



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ANTONIO AUGUSTO LIMA ARAUJO FILHO**

**ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO DE KEFIR E KOMBUCHA EM  
EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE AMÊNDOA DE CASTANHA DE CAJU**  
*(Anacardium Occidentale L.)*

**FORTALEZA**

**2022**

ANTONIO AUGUSTO LIMA ARAUJO FILHO

ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO DE KEFIR E KOMBUCHA EM EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE AMÊNDOA DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium Occidentale*  
L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A687e Araujo Filho, Antonio Augusto Lima.  
Estudo cinético da fermentação de kefir e kombucha em extrato hidrossolúvel de amêndoa de castanha de caju (*Anacardium Occidentale L.*) / Antonio Augusto Lima Araujo Filho. – 2022.  
66 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa.

1. Leite vegetal. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Bactérias ácido acéticas. 4. Ácido glucurônico. 5. Rafinose. I. Título.

CDD 664

---

ANTONIO AUGUSTO LIMA ARAUJO FILHO

ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO DE KEFIR E KOMBUCHA EM EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE AMÊNDOA DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium Occidentale*  
L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 03/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Larissa Morais Ribeiro da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr<sup>a</sup>. Giovana Matias do Prado  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr<sup>a</sup>. Claisa Andrea Freitas Rabelo  
Universidade Estadual do Ceará

## RESUMO

Cresce ao redor do mundo inteiro a quantidade de adeptos à refeições com menor quantidade de produtos de origem animal, sob a justificativa de uma vida mais saudável e contribuição com a preservação do meio ambiente. Surgem, então, as dietas *plant-based* que giram em torno de alimentos vegetais, menos processados, com insumos familiares ao consumidor e produzidos com maior responsabilidade ambiental. A fermentação de alimentos apresenta-se como aliada desse padrão de consumo por ser um processo aceito em diferentes culturas, além de conseguir enriquecer nutricionalmente o produto. O presente trabalho se propôs a estudar a cinética de fermentação de dois consórcios de fungos e bactérias, o kefir e a kombucha, investigando seu potencial simbiótico em bebida de amêndoas de castanha de caju, um insumo consolidado no mercado nacional. A bebida foi formulada com 10% de castanhas secas e cruas, pasteurizada pelo método HTLT, a partir disso, foram formuladas três amostras: LC-F que recebeu inóculo composto 100% de kefir, LC-B inoculada com 100% de kombucha e LC-FB com 50% kefir e 50% kombucha. As amostras foram analisadas com 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de fermentação a 28 °C. Foram monitoradas suas mudanças no pH, sólidos solúveis, acidez titulável, açúcares e ácidos orgânicos, bem como seus níveis de toxicidade aguda e alterações na atividade locomotora de *zebrafish*. Em todas as análises *in vitro*, LC-B apresentou alterações mais lentas com o tempo enquanto LC-F e LC-FB não apenas mostraram maior velocidade em suas reações como apresentaram curvas semelhantes em suas dinâmicas. Em todas as amostras, o pH e os sólidos solúveis reduziram enquanto a acidez titulável aumentou. LC-F e LC-FB esgotaram as reservas de carboidratos em até 48 horas, mas LC-FB foi mais eficiente no consumo de oligossacarídeos. Não foi observada ação simbiótica entre kefir e kombucha associada à otimização da produção de ácidos orgânicos funcionais. LC-FB e LC-B reduziram a capacidade natatória dos peixes, mas a rápida hidrólise de açúcares em LC-FB pode estar associada à maior mobilidade dos animais com 72 horas. Nenhuma amostra em nenhum tempo apresentou toxicidade aguda. Por fim, constatou-se que a mistura de kefir e kombucha apresenta uma dinâmica de hidrólise de açúcares mais eficiente, inclusive para moléculas maiores, mas necessita de outras investigações para confirmação de potencial probiótico.

**Palavras-chave:** leite vegetal; bactérias ácido lácticas; bactérias ácido acéticas; ácido glucurônico; rafinose.

## ABSTRACT

Around the world, there is an increasing number of adepts for diets with fewer animal products, justified in the search for a healthier life and to contribute to the preservation of the environment. Thus, plant-based diets are a global trend that revolves around vegetable foods, with fewer food additives, with products known to the consumer and produced with greater environmental responsibility. Food fermentation is an ally of this consumption pattern because it is a widespread food transformation process that is capable of improving the nutritional quality of the product. The present work aimed to study the fermentation kinetics of two consortia of fungi and bacteria, kefir and kombucha, investigating its symbiotic potential in cashew nut beverage, a known Brazilian feedstock consolidated in the market. The beverage was formulated with water and 10% of dried raw cashew nuts, pasteurized by HTLT method and, after this, three samples were formulated: LC-F that received inoculum composed 100% of kefir, LC-B inoculated with 100% kombucha, and LC-FB with 50% kefir and 50% kombucha. The samples were analyzed with 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 and 72 hours of fermentation at 28 °C. *In vitro* experiments were conducted for pH, soluble solids, titratable acidity and determination of sugars and organic acids, while *in vivo* experiments tested acute toxicity and changes in the locomotor activity of *zebrafish*. In all *in vitro* assays, LC-B showed slower changes over time while LC-F and LC-FB not only showed higher speed in their reactions but also showed similar curves in their dynamics. In all samples, pH and soluble solids reduced while titratable acidity increased. LC-F and LC-FB exhausted their carbohydrate reserves within 48 hours, but LC-FB was more efficient in the consumption of oligosaccharides. No symbiotic action was observed between kefir and kombucha associated with optimization of the functional organic acids production. LC-FB and LC-B reduced the animal's natatory capacity, suggesting probiotic action, but the faster hydrolysis of sugars in LC-FB might be associated with the animal's higher mobility at 72 hours. No sample at any time presented acute toxicity. Finally, it was found that the mixture of kefir and kombucha presents more efficient sugar hydrolysis dynamic, including larger molecules, but requires further investigation to confirm probiotic activity.

