtro de *Savitzky-Golay*, que aplica um ajuste polinomial local aos dados. As correções de linha de base são utilizadas para eliminar efeitos sistemáticos que afetam o sinal, como deslocamentos de linha de base. Métodos como a primeira e a segunda derivadas, a Correção Multiplicativa de Espalhamento (*Multiplicative Scatter Correction* - MSC) e a Variável Normal Padrão (*Standard Normal Variate* - SNV) são amplamente aplicados para minimizar essas interferências [60].

Além disso, pode ser utilizado também o método de Correção do Sinal Ortogonal (*Orthogonal Signal Correction* - OSC) para remover variações que não estão associadas à variável resposta, deixando apenas as informações relevantes para a calibração. Matematicamente, o OSC atua filtrando componentes do bloco de variáveis independentes (**X**) que são ortogonais ao bloco de variáveis dependentes (**Y**), preservando apenas a variação que contribui para a previsão do modelo [61,62].

Essas etapas de pré-processamento são utilizadas para melhorar a relação sinal-ruído, facilitar a interpretação dos dados e aumentar a robustez e a capacidade preditiva dos modelos quimiométricos [60,62].

2.6.1 Calibração pelo método de regressão por mínimos quadrados parciais, *Partial Least Squares (PLS)*

A regressão por mínimos quadrados parciais (*PLS*) é um método multivariado utilizado para realizar ajustes lineares entre variáveis. Ele consiste na decomposição dos dados espectrais da matriz **X** em um produto de matrizes, levando em consideração as informações contidas na matriz **Y** (ou vetor **y**) [56].

A decomposição é feita em variáveis que modelam os sinais analíticos e explicam a variância relacionada aos valores de referência. Cada componente do modelo é denominado Variável Latente (VL), e estas variáveis contêm a máxima informação relevante das matrizes de dados [46].

No método PLS a decomposição é feita segundo as equações 3 e 4 [55]:

$$X = TP^t + E \quad (\text{equação 3})$$

$$Y = UQ^t + F \quad (\text{equação 4})$$

Onde T e U representam os escores, P e Q representam os pesos (*loadings*), e E e F representam os resíduos das matrizes **X** e **Y**, respectivamente. Uma etapa fundamental nesse processo é a seleção das Variáveis Latentes (VL). Tipicamente, utiliza-se a validação cruzada, um método de reamostragem que determina o número de VL com o qual o modelo apresenta o menor erro de predição (RMSECV - Raiz do Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada), que pode ser calculado de acordo com a equação 5:

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_p - y_r)^2}{n}} \quad (\text{equação 5})$$

Onde n é o número total de amostras no conjunto de validação cruzada, y_p é o valor de y previsto e y_r valor de referência de y.

Existem diferentes tipos de validação cruzada, cada um utilizando critérios de reamostragem específicos, de acordo com a natureza dos dados. Para conjuntos de dados pequenos (com até cerca de 20 amostras de calibração), emprega-se o

método *leave-one-out*, onde uma amostra é retirada por vez. Para conjuntos de dados maiores, recomenda-se a validação por blocos contínuos; para conjuntos de dados nos quais as amostras são organizadas de maneira aleatória, utiliza-se a validação por subconjuntos aleatórios. Já para amostras organizadas de maneira sistemática, utiliza-se a validação por venezianas (*venetian blinds*), que seleciona as amostras retiradas em intervalos constantes [63].

Amostras anômalas, também conhecidas como outliers, podem estar presentes tanto no conjunto de calibração quanto no de validação. A detecção de outliers pode ser realizada através da análise dos gráficos de *Q residual* versus *Hotelling T2* e de *leverage* versus *resíduos de Student*. O valor do *Hotelling T2* está relacionado com a influência de uma determinada amostra sobre o modelo. Por outro lado, o *resíduo de Student* indica a falta de ajuste da variável *y* para a amostra. [51]. Amostras que exibem discrepâncias entre os valores preditos pelo modelo e os valores de referência geralmente apresentam resíduos de Student elevados [54].

A qualidade do modelo desenvolvido é avaliada pelos erros de calibração (*RMSEC*) e de previsão (*RMSEP*), para as amostras dos conjuntos de calibração e de validação externa, respectivamente. O *RMSEC* representa a dispersão dos pontos no modelo de calibração e é uma medida de quão bem ele se ajusta aos dados. Já o valor de *RMSEP* avalia a exatidão obtida no resultado de previsão fornecido pelo modelo de calibração. O *RMSEC* e o *RMSEP* podem ser calculados de acordo com a equação 5, com a diferença de serem aplicados ao conjunto de calibração e ao de validação [62].

2.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação de métodos analíticos visa garantir que o procedimento seja adequado para sua finalidade, assegurando a qualidade e confiabilidade dos resultados. Os parâmetros de desempenho, conhecidos como Figuras de Mérito, incluem veracidade, precisão, linearidade, sensibilidade, seletividade e faixa de trabalho. A validação é necessária para métodos novos ou modificados. Os métodos podem ser validados de acordo com diretrizes nacionais e internacionais de órgãos como o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), AOAC

(Associação Oficial de Químicos Analíticos, do inglês: *Association of Official Analytical Chemists*), MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária), EURACHEM, etc. [64,65,66,67,68,69].

2.7.1 Seletividade

A seletividade avalia como o método é capaz de quantificar o analito, mesmo na presença de outros analitos ou prováveis interferentes, sendo possível diferenciar a resposta de um analito da de outros componentes da amostra.

2.7.2 Efeito de matriz

Podem ocorrer interferências causadas por componentes da matriz gerando diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental. No estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz, principalmente para avaliar se é possível trabalhar com uma curva de calibração não matrizada. Se houver efeito de matriz, a linearidade, a precisão e a tendência/recuperação também deverão ser estudadas na matriz.

2.7.3 Linearidade/Faixa de trabalho/Sensibilidade

A linearidade de um procedimento analítico é a habilidade de obter resultados proporcionais à concentração do analito na amostra.

A faixa de trabalho é o intervalo entre a menor e a maior concentração em que o método mantém precisão, exatidão e linearidade aceitáveis.

Já sensibilidade analítica refere-se à variação na resposta do instrumento diante de uma variação na quantidade medida.

Para avaliar a linearidade, são realizados testes estatísticos, incluindo a exclusão de pontos considerados *outliers* por meio do teste de resíduos padronizados de Jackknife. A normalidade dos resíduos pode ser verificada pelo teste

de Ryan-Joiner, enquanto a independência dos resíduos pode ser avaliada pelo teste de Durbin-Watson. A homoscedasticidade dos resíduos pode ser testada pelo Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado. Além disso, são realizados testes de significância da regressão e do desvio da linearidade.

2.7.4 Limite de Detecção (LD)

O Limite de detecção de um método é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Ele pode ser determinado de diferentes maneiras, sendo uma delas através da curva de calibração, pela equação:

$$LD = \frac{3,3s}{b} \quad (\text{equação 6})$$

Onde:

s= desvio padrão da resposta do branco

b= coeficiente angular da curva analítica

Quando houver disponibilidade de branco de amostra, o cálculo pode ser feito utilizando a equação 7.

$$LD = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \quad (\text{equação 7})$$

Onde:

t= abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança

s= desvio padrão amostral dos brancos

Após a definição do Limite de quantificação do método, o LD também pode ser determinado pela equação 8:

$$LD = \frac{LQ}{3,3} \quad (\text{equação 8})$$

2.7.5 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Ele pode ser calculado de várias formas, uma delas é através da equação da reta da curva de calibração, equação 9:

$$LQ = \frac{10.s}{b} \quad (\text{equação 9})$$

Onde:

s= desvio padrão da resposta do branco

b= coeficiente angular da curva analítica

Quando houver disponibilidade de branco de amostra, o cálculo pode ser feito utilizando a equação 10:

$$LQ = 10.s \quad (\text{equação 10})$$

Onde:

s= desvio padrão amostral dos brancos.

2.7.6 Tendência/Recuperação

A tendência pode ser avaliada utilizando-se materiais de referência certificados, comparação com método de referência, comparações interlaboratoriais e ensaios de recuperação. Ela pode ser expressa como recuperação analítica, definida como:

$$\frac{\text{Valor esperado}}{\text{Valor obtido}} \times 100 \quad (\text{equação 11})$$

A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade. A recuperação pode ser estimada pela análise

de amostras fortificadas em pelo menos três níveis (baixa, média e alta) com quantidades conhecidas do analito. E pode ser expressa pela equação 12:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \times 100 \quad (\text{equação 12})$$

Onde:

C1 : concentração do analito na amostra fortificada.

C2 : concentração do analito na amostra não fortificada.

C3 : concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

2.7.7 Precisão

A precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Normalmente ela é avaliada por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. E pode ser expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação (CV%), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), conforme equação 13:

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{equação 13})$$

Onde:

DP= é o desvio padrão;

CMD= é a concentração média determinada

Na repetibilidade os procedimentos são realizados pelo mesmo operador mantendo-se as mesmas condições de análise em um curto período de tempo. Já a precisão intermediária considera a influência de efeitos aleatórios dentro dos laboratórios, como diferentes dias e analistas

2.8 VALIDAÇÃO ANALÍTICA MULTIVARIADA

A validação analítica de métodos de calibração multivariada ainda não está completamente estabelecida. Adaptar os requisitos dos guias clássicos de validação, tanto nacionais, quanto internacionais [64,65,66,67,68,69], se faz necessário para estimar as figuras de mérito na calibração multivariada. Essa etapa é fundamental para garantir que o método tenha um desempenho adequado às condições de sua aplicação [70,71].

Existem exigências nos guias tradicionais de validação que não se aplicam à calibração multivariada, como a necessidade de seletividade do método em relação ao analito, uma vez que seu uso só é vantajoso na ausência de um sinal seletivo. Além disso, a construção de curvas de calibração convencionais para avaliar a linearidade não é praticável em métodos multivariados. Uma abordagem qualitativa para estimar a linearidade nesses casos envolve a análise da distribuição dos resíduos do modelo, os quais devem exibir comportamento aleatório para amostras de calibração e validação [72].

Uma importante referência no campo da análise quantitativa multivariada utilizando espectroscopia no infravermelho é o guia ASTM E1655, intitulado "*Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis*" (Práticas padrão para análise quantitativa multivariada de infravermelho). Suas recomendações podem ser aplicáveis também a dados provenientes de outras técnicas analíticas. Este guia estabelece práticas padrão para a calibração multivariada, abordando aspectos importantes como o preparo de amostras, a aquisição de dados espectrais, a construção do modelo e a avaliação do desempenho, incluindo figuras de mérito como linearidade, exatidão, precisão, faixa de trabalho, entre outras [73].

A exatidão nos métodos multivariados é comumente avaliada através dos valores de RMSEC e RMSEP, sendo o último considerado mais robusto. O RMSEP é estimado utilizando um conjunto externo independente de amostras de validação, que não foi utilizado na construção do modelo [73].

Já a precisão é normalmente avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade expressa a variabilidade analítica sob as mesmas condições de trabalho dentro de um curto intervalo de tempo, enquanto a precisão

intermediária considera a influência de efeitos aleatórios dentro dos laboratórios, como diferentes dias e analistas [64].

Os valores de RPD de calibração e validação, que representam a razão entre o desvio padrão da previsão e o erro quadrático médio da predição (RMSEP) ou o erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV), podem ser obtidos pelas equações 14 e 15. O RPD pode ser interpretado como a razão entre a variação natural das amostras e os erros de previsão. Se o RPD for aproximadamente 1, ou seja, quando a variação das amostras e os erros quadráticos apresentarem valores semelhantes, o método não será considerado eficaz para discriminar as amostras. Por outro lado, um valor de RPD superior a 2,4 indica que o método possui uma capacidade preditiva satisfatória [72].

$$RPD_{cal} = \frac{SD_{cal}}{RMSECV} \quad (\text{equação 14})$$

$$RPD_{val} = \frac{SD_{val}}{RMSEP} \quad (\text{equação 15})$$

O bias médio, ou viés sistemático, representa a diferença entre o valor médio observado e o valor verdadeiro ou esperado para um conjunto de dados. Em modelos multivariados, a presença de bias significativo indica que os erros sistemáticos não são aleatórios e afetam a precisão do modelo, tornando-se críticos para a interpretação dos resultados. Para quantificar esse viés, pode-se utilizar a equação 16 [70]. De acordo com a norma ASTM E1655, a análise desse parâmetro deve ser realizada por meio de um teste t aplicado às amostras de validação, com nível de confiança de 95%. Para isso, o desvio padrão dos erros de validação (SDV) é calculado conforme a equação 17, e o valor t é determinado pela equação 18. Caso o valor calculado de t seja maior que o valor crítico obtido para $nv-1$ graus de liberdade (onde nv é o número de amostras de validação), isso sugere que os erros sistemáticos são estatisticamente significativos, o que implica que o modelo precisa ser ajustado para melhorar a sua precisão [70,73].

$$\text{bias} = \sum_{n=1}^{n_v} \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{n_v} \quad (\text{equação 16})$$

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n_v - 1}} \quad (\text{equação 17})$$

$$t_{bias} = \frac{[bias] \sqrt{n_v}}{SDV} \quad (\text{equação 18})$$

3 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DO TEOR ALCOÓLICO E ACIDEZ VOLÁTIL DE AMOSTRAS DE KOMBUCHA POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS

O controle de qualidade na produção de Kombucha é importante para garantir a segurança no consumo, a conformidade regulatória e a consistência do produto final. Dois parâmetros são fundamentais durante a avaliação: o teor alcóolico e a acidez.

A acidez, principalmente atribuída ao ácido acético, desempenha um papel importante, pois inibe o crescimento de microrganismos, além de contribuir para o sabor característico da bebida. Por sua vez, o teor alcóolico é um indicador chave da atividade fermentativa e deve ser rigorosamente monitorado para garantir que o processo permaneça dentro dos limites estabelecidos, evitando a formação excessiva de álcool [5,9,10,37,74]. O equilíbrio entre acidez e teor alcóolico exerce uma influência direta na aceitação do produto pelos consumidores. Manter a constância nesses parâmetros ao longo de lotes sucessivos é essencial para estabelecer a confiança dos consumidores, contribuindo para a fidelidade à marca.

No Brasil, a Instrução Normativa Nº 41, de 17 de setembro de 2019, determina que a graduação alcóolica deve ser obrigatoriamente indicada no rótulo da Kombucha. Para as versões não alcóolicas, o limite de álcool permitido é de até 0,5% v/v, com uma tolerância de 0,1% v/v. As bebidas classificadas como "zero álcool" podem conter no máximo 0,05% v/v de álcool. No caso das Kombuchas alcóolicas, o teor de álcool pode variar entre 0,6% e 8,0% v/v [3]. Essa amplitude reflete a diversidade de produtos no mercado, proporcionando aos consumidores uma gama de escolhas que atendam às suas preferências individuais. Neste contexto, a transparência na indicação do teor alcóolico torna-se fundamental, permitindo que os consumidores realizem escolhas informadas e alinhadas às suas expectativas.

Já a acidez deve ser declarada com base na acidez volátil, que se refere aos ácidos de baixa massa molecular que podem ser volatilizados sob aquecimento, sendo o ácido acético o principal componente presente na Kombucha. Os valores recomendados situam-se entre 30 e 130 mEq/L (correspondente a 0,17 a 0,74%v/v,

utilizando o mEq do ácido acético igual 0,060052 para conversão). A acidez total corresponde à soma de todos os ácidos presentes na amostra, englobando tanto os ácidos fixos quanto os voláteis. Entre eles, destacam-se os ácidos orgânicos, como láctico, cítrico, tartárico, málico e succínico, além dos ácidos voláteis. [75]

Diversas técnicas podem ser utilizadas na determinação do teor alcoólico de bebidas, incluindo a Kombucha, como cromatografia a gás [76,77,78], ensaios enzimáticos [79] e destilação seguida de densitometria [80], conforme observado nos trabalhos disponíveis na Tabela 4. A destilação seguida de densitometria se destaca pela simplicidade e pela dispensa de equipamentos complexos.

A titulação ácido-base é uma das técnicas mais empregadas na avaliação da acidez, devido à sua simplicidade e baixo custo, como demonstrado em vários estudos disponíveis na Tabela 5 [36,81,82,83]. A maioria desses trabalhos se concentrou na quantificação da acidez total. Para determinar a acidez volátil, é necessário realizar uma etapa prévia de destilação da amostra antes de proceder com a titulação [75].

Na literatura, observa-se o uso de outras técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência [9,84] na determinação do teor de ácido acético de Kombuchas. Vale ressaltar que as técnicas instrumentais, apesar de exigirem maiores investimentos financeiros, apresentam vantagens como maior seletividade, sensibilidade e podem ser aplicadas a diferentes tipos de matrizes e faixas de concentrações [47].

Tabela 4: Técnicas analíticas empregadas na determinação do teor alcoólico de Kombuchas

Técnica analítica	Faixa de trabalho	LD e LQ	Recuperação e Repetibilidade	Referência
HS-GC-FID	0,1 – 2,8%v/v	0,05%v/v (LD)	97 – 102% (Rec) ≤5% (Rep)	[76]
HS-GC -FID	1,12 – 2,00%v/v	N.I.	≤5% (Rep)	[77]
HS-GC -MS	0,025 – 2,47%v/v	0,0002%v/v (LD) 0,002%v/v (LQ)	N.I.	[78]
UPLC-RI	1,25 – 10,00g/L (0,16 – 1,27%v/v)	10mg/L ou 0,001%v/v (LD) 20mg/L ou 0,002%v/v (LQ)	102% (Rec) 4% (Rep)	[9]
Destilação e densitometria	0,00 – 8,00%v/v	N.I.	N.I.	[80]
Enzimático	0,03 – 0,5g/L (0,004 – 0,06%v/v) Diluição das amostras	1,9 mg/L ou 0,0002%v/v (LD) 3,3mg/L ou 0,0004%v/v (LQ)	95% – 104% (Rec) <2% (Rep)	[79]

Fonte: Elaborada pelo autor. Observações: N.I. – Não informado; HS-GC-FID- Cromatografia gasosa com headspace e detector de ionização de chama; UPLC-RID – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de índice de refração.

Tabela 5: Técnicas analíticas empregadas na determinação da acidez de Kombuchas

Técnica analítica	Parâmetro	Faixa de trabalho	LD e LQ	Referência
Titulação ácido-base	Acidez total	N.I.	N.I.	[36], [81], [82] e [83]
UPLC-RI	Teor de ácido acético	0,25 – 2,00g/L (0,03 – 0,25%v/v)	5mg/L ou 0,0006 %v/v (LD) 10mg/L ou 0,001%v/v(LQ)	[9]
HPLC-RI	Teor de ácido acético	N.I	N.I	[84]

Fonte: Elaborada pelo autor. Observações: N.I. – Não informado; HPLC –RI – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de índice de refração; UPLC-RID – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de índice de refração.

Considerando que a maioria das amostras disponíveis no mercado brasileiro é categorizada como não alcoólica, essas foram escolhidas como o foco principal deste projeto de pesquisa. Para a determinação simultânea do teor alcoólico e da acidez volátil das amostras foi adotado um procedimento utilizando cromatografia a gás acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID). Essa abordagem permitiu a quantificação precisa dos analitos em uma única corrida cromatográfica, com um único preparo de amostra, mesmo em concentrações baixas, garantindo alta sensibilidade na análise.

3.1 OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método de determinação simultânea do teor alcoólico e acidez volátil de Kombuchas de marcas brasileiras por cromatografia a gás acoplada a detector de ionização de chamas (GC-FID).

3.2 AMOSTRAS

Foram analisadas 96 amostras comerciais de Kombuchas, provenientes de 30 marcas localizadas nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul do Brasil. Todas as amostras declaravam em seus rótulos um teor alcoólico de até 0,5 % v/v. As coletas ocorreram entre 2021 e 2022, com os produtos enviados ao laboratório pelos próprios fabricantes para avaliação da qualidade. As amostras incluíam tanto a versão original quanto variações aromatizadas e saborizadas com frutas. O estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN-Brasil) sob o número AFA583E.

3.3 MATERIAIS E REAGENTES

As soluções de trabalho foram preparadas com os reagentes: etanol (CAS 64-17-5, Sigma-Aldrich, grau HPLC), ácido acético (CAS 64-19-7, Sigma-Aldrich, grau HPLC) e 1-butanol (CAS 71-36-3, Sigma-Aldrich, grau HPLC). A água deionizada

(18,2 M Ω cm⁻¹ a 25 °C) utilizada foi obtida a partir do equipamento MilliPore Direct-Q[®] 3 UV (França).

3.4 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Visando atender a legislação citada anteriormente com foco nas amostras não alcoólicas, as curvas de calibração foram elaboradas abrangendo a faixa de 0,1 a 0,6%v/v, tanto para o etanol quanto para o ácido acético.

Foi preparada uma solução intermediária contendo 10%v/v de etanol e outra contendo 10% v/v ácido acético de alta pureza, a partir da qual foram preparadas as soluções padrão mistas (etanol e ácido acético) de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6%v/v. A faixa de trabalho de 0,1 a 0,6% v/v corresponde a 17-105 mEq/L de ácido acético.

Posteriormente, foram transferidos 500 μ L de cada solução padrão para um tubo tipo Eppendorf de 2,0 mL. Em seguida, adicionaram-se 20 microlitros da solução de padrão interno 1-butanol 5% v/v em água deionizada. Após essa etapa, cada tubo tipo Eppendorf foi homogeneizado utilizando um agitador vortex (VELP Scientifica, Itália) por 10 segundos a 3000 rpm.

3.5 PREPARO GERAL DE AMOSTRAS

Inicialmente, as amostras foram desgasificadas, transferindo-se aproximadamente 200 mL de cada uma para um Erlenmeyer de 250 mL, com a adição de 2 gotas de agente antiespumante (solução de simeticona 75 mg/mL). A mistura foi agitada em um agitador orbital (marca Kacil, modelo HM01) por cerca de 15 minutos, ou até a cessação das bolhas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos em uma centrífuga KASVI, modelo K 14-0815P, para remover os sólidos suspensos residuais do processo de fermentação. O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e armazenado em freezer a -18 °C até a realização das análises.

3.6 PREPARO DE AMOSTRAS PARA O MÉTODO GC-FID

Após o preparo geral das amostras (item 3.5), foram transferidos 250 μL do sobrenadante para tubos tipo Eppendorf de 2,0 mL, aos quais foram adicionados 250 μL de água, totalizando 500 μL de solução. Em seguida, acrescentou-se 20 μL da solução de padrão interno 1-butanol (5% v/v em água deionizada). Após essa adição, cada tubo tipo Eppendorf foi homogeneizado utilizando um agitador vortex (VELP Scientifica, Itália) por 10 segundos a 3000 rpm.

3.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC-17A (Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização por chama (FID) e uma coluna capilar polar SUPELCOWAX 10, revestida com um filme de polietilenoglicol (PEG) (30 m $\times$ 0,53 mm $\times$ 2,0 μm). O hidrogênio de alta pureza (99,999%) foi utilizado como gás de arraste com uma vazão de 2,6 $\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 240 $^{\circ}\text{C}$. Foram injetados 0,5 μL por amostra, no modo split 1:10, em uma corrida de 11,3 minutos com a seguinte rampa de aquecimento: 120 $^{\circ}\text{C}$ inicial, gradiente de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 170 $^{\circ}\text{C}$ (0 min), gradiente de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 195 $^{\circ}\text{C}$ (0 min), gradiente de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 230 $^{\circ}\text{C}$ (2 min).

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para assegurar que o método atende às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados, procedeu-se à validação considerando as seguintes figuras de mérito: Linearidade/Faixa linear de trabalho, Efeito de matriz, Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Recuperação e Precisão (repetibilidade). Os cálculos foram realizados com base em diretrizes de orientação para validação de métodos analíticos [64,65,66,67,68,69].

No preparo de algumas soluções para a validação, foi utilizada uma kombucha fornecida pela empresa Tropicalia Kombucharia, com baixo teor de etanol

(0,02 % v/v) e ácido acético (0,03 % v/v), previamente quantificados pelo método GC-FID desenvolvido neste trabalho.

3.8.1 Linearidade/Faixa linear de trabalho

A linearidade foi avaliada por meio da preparação de três curvas analíticas independentes, conforme descrito no item 3.4, abrangendo concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6% v/v (seis níveis), utilizando água deionizada como solvente. A faixa de trabalho, de 0,1 a 0,6% v/v, corresponde a 17–105 mEq/L de ácido acético.

3.8.2 Efeito de matriz

Para o estudo do efeito de matriz, foram preparadas três curvas analíticas independentes, utilizando como matriz a Kombucha fornecida pela empresa Tropicalia Kombucharia. As concentrações foram às mesmas da curva preparada em solvente (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 %v/v).

Após a realização dos testes estatísticos de homogeneidade de variâncias (Teste F de Snedecor) por nível de concentração e o Teste t de comparação de médias (Student) por nível de concentração, foi constatado o efeito de matriz para ambos os analitos. Diante disso, seguindo as orientações dos Guias de Validação procederam-se à avaliação da linearidade, limites de detecção, quantificação, precisão e recuperação diretamente na matriz.

3.8.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio de dez brancos independentes, utilizando a Kombucha de processo como matriz e preparados da mesma forma que as amostras, conforme descrito no item 3.6.

3.8.4 Recuperação/Tendência

Devido à indisponibilidade de Materiais de Referência Certificados (MRC) e à identificação do efeito de matriz, foi conduzido um estudo de recuperação por meio da análise da matriz (Kombucha de processo). Ela foi fortificada com quantidades conhecidas dos analitos em três níveis, sendo eles 0,1; 0,3 e 0,6 %v/v (baixo, médio e alto) e com 6 replicatas independentes para cada um. Para isso, procedeu-se o preparo da mesma maneira que para os padrões conforme item 3.5.

3.8.5 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade, executada no mesmo dia e pelo mesmo operador. Calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) das alíquotas independentes preparadas durante a etapa de recuperação. Além disso, a precisão intermediária foi realizada sob condições experimentais idênticas, porém em dias diferentes.

3.9 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.9.1 Análise cromatográfica

O método cromatográfico apresentou robustez na análise das amostras de Kombuchas, destacando-se pela sua simplicidade, rapidez e preparo mínimo de amostras. A incorporação do padrão interno (1-butanol) contribui significativamente para a compensação de variações instrumentais e melhoria da precisão dos resultados.

O cromatograma apresentado na Figura 4, que exhibe o padrão misto (0,6%v/v etanol e ácido Acético) em matriz (vermelho) e em solvente (azul), demonstra a eficiente separação entre os picos de interesse e a estabilidade dos tempos de retenção.

A escolha da coluna cromatográfica SUPELCOWAX 10 revelou-se adequada devido à sua fase estacionária polar de polietilenoglicol (PEG), que favorece

interações seletivas com compostos polares, garantindo uma separação eficaz dos compostos analisados.

A metodologia otimizada possibilita o monitoramento simultâneo do teor de álcool e acidez volátil (em teor de ácido acético), compostos essenciais no controle de qualidade da Kombucha.

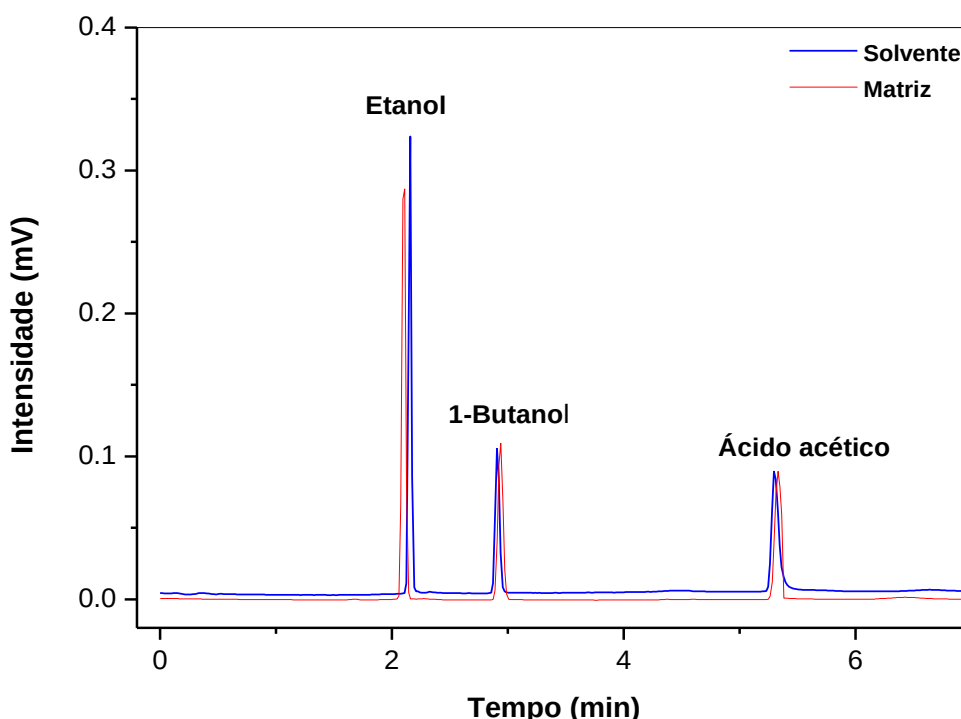


Figura 4: Cromatograma do Padrão Misto (0,6% v/v de Etanol e Ácido Acético) em Matriz (vermelho) e em Solvente (azul) obtido pelo método GC-FID. Fonte: Obtido pelo utilizando o software OriginPro 8.5.

3.9.2 Validação do método

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada tanto em solvente quanto em matriz. Os outliers foram identificados e removidos utilizando o teste de resíduos padronizados de Jackknife, com um critério de exclusão máximo de 22,2%. Foram excluídos 3 outliers na curva de etanol em solvente e 3 na curva em matriz. Na curva do ácido acético em solvente, 2 outliers foram removidos, enquanto nenhum foi detectado na curva em matriz. As curvas de calibração, após a remoção dos outliers, estão apresentadas nas Figuras 5 e 6.