**Keywords:** nut milk; lactic acid bacteria; acetic acid bacteria; glucuronic acid; raffinose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Variação dos valores de pH para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C .....	32
Figura 02 - Variação dos valores de ATT para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C .....	34
Figura 03 - Variação dos valores de SST para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C .....	35
Figura 04 – Cromatograma dos padrões de açúcares pesquisados por CLAE .....	37
Figura 05 - Variação das concentrações de glicose, frutose, sacarose e rafinose (g/100 mL) para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C .....	40
Figura 06 – Variação das concentrações de açúcares dentro de cada amostra analisada (LC-F, LC-FB e LC-B) .....	41
Figura 07 – Cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos pesquisados por CLAE .....	42
Figura 08 – Variação das concentrações dos ácidos glucurônico, lático, acético e cítrico (mg/mL) para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C .....	45
Figura 09 – Variação das concentrações de ácidos orgânicos dentro de cada amostra analisada (LC-F, LC-FB e LC-B) .....	46
Figura 10 – Cruzamento de linhas referente à amostra LC-F nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas .....	48
Figura 11 – Cruzamento de linhas referente à amostra LC-FB nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas .....	48
Figura 12 – Cruzamento de linhas referente à amostra LC-B nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Caracterização físico-química dos produtos fermentados, quanto à pH, sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável total (ATT) .....	31
Tabela 02 – Limites de detecção e quantificação do equipamento de CLAE para as substâncias padrões utilizadas .....	36
Tabela 03 – Quantificações dos açúcares presentes em cada tempo de fermentação das bebidas fermentadas de ACC .....	38
Tabela 04 – Quantificações dos ácidos orgânicos presentes em cada tempo de fermentação das bebidas fermentadas de ACC .....	43
Tabela 05 – Mortalidade de <i>zebrafish</i> por tempo de fermentação nas amostras LC-F, LC-FB e LC-B .....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Amêndoa de castanha de caju
ACE	Ácido acético
ATT	Acidez titulável total
BAA	Bactérias ácido acéticas
BAL	Bactérias ácido lácticas
CIT	Ácido cítrico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FRU	Frutose
GLI	Glicose
GLU	Ácido glucurônico
LAT	Ácido láctico
LC	Leite de castanha
PB	<i>Plant-based</i>
RAF	Rafinose
SAC	Sacarose
SCOBY	<i>Symbiotic culture of bacteria and yeasts</i> (“cultura simbiótica de leveduras e bactérias”)
SST	Sólidos solúveis totais

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
2	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	12
2.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	12
3	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	13
3.1	<b>Dieta à base de plantas</b> .....	13
3.2	<b>Processos fermentativos em alimentos</b> .....	17
3.3	<b>Kefir</b> .....	19
3.4	<b>Kombucha</b> .....	21
3.5	<b>Bebida de amêndoas de castanha de caju</b> .....	23
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
4.1	<b>Matéria prima e reagentes</b> .....	24
4.2	<b>Delineamento experimental</b> .....	25
4.3	<b>Preparo do extrato hidrossolúvel pasteurizado de amêndoas de castanha de caju</b> .....	25
4.4	<b>Preparo e aplicação dos inóculos</b> .....	26
4.5	<b>Análises físico-químicas</b> .....	27
4.6	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</b> .....	27
4.6.1	<i>Determinação de açúcares</i> .....	27
4.6.2	<i>Determinação de ácidos orgânicos</i> .....	28
4.7	<b>Análises toxicológicas</b> .....	28
4.7.1	<i>Atividade locomotora</i> .....	28
4.7.2	<i>Toxicidade aguda</i> .....	29
4.8	<b>Análises estatísticas</b> .....	29
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	29
5.1	<b>Análises físico-químicas</b> .....	30
5.2	<b>Análises cromatográficas</b> .....	35
5.2.1	<i>Determinação de açúcares</i> .....	36
5.2.2	<i>Determinação de ácidos orgânicos</i> .....	39
5.3	<b>Análises toxicológicas</b> .....	47
5.3.1	<i>Atividade locomotora</i> .....	47
5.3.2	<i>Toxicidade aguda</i> .....	50

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
	<b>APÊNDICE A – RESUMO DA TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E REGRESSÃO PARA PH, SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST) E ACIDEZ TITULÁVEL TOTAL (ATT) .....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE B - RESUMO DA TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E REGRESSÃO PARA OS AÇÚCARES GLICOSE (GLI), FRUTOSE (FRU), SACAROSE (SAC) E RAFINOSE (RAF) .....</b>	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE C - RESUMO DA TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E REGRESSÃO PARA OS ÁCIDOS GLUCURÔNICO (GLU), LÁTICO (LAT), ACÉTICO (ACE) E CÍTRICO (CIT) .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há alguns anos que a mídia e a esfera acadêmica já relatam em todo o planeta uma busca das pessoas por hábitos mais saudáveis e sustentáveis. A alimentação é um dos fatores mais incorporados nessa mudança justamente por influenciar diretamente a saúde do consumidor, como também pelo fato de que as cadeias de produção da indústria alimentícia costumam ter impactos negativos no meio ambiente (GODFRAY *et al.*, 2018; HEMLER; HU, 2019).