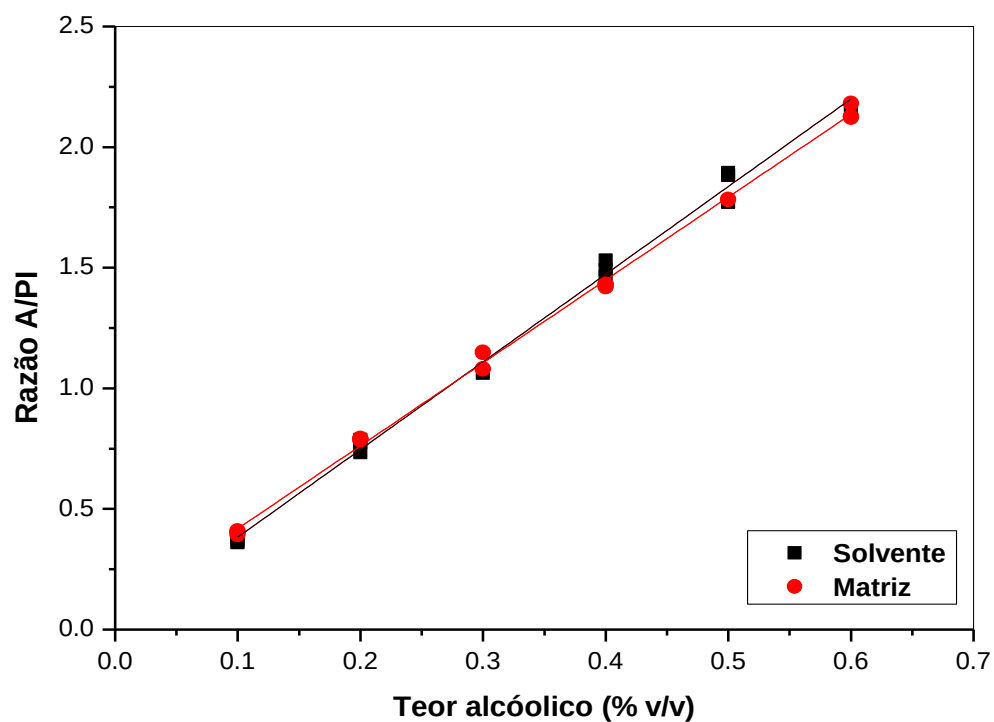


Figura 5. Avaliação da linearidade das curvas do teor alcólico obtidas pelo método GC-FID. Quadrados pretos representam a curva de calibração com solvente, e círculos vermelhos representam a curva de calibração com matriz correspondente. A/PI significa analito/padrão interno. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software OriginPro 8.5.

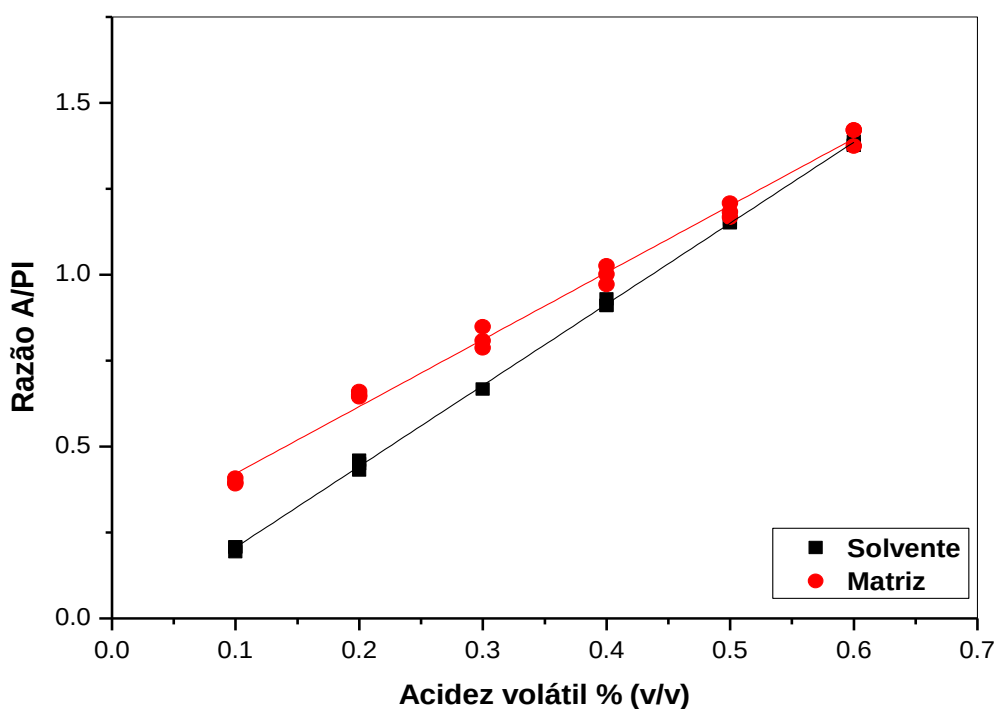


Figura 6. Avaliação da linearidade das curvas de acidez volátil obtidas pelo método GC-FID. Quadrados pretos representam a curva de calibração com solvente, e círculos vermelhos representam a curva de calibração com matriz correspondente. A/PI significa analito/padrão interno. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software OriginPro 8.5.

As regressões lineares das curvas de calibração foram obtidas pelo método de mínimos quadrados ordinários (MMOQ). A normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos foram verificadas pelos testes de Ryan-Joiner, Durbin-Watson e Brown-Forsythe, respectivamente. As análises confirmaram que os resíduos estavam normalmente distribuídos, independentes e homocedásticos ($p > 0,10$ para normalidade; $p > 0,05$ para independência e $p > 0,05$ homocedasticidade). A ANOVA mostrou que as regressões eram significativas ($p < 0,001$), com diferenças significativas nas inclinações entre as curvas em solvente e matriz ($p < 0,05$), constatando-se o efeito de matriz para ambos os analitos. Dessa forma, a curva analítica preparada na matriz foi empregada para a quantificação dos analitos nas amostras, utilizando a estratégia de calibração por similaridade de matriz (*matrix-matching calibration*). Esse procedimento consiste na preparação da curva analítica em uma matriz semelhante à das amostras, visando minimizar os efeitos de

supressão ou intensificação de sinal causado por componentes da matriz sobre a resposta dos analitos [85]. Os resultados dessas avaliações estão detalhados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Parâmetros para avaliação da linearidade das curvas do etanol, tanto em solvente quanto em matriz obtidas pelo método GC-FID

		Curva etanol em solvente	Curva etanol em matriz
n		15	15
Equação		$y = 3,6334x + 0,0197$	$y = 3,4355x + 0,0749$
R²		0,9965	0,9983
¹Normalidade (p>0,10)	R	0,9781	0,9622
	R _{cri}	0,9506	0,9506
²Homocedasticidade α=0,05	t _i	1,655	1,511
	p	0,122	0,155
³Independência	d	2,387	1,404
	d _l (α=0,05)	1,158	1,158
	d _u (α=0,05)	1,391	1,391
⁴Regressão α=0,05	F	3654,9	7716,6
	p	2,57x10 ⁻¹⁷	2,02x10 ⁻¹⁹
⁴Falta de ajuste α=0,05	F	1,337	2,348
	p	0,328	0,132

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: ¹ Teste de Ryan-Joiner: valores próximos de 1 e $R > R_{cri}$, os resíduos são distribuídos seguindo-se a normal. ² Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado: se $p > 0,05$ há homocedasticidade dos resíduos. ³ Teste de Durbin-Watson: se $d > d_u$ os resíduos são independentes. ⁴ ANOVA= se $p < 0,05$ a regressão é significativa e se $p > 0,05$ não há falta de ajuste.

Tabela 7: : Parâmetros para avaliação da linearidade das curvas de ácido acético, tanto em solvente quanto em matriz obtidas pelo método GC-FID

		Curva ácido acético em solvente	Curva ácido acético em matriz
n		16	18
Equação		$y = 2,3579x - 0,0291$	$y = 1.9492x + 0,2267$
R²		0,9995	0,9938
¹ Normalidade (p>0,10)	R	0,9786	0,9639
	R _{cri}	0,9529	0,9567
² Homocedasticidade α=0,05	t _i	0,620	0,906
	p	0,545	0,378
³ Independência	d	2,348	1,713
	d _i (α=0,05)	1,158	1,158
	d _u (α=0,05)	1,391	1,391
⁴ Regressão α=0,05	F	30694,6	2575,0
	p	8,58 x10 ⁻²⁵	4,16 x10 ⁻¹⁹
⁴ Falta de ajuste α=0,05	F	1,169	3,143
	p	0,381	0,555

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: ¹ Teste de Ryan-Joiner: valores próximos de 1 e $R > R_{cri}$, os resíduos são distribuídos seguindo-se a normal. ² Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado: se $p > 0,05$ há homocedasticidade dos resíduos. ³ Teste de Durbin-Watson: se $d > d_u$ os resíduos são independentes. ⁴ ANOVA= se $p < 0,05$ a regressão é significativa e se $p > 0,05$ não há falta de ajuste.

As figuras de mérito determinadas para o método estão em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC [68]. Os valores de repetibilidade estiveram entre 2,0% e 3,4%, e a precisão intermediária entre 2,3% e 3,6%. Foi adotado o LQ de 0,1 %v/v, pois foi o nível mais baixo em que a tendência, recuperação e precisão do método foram avaliadas. O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a equação 8: $LD = LQ/3,3$, resultando em 0,03 %v/v. O resumo das figuras de mérito está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Resumo das figuras de mérito para a validação do método para o etanol e ácido acético

Parâmetro	Etanol	Ácido acético
Faixa de trabalho	0,1-0,6% v/v	0,1– 0,6 % v/v (17–105 mEq/L)
Limite de detecção	0,03% v/v	0,03% v/v
Limite de quantificação	0,1% v/v	0,1% v/v (17 mEq/L)
Repetibilidade (DPR)	2,0-3,4%	2,3–3,2%
Precisão Intermediária (DPR)	2,7-3,6%	2,3-3,5%
Recuperação (DPR)	96-101%	100–104%

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.

Os parâmetros obtidos após a validação do método são condizentes com os estudos da literatura (Tabela 4) que empregaram a cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas para a determinação do teor alcoólico em Kombuchas. Por exemplo, Ebersole et al. (2016) utilizou uma faixa de trabalho de 0,1% a 2,8%v/v, alcançando um limite de quantificação (LQ) de 0,05%v/v, uma recuperação entre 97-102%, e uma precisão $\leq 4\%$ [76]. Similarmente, Patil et al. (2017) empregou uma faixa de trabalho de 1,12% a 2,00%v/v, obtendo uma precisão $<5\%$ [77]. A principal vantagem do método proposto é a possibilidade de quantificar simultaneamente o teor alcoólico e a acidez volátil, em uma única corrida cromatográfica, com um preparo de amostras simples e injeção direta. Diferentemente dos estudos citados, que abordaram exclusivamente o teor alcoólico, o método desenvolvido amplia o escopo analítico.

Comparada à cromatografia líquida, que também pode ser empregada, a GC-FID apresenta menor custo operacional, por dispensar o uso contínuo de solventes orgânicos na fase móvel. A GC-FID possui alta sensibilidade, seletividade, excelente reprodutibilidade, ampla faixa de linearidade, características que a tornam particularmente eficaz na análise de compostos voláteis, como o etanol e os ácidos orgânicos de cadeia curta, mesmo em matrizes complexas [47]. Em relação a métodos tradicionais, como a densitometria associada à destilação, a GC-FID oferece vantagens significativas, incluindo maior sensibilidade, menor tempo de análise, menor manipulação das amostras e redução de perdas por volatilização, o que contribui para maior precisão dos resultados.

No que diz respeito à determinação da acidez volátil, a GC-FID supera os métodos titulométricos em termos de sensibilidade e confiabilidade, eliminando subjetividades associadas à identificação do ponto final da titulação [47].

3.9.3 Aplicação do método validado para a determinação do teor alcoólico e a acidez volátil de amostras de Kombucha por GC-FID

As amostras de Kombucha analisadas apresentaram teores de etanol entre 0,10 e 1,70 % v/v, conforme apresentado no gráfico Boxplot da Figura 7, com algumas necessitando de diluição para a análise. O valor médio foi de 0,64% v/v. A mediana no centro da caixa do Boxplot sugere uma distribuição simétrica. Nenhum outlier foi identificado. Apenas 38 das 96 amostras (40%) rotuladas como não alcoólicas estavam em conformidade com a legislação, ressaltando a necessidade de controles analíticos mais rigorosos pelos produtores.

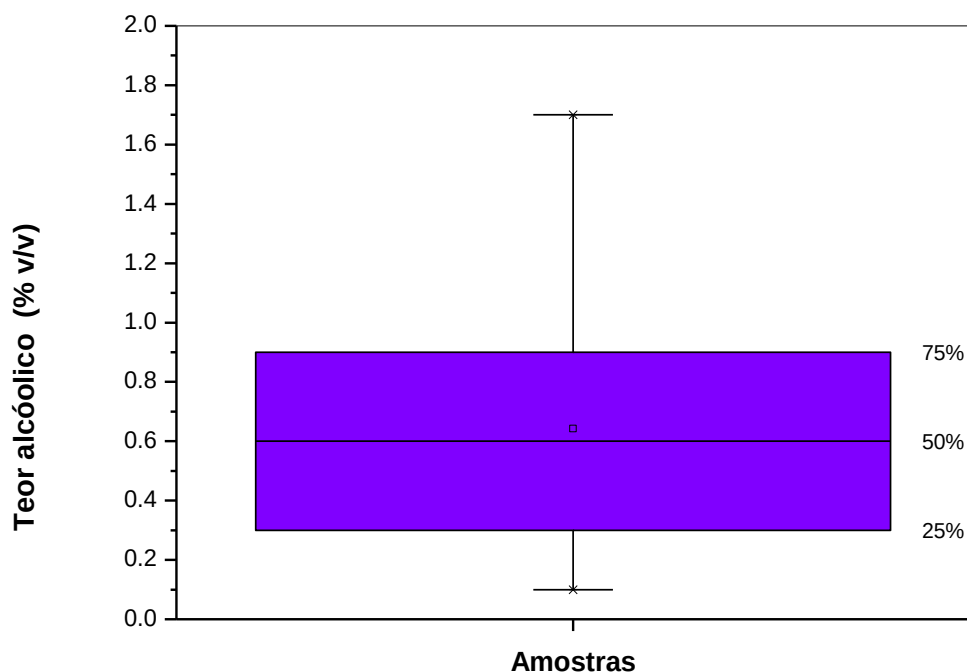


Figura 7: Boxplot do teor alcoólico (% v/v) de amostras comerciais de Kombucha com valores acima do LQ do método GC-FID. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software Origin 8.5.

Os teores de acidez volátil das amostras estiveram entre 17 e 71 mEq/L, conforme mostrado no gráfico Boxplot na Figura 8. A acidez média das amostras foi de 35 mEq/L. Das 96 amostras analisadas, apenas 48 (50%) estavam dentro da faixa estipulada pela legislação (30 a 130 mEq/L), com 38 amostras abaixo desse intervalo e 10 abaixo do limite de quantificação do método GC-FID. A mediana no centro da caixa do Boxplot sugere uma distribuição simétrica, mas 9 outliers foram identificados com valores acima de 48 mEq/L, destacando a variabilidade na produção das Kombuchas.

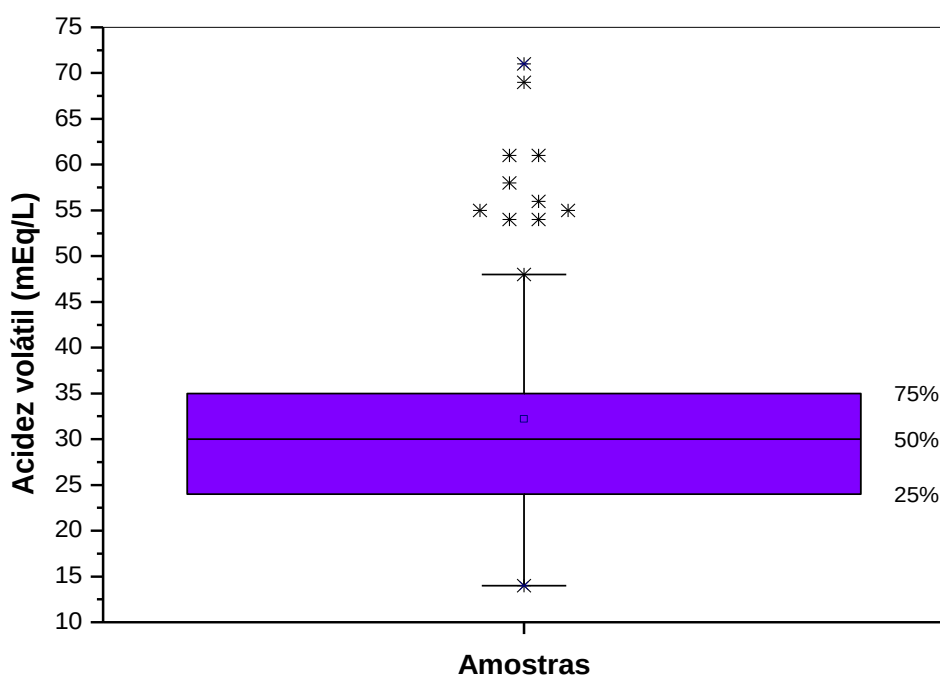


Figura 8: Boxplot da acidez volátil (mEq/L) de amostras comerciais de Kombucha com valores acima do LQ do método GC-FID. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software Origin 8.5.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores em amostras de Kombuchas brasileiras [36], destacando teores de etanol na faixa de 0,58% a 3,02% v/v, excedendo o limite regulamentar do Brasil para bebidas não

alcoólicas. Além disso, foi observada uma notável variação na acidez total das amostras, abrangendo valores de 1,2 a 5,8 g/L (20 a 97mEq/L).

Um estudo realizado nos Estados Unidos [77] identificou teores de etanol entre 1,12% e 2,00% v/v em 18 amostras de Kombuchas comerciais, com um aumento desses teores correlacionado ao tempo de armazenamento. Esse aumento pode ser atribuído à presença de açúcares residuais e à atividade de microrganismos ainda presentes no produto final, que continuam a fermentar o açúcar ao longo do tempo, resultando na produção adicional de etanol.

A significativa variação nos teores de álcool e acidez volátil das amostras sugere discrepâncias nos métodos de produção, como a concentração de chá, açúcar, insumos de saborização, condições de fermentação e a composição do SCOBY. Essas variáveis, junto com as condições de armazenamento, influenciam a fermentação e as propriedades do produto final [6].

A falta de conformidade nos rótulos pode induzir o consumidor a uma escolha equivocada do produto, o que pode representar riscos à saúde devido ao consumo de um conteúdo inadequado. Além de expor ao risco de responsabilidade legal, conforme estabelecido pela Resolução nº 432, de 23 de Janeiro de 2013 do Conselho Nacional de Trânsito (Brasil, 2013), também conhecida como “Lei de Tolerância Zero ao Álcool no Sangue”, que regulamenta a presença de álcool no sangue de condutores de veículos no Brasil [86].

3.10 CONCLUSÕES

O método GC-FID desenvolvido mostrou-se eficaz para a determinação simultânea do teor alcoólico e acidez volátil em Kombuchas. Entre suas principais vantagens, destaca-se a corrida cromatográfica relativamente rápida, o preparo mínimo das amostras e a injeção direta, o que contribui para maior agilidade e simplicidade no processo analítico. Após validação, os parâmetros obtidos demonstraram conformidade com todos os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC, com valores de precisão inferiores a 3,4%.

A aplicação do método em 96 amostras comerciais brasileiras revelou teores alcoólicos variando entre 0,10 e 1,70 %v/v. A maior parte dessas amostras apresentou valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira para

bebidas não alcoólicas (0,5 %v/v), evidenciando a necessidade de atenção quanto à rotulagem e à classificação desses produtos. Em relação à acidez volátil das amostras analisadas, os valores encontrados estiveram entre 17 e 71 mEq/L. Alguns resultados estavam abaixo das especificações recomendadas, que variam de 30 a 130 mEq/L.

A literatura recomenda a utilização de 50 a 200 g/L de sacarose na fase inicial de fermentação da Kombucha [4,5 9, 36, 87, 88]. No entanto, além da sacarose inicial, os açúcares presentes na bebida também podem originar-se de uma segunda fermentação anaeróbia, em que são adicionadas outras fontes de açúcar, como sucos, polpas de frutas ou a própria sacarose para carbonatar e conferir sabor à Kombucha [36].

As concentrações finais de açúcares na Kombucha diferem de acordo com o tempo e as condições de fermentação. Kombuchas fermentadas por períodos mais longos apresentam menores níveis de açúcares residuais, enquanto aquelas com fermentação mais curta contêm uma maior concentração de açúcares, resultando em uma bebida mais doce. Níveis elevados de açúcares podem sugerir o uso excessivo de sacarose na fase inicial da fermentação ou de outras fontes em etapas subsequentes do processo de produção [4,36,38].

O açúcar residual pode continuar servindo como substrato para a fermentação do produto final, pois ainda há microrganismos ativos no meio. O que promove o aumento do teor alcoólico e a produção de CO₂ durante o armazenamento, comprometendo o tempo de prateleira do produto [77].

No Brasil, a legislação não estabelece regulamentações específicas para a quantidade de açúcares em bebidas fermentadas. No entanto, a Resolução RDC nº 429/2020 da ANVISA exige informações nutricionais detalhadas nos rótulos de alimentos embalados, incluindo os teores de açúcares totais e adicionados. Para fins de fiscalização, há uma tolerância de até 20% acima ou abaixo do valor declarado no rótulo, dependendo de cada parâmetro [43].

Complementando essa regulamentação, a IN nº 75/2020 estabelece diretrizes para a rotulagem nutricional frontal de produtos com elevados teores de substâncias prejudiciais à saúde como os açúcares adicionados, gorduras saturadas e sódio. Alimentos sólidos ou semissólidos devem apresentar a declaração frontal “Alto em açúcares adicionados” quando contiverem 15 g ou mais por 100 g. Para alimentos líquidos, a declaração é obrigatória quando o teor for 7,5 g ou mais por 100 mL. Produtos que possuírem 0,5 g ou menos de açúcares totais ou adicionados por 100 g (ou 100 mL) podem ser rotulados como “Não contém” [89].

Os açúcares totais englobam tanto aqueles que estão presentes de forma intrínseca nos ingredientes, como por exemplo, a glicose e frutose, provenientes de frutas e vegetais, quanto os açúcares adicionados.

Os açúcares adicionados incluem monossacarídeos e dissacarídeos incorporados com a finalidade de melhorar o sabor, a textura ou a conservação do produto, e que não estão originalmente presentes no alimento. Exemplos desses açúcares são as frações provenientes da adição de açúcar de cana, açúcar de beterraba, mel, melaço, melado, rapadura, caldo de cana, extrato de malte, sacarose, glicose, frutose, lactose, dextrose, açúcar invertido, xaropes, maltodextrinas, carboidratos hidrolisados e ingredientes que contenham qualquer um desses componentes. Estão excluídos dessa definição os políeis, os açúcares consumidos durante a fermentação ou pelo escurecimento não enzimático, além dos açúcares naturalmente presentes em leites e derivados e em vegetais, incluindo frutas, nas formas inteiras, em pedaços, em pó, desidratadas, em polpas, purês, sucos integrais, reconstituídos ou concentrados [43].

Na Kombucha, a sacarose residual presente na bebida após a fermentação, assim como as frações de monossacarídeos resultantes da sua hidrólise (glicose e frutose), devem ser declaradas como açúcares adicionados. Já os açúcares provenientes de frutas, polpas e sucos integrais são incluídos na contagem dos açúcares totais. Esses açúcares presentes naturalmente em frutas e vegetais são absorvidos de forma mais lenta pelo organismo, devido à presença de fibras, vitaminas e minerais, que regulam essa absorção. Já os açúcares adicionados são rapidamente absorvidos, podendo causar picos na glicemia. Essa distinção é importante em dietas com restrição de açúcar, pois o consumo excessivo de açúcares adicionados está associado a doenças como obesidade e diabetes [90]. Por isso, é importante monitorar esses parâmetros tanto após a primeira quanto após a segunda fermentação, além de considerar a receita e as particularidades de cada bebida.

Neste estudo, foi validado e aplicado um método para quantificação dos teores de açúcares totais em Kombuchas, além do desenvolvimento de uma metodologia para análise do perfil de açúcares e edulcorantes, conforme apresentado a seguir.

4.1 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM DNS (ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO) PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS EM KOMBUCHAS

A RDC nº 429/2020 define açúcares totais como todos os monossacarídeos e dissacarídeos metabolizados pelo organismo humano, excluindo os polióis. Na Kombucha, essa definição abrange a soma da sacarose e dos açúcares redutores, como glicose e frutose, presentes na bebida final. Os açúcares redutores possuem grupamentos aldeído ou cetona livres, o que os torna capazes de sofrer oxidação em reações químicas.

Diversas técnicas analíticas podem ser empregadas na quantificação de açúcares totais e redutores em alimentos. Entre os métodos mais utilizados destacam-se os espectrofotométricos, como o DNS (3,5-dinitrosalicílico) [91], fenol-sulfúrico [92], antrona [91] e Somogyi-Nelson [37]. Métodos titulométricos, como o de Fehling [93,94], também são amplamente aplicados, assim como técnicas instrumentais, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [95,28] e espectroscopia no infravermelho (FTIR) [96]. Alguns desses estudos estão apresentados na Tabela 9.

Os métodos espectrofotométricos são frequentemente preferidos por apresentarem baixo custo operacional, permitindo a análise rápida e eficiente de um grande número de amostras, além de fornecerem resultados confiáveis. Em contrapartida, os métodos cromatográficos oferecem maior sensibilidade, além de possibilitar a identificação e quantificação específica dos açúcares presentes na matriz. A seleção do método mais adequado deve considerar as características da amostra, os açúcares de interesse, a sensibilidade exigida e a disponibilidade de equipamentos laboratoriais [47].

Neste estudo foi válido e aplicado o método espectrofotométrico com DNS, que é utilizado para quantificar açúcares redutores. Uma etapa inicial de hidrólise foi incorporada, promovendo a conversão da sacarose em glicose e frutose, o que permitiu a determinação dos açúcares totais. Esse método foi originalmente desenvolvido por Sumner (1921) [97], sendo a versão utilizada nesta pesquisa,

adaptada por Bernfeld (1955) [98] e otimizada por Vasconcelos et al. (2013) [99,100].

O princípio da técnica baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico pelos açúcares redutores, resultando na formação de um composto nitroamino de cor intensa (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), que absorve luz a 540 nm [99,100].

Tabela 9: Técnicas analíticas para determinação de açúcares em Kombuchas

Técnica analítica	Amostras	Teores	Referência
HPLC-RID	Kombucha artesanal	Sacarose: 2,8 – 51,6 g/L	[95]
		Glicose: 5,3 – 17,3 g/L	
		Frutose: 2,2 – 14,4 g/L	
		Açúcares totais: 10,3 – 83,3 g/L	
UPLC-RID	Kombucha artesanal	Açúcares totais: 2 – 50 g/L	[28]
Método espectrofotométrico com DNS e método da Antrona	Kombucha artesanal	Açúcares redutores: 19,4 g/L	[91]
		Açúcares totais: 32,1 g/L	
Método fenol-sulfúrico	Kombucha artesanal	Açúcares totais: $83,8 \pm 3,13$ a $113 \pm 0,29$ g/L	[92]
FTIR (Analyzer Alpha P TM)	Kombucha artesanal	Sacarose (g/L) $17,81 \pm 1,22$ g/L	[96]
		Glicose (g/L) $9,35 \pm 0,98$ g/L	
		Frutose (g/L) $1,41 \pm 0,25$ g/L	
		Açúcares totais: 28,57 g/L	
Método de Fehling	Kombuchas comerciais	Açúcares redutores: 14,8 – 26,9 g/L	[94]
Método de Somogyi-Nelson	Kombucha artesanal	Açúcares totais: 14,61 g/L	[37]
Método de Fehling	Kombuchas artesanais	Açúcares redutores: 1,70 – 10,71 g/L	[93]

Fonte: Elaborada pelo autor. Observações: HPLC-RID – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de índice de refração; UPLC-RID - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de índice de refração; FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier.

4.1.1 OBJETIVOS

Validar e aplicar o método espectrofotométrico com DNS para quantificação de açúcares totais em Kombuchas, por meio da inclusão de uma etapa de hidrólise. O método utilizado foi originalmente desenvolvido por Sumner (1921), adaptado por Bernfeld (1955) e otimizado por Vasconcelos et al. (2013).

4.1.2 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS Biospectro modelo SP-220, ajustado para um comprimento de onda de 540 nm. A hidrólise ácida foi realizada em um banho ultratermostático da marca Cientec, modelo CT-281.

4.1.3 MATERIAIS E REAGENTES

As soluções de trabalho foram preparadas com os seguintes reagentes: Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (CAS 609-99-4, Sigma-Aldrich, p.a), Sacarose (CAS 57-50-1, Sigma-Aldrich, grau GC), Tartarato duplo de sódio e potássio (CAS 6381-59-5, Synth, p.a), Hidróxido de sódio (CAS 1310-73-2, Synth, p.a), Ácido clorídrico (CAS 7647-01-0, Synth, p.a).

A água deionizada (com condutividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C) utilizada em todas as etapas do experimento foi obtida por meio do sistema MilliPore Direct-Q® 3 UV (França).

4.1.3.1 Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%*m/v*

Para preparar 100 mL de solução, pesaram-se 1,000 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em um béquer e adicionaram-se 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio 2 mol/L (solução A). Em outro recipiente, dissolveram-se 30 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 50 mL de água destilada (solução B). Em seguida, a

solução A foi misturada à solução B e submetida a ultrassom até que os reagentes estivessem completamente dissolvidos. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada. O reagente final foi armazenado em um frasco de polipropileno, devidamente etiquetado e protegido da luz (Vasconcelos, et. al, 2013) [99].