Dentro desse contexto, vem ganhando muita força um padrão de alimentação à base de plantas, chamado de “plant-based”. Esta dieta é um tipo de vegetarianismo cujos pilares principais são: consumir alimentos considerados saudáveis, que vem de fontes com baixo impacto ambiental e que tem o “rótulo limpo”, ou seja, com menor processamento e maior quantidades de ingredientes conhecidos e naturais (ASCHEMANN-WITZEL *et al.*, 2020).

Muitas pesquisas já apontam indícios de que a dieta *plant-based* pode atuar prevenindo ou melhorando alguns quadros de saúde, entre eles: quadros de obesidade, inflamações sistêmicas, doenças cardiovasculares e renais, diabetes, artrite, alergias, câncer e ansiedade (IARC, 2015; MEDAWAR *et al.*, 2019; FEHÉR *et al.*, 2020).

Segundo pesquisa conduzida pelo *Good Food Institute* (GFI, 2018), três a cada 10 brasileiros já buscam reduzir a quantidade consumida de alimentos de origem animal e 59% destes afirmam o fazer por questões de saúde. Em paralelo, levantamento feito pela *Euromonitor Internacional* (2019) diz que o mercado de bebidas vegetais no Brasil cresceu 51,5% em 2018 e as indústrias utilizam principalmente a aveia, o arroz, o coco e as amêndoas como matérias primas, reduzindo o uso de soja nos processamentos.

No intuito de agregar maior qualidade nutricional aos alimentos vegetais, é possível fazer uso dos processos fermentativos para gerar produtos inovadores. As fermentações são capazes de quebrar moléculas complexas em partículas menores e mais digestíveis, além de produzir metabólitos que aumentam o valor nutritivo e alteram aroma, sabor e textura, podendo tornar o produto mais atrativo (HASAN, SULTAN & MAR-E-UM, 2014; SANLIER, GOKCEN & SEZGIN, 2019).

Coelho *et al.* (2020) e Fiorda *et al.* (2017) revisaram dados acerca de kombucha e kefir, considerados “fermentos naturais”, e destacaram seus potenciais na prevenção e tratamento de uma série de enfermidades. Os ditos “fermentos” são, na verdade, conglomerados de fungos e bactérias que vivem em simbiose e que podem ter funções biológicas interessantes aos humanos. Já foram registradas ações probióticas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antidepressivas e antivirais, além de melhoras em quadros de disbiose intestinal, cicatrizações

e alta pressão arterial. Embora se saiba que o kefir e a kombucha sejam ricos em tipos específicos de bactérias (ácido láticas e ácido acéticas, respectivamente) que podem se beneficiar mutuamente (NGUYEN *et al.*, 2015), a maioria dos estudos científicos ao redor do mundo focam em estudá-los separadamente e deixam de investigar seus potenciais simbióticos e/ou sinérgicos.

Relembrando a ideia do alimento plant-based como sendo “rótulo limpo”, as amêndoas de castanha de caju apresentam-se como fortes candidatas à comporem alimentos deste tipo, uma vez que são muito conhecidas e consumidas nacionalmente (ALENCAR; ESPÍNDOLA; CARNEIRO, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020). As amêndoas também estão muito associadas às “boas gorduras” e podem ter efeitos positivos no controle de colesterol e da pressão arterial (MATTISON *et al.*, 2020).

Dadas todas as referências discutidas, este trabalho propõe avaliar o potencial simbiótico de uma bebida inovadora que una os potenciais do kefir, da kombucha e da amêndoa da castanha de caju.

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial simbiótico de bebida fermentada com kefir e kombucha à base de amêndoas de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.).

### 2.1 Objetivos específicos

- a. Elaborar extrato hidrossolúvel de amêndoa de castanha de caju pasteurizado;
- b. Fermentar o extrato com kefir e/ou kombucha durante 72 horas;
- c. Avaliar os perfis cinéticos das fermentações de kefir e de kombucha, separadamente e simultaneamente, quanto à pH, acidez titulável, sólidos solúveis, açúcares e ácidos orgânicos;
- d. Investigar o potencial simbiótico entre kefir e kombucha para otimizar a produção de compostos funcionais;
- e. Aplicar as bebidas fermentadas em modelo animal (*Danio rerio*) para avaliação de toxicidade aguda e possíveis alterações na atividade locomotora.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta sessão, serão apresentados e discutidos os principais tópicos que embasam a pesquisa realizada: dietas à base de plantas, alimentos fermentados, kefir, kombucha e amêndoas de castanha de caju.

#### 3.1 Dietas à base de plantas

A literatura científica relata de maneira extensiva o quanto inúmeros problemas de saúde, crônicos ou não, estão relacionados àquilo que o indivíduo ingere e como isso se torna uma questão de saúde pública (MALIK; WILLET; HU, 2012; DERBYSHIRE, 2017; MEDAWAR *et al.*, 2019). Ainda, a qualidade da dieta de uma população está intrinsecamente ligada à oferta desses alimentos no comércio e ao poder aquisitivo dos grupos em questão, sendo possível identificar um maior consumo de produtos ultraprocessados em parcelas da sociedade que sofrem algum tipo de marginalização étnico-social (BHUPATHIRAJU; HU, 2016).