4.1.4 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Optou-se por utilizar a sacarose como padrão na construção das curvas analíticas, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras desde a etapa de hidrólise. O objetivo foi assegurar uma validação abrangente do método, desde o processo de hidrólise, proporcionando maior confiabilidade aos resultados obtidos. Embora a glicose pudesse ser utilizada como padrão no método espectrofotométrico com DNS, essa opção não permitiria a avaliação completa de todas as etapas do procedimento.

As curvas analíticas foram construídas solubilizando sacarose de alta pureza na faixa de concentração de 10 a 100 g/L. Preparou-se uma solução intermediária de 100 g/L, a partir da qual foram preparadas as soluções de 10; 20; 40; 60; 80 g/L de sacarose. Estas foram diluídas em água deionizada e avolumadas em balões de 10 mL.

Transferiram-se 500 µL de cada solução padrão para um tubo Falcon de 15 mL e procedeu-se a determinação dos teores de açúcares totais.

4.1.5 PREPARO DE AMOSTRAS

Foram analisadas as 96 amostras de Kombuchas disponíveis. Após o preparo geral das amostras (Capítulo 3, item 3.4), transferiram-se 500 µL do sobrenadante para um tubo Falcon de 15 mL e procedeu-se a determinação dos teores de açúcares totais.

4.1.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS

4.1.6.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada com base na adaptação do método de Maldonade et al. (2013) [101]. Inicialmente, 500 µL de solução padrão de sacarose ou amostra foram colocados em um tubo de centrifuga de 10,0 mL e misturados com 2,25 mL de HCl a 2 mol/L. A mistura foi agitada em vórtex e aquecida a 100 °C por 10 minutos para promover a hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Após a hidrólise, o meio foi neutralizado com 2,25 mL de NaOH a 2 mol/L e agitado novamente em vórtex. Em seguida, transferiram-se 50 µL da solução para outro tubo, adicionando 450 µL de água deionizada para diluir a amostra e atingir a faixa de trabalho de 0,1 a 1,0 g/L de açúcares redutores para o método espectrofotométrico com DNS.

4.1.6.2 Método espectrofotométrico com DNS

Com o objetivo de garantir a precisão do método espectrofotométrico com DNS, os parâmetros do processo como temperatura, agitação, tempo de reação, foram ajustados conforme o estudo de otimização de Vasconcelos et al. (2013) [99].

Foram adicionados 500 µL de solução de DNS a 1% (m/v) ao tubo Falcon contendo 500 µL da amostra hidrolisada (obtida na etapa 4.1.6.1). A mistura foi homogeneizada em vórtex a 3000 rpm por 5 segundos e aquecida a 100 °C por 15 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo por 3 minutos, foram adicionados 4 mL de água deionizada, seguido de nova homogeneização em vórtex nas mesmas condições. A leitura da absorbância da curva de calibração e das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm, utilizando o branco analítico para zerar o equipamento.

4.1.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.1.7.1 Linearidade/Faixa linear de trabalho

Para avaliação da linearidade foram preparadas três curvas analíticas independentes com as concentrações: 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g/L de sacarose, em água deionizada, conforme descrito no item 4.1.4. Essas soluções passaram por todas as etapas de determinação dos teores de açúcares totais descritas no item 4.1.6, atingindo a concentração final de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de açúcares redutores.

4.1.7.2 Efeito de matriz

Devido à indisponibilidade de uma matriz de Kombucha com baixos teores de açúcares totais, optou-se simular uma matriz. Com base em informações da literatura, identificou-se que os componentes majoritários principais presentes na matriz são etanol, ácido acético e açúcares [4,5,36].

Considerando os resultados obtidos de teor alcoólico e acidez das amostras de Kombuchas determinados pelo método cromatográfico descrito no capítulo 3 deste trabalho, foi preparada uma matriz simulada contendo 0,4% v/v de etanol e 0,3% v/v de ácido acético em água deionizada.

Foram então preparadas três curvas analíticas independentes na matriz simulada com concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 g/L de sacarose, seguindo o procedimento descrito no item 4.1.4.

Essas soluções passaram por todas as etapas de determinação dos teores de açúcares totais, conforme descrito no item 4.1.6, resultando em concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 g/L.

Para avaliar a possível influência da matriz, foram aplicados os testes estatísticos de homogeneidade de variâncias (Teste F de Snedecor) por nível de concentração e o Teste t de comparação de médias (Student) por nível de concentração. Os resultados indicaram a ausência de efeito da matriz nas análises.

4.1.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Como não foi constatado efeito de matriz, os limites de detecção e de quantificação foram avaliados através de dez brancos independentes, preparados conforme descrito no item 4.6, utilizando apenas água deionizada e os demais reagentes do procedimento analítico. Essas soluções passaram por todas as etapas de determinação dos teores de açúcares totais descritas no item 4.1.6.

4.1.7.4 Recuperação

Considerando a indisponibilidade de materiais de referência certificados (MRC) e a inexistência de efeito de matriz, realizou-se a avaliação da recuperação por meio da análise de soluções de sacarose preparadas em água deionizada em três níveis distintos: 10, 60 e 100 g/L, (baixo, médio e alto). Para cada nível, foram realizadas 6 replicatas independentes preparadas conforme item 4.1.4.

Posteriormente, essas soluções foram submetidas a todas as etapas do processo de determinação dos teores de açúcares totais, conforme descrito no item 4.1.6, resultando em concentrações finais de 0,1, 0,6 e 1,0 g/L de açúcares redutores.

4.1.7.5 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade, executada no mesmo dia e pelo mesmo operador. Calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) das alíquotas independentes preparadas durante a etapa de recuperação. Além disso, a precisão intermediária foi realizada sob condições experimentais idênticas, porém em dias diferentes.

4.1.8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1.8.1 Validação do método

Avaliou-se a linearidade das curvas em solvente e em matriz. A detecção de outliers foi realizada utilizando o teste de resíduos padronizados de Jackknife, adotando um critério de exclusão de até 22,2%. Um outlier foi removido da curva em matriz, enquanto nenhum foi excluído da curva em solvente. A Figura 10 ilustra as curvas de calibração em solvente e em matriz após a remoção dos outliers.

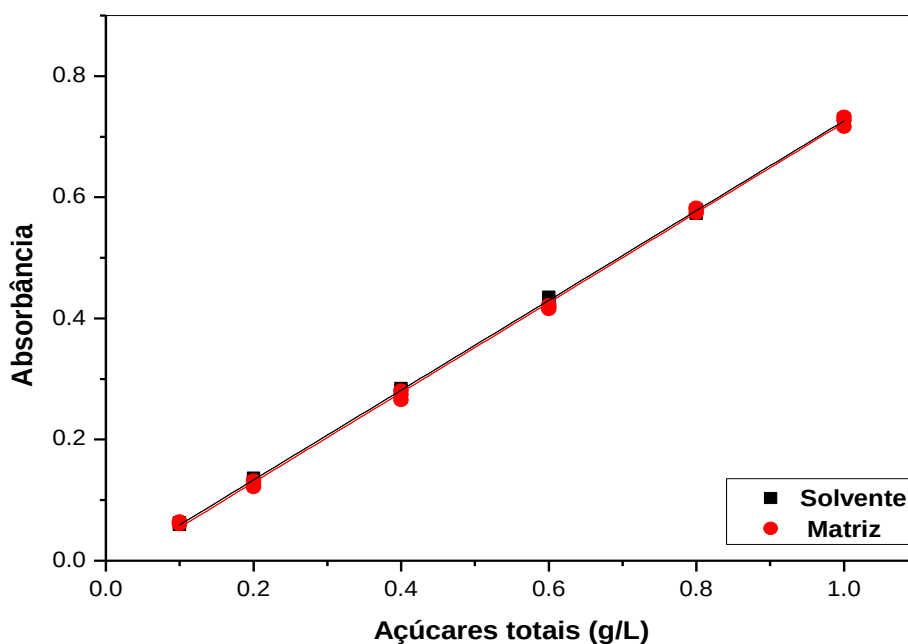


Figura 10: Avaliação da linearidade das curvas dos teores de açúcares totais utilizando o método espectrofotométrico com DNS. A curva no solvente é representada por quadrados pretos, e a curva na matriz é representada por círculos vermelhos. Fonte: Obtida pelo autor utilizando o software origin 8.5.

As curvas de calibração foram ajustadas por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMOQ). Para verificar a normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, foram aplicados os testes de Ryan-Joiner, Durbin-Watson e Brown-Forsythe, respectivamente. Os resultados confirmaram que os resíduos apresentavam distribuição normal, independência e homocedasticidade ($p > 0,10$ para normalidade; $p > 0,05$ para independência e $p >$

0,05 para homocedasticidade). A análise de variância (ANOVA) indicou que as regressões eram significativas ($p < 0,001$) e não houve diferenças significativas nas inclinações entre as curvas em solvente e em matriz ($p > 0,05$), o que descartou a presença de efeito de matriz. O método demonstrou linearidade na faixa de 0,1 a 1,0 g/L. Os resultados detalhados dessas avaliações estão disponíveis na Tabela 10.

Tabela 10 : Parâmetros para avaliação da linearidade das curvas de açúcares totais, tanto em solvente quanto em matriz.

		Curva açúcares totais em solvente	Curva açúcares totais em matriz
n		18	17
Equação		$y = 0,7412x - 0,0149$	$y = 0.7423x - 0.0193$
R^2		0,9998	0,9991
¹ Normalidade ($p > 0,10$)	R	0,9852	0,9807
	R_{cri}	0,9567	0,9567
² Homocedasticidade $\alpha = 0,05$	t_i	0,143	0,278
	p	0,888	0,785
³ Independência	d	2,501	1,427
	$d_l (\alpha = 0,05)$	1,158	1,158
	$d_u (\alpha = 0,05)$	1,391	1,391
⁴ Regressão $\alpha = 0,05$	F	73717,36	17946,96
	p	$9,66 \times 10^{-31}$	7.78×10^{-26}
⁴ Falta de ajuste $\alpha = 0,05$	F	0,535	3,444
	p	$7,13 \times 10^{-1}$	4.28×10^{-2}

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: ¹ Teste de Ryan-Joiner: valores próximos de 1 e $R > R_{cri}$, os resíduos são distribuídos seguindo-se a normal. ² Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado: se $p > 0,05$ há homocedasticidade dos resíduos. ³ Teste de Durbin-Watson: se $d > d_u$ os resíduos são independentes. ⁴ ANOVA= se $p < 0,05$ a regressão é significativa e se $p > 0,05$ não há falta de ajuste.

Um resumo de todas as figuras de mérito obtidas está apresentado na Tabela 11. Os valores de recuperação e precisão estão em conformidade com os critérios estabelecidos pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2016) [68]. Foi adotado o LQ de 0,1 g/L, pois foi o nível mais baixo em que a tendência, recuperação e precisão do método foram avaliadas. O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a equação 8: $LD = LQ/3,3$, resultando em 0,03 g/L.

Tabela 11: Resumo das figuras de mérito para validação do método para determinação de açúcares totais em Kombuchas

Parâmetro	Açúcares totais
Faixa de trabalho	0,1-1,0 g/L
Limite de detecção	0,03 g/L
Limite de quantificação	0,1 g/L
Precisão (repetibilidade DPR)	2,0-3,2%
Precisão Intermediária (DPR)	2,5-3,4%
Recuperação (DPR)	98-105%

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010.

Dentre os métodos espectrofotométricos apresentados na Tabela 9, o empregado neste estudo, que utiliza o reagente DNS (3,5-dinitrosalicílico), destaca-se na quantificação de açúcares redutores por sua simplicidade, rapidez, características que o tornam ideal para análises em larga escala [99, 100]. Em especial, quando associado a uma etapa prévia de hidrólise, o que possibilita a quantificação de açúcares totais, ampliando sua aplicabilidade analítica.

Outros métodos espectrofotométricos, como o fenol-sulfúrico e o da antrona, também são bastante utilizados, mas envolvem reagentes corrosivos e/ou tóxicos, como ácido sulfúrico concentrado, fenol e antrona, aumentando os riscos associados à manipulação. Além disso, métodos como o Somogyi-Nelson e o tradicional titulométrico de Fehling podem ser mais demorados, envolvendo o preparo de muitas soluções e execução de várias etapas, o que pode comprometer a reprodutibilidade e a praticidade do ensaio.

Entre as técnicas instrumentais, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) oferece alta sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação e quantificação individual de açúcares, embora demande maior custo operacional,

equipamentos sofisticados e operadores mais qualificados [47]. A espectroscopia no infravermelho (FTIR), por sua vez, pode ser uma alternativa rápida, com mínimo preparo de amostras, desde que precedida por adequada calibração e modelagem.

4.1.8.2 Aplicação do método validado para a determinação dos teores de açúcares totais

Os teores de açúcares totais nas amostras de Kombucha analisadas (Figura 11) apresentaram uma variabilidade considerável, estando entre 20 e 84 g/L, com uma média de 37 g/L. Dez amostras apresentaram valores abaixo do limite de quantificação (LQ) do método. A mediana, deslocada dentro da caixa do Boxplot, indica uma distribuição assimétrica dos dados, sugerindo a ausência de uma tendência central bem definida. Além disso, foi identificado um outlier com valor superior ao limite dos *whiskers*, destacando-se como um ponto atípico.

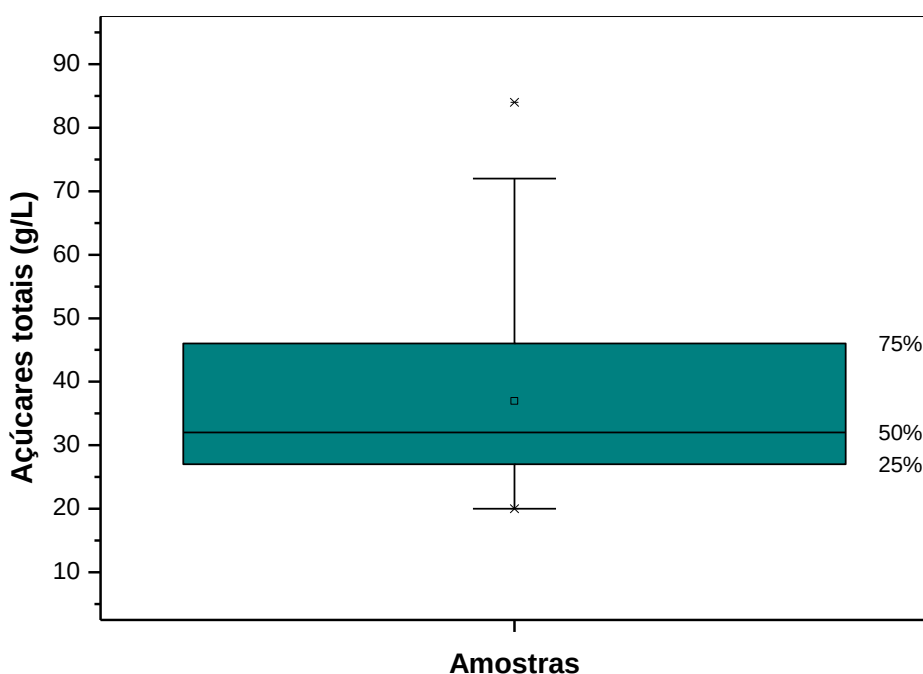


Figura 11: Boxplot dos teores de açúcares totais (g/L) em amostras comerciais de Kombucha com valores acima do LQ do método espectrofotométrico com DNS. Fonte: Obtido pelo autor utilizando o software origin 8.5.

Os resultados obtidos neste estudo, ao quantificar os teores de açúcares totais em 96 amostras de 30 marcas distintas de Kombuchas de várias regiões do Brasil, proporcionam uma visão abrangente do cenário nacional. Essa análise evidenciou uma ampla variabilidade nesses teores, ressaltando os desafios na padronização do processo produtivo e a necessidade de regulamentações mais rigorosas para garantir a qualidade e a conformidade dos produtos.

Esses teores não estavam discriminados nos rótulos das amostras analisadas, coletadas entre 2021 e 2022, pois a RDC nº 429/2020 [43] ainda não havia sido plenamente implementada. Anteriormente, os açúcares totais eram informados juntamente com os demais carboidratos.

Em comparação com outros estudos da literatura, que analisaram amostras de Kombuchas comerciais, grande parte se limitou à quantificação dos parâmetros exigidos pela IN nº 41/2019, como acidez, pH, teor alcoólico e CO₂ dissolvido. A maioria dos trabalhos listados na Tabela 9 refere-se a amostras de Kombuchas artesanais preparadas especificamente para a pesquisa, sem a introdução de etapas posteriores, como a adição de sucos e polpas de frutas. Ainda assim, os teores encontrados estão na faixa de 2 a 113 g/L, evidenciando grandes variações.

De acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS), a ingestão diária máxima de açúcar deve representar no máximo 10% das calorias diárias, o que equivale a 50 gramas de açúcar por dia em uma dieta de 2.000 calorias, aproximadamente dez colheres de chá [90]. Em uma lata de 269 mL de Kombucha, considerando um teor médio encontrado de 37 g/L, é possível consumir 9,95 g de açúcar. Este estudo identificou teores de até 84 g/L, enquanto a literatura cita valores de até 113 g/L. Comparativamente, refrigerantes frequentemente apresentam teores de açúcares totais variando entre 60 a 120 g/L [102,103,104].

É essencial que os consumidores estejam bem-informados sobre a real composição dos produtos para fazerem escolhas conscientes, especialmente diante de alegações de que o consumo de Kombucha pode substituir refrigerantes e das afirmações sobre suas propriedades probióticas. Para isso, é necessário empregar métodos analíticos rápidos e confiáveis, que permitam avaliar não apenas os teores de açúcares totais, mas também outros parâmetros importantes para garantir a

qualidade do produto final. O método validado neste estudo cumpre essa função de forma eficaz.

4.2 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE AÇÚCARES E EDULCORANTES EM KOMBUCHAS POR GC-MS

Avaliar o perfil de açúcares individuais em Kombuchas é importante para compreender o processo fermentativo ocorrido nesta bebida, permitindo identificar o estágio de fermentação, a viabilidade microbiológica, a adição de ingredientes secundários (como frutas ou polpas) e práticas específicas de cada fabricante. Esse perfil não apenas reflete o estágio de fermentação, mas também é um indicador de qualidade.

A legislação brasileira vigente estabelece que apenas açúcares podem ser utilizados na produção de Kombucha, sendo proibida a adição de edulcorantes [3]. No entanto, diante da crescente demanda por produtos com menor valor calórico e dulçor preservado, a possibilidade de adulterações com esses compostos torna-se uma preocupação relevante. Edulcorantes naturais, como o xilitol ($C_5H_{12}O_5$), o eritritol ($C_4H_{10}O_4$), e sintéticos, como a sucralose ($C_{12}H_{19}Cl_3O_3$), são comumente utilizados em alimentos industrializados, por apresentarem baixo impacto calórico e alta estabilidade [105,106,107,108]. As estruturas químicas desses edulcorantes são apresentadas na Figura 12.

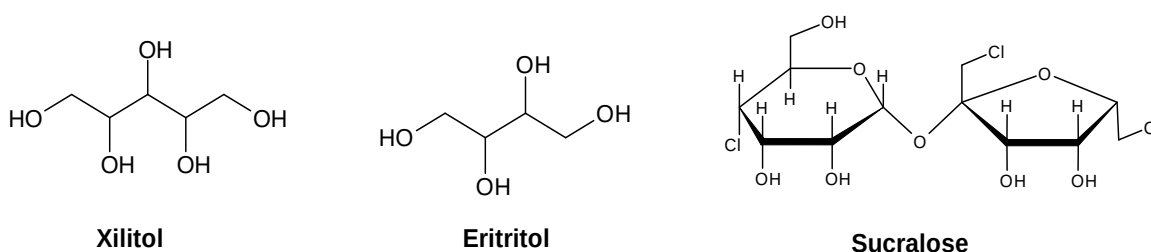


Figura 12: Estrutura química dos edulcorantes xilitol, eritritol e sucralose. Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [105,106,107,108] utilizando o software ChemSketch.

As principais técnicas utilizadas para avaliar o perfil de carboidratos em alimentos, incluindo açúcares, são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, [28, 95, 109, 110] e a Cromatografia Gasosa. Essas técnicas também podem ser aplicadas na análise de edulcorantes.

A cromatografia gasosa exige uma etapa inicial de derivatização, pois os carboidratos, devido à sua baixa volatilidade e alta polaridade, não são adequados para análise direta. Para possibilitar a análise, é necessário convertê-los em derivados que possuam maior volatilidade e estabilidade térmica. Quando acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a cromatografia gasosa oferece alta sensibilidade, especificidade, separação eficiente de compostos voláteis e a capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas confiáveis, especialmente em amostras complexas, com menor interferência das matrizes. Sendo mais vantajosa em comparação com a cromatografia líquida de alta eficiência com detector por índice de refração, que, apesar de ser amplamente utilizada, apresenta menor seletividade por se tratar de um detector universal. Além de ser suscetível a variações no índice de refração dos compostos, especialmente em função de pequenas alterações na composição ou temperatura da fase móvel [47,48, 111].

Um método comum de derivatização de carboidratos é a sililação, no qual reagentes específicos substituem os hidrogênios dos grupos hidroxila por grupos trimetilsilil (TMS), formando derivados sililados mais voláteis e estáveis. Dentre os reagentes utilizados, destacam-se BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida), MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida), MTBSTFA (N-metil-N-(t-butil-dimetilsilil)trifluoroacetamida), TMSI (trimetilsililimidazol) e HMDS (hexametildisilazano). Além disso, o TMCS (trimetilclorosilano) é frequentemente empregado como catalisador junto ao BSTFA, aumentando a eficiência da derivatização. Contudo, é necessário cuidado nas condições de derivatização, uma vez que a presença de umidade pode causar a hidrólise dos reagentes, comprometendo a eficiência do processo [48, 112, 113,114]. Na Figura 13 são apresentadas as estruturas desses derivatizantes.

Outras estratégias de derivatização incluem a acilação, que melhora a volatilidade dos compostos pela adição de grupos acila, como o acetil ($-\text{COCH}_3$). Essa reação é comumente realizada utilizando reagentes, como anidrido ácido acético ou cloreto de acila. Outra estratégia é a alquilação, que envolve a adição de

grupos alquila, como metila ou etila, convertendo grupos hidroxila em ésteres metílicos. Essas modificações facilitam a análise dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) [48,112,114].

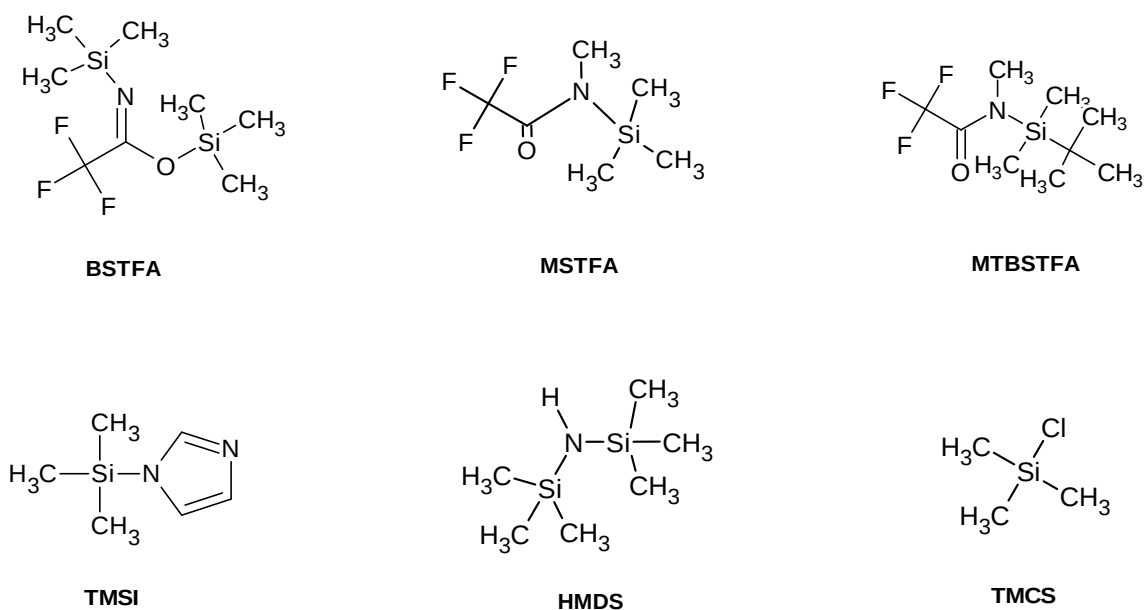


Figura 13: Estruturas químicas dos derivatizantes mais utilizados no processo de silição.. Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [114] utilizando o software ChemSketch.

Para açúcares redutores, como glicose e frutose, que apresentam um grupo carbonila livre, é comum a realização de uma etapa de oximação antes da silição. Esse processo impede a formação de múltiplos isômeros, o que simplifica o cromatograma e melhora a sensibilidade analítica ao diminuir a sobreposição de picos [48]. Em solução, tanto a glicose quanto a frutose existem em um equilíbrio dinâmico entre a forma aberta (linear) e as formas cíclicas. A oximação estabiliza a forma aberta dessas moléculas, reagindo com o grupo carbonila para formar oximas, o que reduz a formação de isômeros estruturais adicionais. A Figura 14 ilustra o equilíbrio entre as formas aberta e cíclica da glicose.

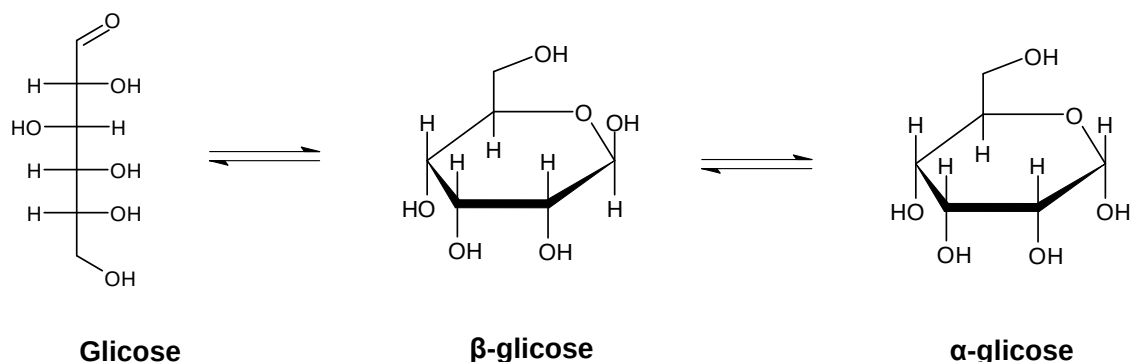


Figura 14: Equilíbrio entre as formas aberta e cíclica da glicose em solução. Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software ChemSketch.

A derivatização desses compostos ocorre em duas etapas: (1) oximação com hidroxilamina ou alcoxiâminas, como metoxilamina, seguida de (2) sililação, que aumenta a volatilidade e a estabilidade térmica dos compostos, facilitando sua análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A Figura 15 ilustra essas reações para a glicose. As oximas resultantes geram dois picos no cromatograma, correspondendo às formas estereoisoméricas *sin* (E) e *anti* (Z). No isômero *sin*, o grupo oxima está orientado no mesmo lado do grupo substituinte adjacente, enquanto no isômero *anti*, o grupo oxima está no lado oposto. Carboidratos não redutores, como a sacarose, exibem um único pico no cromatograma, pois não passam pela etapa de oximação devido à ausência de um grupo carbonila livre [48]. O mesmo ocorre com edulcorantes como xilitol, eritritol e sucralose, que também não formam oximas e geram apenas derivados sililados.

A Tabela 12 apresenta estudos na literatura que empregaram derivatização e quantificação por GC-MS para análise de carboidratos e outros compostos em alimentos e diversas matrizes. Neste estudo, foi adotado um método que combina oximação e sililação com MSTFA, permitindo a quantificação simultânea de glicose, frutose, sacarose e edulcorantes como eritritol, xilitol e sucralose por GC-MS.

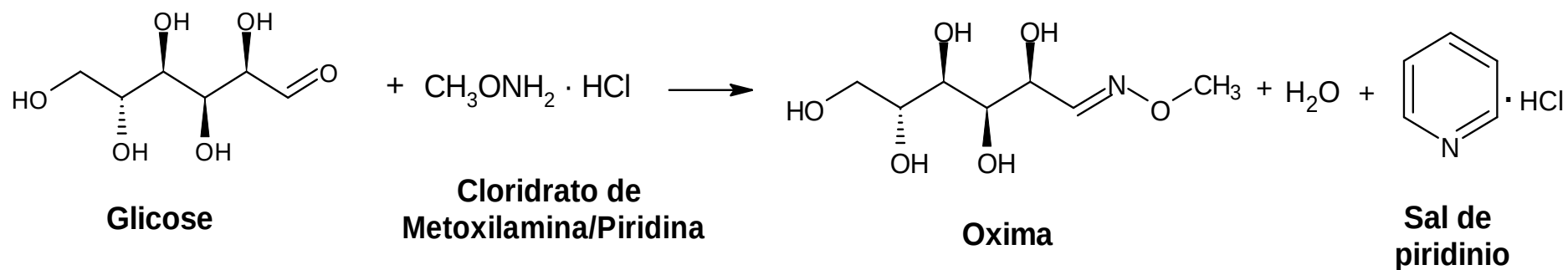
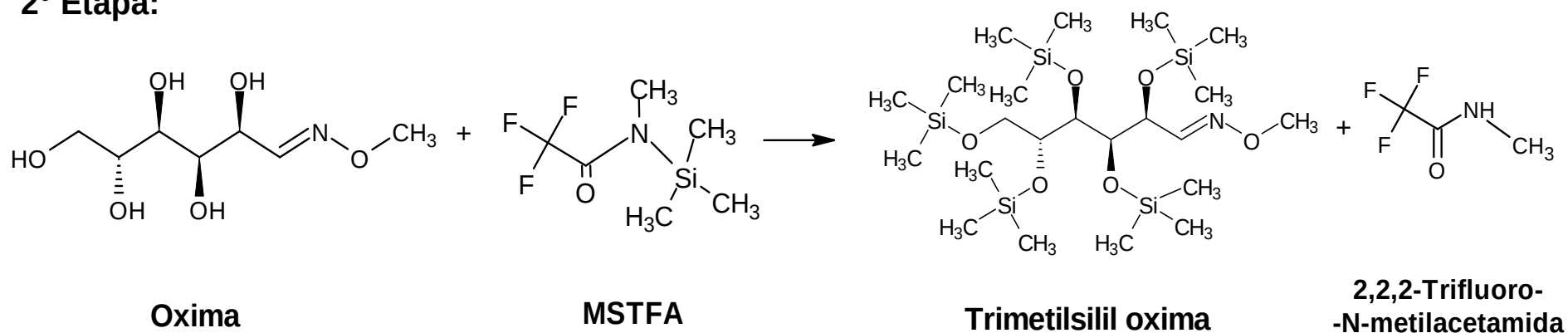
1º Etapa:**2º Etapa:**

Figura 15: Reações de oximação e sililação da glicose Fonte: Elaborada pelo autor com base nas referências [114] utilizando o software ChemSketch.

Tabela 12: Estudos na literatura que empregaram derivatização e quantificação por GC-MS para análise de carboidratos e outros compostos em alimentos e diversas matrizes

Técnica analítica	Derivatizantes	Condições analíticas	Analitos	Matriz	Faixa de trabalho	LD e LQ	Referência
GC-MS (Oximação e sililação)	1º: Cloridrato de O - metil-hidroxilamina; 2º: BSTFA	1º: 95°C, 45 min.. 2º: 90°C, 30 min.	Glicose, frutose, sacarose e manose	Suco de tâmara	N.I.	N.I.	[115]
GC-MS (Oximação e sililação)	1º: Cloridrato de O-Metilhidroxilamina; 2º: MSTFA	1º: 30°C, 90 min. 2º: 37°C, 30 min.	Diversos analitos, dentre eles carboidratos	Material biológico	N.I.	N.I.	[116]
GC-MS (Sililação)	BSTFA/TMCS	1º: 40°C, 15 min.	Diversos analitos, dentre eles carboidratos	Kombucha	N.I.	N.I.	[9]
GC-MS (Oximação e sililação)	1º: Cloridrato de O-Metilhidroxilamina; 2º: MSTFA ou BSTFA ou BSTFA/TMCS	1º: 30°C, 17 h. 2º: 37°C, 1 h.	Diversos analitos, dentre eles carboidratos	leite	N.I.	N.I.	[113]
GC –MS (Oximação e sililação)	1º: Cloridrato de O-etilhidroxilamina; 2º: BSTFA/TCMS	1º: 70°C, 1 h 2º: 70°C, 2 h	42 analitos, dentre eles: glicose, frutose, sacarose	xarope de agave, xarope de bordo, açúcar de palma e mel	N.I.	N.I.	[48]
GC-MS (Oximação e sililação)	1º: Cloridrato hidroxilamina; 2º: HMDS/TFA	1º: 75°C, 30 min. 2º: 45°C, 30 min.	glicose, frutose, sacarose	Mel e bebidas vitamínicas	50-5000 µg/mL	LD: 0,47 - 0,68 µg/mL; LQ: 1,58 – 2,27 µg/mL	[117]
GC-MS (Oximação e sililação)	1º: Cloridrato hidroxilamina; 2º: HMDS/TFA	1º: 75°C, 30 min. 2º: 45°C, 30 min	25 analitos, dentre eles: glicose e frutose	Mel	N.I.	N.I.	[118]
GC-MS (Sililação)	HMDS/TMCS	25°C, 5 min.	Sucralose	Adoçante	0,005 - 0,06 mg/mL	N.I.	[119]

Fonte: Elaborada pelo autor. Observações: N.I. – Não informado; TFA - ácido trifluoroacético.

4.2.1 OBJETIVOS

Desenvolver um método para avaliar o perfil de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e edulcorantes (eritritol, xilitol e sucralose) em Kombuchas de marcas nacionais, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), com derivatização por oximação e sililação.

4.2.2. MATERIAIS E REAGENTES

As soluções de trabalho foram preparadas com os seguintes reagentes: Glicose (CAS 50-99-7, Sigma-Aldrich, grau GC), frutose (CAS 57-48-7, Sigma-Aldrich, grau GC), sacarose (CAS 57-50-1, Sigma-Aldrich, grau GC), eritritol (CAS 149-32-6, Sigma-Aldrich, grau GC), xilitol (CAS 87-99-0, Sigma-Aldrich, grau GC), sucralose (CAS 56038-13-2, Sigma-Aldrich, grau GC), inositol (CAS 6917-35-7, Sigma-Aldrich, grau GC), metanol (CAS 67-56-1, Sigma-Aldrich, grau HPLC), Cloridrato de O-metil-hidroxilamina (CAS 593-56-6, Sigma-Aldrich, grau GC), N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) (CAS 24589-78-4, Sigma-Aldrich, grau GC), piridina (CAS 110-86-1, Sigma-Aldrich, grau HPLC) e n-heptano (CAS 142-82-5, Sigma-Aldrich, grau HPLC). A água deionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C) utilizada foi obtida a partir do equipamento MilliPore Direct-Q® 3 UV (França).

4.2.2.1 Preparo da solução Cloridrato de O-metil-hidroxilamina(30mg/mL)

Para o preparo de um volume final de 10 mL de solução, pesou-se 0,3000 g de Cloridrato de O-metil-hidroxilamina em um béquer, seguido pela adição de piridina para solubilizar o composto. A mistura foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com piridina. O reagente foi armazenado em um frasco de vidro etiquetado e datado, protegido da luz com papel alumínio, e mantido em freezer a -18°C até a realização das análises [116].

4.2.2.2 Preparo da solução de padrão interno inositol (5 mg/mL)

Preparou-se uma solução intermediária de inositol a 50 mg/mL. Para isso, pesou-se 0,5000 g de inositol em um béquer, adicionou-se água para solubilização, e a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água. Em seguida, pipetou-se 1 mL dessa solução para um segundo balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com metanol, o que resultou em uma diluição de 10 vezes, obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL de inositol. A solução foi armazenada em frasco de vidro etiquetado e datado, mantido em geladeira a -4°C até o momento das análises.

4.2.3 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração foram preparadas utilizando um mix de glicose, frutose, sacarose, eritritol, xilitol e sucralose, com uma concentração de 5 mg/mL de cada analito em água. Para gerar os pontos da curva, foram pipetados volumes de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 microlitros da solução estoque para um tubo Eppendorf® de 2,0 mL, conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13: Preparo da curva analítica

Concentração final após derivatização (mg/mL)	Volume pipetado (µL) Solução padrão intermediária (5 mg/mL)	Massa final (mg)	Volume final (mL)
0,042	5	0,025	0,6
0,083	10	0,050	0,6
0,167	20	0,100	0,6
0,250	30	0,150	0,6
0,333	40	0,200	0,6
0,500	60	0,300	0,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, foram adicionados 10 μL da solução de padrão interno de inositol (5 mg/mL) a cada tubo. As soluções foram então secas em uma chapa de aquecimento a aproximadamente 50 °C com fluxo de ar gerado por uma bomba adaptada (Figura 16).

Após a secagem, 50 μL de cloridrato de O-metil-hidroxilamina (30 mg/mL) foram adicionados a cada tubo, que foram selados com Parafilm® e aquecidos a 40 °C por 1 hora, com a temperatura controlada. Em seguida, adicionou-se 50 μL de MSTFA, e a mistura foi homogeneizada em vórtex a 3000 rpm por 10 segundos. Os tubos foram novamente vedados com Parafilm® e mantidos a 40 °C por mais 1 hora.

Após esse período, os tubos foram resfriados e 500 μL de n-heptano foram adicionados, totalizando um volume final de 600 μL . As soluções foram transferidas para vials de 1,5 mL para posterior injeção no sistema cromatográfico, resultando em uma faixa de trabalho de 0,042 a 0,500 mg/mL, após a derivatização.

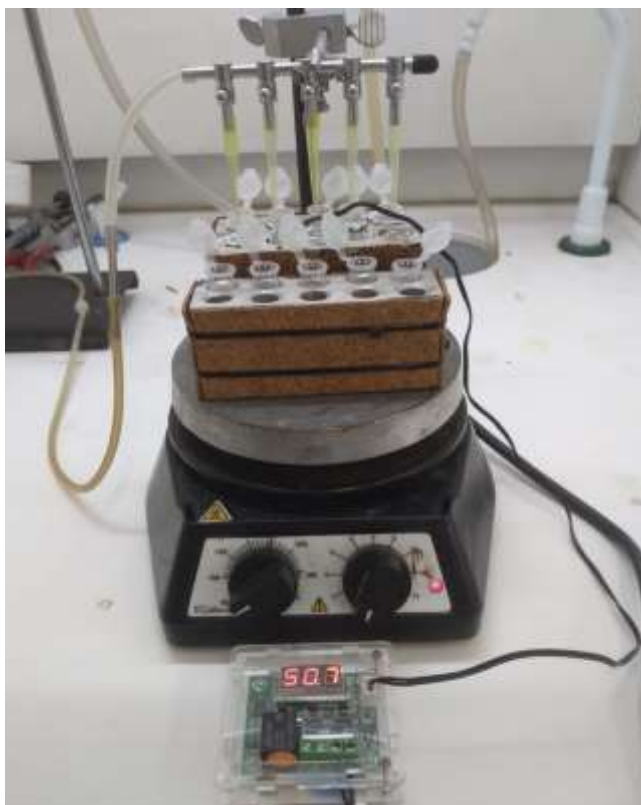


Figura 16: Sistema de aquecimento com fluxo de ar e bomba adaptada para a secagem das amostras, visando o preparo posterior para análise por GC-MS. Fonte: Obtida pelo autor.

4.2.4 PREPARO DE AMOSTRAS

Após o preparo inicial das amostras (Capítulo 3, item 3.4), 10 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo Eppendorf® de 2,0 mL, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.3. Das 96 amostras de Kombuchas comerciais disponíveis, 70 amostras foram analisadas.

4.2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Foi utilizado um cromatógrafo a gás (GC) Shimadzu® GC-2010 (Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo simples (QMS), modelo QP2010, com uma coluna Rtx-5MS Restek (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O hélio de alta pureza (99,999%) foi empregado como gás de arraste, com vazão de 1,0 mL/min.

Foi injetado 1 µL de amostra no modo split 1:50. A separação cromatográfica teve duração total de 25,83 minutos, com a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial de 150 °C (mantida por 2 minutos), seguida de aquecimento a 10 °C/min até 290 °C (mantida por 5 minutos); aumento de 30 °C/min até 320 °C; e, por fim, redução de -20 °C/min até retornar à temperatura inicial de 150 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 °C. A temperatura da fonte de ionização foi mantida em 200 °C, enquanto a interface permaneceu a 250 °C.

A ionização ocorreu por impacto de elétrons a 70 eV. As análises foram realizadas no modo SCAN, com uma faixa de 50 a 500 *m/z* e tempo de corte do solvente de 3 minutos.

4.2.6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.6.1 Validação parcial do método GC-MS

Foi avaliada a linearidade das curvas de calibração preparadas em solvente, com a elaboração de três curvas independentes. Primeiramente, um gráfico de resposta em função da concentração foi elaborado para identificar visualmente possíveis valores discrepantes. A exclusão dos outliers foi realizada por meio do teste de resíduos padronizados de Jackknife. As curvas de calibração, após a remoção dos outliers, podem ser visualizadas no Apêndice A.

As regressões lineares das curvas de calibração foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMOQ). A normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos foram verificadas pelos testes de Ryan-Joiner, Durbin-Watson e Brown-Forsythe, respectivamente. Os resultados indicaram que os resíduos apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$), independência ($p > 0,05$) e homocedasticidade ($p > 0,05$). A análise de variância (ANOVA) revelou que as regressões eram significativas ($p < 0,001$). Dessa forma, a faixa de trabalho demonstrou linearidade no intervalo de 0,042 a 0,500 mg/mL, após a derivatização.

A exatidão (recuperação) e a precisão (repetibilidade) do método também foram avaliadas nos pontos inicial e final da curva de calibração, apresentando taxas de recuperação entre 93% e 104% e repetibilidade de 4,8% a 5,3%, em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC. O limite de quantificação (LOQ) foi definido como o menor ponto na curva de calibração (0,042 g/L), no qual os parâmetros de recuperação e repetibilidade foram determinados. O limite de detecção (LOD) foi estimado usando a equação $LOD = LOQ / 3,3$, resultando em 0,013 g/L.

4.2.6.2 Análise cromatográfica

A aplicação do método cromatográfico nas amostras de Kombucha resultou em uma análise eficiente, destacando-se pela alta sensibilidade e seletividade, proporcionadas pela espectrometria de massas. Essa combinação possibilitou a análise simultânea de todos os analitos em uma única corrida, facilitando a

identificação e quantificação precisa dos compostos presentes. A identidade dos analitos foi confirmada por meio da biblioteca NIST8 (*National Institute of Standards and Technology*, 2008).

Na Figura 17 está apresentado o espectro de massas da sacarose, enquanto os demais espectros obtidos podem ser consultados no Apêndice A. A derivatização com MSTFA gera entre outros íons, o íon trimetilsilil $(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$, com m/z 73, que aparece como um pico intenso e serve como marcador da presença do grupo TMS. Dependendo da estrutura do analito e do número de grupos TMS, outros íons podem ser gerados. Entre os fragmentos característicos, pode ser observado também em todos os espectros o íon m/z 103, proveniente da clivagem de uma ligação oxigenada, formando o fragmento $(\text{CH}_3)_3\text{SiOCH}_2^+$, presente em compostos com grupos hidroxila, como os açúcares analisados neste estudo, além do m/z 217 [48,112,113].

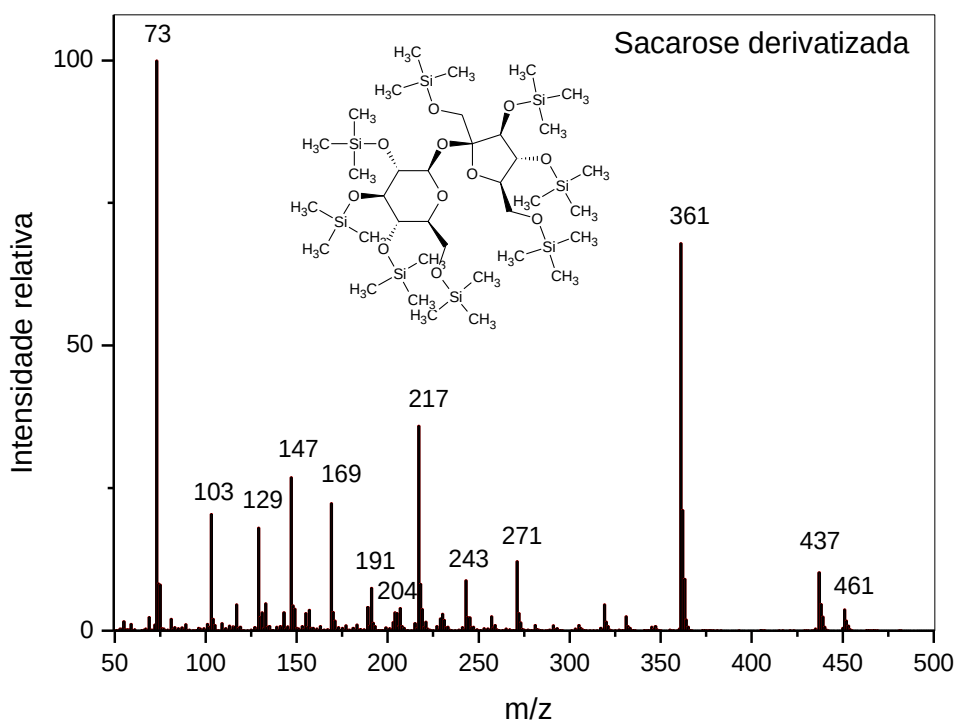


Figura 17: Espectro de massas da sacarose após derivatização utilizando oximação e silação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

No cromatograma disponível na Figura 18, são observados dois picos distintos referentes aos isômeros E (anti) e Z (sin) da glicose e da frutose. A Figura 18b exibe um zoom dos picos, permitindo visualizar com maior detalhe a separação dos isômeros para cada monossacarídeo. A diferença na orientação do grupo oxima resulta em picos distintos no cromatograma, com variações tanto nos tempos de retenção quanto na intensidade dos sinais [112,118]. Para a quantificação, optou-se por somar as áreas dos picos E (anti) e Z (sin), o que contribui para aumentar a precisão dos resultados, pois leva em consideração a totalidade dos compostos presentes na amostra.

A derivatização demonstrou ser eficiente na conversão dos compostos em formas voláteis, adequadas para análise por cromatografia gasosa. A adição de inositol como padrão interno ajudou a compensar variações instrumentais, melhorando a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. Os cromatogramas gerados demonstram uma separação eficiente entre os picos de interesse, com tempos de retenção estáveis, indicando a reprodutibilidade do método.

A coluna cromatográfica Rtx-5MS Restek, com fase estacionária composta por 5% de fenil e 95% de dimetilpolisiloxano, demonstrou-se eficaz devido à sua alta estabilidade térmica, baixa afinidade com os analitos e excelente capacidade de separação de compostos com diferentes polaridades. Essas propriedades permitiram uma separação eficiente dos açúcares presentes nas amostras de Kombucha, como glicose, frutose e sacarose, além de possibilitar a análise dos edulcorantes eritritol, xilitol e sucralose.

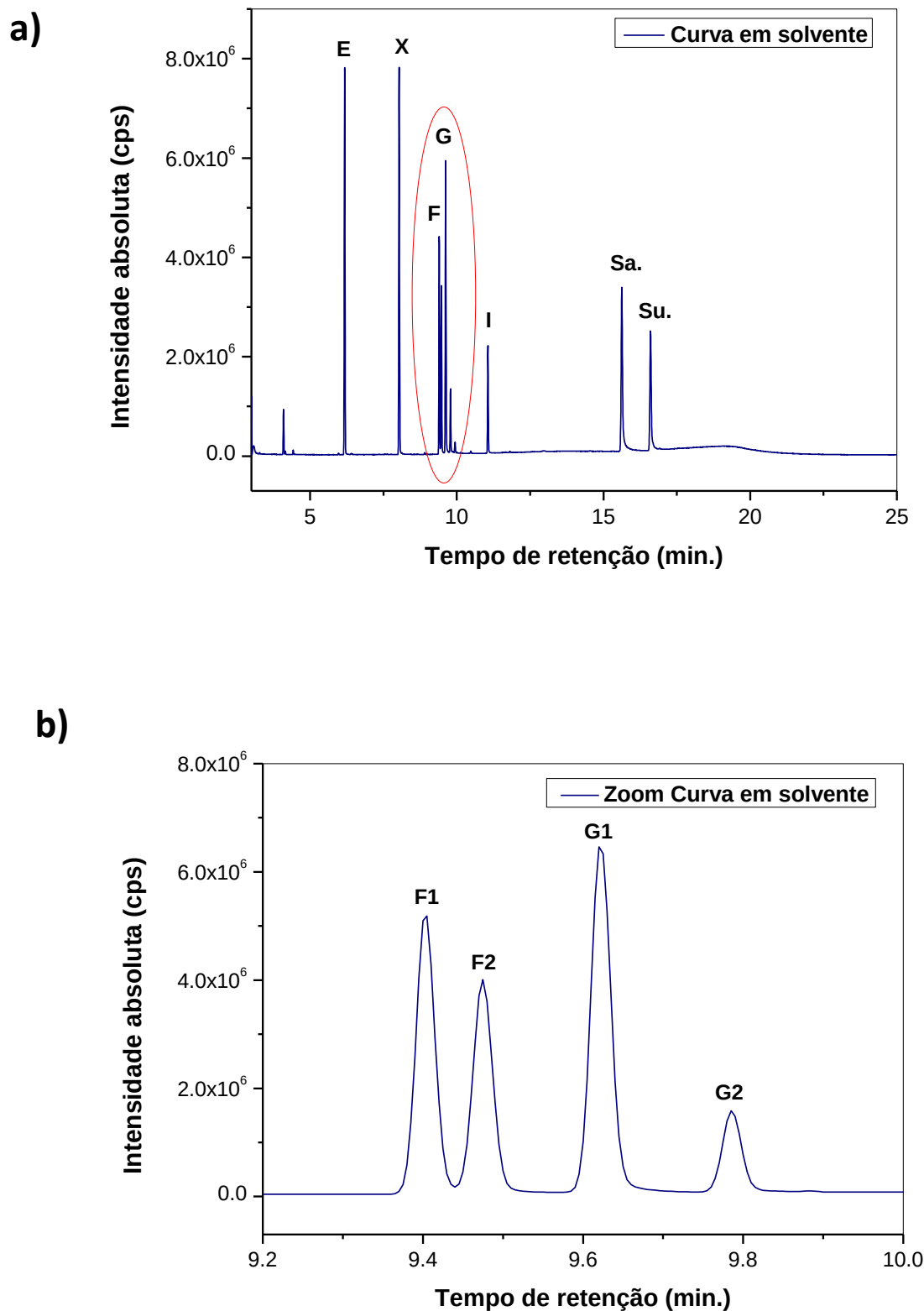


Figura 18. (a) Cromatograma da análise dos padrões de açúcares e edulcorantes preparados em solvente. Identificação dos picos: E = eritritol, X = xilitol, F = frutose, G = glicose, I = inositol, Sa = sacarose e Su = sucralose. A área destacada em vermelho representa a ampliação mostrada em (b), destacando a separação dos isômeros *sin* e *anti* da glicose e frutose. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

4.2.7.3 Aplicação do método para a determinação do perfil de açúcares e edulcorantes em amostras de Kombucha por GC-MS

A análise das 70 amostras não revelou a presença dos edulcorantes eritritol, xilitol ou sucralose.

Quanto aos teores de glicose, as concentrações variaram de 2,5 a 23,9 g/L, conforme ilustrado no gráfico Boxplot da Figura 19, com valor médio de 11,3 g/L. Quatro amostras apresentaram concentrações abaixo da faixa de trabalho do método, enquanto duas amostras ultrapassaram a faixa. A mediana, representada pela linha central dentro da caixa do Boxplot, sugere que a distribuição dos dados é simétrica, com uma tendência central bem definida. Além disso, nenhum outlier foi identificado, o que reforça a consistência e a homogeneidade dos resultados obtidos.

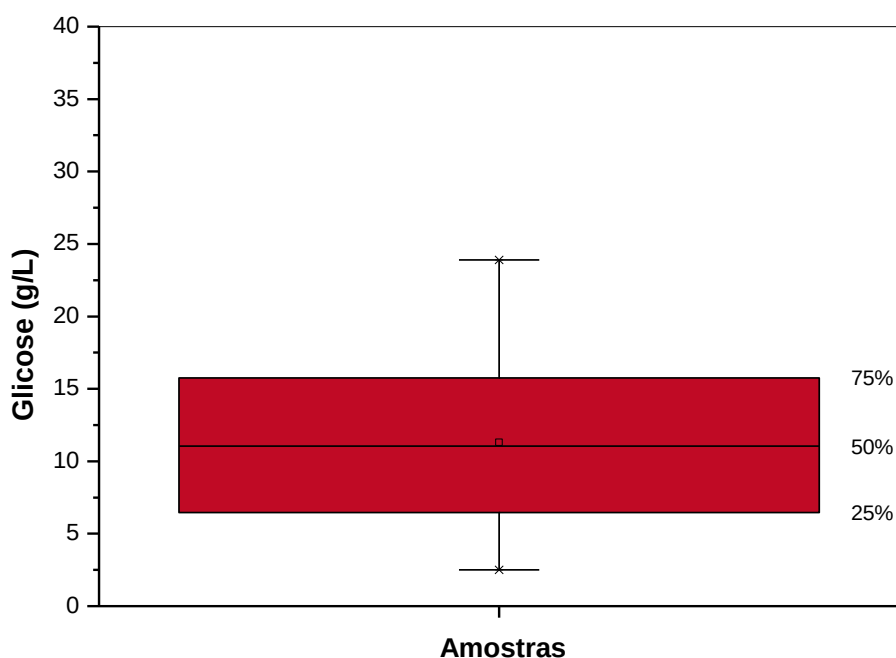


Figura 19. Boxplot dos teores de glicose nas amostras de Kombucha que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.

No que diz respeito aos teores de frutose, as concentrações variaram de 2,5 a 29,8 g/L (Figura 20), com valor médio de 13,6 g/L. Todas as amostras apresentaram valores dentro da faixa de trabalho. A mediana, centralizada na caixa do Boxplot, sugere uma distribuição simétrica dos dados, indicando uma tendência central bem definida. Nenhum outlier foi identificado.

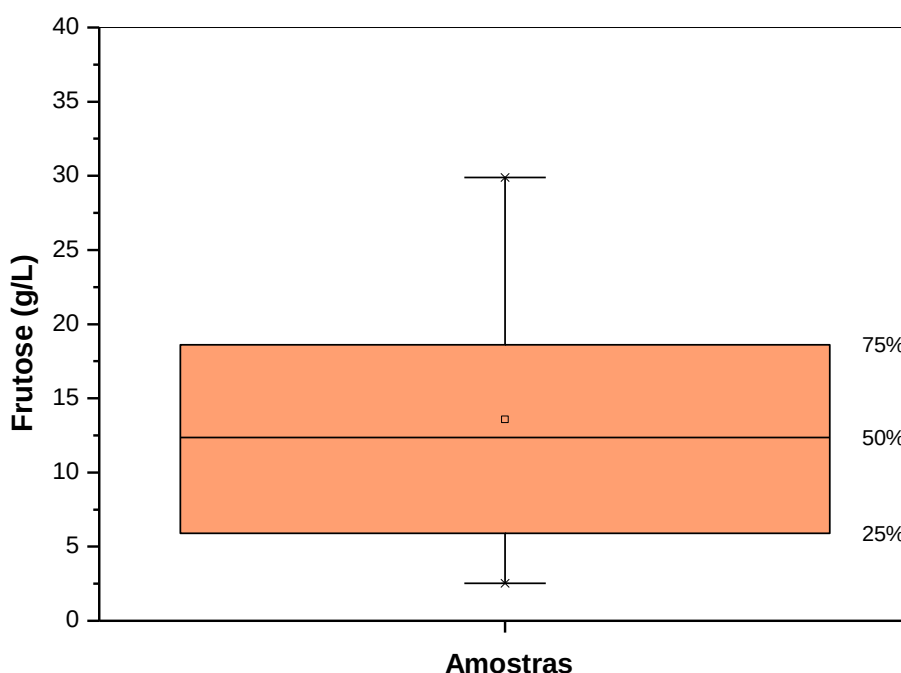


Figura 20. Boxplot dos teores de frutose nas amostras de Kombucha que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.

Quanto aos teores de sacarose, das 70 amostras analisadas, 42 apresentaram concentrações acima da faixa de trabalho do método (0,042 a 0,500 mg/mL, após a derivatização), o que exigiria a diluição dessas amostras. No entanto, devido à indisponibilidade do derivatizante MSTFA, não foi possível realizar essas análises. Assim, apenas 28 amostras, que estavam dentro da faixa de trabalho, puderam ser quantificadas, com concentrações de sacarose variando entre 3,6 e 29,9 g/L, com valor médio de 17,1 g/L, conforme ilustrado no gráfico da Figura 21.

A mediana dos valores de sacarose não está centralizada na caixa do Boxplot, indicando uma distribuição assimétrica dos dados e sugerindo uma tendência central menos definida. Quanto maior a caixa, maior a dispersão dos

dados. Esse comportamento ressalta as diferenças nos níveis de sacarose entre as amostras, refletindo a complexidade da produção das Kombuchas, que pode ser influenciada por variações na fermentação e nos ingredientes utilizados.

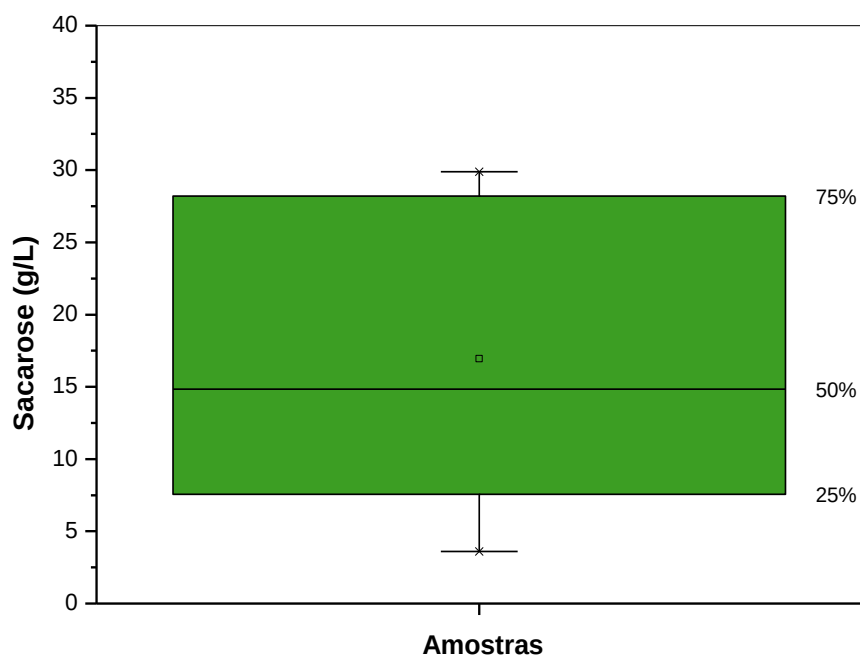


Figura 21. Boxplot dos teores de sacarose nas amostras de Kombucha que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.