Em artigo publicado na revista *Nature*, os autores Malik, Willet e Hu (2012) apontam que o aumento de casos de doenças crônicas relacionadas à alimentação foi diretamente influenciado pela rápida urbanização e pela corrida econômica dos países, o que aumentou o consumo de proteína animal processada, açúcares adicionados e grãos refinados. Mais recentemente, Godfray *et al.* (2018) publicaram na *Science* que o escalonamento da produção de carne é um dos maiores vilões para o meio ambiente: a abertura de pastos implica em desmatamento de grandes áreas, o alto nível trófico desses animais demanda maior volume de água na sua criação e a prática pecuária é uma das maiores responsáveis pela emissão de gases estufa atualmente.

Dado o exposto, percebe-se como as saúdes pessoal, coletiva e planetária estão fortemente entrelaçadas e que estão todas ameaçadas por dietas de baixa qualidade e pela degradação ambiental (HEMLER; HU, 2019). Consumidores em todos os continentes já tem entrado em contato com esse acúmulo de evidências e, como resposta, muitos buscam mudar os seus hábitos alimentares em uma tentativa de contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de produção de alimentos. A redução parcial ou total do consumo de produtos de origem animal entra como uma das principais estratégias dos consumidores que estão preocupados com o seu bem-estar e com o da Terra (DERBYSHIRE, 2017; GRAÇA. GODINHO; TRUNINGER, 2019; CURTAIN; GRAFENAUER, 2019; DELIENS; MULLIE; CLARYS, 2021).

Em revisão conduzida por Graça, Godinho e Truninger (2019), os autores organizaram as motivações que levam as pessoas a basear suas dietas em produtos vegetais e encontraram diversas categorias, dentre elas: preocupação ecológica, proximidade com animais domésticos, redução de sofrimento animal, desgosto com o gosto do produto animal, interesse em novos alimentos, exposição repetida à produtos vegetais e busca por melhor saúde.

Visto que cada consumidor tem motivações em uma ou mais categorias, vão se delineando diferentes padrões de alimentação baseados no quão estrita é a dieta seguida. Os consumidores que se identificam como “veganos” são aqueles que se posicionam contra toda e qualquer fonte de sofrimento e exploração animal, não apenas na esfera da alimentação como também na têxtil, cosmética, farmacêutica, etc. Os ditos “vegetarianos” mantêm uma relação exclusivamente dietética com os produtos de origem vegetal, abolindo sempre o consumo de carnes mas podendo dividir-se em subgrupos que consomem ou ovo ou leite ou ambos (PAIVA; LUIZ, 2020). O terceiro grupo, mais recentemente nominado, é formado pelos “flexitarianos”, também chamados de “semi-vegetarianos”, “redutores de carne” ou “onívoros conscientes” (DERBYSHIRE, 2017; KEMPER; WHITE, 2021), que são aqueles que reduzem ou evitam o consumo de carne em alguns dias da semana ou apenas a ingerem em ocasiões especiais (ROSENFELD, 2018).

Até 8% da população brasileira já se considerava vegetariana em 2018, segundo o IBOPE (2018), e o Brasil foi o quinto país com maior crescimento no número de vegetarianos entre 2016 e 2017 (EUROMONITOR, 2019b). Uma investigação feita pelo Good Food Institute (GFI, 2018) traz números semelhantes à pesquisa do IBOPE, apontando 6% da população como vegetariana. O GFI ainda informa que 3 a cada 10 brasileiros já buscam reduzir a quantidade consumida de alimentos de origem animal e 59% destes afirmam o fazer por questões de saúde, elevando a indústria nacional de alimentos saudáveis à 5ª posição de maior relevância ao redor do mundo nesse segmento. É importante considerar que o Brasil tem dimensões continentais, logo, 6 a 8% da população representa pelo menos 13 milhões de pessoas (IBGE, 2021), número este que pode ser equivalente à metade da população australiana ou mesmo maior do que o de países inteiros, como Suécia, Portugal, Bélgica, Dinamarca ou Grécia (WPP, 2019).

Em comunhão com todos os padrões de dieta citados, a alimentação hoje difundida como *plant-based* (PB, do inglês “à base de plantas”) é aquela que prioriza sempre produtos vegetais alternativos aos animais, além de zelar por itens mais frescos, integrais e com menos aditivos químicos. Aschemann-Witzel *et al.* (2020) apontam dois termos centrais na descrição do alimento *plant-based*: é o alimento da liberdade (“*freedom food*”) e de rótulo limpo (“*clean label*”). O primeiro epíteto justifica-se na ideia de que o alimento PB pode ser consumido com



menor preocupação acerca dos seus impactos ambientais e na saúde do consumidor, quando em comparação com o produto animal. Já o segundo termo dá-se pela associação desse tipo de alimento com a baixa presença, ou mesmo ausência, de aditivos alimentares, além do uso de técnicas mais tradicionais de processamento, lista de ingredientes curta e fácil de entender e produção com insumos familiares ao consumidor.