Com base nas 28 amostras nas quais foi possível quantificar os três açúcares (glicose, frutose e sacarose), foi elaborado um perfil completo da composição dos açúcares presentes, o qual pode ser visualizado na Figura 22. As análises realizadas permitiram mapear a distribuição dos diferentes tipos de açúcares nas amostras, oferecendo uma visão abrangente de sua composição.

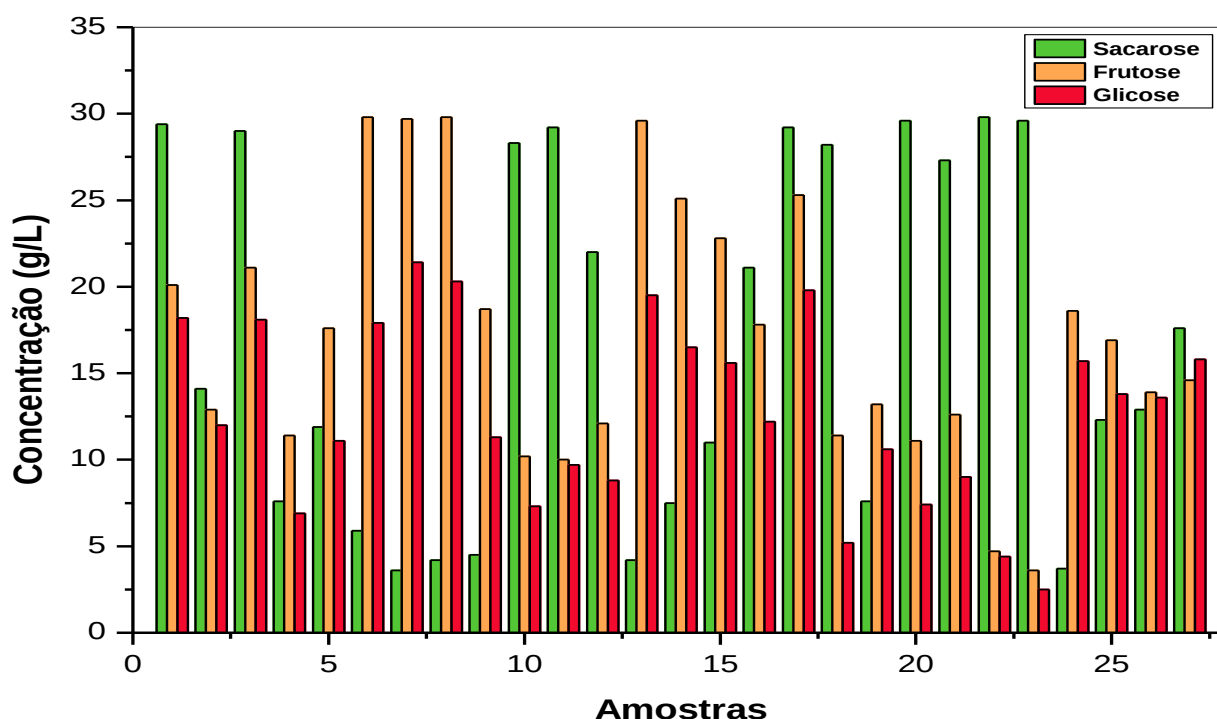


Figura 22. Perfil de açúcares nas amostras de Kombucha com valores que se encontram dentro da faixa de trabalho do método. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin 8.5.

Na Figura 22, observa-se que a sacarose, frequentemente adicionada como o açúcar inicial no processo fermentativo das Kombuchas, apresenta níveis mais altos em diversas amostras. Com o avanço da fermentação, a sacarose é hidrolisada em seus monossacarídeos constituintes, glicose e frutose. No entanto, uma parte significativa da sacarose inicial não é totalmente consumida e permanece como açúcar residual nas amostras, o que exige que seja declarada no rótulo como açúcar adicionado. Como as concentrações de sacarose da maioria das amostras analisadas estavam acima da faixa de trabalho do método, é possível inferir que excederam 30 g/L. Para valores superiores a 75 g/L, deve ser realizada a declaração frontal no rótulo, com a indicação “alto em açúcares adicionados” [43,89].

As amostras analisadas mostraram perfis distintos de açúcares, com algumas apresentando altos teores de glicose e/ou frutose e baixos de sacarose. Esse perfil pode indicar uma hidrólise eficiente da sacarose, mas sugere também uma possível ineficiência na fermentação subsequente, que converte os monossacarídeos em etanol e ácidos. Ou pode ser devido a uma interrupção intencional da fermentação,

com o objetivo de preservar uma maior concentração de monossacarídeos (glicose e frutose), conferindo à bebida um perfil mais adocicado e palatável. Essa interpretação, no entanto, é especulativa, pois esses monossacarídeos também podem ser oriundos de frutas e polpas adicionadas, o que é comum na produção de Kombucha e torna incerta a origem exata da glicose e da frutose [4,5,36].

Durante a fermentação, a glicose tende a ser consumida mais rapidamente do que a frutose. Leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, consomem a glicose de forma mais eficiente. A glicose, por ser prontamente metabolizada nas vias fermentativas, resulta em uma produção mais rápida de etanol. A frutose, embora também utilizada, é consumida a uma taxa mais lenta, permanecendo em concentrações mais altas nas fases iniciais da fermentação, enquanto a glicose se esgota mais rapidamente. Esse fenômeno é observado no perfil das amostras, em que o teor de glicose é mais baixo do que o de frutose em todas as amostras, exceto uma [4].

Analisar o perfil de açúcares é importante tanto para monitorar a eficiência do processo fermentativo quanto para garantir uma rotulagem correta do produto, conforme as exigências de transparência ao consumidor.

Venturim et al. (2020), ao investigarem Kombuchas artesanais por meio da técnica HPLC-RID, observaram uma significativa variabilidade nos teores de açúcares, semelhante aos resultados obtidos neste estudo. Os intervalos de concentração reportados foram: sacarose entre 2,8 e 51,6 g/L, glicose entre 5,3 e 17,3 g/L e frutose entre 2,2 e 14,4 g/L [95].

As variações nos níveis de açúcares em ambos os estudos refletem, principalmente, as diferenças nos métodos de produção e a diversidade das comunidades microbianas presentes, que metabolizam os açúcares de maneiras distintas ao longo do processo fermentativo.

]

4.3 CONCLUSÕES

O método espectrofotométrico com DNS validado mostrou-se eficaz para determinar os níveis de açúcares totais nas amostras de Kombuchas comerciais brasileiras, oferecendo resultados confiáveis, sendo um método simples e que permite uma ampla gama de análises. Foram analisadas 96 amostras, nas quais se observou uma grande variação nos teores de açúcares totais, oscilando entre 20 e 84 g/L. Estudos anteriores, tanto no Brasil quanto em outros países, encontraram concentrações entre 2 e 113 g/L.

Paralelamente, o método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com derivatização, demonstrou eficiência para a determinação simultânea de açúcares e edulcorantes em matrizes fermentadas complexas, como a Kombucha. A utilização da espectrometria de massas proporcionou elevada sensibilidade e seletividade. A derivatização por sililação mostrou-se adequada para aumentar a volatilidade dos compostos, enquanto a etapa de oximação foi fundamental para evitar a formação de múltiplos isômeros, resultando em cromatogramas mais simples e com menor sobreposição de picos, o que contribuiu diretamente para a melhoria da resolução analítica.

Nas 70 amostras analisadas, não foi encontrado nenhum dos edulcorantes investigados (eritritol, xilitol ou sucralose) indicando conformidade com a legislação brasileira vigente, que proíbe a adição desses compostos à bebida. Observou-se, ainda, uma ampla variação nos teores de glicose, frutose e sacarose, reflexo das diferenças nos processos tecnológicos, ingredientes empregados e estratégias de fermentação adotadas pelos fabricantes. A presença de elevados teores de açúcares residuais (>30 g/L) em diversas amostras evidencia a necessidade de monitoramento contínuo, tanto do ponto de vista sensorial quanto em relação à segurança e à estabilidade do produto.

A falta de clareza nos rótulos quanto aos níveis de açúcares pode representar um risco à saúde, especialmente para pessoas com restrições alimentares, como diabéticos. Por isso, é fundamental garantir uma regulamentação apropriada e fiscalização rigorosa para assegurar que as informações fornecidas aos consumidores sejam precisas.

5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE EM KOMBUCHAS

Nos últimos anos, houve um notável aumento na utilização da espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR) combinadas com quimiometria para o controle de qualidade de alimentos e bebidas. Esse crescimento foi impulsionado por diversos fatores, incluindo avanços tecnológicos que resultaram em instrumentação mais acessível, ampliando sua disponibilidade nos laboratórios, além dos avanços em procedimentos de tratamento de dados que permitem a determinação de propriedades de interesse em sistemas relativamente complexos, mesmo na presença de interferentes e possibilita determinações simultâneas de vários analitos [120,121].

Devido à globalização do comércio de alimentos, há uma crescente demanda por técnicas de análise rápidas e não destrutivas para garantir a conformidade com os regulamentos de segurança alimentar e detectar possíveis adulterações. Nesse cenário os modelos quimiométricos associados à espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR) oferecem uma série de vantagens para a quantificação de analitos em alimentos. Essas técnicas são rápidas e eficientes, permitindo a aquisição de espectros em curtos períodos, podendo ser aplicadas diretamente em amostras líquidas e sólidas com pouca ou nenhuma preparação prévia [120,121].

O uso dessas técnicas tem o potencial de reduzir os custos operacionais, uma vez que elimina a necessidade de reagentes caros associados aos métodos químicos convencionais, tornando-se uma opção mais acessível em comparação com técnicas analíticas mais complexas, como a cromatografia. Além disso, geram menos resíduos, contribuindo para práticas mais sustentáveis com menor impacto ambiental [122].

Existem poucos estudos na literatura que empregam métodos quimiométricos na análise da composição química de Kombuchas. Alguns dos poucos encontrados

estão disponíveis na Tabela 14. É importante ressaltar que as amostras utilizadas nesses estudos foram preparadas especificamente para a pesquisa. No presente trabalho, as amostras são comerciais e provenientes de diferentes fabricantes e regiões do Brasil, o que confere aos modelos desenvolvidos uma maior robustez e representatividade. Embora haja poucos exemplos focados em Kombucha, as técnicas quimiométricas têm ampla aplicação na análise de bebidas como cervejas, vinhos e sucos, como exemplificado na Tabela 14.

Durante o desenvolvimento desta pesquisa, foi dada prioridade aos principais parâmetros de controle de qualidade das Kombuchas, que incluem a acidez e o teor alcoólico, conforme especificado pela IN n° 41/2019 [3]. Também foram considerados os teores de açúcares totais, que são importantes para a conformidade com a Tabela Nutricional do produto (RDC 429/2020) [43], além dos teores de glicose e frutose, que fornecem informações valiosas sobre o processo fermentativo da bebida.

O espectro de infravermelho médio, que se estende de 4000 a 400 cm^{-1} , abrange uma ampla faixa espectral capaz de revelar vibrações características de diferentes classes de analitos, incluindo açúcares, ácidos, álcoois e compostos fenólicos [120]. Isso permite a quantificação simultânea de vários compostos, uma vantagem particular em bebidas com uma variedade de componentes. Além disso, por ser um método simples, rápido e amplamente disponível em laboratórios de controle de qualidade de alimentos, o MIR é uma escolha eficaz e prática para analisar esses parâmetros críticos [121].

Tabela 14: Métodos quimiométricos na análise da composição química de bebidas fermentadas.

Técnica analítica	Método de referência	Tipo de matriz	Parâmetros avaliados	Modelos quimiométricos	Referência
NIR associado à PLS-BPANN	Espectrofotométrico ácido antrona-sulfúrico	Kombucha artesanal	Monitoramento online de açúcar total durante a fermentação	RMSEP = 0,8600g/L; R^2_{pred} = 0,9437	[123]
	Açúcares solúveis: método antrona-ácido sulfúrico;			Açúcares solúveis: R^2_{pred} = 0,9746 e RMSEP = 0,5275g/L;	
NIR associada aos algoritmos PLS, SSA, WOA, AVOA	- Acidez total: titulação potenciométrica; - Concentração bacteriana: densidade óptica com espectrofotômetro UV/VIS	Kombucha artesanal	Monitoramento online de açúcares solúveis, ácidos totais e bactérias durante a fermentação	- Ácidos totais: R^2_{pred} = 0,9570 e RMSEP= 0,3888g/L; - Concentração bacteriana: R^2_{pred}= 0,9830 e RMSEP=0,0407 (Abs)	[124]
HS-SPME-GC/MS associada à PCA e PLS-DA	HS-SPME-GC/MS	Kombucha artesanal	Empregou-se PCA e PLS-DA para encontrar a relação entre os componentes do aroma e o tempo de fermentação	N.I.	[125]
				Glicose: Faixa de trabalho 0,62 a 10,51 g/L; RMSEPcal = 0,879 (RNAs) e R^2_{cal} = 0,989 (RNAs);	
FTIR associada à PLS-1 e RNAs	Fortificação em matriz sem o analito	Kombucha artesanal	Quantificação simultânea de glicose, ácido glucurônico e glucônico durante a fermentação	- Ácido glucurônico: Faixa de trabalho 0,07 a 7,72 g/L; RMSEPcal = 1,24 (RNAs) e R^2_{cal} = 0,971 (RNAs); - Ácido glucônico: Faixa de trabalho 0,04 a 1,16 g/L; RMSEPcal = 1,13 (RNAs) e R^2_{cal} = 0,954 (RNAs).	[126]

Tabela 14: Métodos quimiométricos na análise da composição química de bebidas fermentadas.

Técnica analítica	Método de referência	Tipo de matriz	Parâmetros avaliados	Modelos quimiométricos	Referência
NIR associado à PCA	• Compostos bioativos: UPLC; • Etanol: espectrofotometria; UV/VIS - Método de Salik e Povoh (1993); • pH: medidor de pH; • Açúcares redutores totais: Método DNS; • Acidez total titulável: titulométrica com NaOH	Kombucha artesanal (chá preto e chá verde)	Etanol, pH, açúcares redutores totais, acidez titulável total e compostos bioativos durante a fermentação	N.I.	[127]
NIR associado à PLS	GC-FID	Cerveja	Etanol	Faixa de trabalho 3,2 a 10,9%v/v; RMSEP = 0,6%v/v; $R^2_{cal} = 0,9335$; RPD _{val} =2,7	[128]
FTIR associado à PLS		Vinho	Acidez total e volátil	Acidez total: Faixa de trabalho 2 a 10g/L e RMSEP= 0,085g/L Acidez volátil: Faixa de trabalho 0,2 a 2,2g/L e RMSEP=0,022g/L	[129]
FTIR associado à PLS	HPLC após quebra enzimática	Sucos de fruta cítricas	Sacarose (Sac), glicose (Gli), frutose (Fru), 1-cestose (GF2), nistose (GF3) e 4F-frutofuranosil nistose(GF4)	RMSEP: Gli, Fru, Sac, GF2 e GF3 são respectivamente 0,51, 0,49, 0,73, 0,86 e 0,61g/L	[130]

Fonte: Elaborada pelo autor. Observações: N.I. – Não informado; BPANN - rede neural de retropropagação; NIR - Espectroscopia no infravermelho próximo; SSA – análise espectral singular, WOA – Algoritmo de otimização de baleia, AVOA - Inversão quadrática de dados; HS-SPME-GC/MS- Microextração em fase sólida acoplada a Headspace e cromatografia a gás com detector de massas; PCA – Análise por componentes principais; PLS-DA - Regressão por mínimos quadrados parciais; RNAs - redes neurais artificiais; FTIR - espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier ; Cal- calibração; Pred – predição.

5.1 OBJETIVOS

Desenvolver modelos quimiométricos simples e rápidos utilizando espectroscopia no infravermelho médio e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), que permitam quantificar o teor alcoólico, acidez, açúcares totais, teor de glicose e frutose de amostras de Kombucha.

5.2 EQUIPAMENTOS

Os espectros infravermelhos das 96 amostras de Kombucha foram adquiridos utilizando um espectrofotômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), modelo Frontier, da marca PerkinElmer. Foi empregado um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante. Os espectros foram registrados em transmitância dentro da faixa de $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ e um total de 32 varreduras.

5.3 PREPARO DE AMOSTRAS

Após o preparo geral das amostras (Capítulo 3, item 3.4), foram retirados 50 μL de cada uma e transferidos para a célula de ATR com o auxílio de uma micropipeta. Antes de cada leitura, a célula foi limpa com algodão e acetona PA.

5.4 TRATAMENTO DOS DADOS

As medidas de transmitância versus número de onda foram coletadas e organizadas na forma de uma matriz de dados $\mathbf{X}_{n \times p}$. Nessa matriz, as linhas representam as n-amostras e as colunas as p-variáveis (número de onda). Além disso, foi construído um vetor $\mathbf{y}_{n \times 1}$ contendo os teores do analito. Os modelos de

calibração multivariada por PLS foram elaborados utilizando o software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.5.1 Espectros de transmitância no infravermelho obtidos por FTIR

Os espectros de transmitância no infravermelho de todas as amostras de Kombucha foram obtidos de acordo com o descrito na seção 5.2 e estão representados na Figura 23. Devido à alta concentração de água na composição das amostras, torna-se difícil a identificação das bandas características das amostras devido à sobreposição com as bandas largas típicas da molécula de água: uma banda larga em torno de 3500 cm^{-1} (região I), atribuída às vibrações de estiramento O–H, e outra em $1595\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ (região III), correspondente à deformação angular H–O–H (modo tesoura) [131].

Ao analisar os espectros de todas as amostras de Kombucha, desconsiderando as bandas da molécula de água, as principais diferenças são observadas nas faixas de $3000\text{ a }2250\text{ cm}^{-1}$ (região II) e $1500\text{ a }750\text{ cm}^{-1}$ (região IV). Como as bandas nessas regiões não foram muito claras suas correlações com os grupos funcionais foram atribuídas após a construção dos modelos quimiométricos apresentados posteriormente. A região do espectro empregada na construção dos modelos PLS foi de $4000\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$.

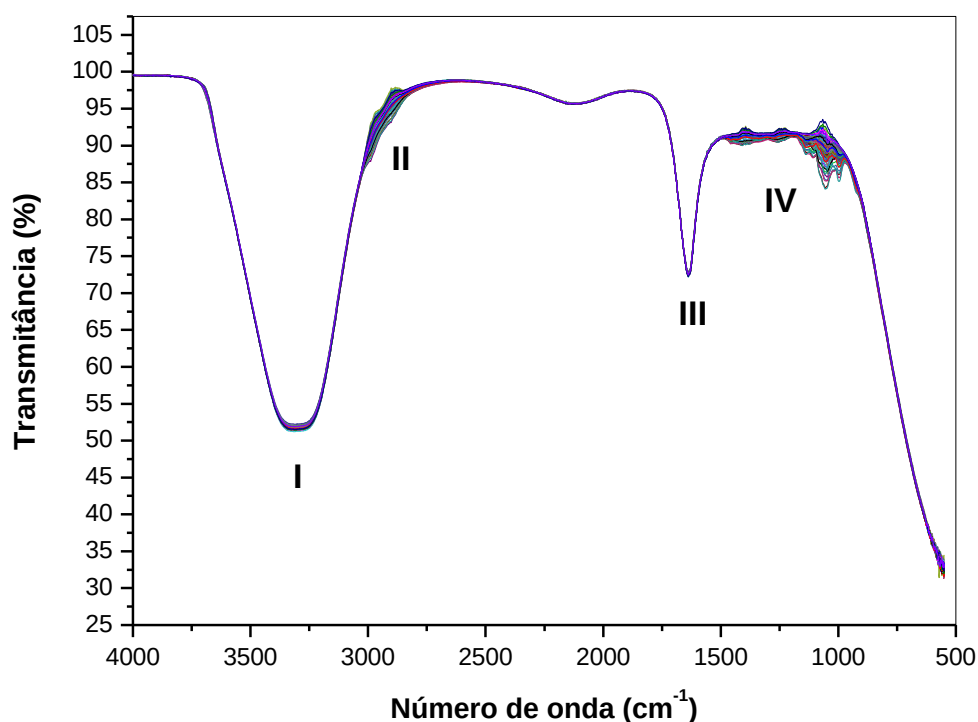


Figura 23: Espectros de infravermelho médio das 96 amostras de Kombucha. Fonte: Espectrofotômetro no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), modelo Frontier, marca PerkinElmer.

5.5.2 Modelo PLS para determinação do teor alcoólico de Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio

Foi construído um modelo de calibração multivariada baseado na regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), empregando espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), para a determinação do teor alcoólico em Kombuchas. A faixa espectral considerada foi de 4000 a 900 cm^{-1} . Os valores de referência utilizados na calibração foram obtidos pelo método cromatográfico (GC-FID), desenvolvido e validado neste estudo (Capítulo 3).

Todas as 96 amostras foram incluídas no modelo, resultando na matriz $\mathbf{X}_{96 \times 3100}$ (espectros FTIR) e no vetor $\mathbf{Y}_{96}$ (teores de etanol), uma vez que todas apresentaram concentrações acima do Limite de Quantificação (LQ) do método, variando de 0,10 a 1,70 % v/v.

Para selecionar as amostras nos conjuntos de calibração e validação, utilizou-se o algoritmo Kennard-Stone, assegurando a independência dos conjuntos e abrangendo toda a faixa de concentração do analito. O conjunto de calibração incluiu 2/3 (64) do total de amostras, enquanto o conjunto de validação contou com 1/3 (32) das amostras, garantindo a inclusão de amostras mais representativas na calibração.

Os dados foram pré-processados com a primeira derivada Savitzky-Golay (ordem: 2; janela: 15 pontos) e centralizados na média. A validação cruzada foi realizada por subconjuntos aleatórios com 7 divisões e 20 iterações. O número de variáveis latentes foi determinado considerando o menor RMSECV (raiz do erro quadrático médio de validação cruzada).

A detecção de outliers foi realizada por meio da avaliação dos gráficos de Q residual versus Hotelling T^2 e de *leverage* versus resíduos de Student, considerando um nível de confiança de 95%. O número de outliers identificados não ultrapassou o limite recomendado de 2/9 (22,2%) tanto para o conjunto de calibração quanto para o de validação [57,132,133].

Foram identificadas 10 amostras como outliers no conjunto de calibração e 3 no conjunto de validação. Após a otimização por detecção de outliers, o número de variáveis latentes foi definido como 3, descrevendo 92,23% da variância em X e 94,11% da variância em Y .

Os principais parâmetros do modelo estão apresentados na Tabela 15. Os valores de RMSEC, RMSEP e R^2 indicam que o modelo possui boa exatidão e ajuste, conforme demonstrado na Figura 24, que representa os valores reais versus preditos do teor de etanol.

O RMSEC reflete a dispersão dos pontos no modelo de calibração, enquanto um valor menor de RMSEP sugere uma maior exatidão na previsão. O coeficiente de correlação, r , mede a correlação entre os valores de referência e os valores previstos do conjunto de calibração e de validação, sendo valores mais próximos de 1 indicativos de uma maior correlação entre os dados [57,132,133].

Tabela 15: Parâmetros do modelo PLS para determinação do teor de alcóolico antes e depois da remoção de outliers

Parâmetros calibração multivariada		
	Antes	Depois
Número de amostras de calibração	64	54
Número de amostras de validação	32	29
Número de variáveis latentes	3	3
RMSEC	0,23	0,09
RMSECV	0,28	0,10
RMSEP	0,24	0,07
R^2_{cal}	0,602	0,938
R^2_{val}	0,521	0,943

Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.

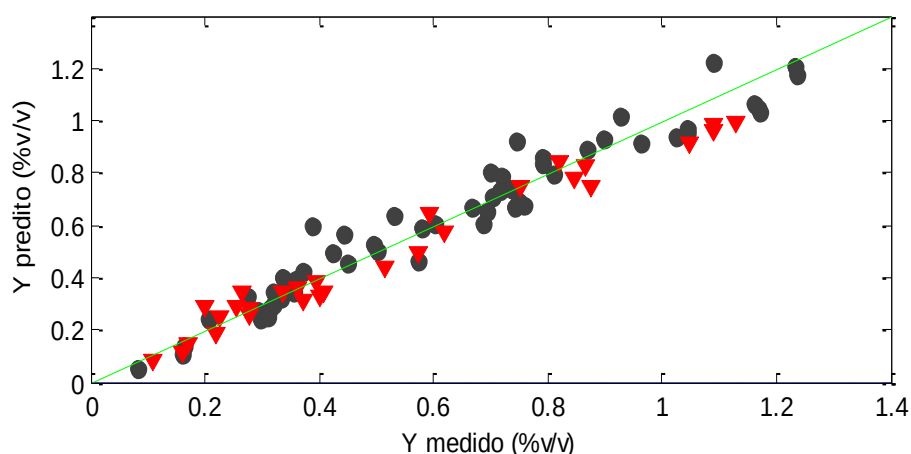


Figura 24: Gráfico de valores reais (círculos pretos) versus preditos (triângulos vermelhos) do teor alcóolico (% v/v). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

Um aspecto importante para qualquer modelo de calibração multivariada MIR é a interpretação espectral por meio dos vetores informativos. Na Figura 25, são apresentados os vetores dos coeficientes de regressão e a importância das variáveis na projeção (VIP) para o modelo PLS desenvolvido. Os escores VIP (Figura 26) indicam a importância absoluta de cada variável para o modelo PLS, com um valor de 1,0 sendo sugerido como limite para as variáveis mais significativas. Os coeficientes de regressão mais positivos estão diretamente relacionados à predição do analito. Ao analisar a Figura 25, identificamos as regiões espectrais que mais contribuem para a previsão do teor alcoólico. O coeficiente mais positivo é

observado em torno de 1050 cm^{-1} (1038 e 1051 cm^{-1}), correspondendo ao estiramento da ligação C-O de álcoois primários [52]. Esse mesmo padrão é confirmado na Figura 26, onde a banda que mais influenciou a construção do modelo também está próxima de 1050 cm^{-1} .

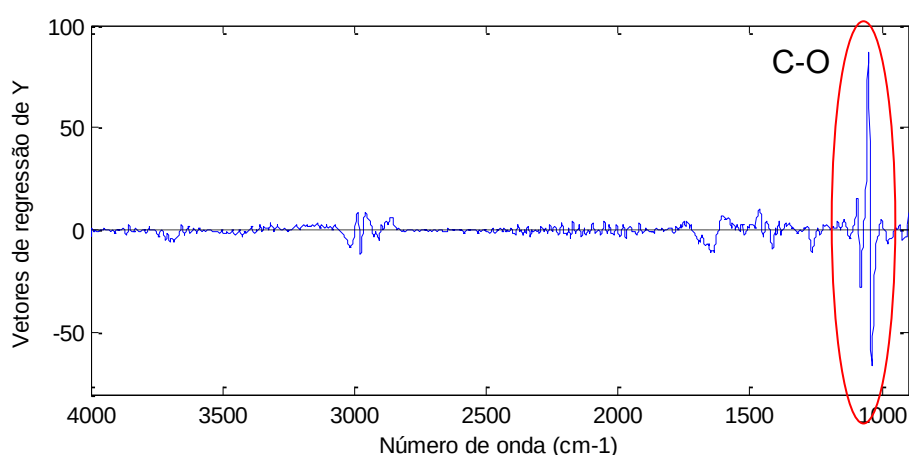


Figura 25. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda para o modelo de determinação de teor alcóolico de Kombuchas.. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

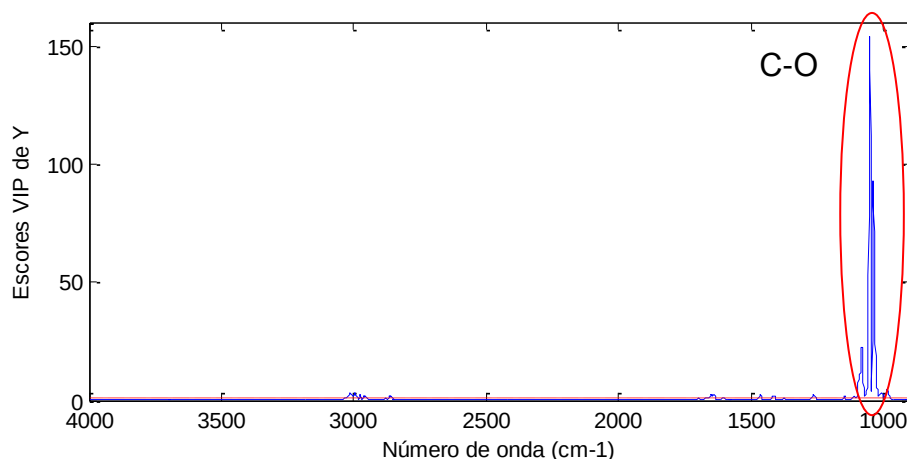


Figura 26. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o modelo de determinação de teor alcóolico de Kombuchas. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

O modelo foi validado em termos das figuras de mérito: exatidão, precisão, linearidade, faixa de trabalho, bias e relação de desempenho do desvio (RPD) e os resultados estão disponíveis na Tabela 16. A independência dos resíduos foi

avaliada utilizando o teste de Durbin-Watson. Valores de RPD acima de 2,4 sugerem que o método possui uma boa capacidade preditiva [104,100].

Tabela 16: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor alcóolico de Kombuchas

Figuras de Mérito	Parâmetros	Valores
Precisão	Repetibilidade RSD (%)	3,6 - 4,2%
	Precisão Intermediária RSD (%)	3,8 – 4,7%
Linearidade	Teste Durbin-Watson	d=1,80 dl ($\alpha=0,05$)=1,34 du ($\alpha=0,05$)=1,48
	Inclinação	0,95±0,02
	Intercepto	0,024±0,018
	Coeficiente de Correlação	0,9478
	Faixa de trabalho	0,16 -1,70%v/v
Bias	bias	- 0,03
	t _{calculado}	1,803
	T _{crítico} (28;95%)	2,048
RPD	Conjunto de calibração	3,4
	Conjunto de validação	5,1

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010 Observações: Teste de Durbin-Watson: se $d > d_l$ e $d > d_u$ os resíduos são independentes. Teste T: se $t_{cal} < t_{cri}$ os erros sistemáticos não são estatisticamente significativos.

Após a validação, o modelo demonstrou ser linear na faixa de trabalho de 0,16–1,70 %v/v, com R^2_{cal} igual a 0,9478, RPD_{val} de 5,1, além de valores de repetibilidade entre 3,6–4,2% e precisão intermediária entre 3,8– 4,7%. O teste de bias revelou que os erros sistemáticos presentes no modelo multivariado não são estatisticamente significativos, o que evidencia a confiabilidade dos resultados [70].

O método de referência GC-FID, também desenvolvido e validado neste estudo (capítulo 3), para uma faixa de trabalho de 0,1 a 0,6 %v/v, obteve um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9983, apresentando repetibilidade entre 2,0% e 3,4% e precisão intermediária entre 2,7-3,6%. Comparando os dois métodos, conclui-se que ambos são satisfatórios para a quantificação do teor alcoólico em

Kombuchas comerciais, sendo a técnica de infravermelho associada ao modelo quimiométrico mais rápida e com menor custo.

Com base nos resultados da análise do teor alcóolico das amostras de Kombuchas disponíveis no Capítulo 3, observou-se que o valor médio das amostras foi de 0,64% v/v, excedendo o limite permitido pela legislação de 0,5% v/v para as variedades não alcoólicas (conforme IN Nº 41/2019). Esse valor pode ser declarado com uma tolerância admitida de 0,1% v/v. O modelo desenvolvido apresentou um RMSEP de 0,07% v/v, possibilitando a quantificação desse parâmetro de maneira rápida e em conformidade com a legislação.

5.5.3 Modelo PLS para determinação da acidez volátil de Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio

Um modelo para determinação da acidez em Kombuchas foi desenvolvido com base nos valores de referência obtidos por meio do método cromatográfico (GC-FID) elaborado e validado neste estudo (Capítulo 3). A faixa espectral considerada foi de 4000 a 900 cm^{-1} .

O modelo foi construído utilizando 86 amostras com acidez acima do Limite de Quantificação (LQ) do método, variando entre 17 e 72 mEq/L. Dado que a maioria das amostras apresentava teores na faixa estreita entre 0,1 e 0,2 %v/v (correspondente a 17-35 mEq/L), para ampliar a faixa de trabalho, selecionou-se 10 amostras que foram dopadas com ácido acético. Estas amostras foram dopadas em 9 concentrações diferentes (0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,50; 0,60%v/v), totalizando 90 amostras.

No total, foram utilizadas 176 amostras no modelo com concentrações entre 17-130 mEq/L, cobrindo toda a faixa exigida pela legislação que deve ser entre 30-130 mEq/L (IN nº41/2019), resultando na matriz $\mathbf{X}_{176 \times 3100}$ (espectros FTIR) e no vetor $\mathbf{Y}_{176}$ (teores de acidez volátil).

Na construção do modelo foram selecionadas 117 amostras para o conjunto de calibração (2/3) e 59 para a validação, empregando-se o algoritmo Kennard-Stone. Os dados foram pré-processados com a correção ortogonal do sinal (OSC) e centralizados na média, removendo assim a informação não correlacionada com a

variável de resposta (Y) e reduzindo efeitos de variações sistemáticas indesejadas, sem relevância para a predição da acidez volátil.

A validação cruzada foi realizada por subconjuntos aleatórios com 10 divisões e 20 iterações. O número de variáveis latentes foi determinado considerando-se o menor RMSECV (raiz do erro quadrático médio de validação cruzada).

Foram identificadas 2 amostras como outliers no conjunto de calibração e 8 no conjunto de validação. Após a otimização por detecção de outliers, o número de variáveis latentes foi determinado como 2, descrevendo 74,54% da variância em X e 98,83% da variância em Y.

Os principais parâmetros do modelo estão apresentados na Tabela 17. Os valores de RMSEC, RMSEP e R^2 indicam que o modelo possui boa precisão, exatidão e ajuste, conforme demonstrado na Figura 27, que mostra os valores reais versus preditos da acidez.

Tabela 17: Resultados para o modelo PLS para determinação da acidez de amostras de Kombuchas antes e depois da detecção de outliers

Parâmetros calibração multivariada		
	Antes	Depois
Número de amostras de calibração	117	115
Número de amostras de validação	59	51
Número de variáveis latentes	2	2
RMSEC	3,3	3,2
RMSECV	11,0	11,2
RMSEP	7,3	3,9
R^2_{cal}	0,988	0,989
R^2_{val}	0,932	0,982

Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.

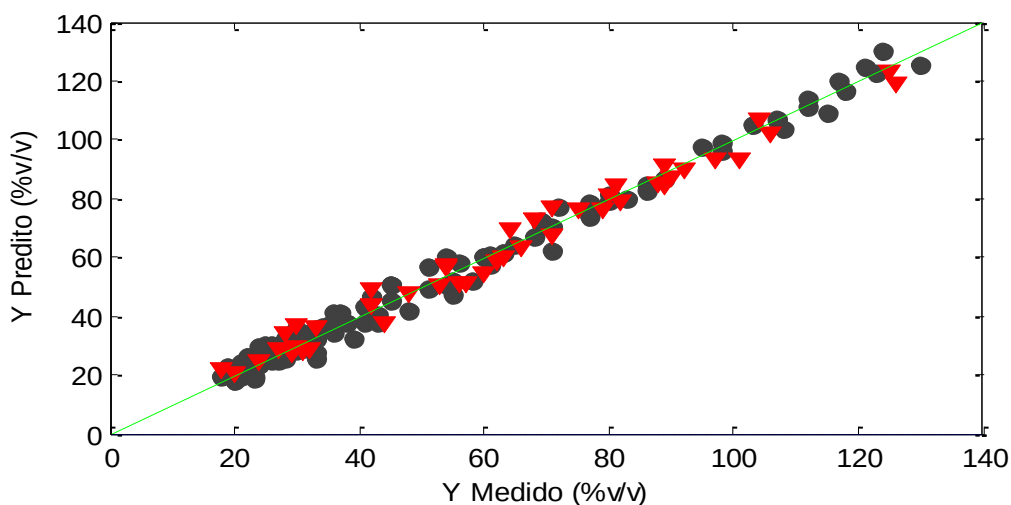


Figura 27: Gráfico de valores reais versus preditos da acidez (mEq/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

Analisando-se os gráficos presentes nas Figuras 28 e 29, conclui-se que as bandas que mais contribuíram para a construção do modelo foram entre 1300-1100 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C-O de ácidos; entre 1320-1210 cm^{-1} devido à deformação angular de ligação C-O que costuma aparecer como duplete para dímero de ácido carboxílico; entre 1725-1700 cm^{-1} correspondente ao estiramento de ligação C=O de ácido carboxílico na forma de dímero. Além de banda larga de estiramento de ligação O-H para dímero de ácido carboxílico situada entre 3300-2500 cm^{-1} [52].

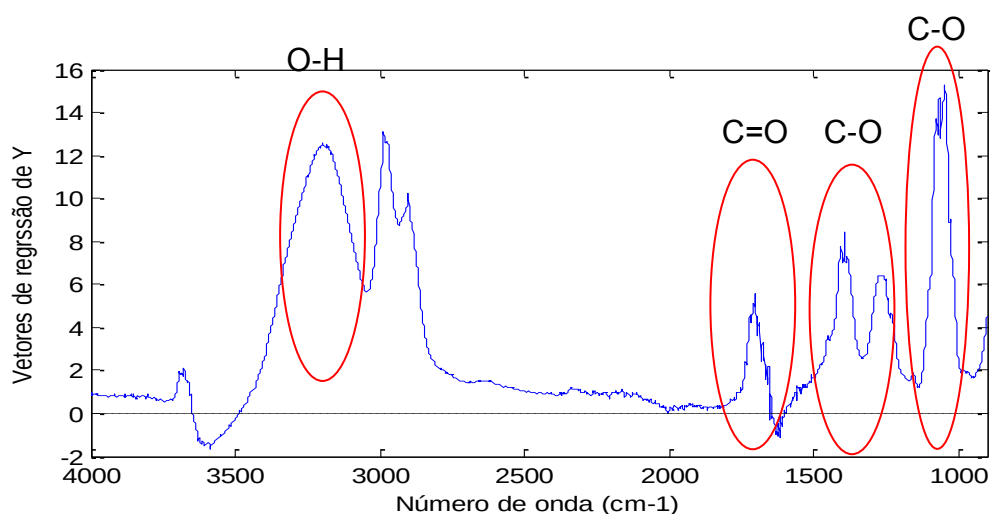


Figura 28: Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda para o modelo da acidez (mEq/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

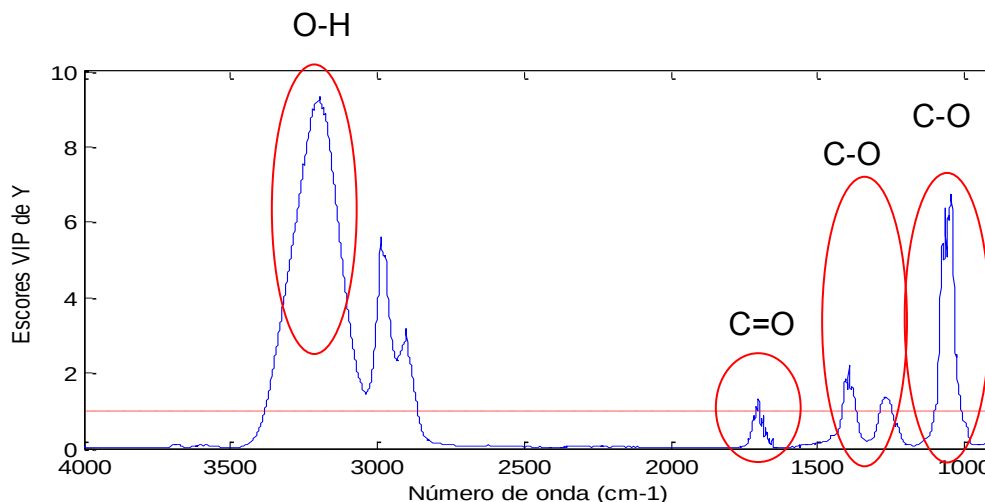


Figura 29: Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o modelo da acidez (mEq/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

Na Figura 30 é possível observar as interações presentes nas moléculas de ácido carboxílico que tendem a se ligar por ligações de hidrogênio, formando um dímero. Nesse arranjo, duas moléculas passam a comportar-se como uma só molécula, com o dobro da massa molecular [104]. Essa interação foi identificada em diversas bandas de absorção presentes no espectro de infravermelho médio das amostras de Kombuchas.

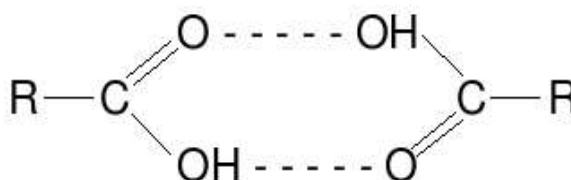


Figura 30: Dímero de ácido carboxílico formado por ligações de hidrogênio. Fonte: Adaptado de referência [134].

O modelo desenvolvido foi validado (conforme Tabela 18) e demonstrou linearidade na faixa de trabalho de 18-130 mEq/L, com repetibilidade de 3,2 – 4,3% e precisão intermediária entre 3,8 – 4,6%. Comparado ao método de referência GC-FID, também desenvolvido e validado neste estudo (capítulo 3), para uma faixa de trabalho de 0,1–0,6 %v/v (17–105 mEq/L), que alcançou um R^2 de 0,9938, com repetibilidade entre 2,3% e 3,2% e precisão intermediária entre 2,3-3,5%. Concluiu-se que o modelo quimiométrico também demonstrou um desempenho satisfatório na

quantificação da acidez em Kombuchas comerciais. Ao escolher entre os dois métodos, é importante considerar a disponibilidade de equipamentos, o custo e o preparo de amostras.

Tabela 18: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação da acidez de Kombuchas.

Figuras de Mérito	Parâmetros	Valores
Precisão	Repetibilidade RSD (%)	3,2 – 4,3%
	Precisão Intermediária RSD (%)	3,8 – 4,6%
Linearidade	Teste Durbin-Watson	d=1,98 dl ($\alpha=0,05$)=1,46 du ($\alpha=0,05$)=1,55
	Inclinação	0,98±0,01
	Intercepto	1,04±0,56
	Coefficiente de Correlação	0,9868
	Faixa de trabalho	18 -130 mEq/L
bias	bias	0,286
	t_{cal}	0,462
	$T_{crit} (50;95\%)$	2,009
RPD	Conjunto calibração	3,7
	Conjunto validação	5,2

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: Teste de Durbin-Watson: se $d > d_l$ e d_u os resíduos são independentes. Teste T: se $t_{cal} < t_{cri}$ os erros sistêmicos não são estatisticamente significativos.

Com base nos resultados de acidez das amostras de Kombuchas obtidos no Capítulo 4, observou-se que o modelo desenvolvido permite a quantificação deste parâmetro com um erro aproximado de 11%. Isso é considerando que a acidez média das amostras foi de 35 mEq/L e o RMSEP foi de 3,9 mEq/L. Este modelo está alinhado com trabalhos disponíveis na literatura que elaboraram modelos para avaliar a acidez em amostras de Kombuchas ou outras bebidas fermentadas (Tabela 14).

5.5.4 Modelo PLS para determinação dos teores de açúcares totais em Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio

Foram utilizadas na construção do modelo as 86 amostras que apresentaram teores de açúcares entre 20 e 84 g/L, valores acima do Limite de Quantificação (LQ) do método espectrofotométrico com DNS (Capítulo 4, item 4.1). A faixa espectral considerada foi de 4000 a 900 cm^{-1} , resultando na matriz $\mathbf{X}_{86 \times 3100}$ e no vetor $\mathbf{Y}_{86}$, correspondente aos teores de açúcares totais.

Foram selecionadas 57 amostras para o conjunto de calibração, correspondentes a 2/3 do total, enquanto 29 amostras foram reservadas para a validação, por meio do algoritmo Kennard-Stone. Para o pré-processamento dos dados utilizou-se a primeira derivada Savitzky-Golay (ordem: 2; janela: 15 pontos) e a centralização dos dados na média. A validação cruzada foi realizada por subconjuntos aleatórios com 7 divisões e 20 iterações.

Na etapa detecção de *outliers* foram identificadas 12 amostras como *outliers* no conjunto de calibração e 2 no conjunto de validação. Após a otimização, o número de variáveis latentes foi estabelecido como 3, explicando 90,93% da variabilidade em X e 93,54% da variabilidade em Y.

Na tabela 19 estão disponíveis os principais parâmetros do modelo. É possível observar um bom ajuste do modelo através da figura 31 que apresenta o gráfico de valores reais versus preditos do teor de açúcares. Os valores de RPD acima de 2,4 indicam que esse modelo possui boa capacidade preditiva.

Tabela 19: Resultados do modelo PLS para a determinação do teor de açúcares totais em Kombuchas antes e depois a remoção de outliers

Parâmetros calibração multivariada		
	Antes	Depois
Número de amostras de calibração	57	45
Número de amostras de validação	29	27
Número de variáveis latentes	3	3
RMSEC	7,8	2,8
RMSECV	8,8	3,5
RMSEP	4,8	2,7
R^2_{cal}	0,768	0,935
R^2_{val}	0,730	0,879

Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.

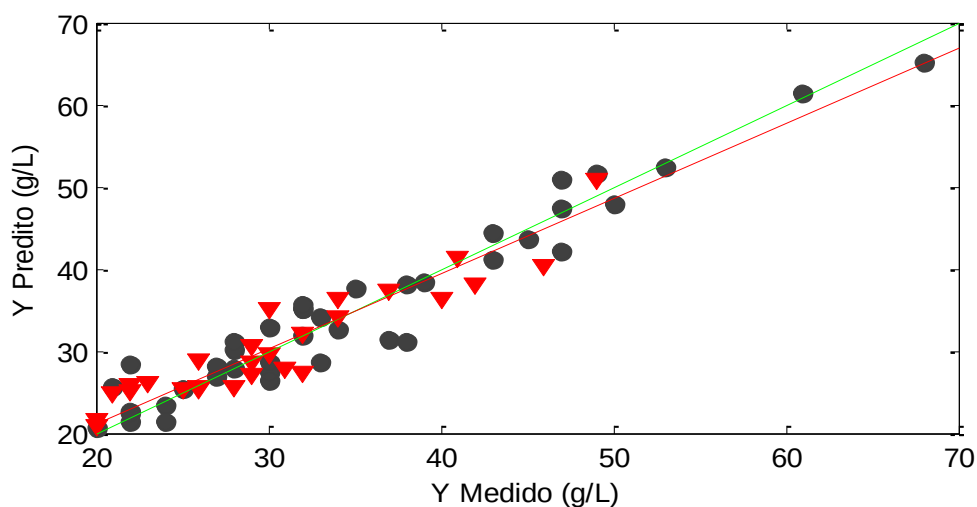


Figura 31: Gráfico de valores reais versus preditos dos teores de açúcares totais (g/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

A análise dos Vetores de Regressão e dos Escores VIP (Figuras 32 e 33) evidencia as regiões espectrais mais relevantes na construção do modelo. Destacam-se as bandas entre 1000 e 900 cm^{-1} , associadas à deformação angular das ligações C-C, próximo a 1050 cm^{-1} , referente ao estiramento das ligações C-O, e em 1126 cm^{-1} , atribuída à deformação axial do sistema C-O-C da sacarose. Além disso, observa-se a banda em torno de 1300 cm^{-1} , relacionada à deformação angular das ligações O-H, a 1450 cm^{-1} , associada à deformação angular das ligações C-H, e próximas a 3000 cm^{-1} , características do estiramento das ligações C-H [52].

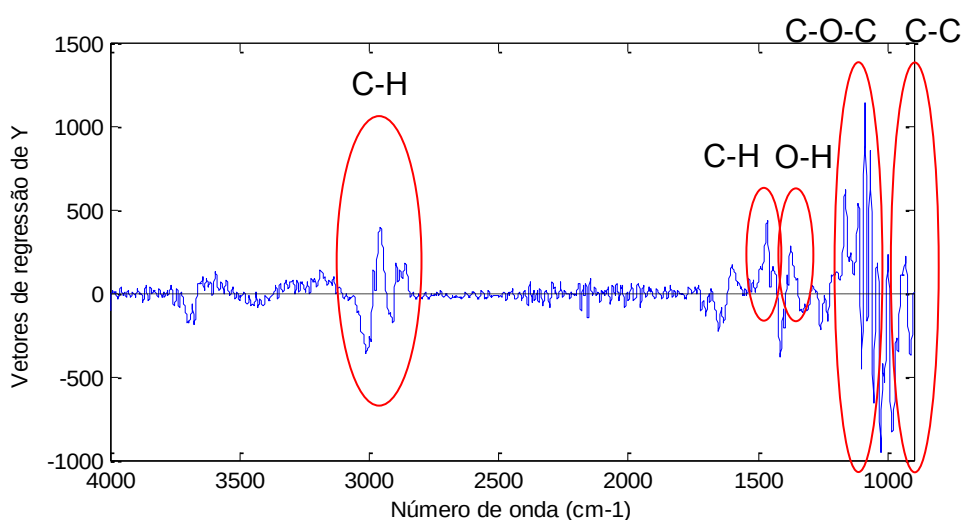


Figura 32. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda dos teores de açúcares totais. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

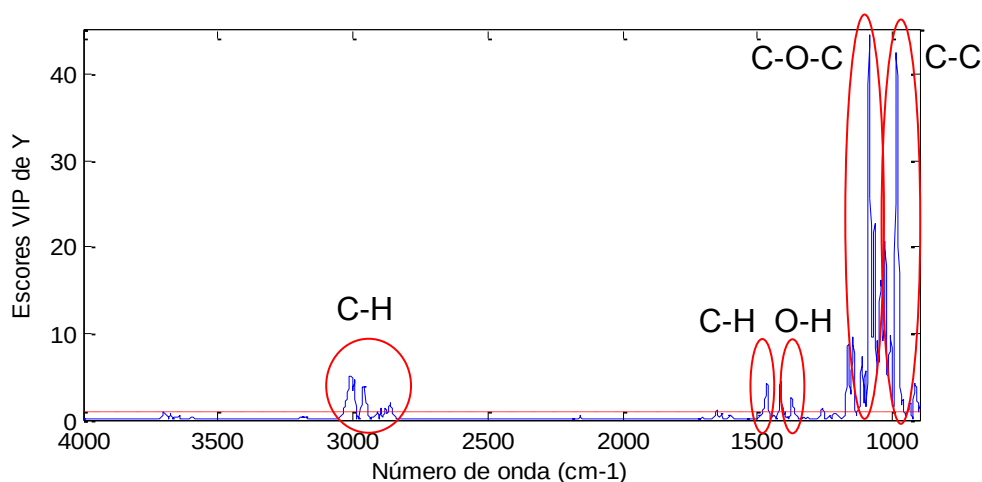


Figura 33. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para os teores de açúcares totais. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox

O modelo foi validado e os resultados estão apresentados na Tabela 20. Observou-se que os valores obtidos para repetibilidade estão entre e a precisão intermediária são inferiores a 5%. O modelo mostrou-se linear dentro da faixa de trabalho de 20 a 68 g/L. O teste de bias indicou que os erros sistemáticos podem ser desconsiderados [70].

Tabela 20: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor de açúcares de Kombuchas

Figuras de Mérito	Parâmetros	Valores
Precisão	Repetibilidade RSD (%)	3,1 – 3,9%
	Precisão Intermediária RSD (%)	3,5 – 4,3%
Linearidade	Teste Durbin-Watson	d=1,79 dl ($\alpha=0,05$)=1,32 du ($\alpha=0,05$)=1,47
	Inclinação	0,90±0,03
	Intercepto	2,09±1,13
	Coefficiente de Correlação	0,9198
	Faixa de trabalho	20 – 68 g/L
bias	bias	0,183
	t _{cal}	0,270
	T _{crit} (26;95%)	2,052
RPD	Conjunto calibração	4,7
	Conjunto validação	3,1

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: Teste de Durbin-Watson: se $d > d_l$ e d_u os resíduos são independentes. Teste T: se $t_{cal} < t_{cri}$ os erros sistêmicos não são estatisticamente significativos.

Após análise dos resultados dos teores de açúcares totais das amostras de Kombuchas disponíveis no Capítulo 4, constatou-se que o valor médio foi de 37 g/L. O modelo desenvolvido demonstrou um RMSEP de 2,7 g/L, viabilizando a quantificação deste parâmetro de forma ágil com um erro médio de 7%. Esses resultados estão em conformidade com a legislação RDC nº 429/2020, que permite uma margem de tolerância de até 20% na apresentação dos parâmetros na Tabela Nutricional, conforme detalhado no capítulo 4 [43].

Ambos os métodos apresentados nesse estudo para a quantificação dos teores de açúcares totais em Kombuchas comerciais, demonstraram ser adequados para a finalidade pretendida. O método DNS (capítulo 4), para uma faixa de trabalho de 0,1–1,0 g/L, obteve um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9938, apresentando repetibilidade entre 2,0% e 3,2% e precisão intermediária entre 2,5–3,4%.

5.5.5 Modelo PLS para determinação do teor de glicose em Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio

Das 70 amostras analisadas pelo método de avaliação do perfil de açúcares e detecção de edulcorantes (Capítulo 4, item 4.2), 64 foram utilizadas na construção deste modelo. Quatro amostras apresentaram concentrações abaixo do limite de quantificação (LQ), enquanto duas ultrapassaram a faixa de trabalho estabelecida. A faixa espectral utilizada foi de 4000 a 900 cm^{-1} e as concentrações das amostras variaram de 2,5 a 23,9 g/L, resultando na matriz $\mathbf{X}_{64 \times 3100}$ e no vetor $\mathbf{Y}_{64}$.

Foram selecionadas 43 amostras para o conjunto de calibração, correspondendo a 2/3 do total, enquanto 21 amostras foram reservadas para validação, utilizando o algoritmo Kennard-Stone.

Os dados foram pré-processados com a correção ortogonal do sinal (OSC) e centralizados pela média. A validação cruzada foi realizada com subconjuntos aleatórios, utilizando 2 divisões e 20 iterações.

Durante a detecção de outliers, foi identificada 1 amostra como outlier no conjunto de calibração e 5 no conjunto de validação. Após a otimização, o número

de variáveis latentes foi ajustado para 2, explicando 59,23% da variabilidade em X e 91,87% da variabilidade em Y.

Os principais parâmetros do modelo estão disponíveis na Tabela 21. O bom ajuste do modelo pode ser observado na figura 34, que apresenta o gráfico de valores reais versus preditos do teor de glicose.

Tabela 21: Resultados do modelo PLS para a determinação do teor de glicose em Kombuchas antes e depois a remoção de outliers

Parâmetros calibração multivariada		
	Antes	Depois
Número de amostras de calibração	43	42
Número de amostras de validação	21	16
Número de variáveis latentes	2	2
RMSEC	1,8	1,6
RMSECV	4,5	4,4
RMSEP	4,1	2,1
R^2_{cal}	0,900	0,919
R^2_{val}	0,630	0,830

Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.

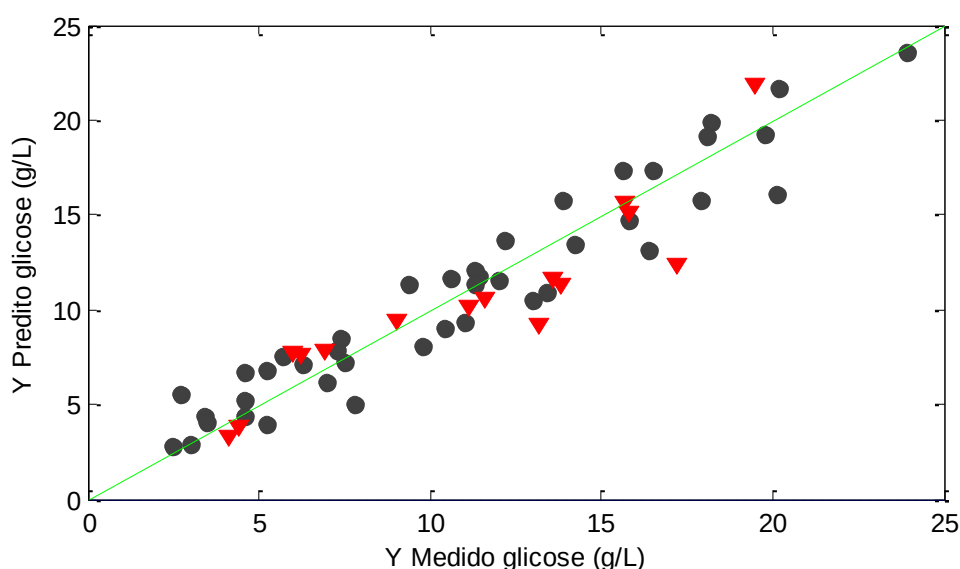


Figura 34: Gráfico de valores reais versus preditos do teor de glicose (g/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

Observando-se os gráficos de Vetores de Regressão para Y em função do número de onda (Figura 35) e, especialmente, o gráfico de Escores VIP para Y em função do número de onda (Figura 36), verifica-se que as regiões espectrais que mais contribuem para a construção do modelo estão localizadas entre 1150 e 1000 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação C-O, característica dos grupos hidroxila (-

OH), sendo essa a banda mais pronunciada. Também se destaca, embora de forma menos intensa, a região próxima a 3000 cm^{-1} , associada à vibração de estiramento da ligação C-H. Além da banda em aproximadamente 1450 cm^{-1} é associada à deformação angular das ligações C-H[52].

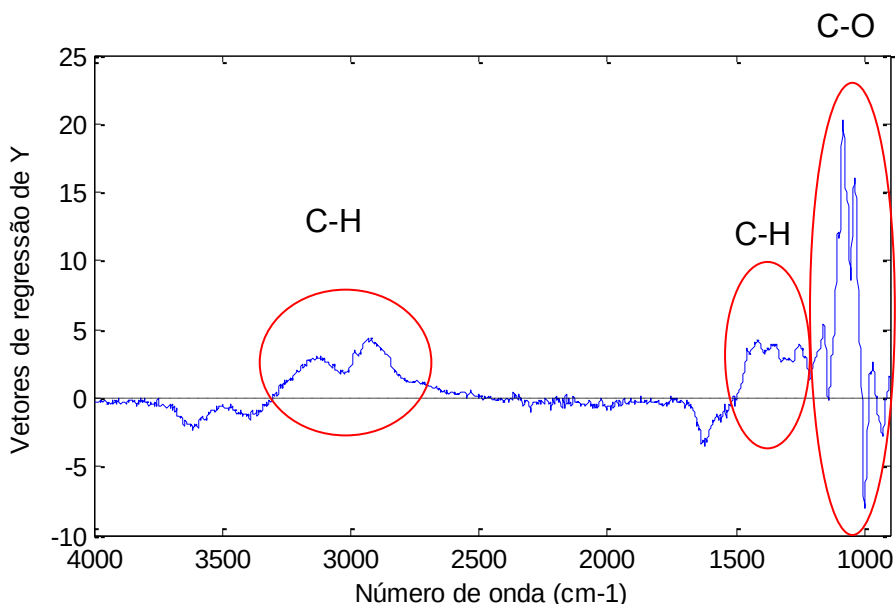


Figura 35. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda do teor de glicose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

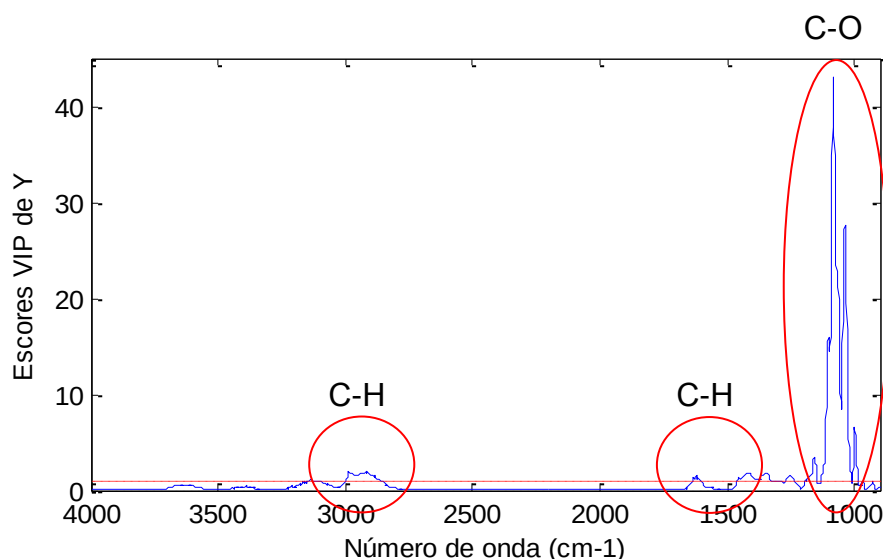


Figura 36. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o teor de glicose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

O modelo foi validado, e os resultados estão apresentados na Tabela 22. Verificou-se que os valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária são inferiores a 5%. O modelo demonstrou linearidade dentro da faixa de trabalho de 2,5

a 23,9 g/L, e os valores de RPD superiores a 2,4 indicam boa capacidade preditiva. O teste de bias indicou que os erros sistemáticos podem ser desconsiderados [70].