Fehér *et al.* (2020) levantaram artigos, dos anos 1970 a 2010, que discutissem os benefícios e barreiras percebidas pelo consumidor na adoção de hábitos alimentares à base de plantas, a fim de tentar entender melhor como tem se dado essa transição internacionalmente. O primeiro fator que chama a atenção é a quantidade de publicações nesse escopo, passando de 5 a 48 da primeira à última década. A seguir, os autores também informam que a dieta à base de plantas não é uniforme entre os praticantes, mas que sempre se baseia em pilares vegetarianos. No que diz respeito às barreiras, a dificuldade de abandonar o consumo de carne e produtos animais é a maior barreira para a adoção de mais hábitos *plant-based*. Ainda assim, os autores apontam que essa prática é adequada a todas as idades e padrões de vida, sendo a busca por saudabilidade a principal justificativa em até 47% dos casos de transição.

Desde que planejada e assistida por profissionais, uma dieta mais focada em produtos vegetais pode ajudar em quadros de obesidade, doenças cardiovasculares e renais, diabetes, artrite, alergias (FEHÉR *et al.*, 2020) e até câncer, uma vez que carnes processadas foram classificadas como “carcinogênicas para humanos” pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, um órgão da Organização Mundial da Saúde (IARC, 2015). Alguns estudos apontam que a microbiota intestinal também pode se beneficiar desse padrão de alimentação, modulando uma cascata de reações benéficas ao organismo que vão desde uma menor inflamação sistêmica do corpo até a maior liberação de precursores de neurotransmissores, atuando em prol de várias funções neurológicas e psiquiátricas (MEDAWAR *et al.*, 2019).

Medawar *et al.* (2019) pesquisaram pela influência do termo “*plant-based*” na plataforma PubMed, especializada em artigos científicos voltados para a biomedicina. A revisão sistemática procurou por “*plant-based*” ou “vegetariano” ou “vegano” e “dieta” e “intervenção”, sempre fazendo uso dos filtros para “testes clínicos” e “humanos”, entre 2000 e 2018. Também no âmbito da biomedicina nota-se a crescente disseminação dos conceitos da alimentação PB, uma vez que desde 2011 esse termo é mais publicado do que “vegetariano” ou “vegano”. No ano 2000, o termo “vegetariano” era 2x mais presente nas publicações que “*plant-based*”, fato este que se inverteu a partir de 2017.

Os hábitos alimentares com base em produtos vegetais estão sendo tão associados à melhora da saúde do indivíduo que essa correlação é um dos principais fatores para a sua

popularidade, inclusive contando com a ajuda de redes sociais na divulgação dos benefícios. Pesquisadores brasileiros utilizaram a rede social Twitter para analisar os nichos de mercado vegano e *plant-based* entre 2018 e 2019 e perceberam que as postagens relacionadas ao veganismo recebiam aproximadamente 3,5 vezes mais criticismo e comentários negativos do que os “tweets” associados à alimentação PB (ALEIXO *et al.*, 2020). A mesma pesquisa revelou que os termos ligados à dieta PB apareciam quase 4 vezes mais na categoria “nutrição, atividade física, saúde e qualidade de vida” do que aqueles ligados ao veganismo, representando, inclusive, 45% de todos os *posts* coletados para o nicho PB.

Essa popularidade dos produtos vegetais já começa a ter repercussões econômicas. Em estudo de revisão mercadológico, Aschemann-Witzel *et al.* (2020) afirmam que os produtos PB no mercado dinamarquês dobraram sua oferta entre 2011 e 2015, já sendo exportados para toda a Europa, para alguns países da Oceania e para Singapura. Adicionalmente, a Alemanha desponta como produtora de substitutos vegetais de carne, indo de 14 toneladas vendidas em 2014 a 20 toneladas em 2018. Por fim, esse estudo revela que 39% dos produtos *plant-based* vendidos mundialmente eram provenientes de empreendimentos europeus em 2016.

Nas Américas, os pesquisadores Wolf, Malone e McFadden (2020) demonstram que o mercado de leite bovino nos EUA teve uma redução significativa nas vendas em um período de 5 anos, entre 2013 e 2018, deixando de movimentar aproximadamente \$US 5 bilhões. Os autores afirmam que parte deste decréscimo pode se justificar pelo aumento do consumo de substitutos vegetais do leite, uma vez que a oferta destes produtos aumentou 61% no mesmo período, movimentando \$2,3 bilhões apenas em 2018.

Em levantamento feito pela Euromonitor Internacional (2019a), o mercado de bebidas vegetais no Brasil cresceu 35% ao ano de 2013 a 2018 e as indústrias utilizam principalmente a aveia, o arroz, o coco e as amêndoas como matérias primas, enquanto o uso de soja decaiu 19% em relação a 2017. A mesma pesquisa revelou que marcas consolidadas no segmento e consideradas “gigantes”, tais como Coca-Cola e Nestlé, entraram com novos produtos para atender a demanda, difundindo ainda mais os alimentos vegetais. Em paralelo 60% dos brasileiros onívoros estão dispostos a aumentar o consumo de produtos vegetarianos se estes estiverem em uma faixa de preço próxima aos produtos de origem animal que já estão acostumados a comprar (IBOPE, 2018).

Bebidas vegetais alternativas ao leite são desenvolvidas no intuito de assemelharem-se visualmente ao leite bovino, mas frequentemente possuem menor qualidade nutricional e mais retrogostos indesejados. Ainda assim, seguindo a tendência do “clean label”, é interessante evitar suplementar esses produtos com elementos extrínsecos e/ou sintéticos (ASIOLI *et al.*,

2017). Uma possível estratégia para atingir os perfis nutricionais e sensoriais desejados é uma técnica muito antiga e amplamente difundida: a fermentação. Além de poder contribuir para uma melhor aceitação do público (HASAN, SULTAN; MAR-E-UM, 2014; SANLIER, GOKCEN; SEZGIN, 2019), é possível fazer uso de culturas de fermentação mistas, com mais de um microrganismo, aproveitando o potencial de sinergia entre esses fermentadores para o aumento da qualidade do produto com o mínimo esforço (TANGYU *et al.*, 2019)

### 3.2 Processos fermentativos em alimentos

Alimentos fermentados são aqueles que foram submetidos à ação de microrganismos para atingir modificações bioquímicas desejáveis e consequentes alterações na estrutura do próprio alimento (CAMPBELL-PATT, 1994).

A humanidade faz uso desse tipo de processo há muitos milhares de anos, provavelmente desde o Neolítico (10 a 5 mil anos A.C.), e a sua manutenção sempre esteve intimamente ligada com a cultura e as matérias primas disponíveis de cada região. Na Europa e no Oriente Médio, onde o pastoreio era mais presente, os queijos e os iogurtes se consolidaram cedo; no sudeste asiático, com mais terreno montanhoso e litorâneo, prevaleceram os produtos fermentados de soja, arroz e peixes; na África fermentaram-se as espécies endêmicas de cereais e raízes, principalmente a mandioca, enquanto nas Américas o milho e o cacau foram exemplos de vegetais que assumiram essa posição (KATZ, 2012; TAMANG *et al.*, 2019).

A fermentação sempre andou lado a lado com a cultura dos povos, moldando-se às particularidades de cada etnia e, naturalmente, alterando a maneira como essa técnica era manipulada. Inicialmente, o processo mais comum de fermentação era por vias espontâneas, onde os microrganismos do próprio alimento e do ambiente iniciariam as transformações bioquímicas, sem controle rigoroso do processo e com uma complexidade microbiológica enorme (TAMANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021). Curiosamente, o termo “fermentar” vem do latim “fervere”, onde o alimento “fervia sem calor”, ou seja, apresentava bolhas como resultado da produção de gases do processo (WHITTINGTON. DAGHER; BRUNO-BÁRCENA, 2019).

Durante séculos os povos foram se familiarizando com a técnica e, após muita tentativa e erro, a técnica de *backslopping* foi desenvolvida para dar início às primeiras “culturas” de microrganismos, ou seja, as primeiras misturas com complexidade microbiológica minimamente estável e que poderia gerar um produto final com algumas características já conhecidas. Essa técnica consiste em iniciar uma nova fermentação, em substrato fresco, a partir de uma alíquota de material previamente fermentado com sucesso (KIM *et al.*, 2018). Essa

prática começou a perder força após o desenvolvimento da pasteurização no século XIX, o que aumentou a expectativa de vida humana mas também criou uma interpretação “germofóbica” do universo microbiano, nutrindo uma “fascinação social por esterilização de alimentos” que sobrevive até hoje, como apontam Whittington, Dagher & Bruno-Bárcena (2019).

Os pesquisadores do último século esforçaram-se em isolar as bactérias, fungos e leveduras, chamando os isolados de “*starters*” (do inglês, “iniciadores”), sob as justificativas de maior segurança alimentar e otimização dos escalonamentos industriais, uma vez que se estaria lidando com apenas pouquíssimas cepas de microrganismos, com funcionamento mais conhecido do que uma mistura complexa desses (LARANJO; POTES; ELIAS, 2019; GARCIA-DIEZ; SARAIVA, 2021).

De fato, o uso de culturas *starters* traz benefícios à produção de alimentos, mas também deixa de aproveitar os potenciais simbióticos e/ou sinérgicos entre diferentes gêneros microbianos. As relações positivas entre seres vivos são documentadas há muito tempo e as relações cooperativas também estão presentes nos ecossistemas do universo microbiológico (FURUKAWA *et al.*, 2013; TANGYU *et al.*, 2019; TAMANG *et al.*, 2020).

Uma das relações simbióticas que vem chamando atenção na esfera da fermentação de alimentos, é a cooperação entre leveduras, bactérias ácido lácticas (BAL) e bactérias ácido acéticas (BAA) em culturas mistas. As primeiras usam a fermentação alcoólica para produzir etanol e gás carbônico, sendo utilizadas na produção de pães e cervejas (HUTKINS, 2019); as segundas usam a fermentação láctica para produzir o ácido láctico que é capaz de trazer mudanças sensoriais desejadas em leites e carnes (GRUJOVIC *et al.*, 2021); e as terceiras dão início à fermentação acética, oxidando etanol e produzindo ácido acético, sendo útil na produção de chocolates e de vinagre (LYNCH *et al.*, 2019).

De-Vuyst & Leroy (2020) apresentam uma extensa visão global do estado da arte para a fermentação de grãos de cacau desde os anos 2000 a 2020 e apontam que as fermentações sucessivas de leveduras, BAL e BAA são cruciais para a cura correta dos grãos. Sintetizando, as leveduras e as BAL inicialmente fermentam a glicose presente nas polpas e produzem, respectivamente, etanol e lactato que, por sua vez, são indispensáveis para o funcionamento das BAA e sua produção de ácido acético. Tudo isso acontece de maneira simultânea com reações de quebra de pectina e produção de açúcares e outros ácidos orgânicos que culminam em um perfil específico de sabor e aroma necessários para o processamento de chocolate.