Tabela 22: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor de glicose de Kombuchas

Figuras de Mérito	Parâmetros	Valores
Precisão	Repetibilidade RSD (%)	3,9 – 4,3%
	Precisão Intermediária RSD (%)	4,1 – 4,8%
Linearidade	Teste Durbin-Watson	d=1,62 d _l (α=0,05)=1,18 d _u (α=0,05)=1,40
	Inclinação	0,86±0,05
	Intercepto	1,69±0,65
	Coefficiente de Correlação	0,9063
	Faixa de trabalho	2,5 – 23,9 g/L
bias	bias	0,080
	t _{cal}	0,160
	T _{crit} (18;95%)	2,101
RPD	Conjunto calibração	2,7
	Conjunto validação	4,0

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: Teste de Durbin-Watson: se $d > d_l$ e d_u os resíduos são independentes. Teste T: se $t_{cal} < t_{cri}$ os erros sistemáticos não são estatisticamente significativos.

Após análise dos resultados do teor de glicose das amostras de Kombuchas disponíveis no Capítulo 4, item X constatou-se que o valor médio foi de 11,3 g/L. O modelo desenvolvido demonstrou um RMSEP de 2,1 g/L, viabilizando a quantificação deste parâmetro de forma ágil com um erro médio de 18,6 %. Esses resultados estão em conformidade com a legislação RDC nº 429/2020, que permite uma margem de tolerância de até 20% na apresentação dos parâmetros na Tabela Nutricional, conforme detalhado no capítulo 4 [43].

5.5.6 Modelo PLS para determinação do teor de frutose em Kombuchas utilizando espectroscopia no infravermelho médio

Este modelo foi desenvolvido utilizando-se as 70 amostras analisadas pelo método de avaliação do perfil de açúcares e detecção de edulcorantes (Capítulo 4, item 4.2), pois todas estavam dentro da faixa de trabalho do método, com concentrações variando de 2,5 a 29,8 g/L. A faixa espectral utilizada foi de 4000 a 900 cm^{-1} , resultando na matriz $\mathbf{X}_{70 \times 3100}$ e no vetor $\mathbf{Y}_{70}$.

Para a construção do modelo, foram selecionadas 47 amostras para o conjunto de calibração (equivalente a 2/3 do total), enquanto 23 amostras foram reservadas para validação, por meio do algoritmo Kennard-Stone.

No pré-processamento dos dados, foi aplicada a primeira derivada Savitzky-Golay (ordem 2; janela de 15 pontos), juntamente com a centralização dos dados na média. A validação cruzada foi realizada por meio de subconjuntos aleatórios, com 2 divisões e 20 iterações.

Durante a detecção de outliers, foram identificadas 10 amostras como outliers no conjunto de calibração e 4 no conjunto de validação. Após a otimização, o número de variáveis latentes foi ajustado para 3, explicando 91,39% da variabilidade em X e 89,87% da variabilidade em Y. Na Figura 37 está apresentado o gráfico de valores reais versus preditos para o teor de frutose.

Tabela 23: Resultados do modelo PLS para a determinação do teor de frutose em Kombuchas antes e depois a remoção de outliers

Parâmetros calibração multivariada		
	Antes	Depois
Número de amostras de calibração	47	37
Número de amostras de validação	23	18
Número de variáveis latentes	3	3
RMSEC	4,7	2,2
RMSECV	5,4	3,1
RMSEP	4,8	2,1
R^2_{cal}	0,636	0,900
R^2_{val}	0,737	0,900

Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados obtidos pelo software MATLAB versão R2010a com pacote PLS Toolbox.

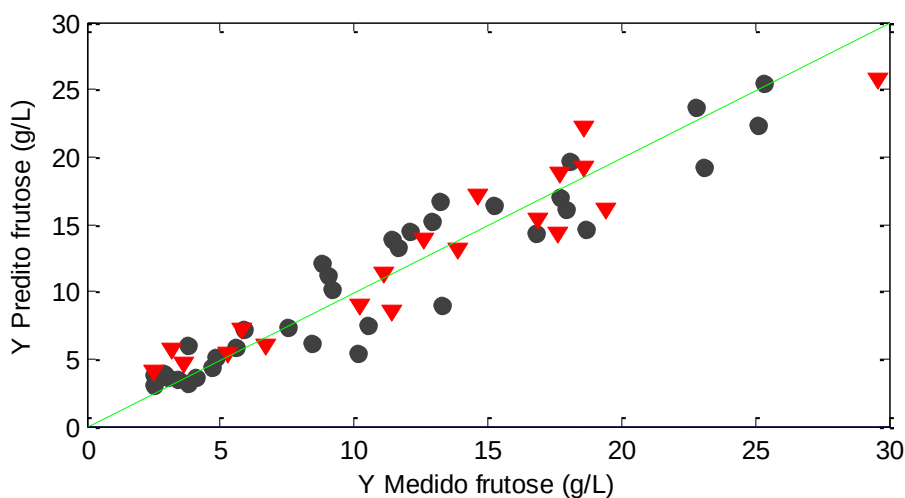


Figura 37: Gráfico de valores reais versus preditos do teor de frutose(g/L). Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

Nas Figuras 38 e 39, são apresentados respectivamente, os gráficos de Vetores de Regressão para Y em função do número de onda e de Escores VIP de Y versus número de onda para o teor de frutose. A partir desses gráficos, é possível identificar as bandas que mais contribuíram para a construção do modelo de frutose. Entre 1050 e 1150 cm^{-1} , destacam-se as vibrações de estiramento das ligações C-O, enquanto a faixa entre 1000 e 900 cm^{-1} é atribuída à deformação angular das ligações C-C. Na região em torno de 3000 cm^{-1} , ocorre o estiramento das ligações C-H. Além disso, a banda em aproximadamente 1450 cm^{-1} é associada à deformação angular das ligações C-H [52].

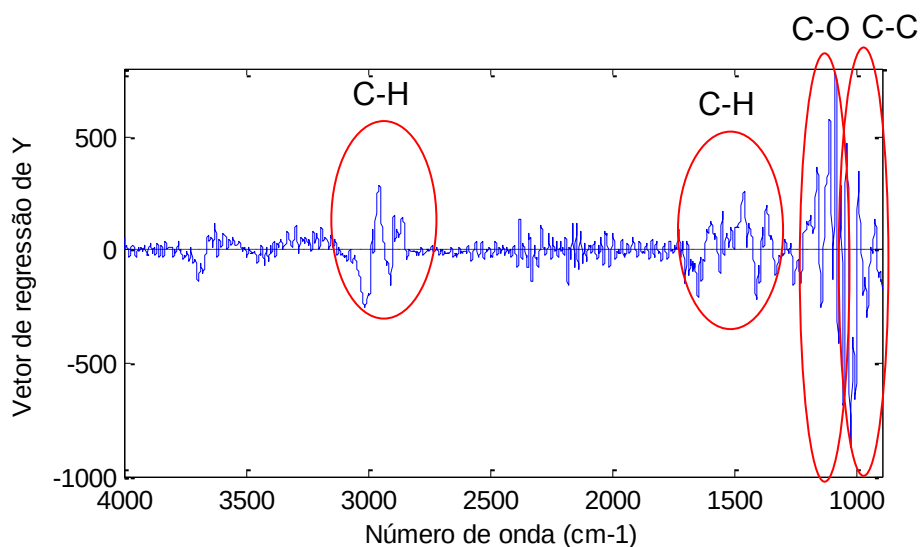


Figura 38. Gráfico de vetores de regressão para Y versus número de onda do teor de frutose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

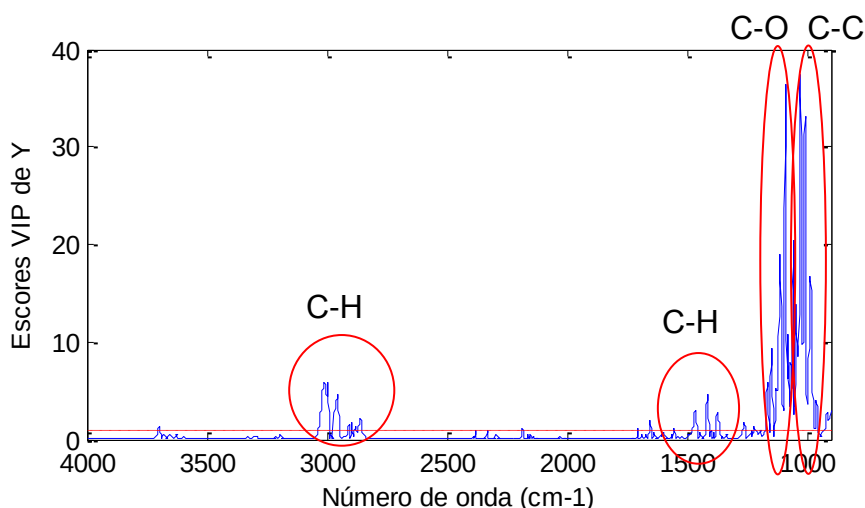


Figura 39. Gráfico de Escores VIP de Y versus número de onda para o teor de frutose. Fonte: Obtida através software MATLAB, na versão R2010a, utilizando o pacote PLS Toolbox.

A validação do modelo foi realizada e os resultados encontram-se na Tabela 24. Os resultados de repetibilidade estão entre 4,0 e 4,5%, e a precisão intermediária entre 4,2 e 5,0%, o que demonstra alta consistência e confiabilidade nas medições. O modelo exibiu um comportamento linear dentro da faixa de concentração de 2,5 a 29,8 g/L. O teste de viés revelou que os erros sistemáticos não são estatisticamente significativos [70]. Além disso, os valores de RPD superiores a 2,4 confirmam a boa capacidade preditiva do modelo.

Tabela 24: Figuras de mérito validação modelo PLS para determinação do teor de frutose de Kombuchas

Figuras de Mérito	Parâmetros	Valores
Precisão	Repetibilidade RSD (%)	4,0 – 4,5%
	Precisão Intermediária RSD (%)	4,2 – 5,0%
Linearidade	Teste Durbin-Watson	d=1,87 d _l (α=0,05)=1,08 d _u (α=0,05)=1,36
	Inclinação	0,91±0,04
	Intercepto	0,84±0,30
	Coefficiente de Correlação	0,9001
	Faixa de trabalho	2,5 – 29,8 g/L
bias	bias	0,668
	t _{cal}	1,278
	T _{crit} (14;95%)	2,145
RPD	Conjunto calibração	2,5
	Conjunto validação	2,6

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software Microsoft Excel 2010. Observações: Teste de Durbin-Watson: se $d > d_l$ e d_u os resíduos são independentes. Teste T: se $t_{cal} < t_{cri}$ os erros sistemáticos não são estatisticamente significativos.

A análise dos dados referentes ao teor de frutose nas amostras de Kombucha, conforme descrito no Capítulo 4, item 4.2, revelou que o valor médio foi de 13,6 g/L. O modelo desenvolvido apresentou um RMSEP de 2,1 g/L, permitindo a quantificação desse parâmetro de maneira rápida, com um erro médio de 15,4%. Esses resultados estão em conformidade com os requisitos da RDC nº 429/2020, que estabelece uma margem de tolerância de até 20% para a declaração dos parâmetros na Tabela Nutricional [43].

5.6 CONCLUSÕES

Os modelos de calibração multivariada utilizando espectroscopia no infravermelho médio e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), desenvolvidos e validados neste estudo, exibiram valores de RMSEC, RMSEP e R² que indicam boa exatidão e ajuste. Os valores de RPD acima de 2,4 confirmam a boa capacidade preditiva dos modelos, que permitem quantificações rápidas e com mínimo preparo de amostras, em conformidade com as normativas IN nº 41/2019 e

RDC 420/2019. Após a validação, os modelos demonstraram linearidade nas faixas de trabalho e precisão inferior a 5%, além de ausência de viés estatisticamente significativo, evidenciando a robustez e confiabilidade dos resultados.

Portanto, os modelos desenvolvidos neste estudo são considerados confiáveis e eficazes para a finalidade proposta, apresentando vantagens significativas em relação aos métodos analíticos tradicionais, como menor uso de reagentes, rapidez, simplicidade operacional e potencial de aplicação em análises de rotina. Dessa forma, podem ser incorporados por laboratórios prestadores de serviço, instituições de pesquisa e laboratórios vinculados a órgãos de fiscalização sanitária e de controle de qualidade, contribuindo para uma fiscalização mais eficiente e com maior capacidade de resposta.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho oferecem um panorama abrangente e inédito das kombuchas comercializadas no mercado brasileiro, revelando variações significativas na composição. Destacando-se os níveis elevados de etanol na maioria das amostras, em desacordo com os limites legais estabelecidos para bebidas não alcoólicas, além de discrepâncias quanto ao teor de açúcares e acidez. Esses achados revelam não apenas diferenças decorrentes de processos fermentativos intrinsecamente complexos, mas também a ausência de padronização nos métodos de produção adotados pelos fabricantes.

Do ponto de vista do consumidor, tais resultados assumem relevância direta, pois permitem compreender a real composição nutricional e química das bebidas consumidas, o que impacta na percepção de qualidade, nos efeitos fisiológicos e na segurança alimentar. Ressalta-se, ainda, que a ausência de informações claras nos rótulos, em especial no que se refere aos teores de açúcares, pode representar risco à saúde de indivíduos com restrições dietéticas, como diabéticas, reforçando a necessidade de maior rigor na rotulagem.

Para os órgãos reguladores, como ANVISA e MAPA, este estudo oferece subsídios técnicos importantes para o aprimoramento dos mecanismos de fiscalização e para a proposição de revisões na legislação vigente, sobretudo no que diz respeito à caracterização físico-química, aos processos de fabricação, comercialização, rotulagem e condições de armazenamento da kombucha. Evidencia-se, portanto, a necessidade de normativas mais específicas e atualizadas, que contemplem a natureza multifatorial e fermentativa desta bebida, de modo a assegurar padrões mínimos de qualidade e conformidade.

Para os fabricantes, os achados deste estudo servem como um alerta quanto à necessidade de alinhar seus processos produtivos às normas técnicas e sanitárias, garantindo a segurança do consumidor, a transparência nas informações fornecidas, fortalecendo a credibilidade e a competitividade do setor. Além da necessidade de maior controle de processo e monitoramento da fermentação, seja por meio de metodologias clássicas de referência, seja pelo uso de técnicas rápidas e robustas, como a espectroscopia no infravermelho médio aliada à quimiometria.

Em síntese, este trabalho não apenas caracteriza o estado atual dos produtos disponíveis no Brasil, mas também demonstra o potencial de aplicação de técnicas analíticas avançadas no controle de qualidade de bebidas fermentadas, ressaltando a importância da integração entre pesquisa científica, regulamentação e indústria para promover segurança alimentar, inovação e sustentabilidade no mercado de Kombucha.

REFERÊNCIAS

- [1] PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, v. 41, p. 111–123, 2008.
- [2] BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. ANVISA, 2018. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf. Acesso em: maio 2022.
- [3] BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>. Acesso em: maio 2022.
- [4] VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, v. 83, p. 580-588, 2018.
- [5] MIRANDA, J. F. M.; RUIZ, L. F.; SILVA, C. B.; UEKANE, T. M.; SILVA, K. A.; GONZALEZ, A. G. M.; FERNANDES, F. F.; LIMA, A. R. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, v. 87, p. 503–527, 2022.
- [6] WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- [7] BARROS, V. C.; FREITAS, A. C. Perfil de consumidores de Kombucha no Brasil e no mundo. *Convibra*. Disponível em: https://convibra.org/congresso/res/uploads/pdf/artigo27320_4_20202443.pdf. Acesso em: maio 2022.
- [8] TRAN, T.; BILLET, K.; TORRES-COBOS, B.; VICHI, S.; VERDIER, F.; MARTIN, A.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; TOURDOT-MARÉCHA, R. Use of a Minimal Microbial Consortium to Determine the Origin of Kombucha Flavor. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.
- [9] VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.; RENARD, T.; ROLLAND, C.; TAILLANDIER, P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in Kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, v. 83, p. 44–54, 2019.
- [10] AL-MOHAMMADI, A.; ISMAIEL, A. A.; IBRAHIM, R. A.; MOUSTAFA, A. H.; ZEID, A. A.; ENAN, G. Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. *Molecules*, v. 26, n. 5026, 2021.
- [11] MORDOR INTELLIGENCE. Relatório sobre o mercado global de Kombucha. 2024. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/Kombucha-market>. Acesso em: out. 2024.

- [12] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Anuário de Bebidas Não Alcoólicas. Brasília, 2024. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-lanca-anuario-das-bebidas-nao-alcoolicas-2024/AnuriodeBebidasNoAlcolicas2024_site.pdf. Acesso em: out. 2024.
- [13] KOMBUCHA BREWERS INTERNATIONAL (KBI). Disponível em: <https://Kombuchabrewers.org/>. Acesso em: abr. 2024.
- [14] BARROS, V. C.; FREITAS, A. C. Perfil de consumidores de Kombucha no Brasil e no mundo. Convibra. Disponível em: https://convibra.org/congresso/res/uploads/pdf/artigo27320_4_20202443.pdf. Acesso em: maio 2022.
- [15] AGARWA; BHONSLE. Kombucha Market Size, Share & Trends Analysis Report By Flavor (Original, Flavored). By Distribution, 2020.
- [16] KALLEL, L.; DESSEAU, V.; HAMDI, M.; STOCKER, P.; AJANDOUZ, E. H. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, v. 49, n. 1, p. 226–232, 2012.
- [17] GAGGIÀ, F.; BAFFONI, L.; GALIANO, M.; NIELSEN, D. S.; JAKOBSEN, R. R.; CASTRO-MEJÍA, J. L.; BOSI, S.; TRUZZI, F.; MUSUMECI, F.; DINELLI, G.; DI GIOIA, D. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2019.
- [18] CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; DOS SANTOS D'ALMEIDA, C. T.; DO NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D. L.; CAMERON, C.; FERREIRA, M. S. L.; DE BARROS, F. A. R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profiles, which impact their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, v. 128, p. 108782, 2020.
- [19] JAKUBCZYK, K.; KAŁDUŃSKA, J.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Chemical profile and antioxidant activity of the Kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, v. 9, n. 5, 2020.
- [20] KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of Kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*, v. 7, n. 12, p. 1–18, 2019.
- [21] IVANIŠOVÁ, E.; MEŇHARTOVÁ, K.; TERENTJEVA, M.; HARANGOZO, L.; KÁNTOR, A.; KAČÁNIOVÁ, M. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of Kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*, v. 57, n. 5, p. 1840–1846, 2020.
- [22] JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, v. 102, n. 1, p. 392–398, 2007.
- [23] BAUER-PETROVSKA, B.; PETRUSHEVSKA-TOZI, L. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 201–205, 2000.

- [24] KUMAR, S. D.; NARAYAN, G.; HASSARAJANI, S. Determination of anionic minerals in black and Kombucha tea using ion chromatography. *Food Chemistry*, v. 111, p. 784–788, 2008.
- [25] 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. 171–178, 2014.
- [26] WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- [27] 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.
- [28] VILLARREAL-SOTOA, S. A.; BOUAJILAA, J.; PACEA, M.; LEECHB, J.; COTTERB, P. D.; SOUCHARDA, J.; TAILLANDIERA, P.; BEAUFORTA, S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, v. 333, 2020.
- [29] WANG, Y.; JI, B.; WU, W.; WANG, R.; YANG, Z.; ZHANG, D.; TIAN, W. Hepatoprotective effects of Kombucha tea: Identification of functional strains and quantification of functional components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 94, n. 2, p. 265–272, 2013.
- [30] KOZYROVSKA, N. O.; REVA, O. M.; GOGINYAN, V. B.; DEVERA, 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.
- [31] WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- [32] VÁZQUEZ-CABRAL, B. D.; LARROSA-PÉREZ, M.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; RUTIAGA-QUÍÑONES, J. G.; GAMBOA-GÓMEZ, C. I.; ROCHA-GUZMÁN, N. E. Oak Kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 272, p. 1–9, 2017.
- [33] JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. Reference Module in Food Science, p. 1–8, 2016.
- [34] SRIHARI, T.; ARUNKUMAR, R.; ARUNAKARAN, J.; SATYANARAYANA, U. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by Kombucha (lyophilized). *Biomedicine and Preventive Nutrition*, v. 3, n. 1, p. 53–58, 2013.
- [35] COELHO, R. M. D.; ALMEIDA, A. L.; AMARAL, R. Q. G.; MOTA, R. N.; SOUSA, P. H. M. Kombucha: review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 22, 100272, 2020.
- [36] SUHRE, T. Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

- [37] PONTAROLLO, S. A.; ZANETTE, E. C. M. Desenvolvimento de Kombucha: caracterização microbiológica, físico-química e aspectos de mercado. *Brazilian Journal of Food Research*, v. 11, n. 4, p. 1-14, 2020.
- [38] CHU, S. C.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. *Food Chemistry*, v. 98, n. 3, p. 502–507, 2006.
- [39] LONČAR, E.; DJURIĆ, M.; MALBAŠA, R.; KOLAROV, L. J.; KLAŠNJA, M. Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*, v. 84, n. 3, p. 186–192, 2006.
- [40] OJO, A. O.; SMIDT, O. Microbial composition, bioactive compounds, potential benefits and risks associated with Kombucha: a concise review. *Fermentation*, v. 9, p. 472, 2023.
- [41] 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.
- [42] COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE, L.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 93, n. 5, p. 1–16, 2017.
- [43] BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 429, de 09 de outubro de 2020. Ministério da Saúde/ANVISA. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/rotulagem-nutricional-novas-regras-entram-em-vigor-em-120-dias>. Acesso em: abr. 2024.
- [44] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Unicamp, 2006.
- [45] DETTMER-WILDE, K.; ENGEWALD, W. Practical gas chromatography: a comprehensive reference. Berlin: Springer, 2014. HARRIS, D. C. Quantitative chemical analysis. 8. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.
- [46] NASCIMENTO, R. F. do; LIMA, A. C. A. de; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. da. Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 2018.
- [47] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. 6. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.
- [48] BECKER, M.; LIEBNER, F.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Ethoximation-silylation approach for mono- and disaccharide analysis and characterization of their identification parameters by GC/MS. *Talanta*, v. 115, p. 642-651, 2013.
- [49] CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- [50] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira. v. 1. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

- [51] BARBOZA, F. M. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.
- [52] BARBOSA, L. C. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Ed. UFV, 2011.
- [53] ALISKE, M. A. Medidas de espectroscopia no infravermelho médio para a determinação do teor de biodiesel em óleo diesel. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- [54] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- [55] GUIMARÃES, C. C. Desenvolvimento e validação de modelos quimiométricos baseados em espectroscopia no infravermelho próximo para a predição de parâmetros do caldo e da biomassa do sorgo sacarino visando à produção de etanol. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- [56] ASTM E1655 - Standard practices for infrared multivariate quantitative analysis. 2012.
- [57] GEMPERLINE, P. Practical guide to chemometrics. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- [58] NESPECA, M. G. Desenvolvimento de modelos quimiométricos associados à espectroscopia no infravermelho para determinação de parâmetros físico-químicos do óleo diesel. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- [59] ALEME, H. G. Determinação de parâmetros físico-químicos do óleo diesel a partir das curvas de destilação utilizando técnicas quimiométricas. 2011. 149 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- [60] CARVALHO, J. K. Avaliação de métodos de pré-processamento e modelagem matemática aplicados à espectroscopia no infravermelho próximo para estimar teores de argila e matéria orgânica do solo. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
- [61] WOLD, S.; ANTTI, H.; LINDGREN, F.; ÖHMAN, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 44, p. 175–185, 1998.
- [62] WISE, B. M. et al. Chemometrics tutorial for PLS_Toolbox and Solo. USA: Eigenvector Research, Inc., 2006.
- [63] BOTELHO, B. G. Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas, espectroscopia no infravermelho e imagens digitais. 2014. 119 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- [64] INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2020.
- [65] MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Manual da Garantia da Qualidade. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2015. Disponível

em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/manual-de-garantia-da-qualidade-analitica_2015.pdf. Acesso em: out. 2022.

[66] EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, v. 50, p. 8-36, 2002.

[67] EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods – Food information to consumers. UK, 2014. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf. Acesso em: mar. 2023.

[68] AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Guidelines for standard method performance requirements. In: AOAC (Org.). Official Methods of Analysis, 2012.

[69] MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em: nov. 2022.

[70] VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. Química Nova, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

[71] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, v. 74, p. 835-855, 2002.

[72] BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Development and analytical validation of robust near-infrared multivariate calibration models for the quality inspection control of mozzarella cheese. Food Analytical Methods, v. 6, p. 881-891, 2013.

[73] ASTM. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. West Conshohocken: ASTM International, 2012.

[[74] 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, v. 7, e7565, 2019.

[75] RIZZON, L. A.; SALVADOR, M. B. G. Metodologia para análise de vinho. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Uva e Vinho, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010.

[76] 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, 2017.

[77] 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.

- [78] CHAN, M.; SY, H.; FINLEY, J.; ROBERTSON, J.; BROWN, P. N. Determination of ethanol content in Kombucha using headspace gas chromatography with mass spectrometry detection: single laboratory validation. *Journal of AOAC International*, v. 104, n. 1, p. 122-128, 2021.
- [79] LACORN, M.; HEKTOR, T. Determination of ethanol in Kombucha, juices, and alcohol-free beer by Enzytec™ Liquid Ethanol: single-laboratory validation, first action 2017.07. *Journal of AOAC International*, v. 101, n. 4, 2018.
- [80] ORTIZ, A. L. P. P.; LIMA, T. C. F.; CONFORT, S. R. A.; SANTOS, L. M. R.; DIAS, A. G. Análise das propriedades físico-químicas de Kombuchas comerciais. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar*, v. 3, n. 12, 2022.
- [81] DADA, A. P.; LAZZARI, A.; CESTÁRIO, A. C. O.; SILVA, D. S.; SARAIVA, B. R.; ROSA, C. I. L. F.; PINTRO, P. T. M. Caracterização de Kombucha elaborado a partir de chá verde. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, 2021.
- [82] HUME, C. P. B. P. Kombucha artesanal e comercial: aspectos microbiológicos e parâmetros físico-químicos. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.
- [83] CABRAL, E. D. Elaboração de Kombuchas artesanais à base de chá verde: análise físico-química e microbiológica. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 2021.
- [84] SANTOS, A. R. S. Avaliação cinética da fermentação de chá de erva-mate tostada por SCOBY de Kombucha. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.
- [85] FU, Y.; ZHANG, J.; QIN, J.; DOU, X.; LUO, J.; YANG, M. Representative matrices for use in matrix-matched calibration in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in different types of food-medicine plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 111, p. 104617, 2022.
- [86] BRASIL. Resolução nº 432, de 23 de janeiro de 2013. Conselho Nacional de Trânsito. Dispõe sobre os procedimentos a serem adotados pelas autoridades de trânsito e seus agentes na fiscalização do consumo de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência. Disponível em: <https://www.gov.br/prf/pt-br/concurso-2021/resolucoes/R432-13>. Acesso em: mar. 2023.
- [87] DUTTA, H.; PAUL, S. K. Kombucha drink: production, quality, and safety aspects. In: *Production and Management of Beverages*. 2019.
- [88] GACHHUI, S.; CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, A.; CHATZINOTAS, W.; CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYA, R.; GACHHUI, Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, v. 220, p. 63–72, 2016.
- [89] BRASIL. Instrução Normativa-IN nº 75, de 8 de outubro de 2020. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Diário Oficial da União, Brasília, 09 out. 2020, Seção 1, p. 113. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-75-de-8-de-outubro-de-2020-276415858>. Acesso em: maio 2024.