De maneira semelhante, alguns trabalhos já apontam essas cooperações acontecendo em bebidas fermentadas por associados de fungos e bactérias, chamados de kefir e kombucha,

adicionados de cepas de BAA ou BAL, ainda que os mecanismos bioquímicos não estejam completamente elucidados.

Yang *et al.* (2008) isolaram a cepa *Gluconacetobacter* spp A4 a partir de kombucha e suplementaram sua cultura com cepas de BAL (*Lactobacillus* spp, *Lactococcus latis* e *Leuconostoc* spp.) para investigar alterações nas produções de ácidos orgânicos. Os autores concluíram que há simbiose entre as cepas investigadas, uma vez que a suplementação aumentou a produção do ácido funcional DSL (ácido D-sacárico-1,4-lactona), provavelmente por que as BAL, ao consumir glicose, produziram xilose e ácido acético que servem de substrato para as BAA.

Leite *et al.* (2013), em revisão, discorrem sobre as interações entre os microrganismos do kefir e levantam indícios de que o crescimento das bactérias e leveduras associadas não ocorre de maneira eficiente quando separadas, além de que a secreção de vitaminas do complexo B por parte das *Acetobacter* spp. (BAA) colabora com o desenvolvimento das BAL.

Ozdemir *et al.* (2015) suplementaram grãos de kefir de leite com cepas de BAA (*Gluconacetobacter* spp.) e perceberam que o crescimento da biomassa dos grãos foi maior quando comparado aos grãos não suplementados, além de produzir uma bebida com melhor aceitação sensorial quanto à sabor e textura, sem perdas nas pontuações para aroma.

Nguyen *et al.* (2015a) suplementaram kombucha com cepas de BAL (*Lactobacillus* spp.) isoladas de conserva de pickles, de kombucha e de kefir de leite e descobriram que as bebidas que receberam as cepas provenientes de kefir produziram quase 40% mais de ácido glucurônico, um ácido funcional, após 5 dias de fermentação.

### 3.3 Kefir

O kefir é uma bebida fermentada originada provavelmente na região do Cáucaso, no limite entre o sudeste europeu e a Ásia, e o seu nome vem do turco “*keyif*” que é o equivalente a “sentir-se bem” em português. Essa associação do nome ao bem-estar dá-se pelas características sensoriais da bebida, sendo levemente ácida e gaseificada, podendo ser percebida como refrescante (LEITE *et al.*, 2013). Por vezes sendo chamada até de “champagne de leite”, a bebida era considerada medicinal pelos povos originários da região (ROSELL, 1932).

A bebida é tradicionalmente feita a partir de leite animal e se utilizam grãos de kefir como cultura *starter* mista. Os grãos, que vão de 0,5 a 3,5 cm, são compostos de inúmeras espécies de leveduras e bactérias, podendo chegar a mais de 50, unidos por uma matriz de polissacarídeos produzida pela própria associação de microrganismos (EGEA *et al.*, 2020).

Essa associação, ou consórcio, também pode ser chamada pela sigla em inglês, SCOBY, que significa “cultura simbiótica de leveduras e bactérias” (“*symbiotic culture of bacteria and yeasts*”).

A maior parte das cepas do SCOBY de kefir são bactérias ácido láticas, mas também há uma porcentagem de bactérias ácido acéticas e de leveduras. É difícil mensurar com exatidão o quanto há de cada gênero no consórcio, uma vez que as condições geográficas e de cultivo (temperatura, tipo de leite, proporções e tempos de fermentação) podem alterar muito as dinâmicas do ecossistema microbiológico dos grãos (NEJATI; JUNNE; NEUBAUER, 2020).

A produção da bebida é bastante simples e, também por isso, tem ganhado popularidade em cenários domésticos. O processo tradicional consiste em adicionar 10% dos grãos ao meio de fermentação (p/v), agitar e deixar em repouso durante 24 horas em temperatura ambiente (ou 25 °C). Após esse tempo, a bebida é filtrada para a retirada dos grãos e está pronta para o consumo (EGEA *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, se utiliza leite animal como meio de fermentação, contudo, já existem muitos trabalhos científicos que aplicam o SCOBY de kefir em diversos substratos. Água com açúcar é o substrato mais utilizado além do leite e os grãos facilmente se adaptam nesse meio, sendo conhecidos como “kefir de água” (FIORDA *et al.*, 2017). Substratos vegetais tem ganhado muita atenção nos últimos anos, especialmente com o crescimento da dieta *plant-based*, e muitos resultam em produtos com boas funcionalidade e aceitação, como é o caso de trabalhos com extratos de manga e umbu (TAVARES *et al.*, 2021), soja e amêndoa (ATIK *et al.*, 2021), coco e inulina (ALVES *et al.*, 2021), oliva russa (DARVISHZADEH; ORSAT; MARTINEZ, 2021), entre outros.

Há também registros de benefícios à saúde associados ao consumo de kefir, principalmente pela alta concentração de bactérias ácido láticas. Em revisão, Fiorda *et al.* (2017) levantam uma série de artigos científicos que sugerem atividades antiedematogênicas, anti-inflamatórias, antiulcerogênicas, antioxidantes, cicatrizantes e antimicrobianas para bebidas feitas com kefir de água. Os autores comentam também que muitas espécies de BAL isoladas a partir de grãos de kefir exibiram ausência de patogenicidade, resistência às condições gastrointestinais, capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal e capacidade de eliminar competitivamente patógenos, portanto, tornando-se altamente adequadas para atuação probiótica.