- [90] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Como identificar o açúcar escondido nos alimentos. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/dicas/alimentacao/como-identificar-o-acucar-escondido-nos-alimentos#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o,de%20dez%20colheres%20de%20ch%C3%A1>. Acesso em: mar. 2024.
- [91] SANTOS, Y. M. A.; MOTA, M. M. A.; SANTIAGO, A. M.; GOUVEIA, D. S.; DANTAS, R. L.; MOREIRA, I. S. Avaliação da composição de Kombucha à base de diferentes chás (verde e preto). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, v. 12, n. 3, p. 1-6, 2019.
- [92] MARVÃO, L. S. Elaboração e avaliação nutricional de Kombuchas feitas a partir de folhas e vagens de feijões de *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Porto, 2022.
- [93] SOUZA, J. S. Caracterização físico-química da bebida fermentada Kombucha. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), 2022.
- [94] MORAES, L. S.; BENDER, S.; KOTTWITZ, L. B. M. Determinação composicional de amostras de Kombuchas acrescidas de polpas de frutas. *Journal of Health*, v. 2, n. 2, p. 252, 2020.
- [95] VENTURIM, B. C. Produção de Kombucha a partir de diferentes inóculos brasileiros. 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2022.
- [96] IVANIS`OVA`, M.; MEN`HARTOVA`, E. K.; TERE`NTJEVA, M.; HARANGOZO, L.; KAC`A`NIOVA, A. K. M. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of Kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*, v. 57, n. 5, p. 1840–1846, 2020.
- [97] SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 47, p. 5-9, 1921.
- [98] BERNFELD, P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, v. 1, p. 149-157, 1955.
- [99] VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, v. 88, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103342/1/BPD13017.pdf>. Acesso em: 2022.
- [100] GONÇALVES C.; JASSO, R. M. R.; GOMES N.; TEIXEIRA J. A.; BELO I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*. v. 2, p. 2046-2048, 2010.
- [101] MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Comunicado técnico 85. Embrapa, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81580/1/cot-85.pdf>. Acesso em: 2022.
- [102] SANTOS, G. L.; GEMMER, R. E.; OLIVEIRA, E. C. Análise de açúcares totais, redutores e não redutores em refrigerantes pelo método titulométrico de Eynon-Lane. *Destaques Acadêmicos*, v. 8, n. 4, p. 186-197, 2016.

- [103] SCHLESNER, S. K. Determinação de açúcares totais em refrigerantes com smartphone. 2020. Dissertação de mestrado — Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2020.
- [104] CAMPOS, L. M. M.; TEIXEIRA, A. Z. A. Investigação das bebidas açucaradas no mercado de refrigerantes brasileiro. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 9, n. 07, 2023.
- [105] NICOLOUCIA, Í. G.; TAKEHARA, C. T.; BRAGOTTO, A. P. A. Edulcorantes de alta intensidade: tendências de uso em alimentos e avanços em técnicas analíticas. *Química Nova*, v. 45, n. 2, p. 207-217, 2022.
- [106] RAJAPAKSHA, S. M.; SAMARASEKARA, D.; BROWN, J. C.; HOWARD, L.; GERKEN, K.; ARCHER, T.; LATHAN, P.; MLSNA, T.; MLSNA, D. Determination of xylitol in sugar-free gum by GC–MS with direct aqueous injection: A laboratory experiment for chemistry students. *Journal of Chemical Education*, v. 95, p. 2017-2022, 2018.
- [107] SUEZ, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, v. 514, p. 181, 2014.
- [108] NETTLETON, J. A.; LUTSEY, P. L.; WANG, Y.; LIMA, J. A.; MICHOS, E. D.; JACOBS, D. R., Jr. Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*, v. 32, n. 4, p. 639-644, abr. 2009.
- [109] LUO, X. et al. Comparison of ELSD and RID combined with HPLC for simultaneous determination of six rare sugars in food components. *Microchemical Journal*, v. 201, p. 110666, 2024.
- [110] SOYSEVEN, M.; SEZGIN, B.; ARLI, G. A novel, rapid and robust HPLC-ELSD method for simultaneous determination of fructose, glucose, and sucrose in various food samples: Method development and validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 107, p. 104400, 2022.
- [111] SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *Journal of Chromatography A*, v. 1059, p. 143-148, 2004.
- [112] SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M. R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, v. 77, p. 1473-1482, 2009.
- [113] PARVATAM, R.; SINGH, R.; SHARMA, R. Comparison of different derivatising reagents in identification of milk metabolites using GC–MS. *International Dairy Journal*, v. 138, p. 105535, 2023.
- [114] SILVEIRA, A. L. Desenvolvimento e validação de método por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial para análise de resíduos de anabolizantes em urina de bovinos. 2017. Dissertação de mestrado — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

- [115] AL-MHANNA, N. M.; HUEBNER, H.; BUCHHOLZ, R. Analysis of the sugar content in food products by using gas chromatography mass spectrometry and enzymatic methods. *Foods*, v. 7, p. 185, 2018.
- [116] FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: The combination of targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, v. 114, p. 30.4.1–30.4.32, 2016.
- [117] YUN, J.-S. et al. Simultaneous determination of fructose, glucose, and sucrose in honey and commercial drinks by GC and GC/MS. *Korean Journal of Food Science and Technology*, v. 45, n. 5, p. 537-544, 2013.
- [118] RUIZ-MATUTE, A. I. et al. Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemistry*, v. 120, p. 637-642, 2010.
- [119] QIU, Z. et al. GC–MS determination of sucralose in Splenda, Wenlong. *Chromatographia*, v. 66, n. 11/12, p. 889-893, 2007.
- [120] SANTANA, F. B. et al. Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V. *Química Nova*, v. 43, n. 3, p. 371-381, 2020.
- [121] SOUZA, A. M. et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.
- [122] BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
- [123] ZHAO, S. et al. On-line monitoring of total sugar during Kombucha fermentation process by near-infrared spectroscopy: Comparison of linear and non-linear multiple calibration methods. *Food Chemistry*, v. 423, 2023.
- [124] ZHAO, S. et al. On-line detecting soluble sugar, total acids, and bacterial concentration during Kombucha fermentation based on the visible/near infrared combined meta-heuristic algorithm. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 123, 2023.
- [125] WANG, Z. et al. Identification of volatile compounds and metabolic pathway during ultrasound-assisted Kombucha fermentation by HS-SPME-GC/MS combined with metabolomic analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 94, 2023.
- [126] FRANCO, V. G. et al. Monitoring substrate and products in a bioprocess with FTIR spectroscopy coupled to artificial neural networks enhanced with a genetic-algorithm-based method for wavelength selection. *Talanta*, v. 68, p. 1005–1012, 2006.
- [127] BARBOSA, C. D. et al. Data fusion of UPLC data, NIR spectra and physicochemical parameters with chemometrics as an alternative to evaluating Kombucha fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, v. 133, 2020.
- [128] FULGÊNCIO, A. C. C. et al. Determination of alcohol content in beers of different styles based on portable near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Food Analytical Methods*, v. 15, p. 307–316, 2022.

- [129] PIZARRO, C. et al. Prediction of total and volatile acidity in red wines by Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and iterative predictor weighting. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 399, p. 2061–2072, 2011.
- [130] YAJIMA, Y. et al. Simultaneous content determination of mono-, di-, and fructo-oligosaccharides in citrus fruit juices using an FTIR-PLS method based on selected absorption bands. *International Journal of Food Science*, v. 2024, 11 p.
- [131] FORATO, L. A. et al. A espectroscopia na região do infravermelho e algumas aplicações. Embrapa, 2010. Documento 51. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884592/1/DOC512010.pdf>. Acessado em: abril de 2024.
- [132] SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.
- [133] HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- [134] FIGURA DE DÍMERO DE ÁCIDO CARBOXÍLICO. Portal CESAD. Universidade Federal de Sergipe. Aula Química dos Compostos Orgânicos. Dímero de ácido carboxílico formado por ligações de hidrogênio. Disponível em: https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalago/10043808042014Quimica_dos_Compostos_Organicos_II_Aula_3.pdf. Acessado em: março de 2024.

APÊNDICE A – Informações complementares ao capítulo 4

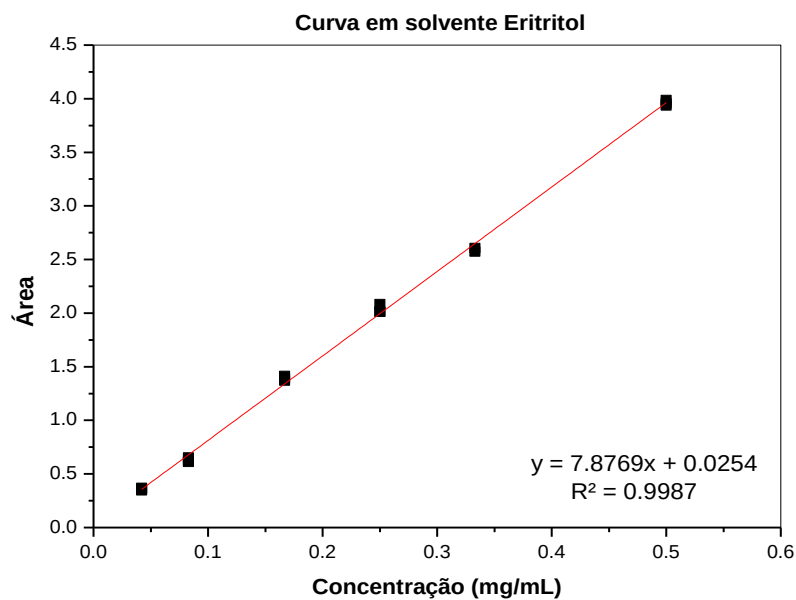


Figura A1. Curva do eritritol em solvente utilizando o método GC-MS após a remoção de *outliers*.
Fonte: Obtido utilizando o software OriginPro 8.5.

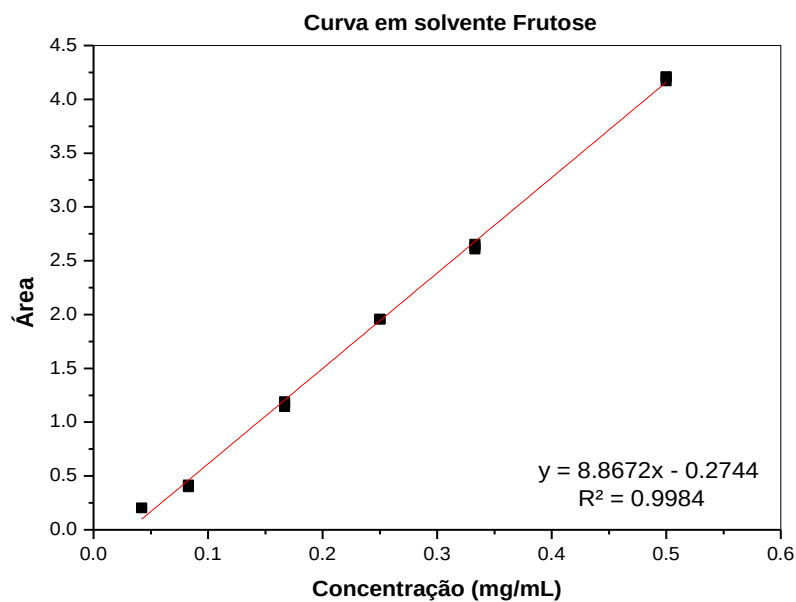


Figura A2. Curva da frutose em solvente utilizando o método GC-MS após a remoção de *outliers*.
Fonte: Obtido utilizando o software OriginPro 8.5.

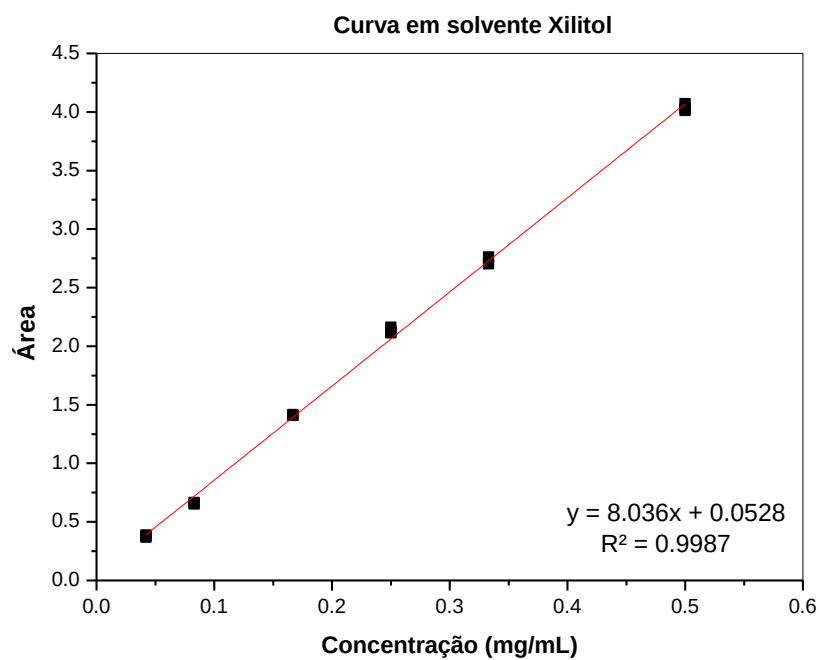


Figura A3. Curva do xilitol em solvente utilizando o método GC-MS após a remoção de *outliers*.
Fonte: Obtido utilizando o software OriginPro 8.5.

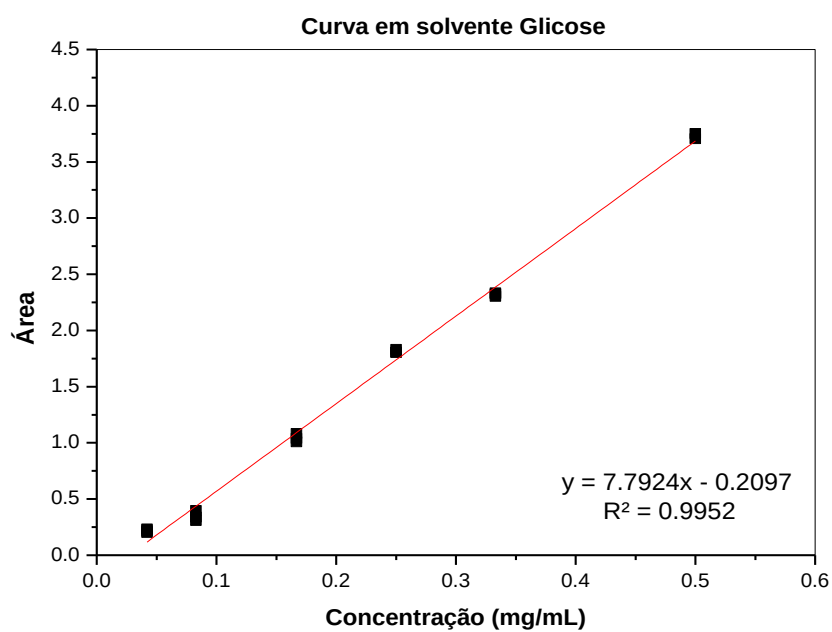


Figura A4. Curva da glicose em solvente utilizando o método GC-MS após a remoção de *outliers*.
Fonte: Obtido utilizando o software OriginPro 8.5.

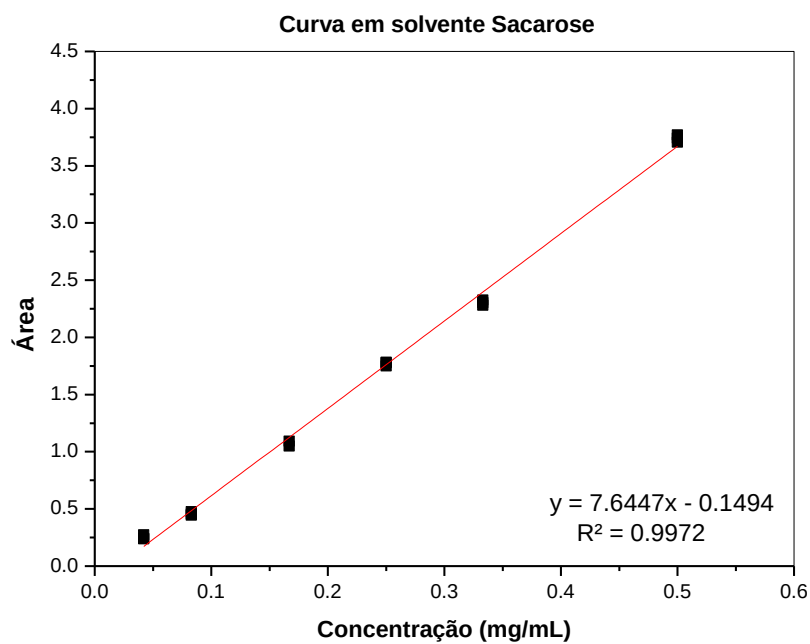


Figura A5. Curva da sacarose em solvente utilizando o método GC-MS após a remoção de *outliers*.
Fonte: Obtido utilizando o software OriginPro 8.5.

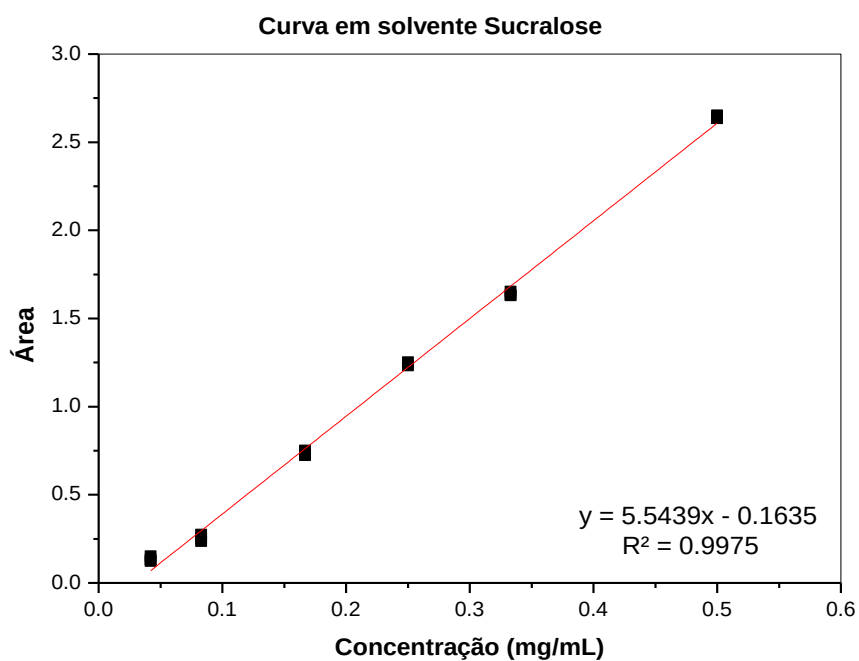


Figura A6. Curva da sucralose em solvente utilizando o método GC-MS após a remoção de *outliers*.
Fonte: Obtido utilizando o software OriginPro 8.5.

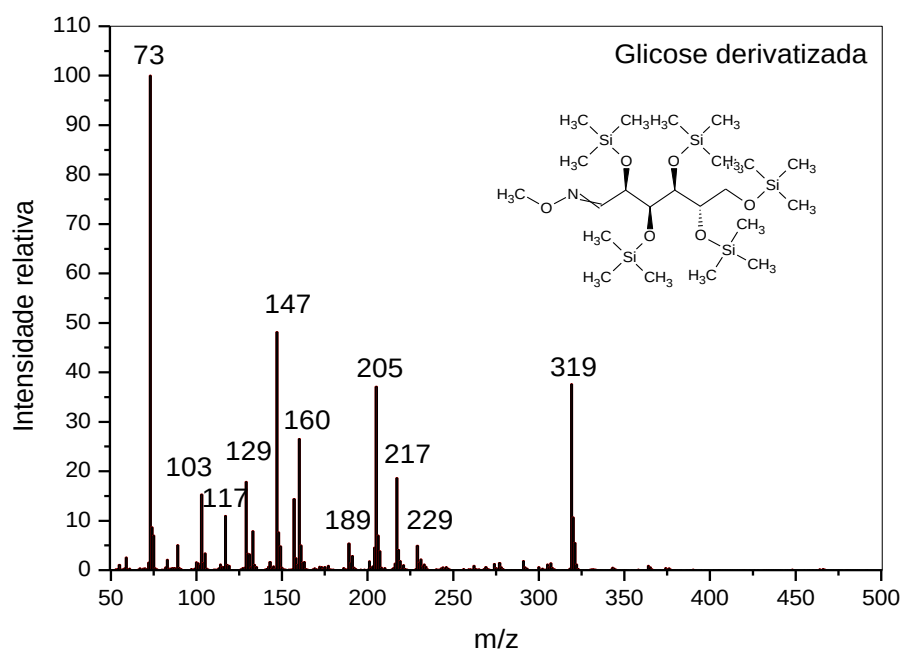


Figura A7: Espectro de massas da glicose após derivatização utilizando oximação e sililação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

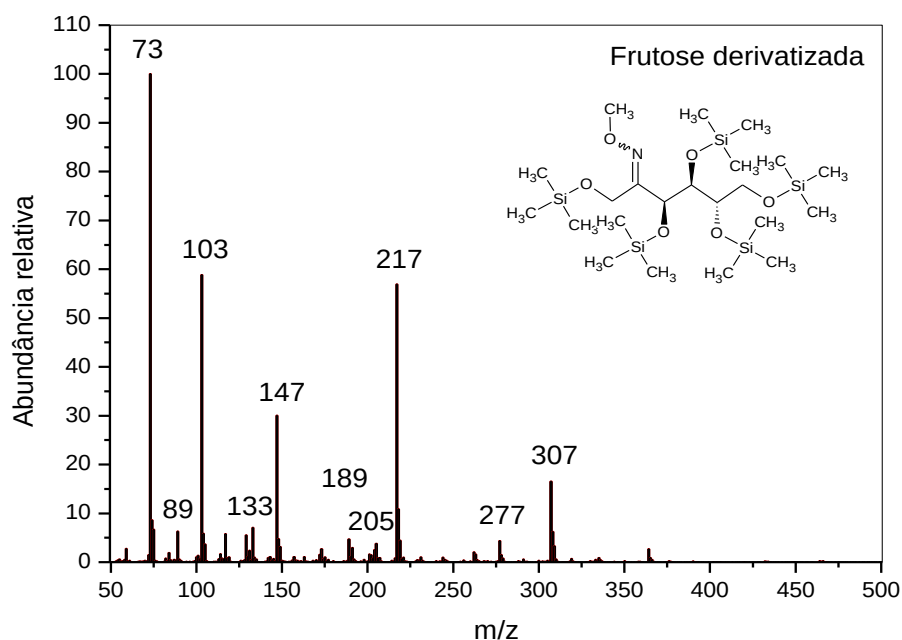


Figura A8: Espectro de massas da frutose após derivatização utilizando oximação e sililação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

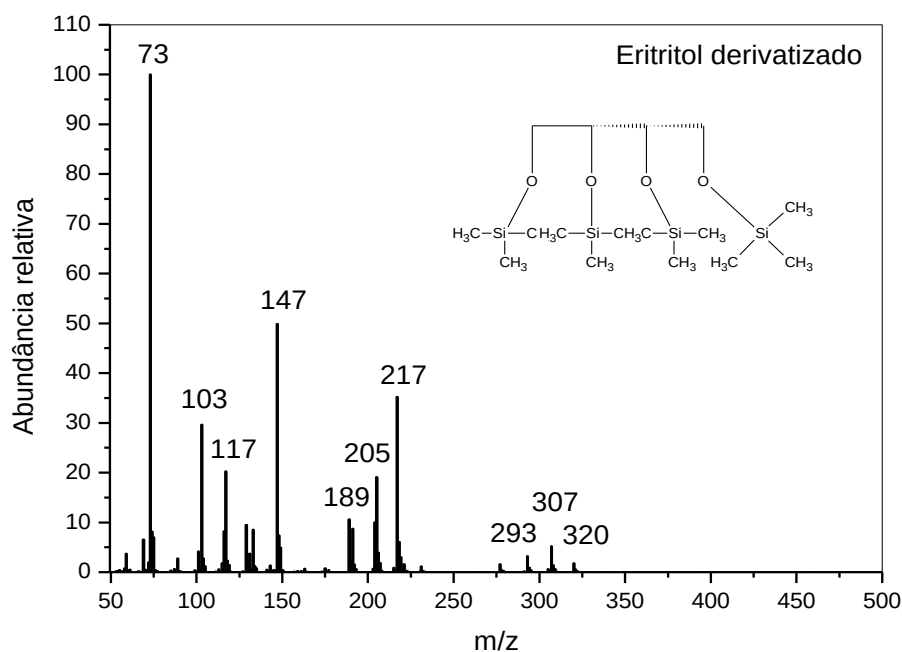


Figura A9. Espectro de massas o eritritol após derivatização utilizando oximação e sililação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

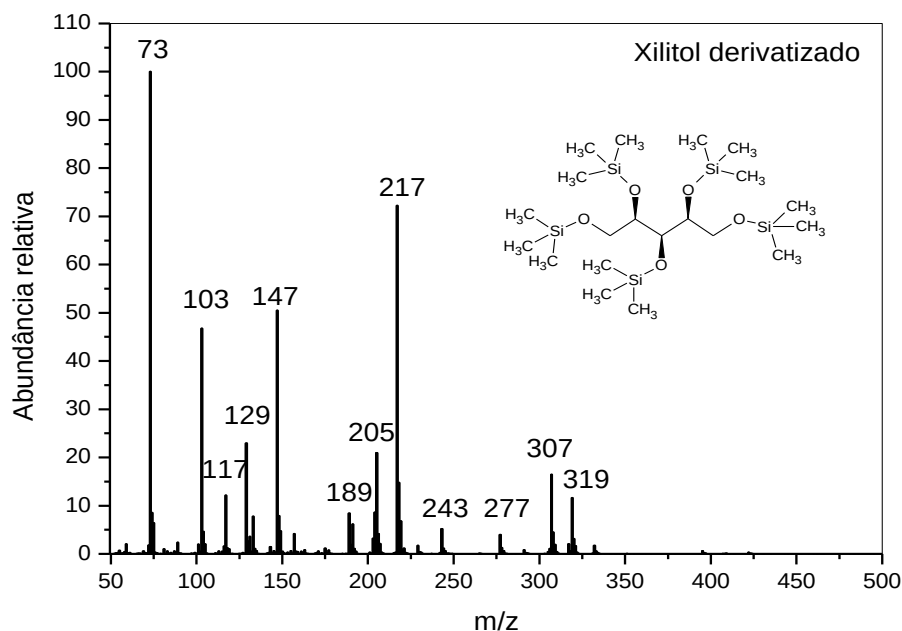


Figura A10: Espectro de massas do xilitol após derivatização utilizando oximação e sililação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

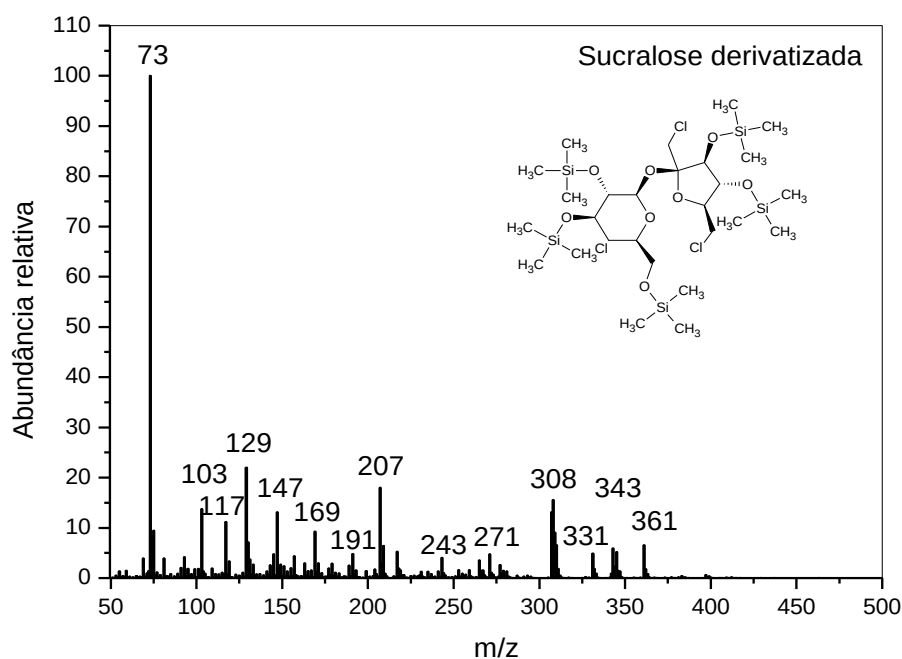


Figura A11. Espectro de massas da sucralose após derivatização utilizando oximação e sililação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.

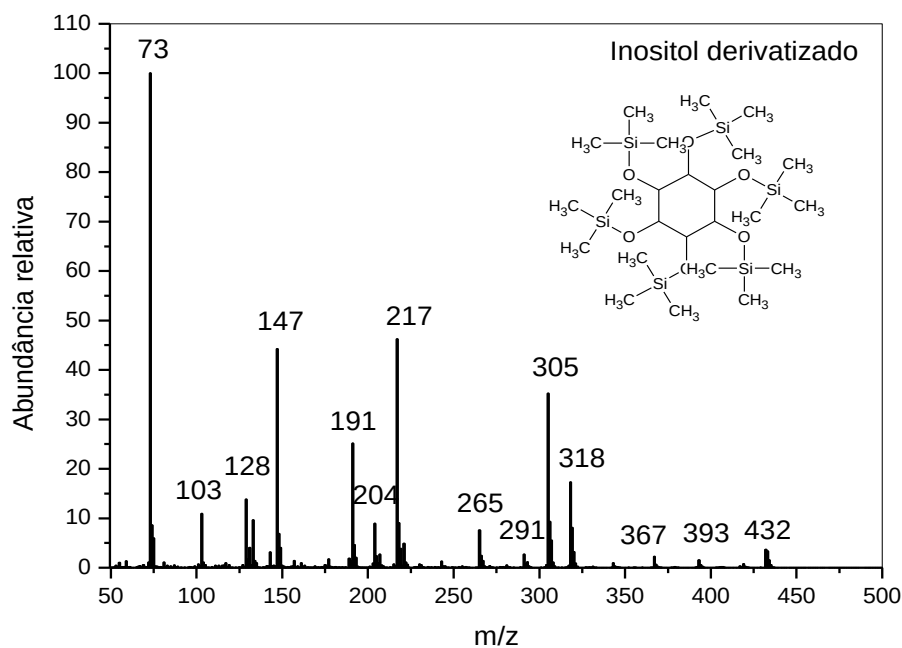


Figura A12. Espectro de massas da inositol após derivatização utilizando oximação e sililação. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software origin 8.5 com base nos dados obtidos no software GC-MSsolution da Shimadzu.