Castellone *et al.* (2021), em um estudo direcionado à saudabilidade de alimentos fermentados por bactérias ácido láticas, apontam mais efeitos benéficos do consumo de kefir, inclusive salientando a sua influência no eixo intestino-cérebro. Os pesquisadores relatam que

ao substituir e reduzir a microflora intestinal prejudicial, as BALs modulam o sistema imune e amenizam sintomas de depressão, ansiedade, estresse e transtornos do sono. Valcarce *et al.* (2020) ao tratar *zebrafish* com *Lactobacillus ramosus*, uma espécie de BAL já descrita em grãos de kefir, encontrou alterações de comportamento do animal, sugerindo ação ansiolítica influenciada pela ação probiótica.

No Brasil, a regulamentação de bebidas fermentadas com kefir fica sob legislação da Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007). Nessa IN, ficam definidos valores de lipídios, acidez, etanol e contagem de bactérias para as bebidas da categoria, contudo, a norma apenas abrange bebidas lácteas fermentadas, sendo inexistente uma legislação que abarque bebidas vegetais fermentadas por kefir.

### 3.4 Kombucha

A kombucha é uma bebida fermentada a partir do chá de *Camellia sinensis*. Sua provável origem remonta ao século 200 A.C., no leste asiático, mais especificamente na região da Manchúria (China). A história conta que seu nome tem relação com um médico da época, chamado Kombu, que teria tratado um imperador chinês com o chá fermentado e, a partir daí a bebida se popularizou e foi difundida para os países vizinhos (COELHO *et al.*, 2020).

A bebida é tradicionalmente feita de chá verde ou chá preto (*C. sinensis*) adoçados e a cultura *starter* apresenta-se na forma de um biofilme que é produzido durante as fermentações por bactérias sintetizadoras de celulose. Esse biofilme também é um tipo consórcio de bactérias e leveduras, um SCOBY, mas as predominâncias dos microorganismos acontece de maneira diferente em comparação com os grãos de kefir. Na kombucha, a majoritariedade do ecossistema microbiológico é representada pelas bactérias ácido acéticas, chegando a 85% unicamente do gênero *Gluconacetobacter*, seguidas pelas leveduras e, por fim, pelas bactérias ácido láticas (WATAWANA *et al.*, 2016; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Para a produção da bebida, adiciona-se de 1 a 20% de açúcar em chá verde ou preto, além de 0,25 a 10% de SCOBY e 3 a 30% de bebida fermentada previamente, como na técnica de *backslopping*. A fermentação deve acontecer durante 7 a 14 dias, em uma temperatura próxima dos 25 °C. Após essa primeira fermentação, é possível adicionar um líquido saborizante e conduzir mais uma fermentação de 24 horas, em recipiente fechado, para maior gaseificação. Assim, a bebida pode tornar-se bastante efervescente e usufruir de uma vasta gama de sabores, atraindo os consumidores (COELHO *et al.*, 2020; MIRANDA *et al.*, 2021).

A oportunidade de adicionar outros produtos em uma segunda etapa fermentativa, abre espaço para um aprimoramento das qualidades nutricionais, funcionais e sensoriais da bebida. Miranda *et al.* (2021) relatam trabalhos que adicionaram infusões de outras ervas, flores, café, eucalipto, sucos de fruta, produtos de soja e até leite bovino na segunda etapa de fermentação. Ainda, outros trabalhos substituíram parte do chá da primeira etapa por sucos de uva (AYED; BEN-ABID; HAMDI, 2016) e de palma-forrageira (AYED & HAMDI, 2015) e conseguiram altos níveis de aceitação e atividade antioxidante nas bebidas. Leonarski *et al.* (2021) também trabalharam com substratos alternativos para a kombucha, dessa vez suplementando a fermentação tradicional com extratos de co-produtos de acerola para aumentar a concentração de vitamina C na bebida final.

Segundo Vargas, Fabricio e Ayub (2021), os benefícios à saúde associados ao consumo de kombucha são vários, verificados por metodologias *in vitro* (ação anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, antibacteriana e anticarcinogênica) e *in vivo* (ação anti-hiperglicêmica, neuroprotetora, imunomoduladora, antiviral, hepatoprotetora, anti-inflamatória e radioprotetora). Os pesquisadores informam que, diferentemente das ações probióticas bem documentadas das BAL, os efeitos biológicos da kombucha estão mais associados aos metabólitos secretados pelas BAA do que pela sua ação probiótica em si.

Os três principais ácidos funcionais associados à kombucha são o ácido glucônico, o DSL (ácido D-sacárico-1,4-lactona) e o ácido glucurônico (YANG *et al.*, 2008; COELHO *et al.* 2020). Este último é produzido pelo fígado humano e é conhecido como uma das substâncias naturais com maior poder desintoxicante, uma vez que é capaz de se ligar às toxinas, tornando-as mais hidrossolúveis e mais fáceis de eliminar pela urina (MARTINEZ-LEAL; PONCE-GARCIA; ESCALANTE-ABURTO, 2020).

No Brasil, a produção de bebidas fermentadas de kombucha é regulamentada pela Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 (BRASIL, 2019). A legislação define a bebida como uma infusão de *C. sinensis* fermentada por SCOBYs, aeróbica e anaerobicamente. O documento ainda prevê a gaseificação, até 0,05% de teor alcoólico e saborização da bebida. Nesse último item, dado como “ingredientes opcionais”, estão previstas infusões extras com outras espécies vegetais, frutas, especiarias, mel, melado e quaisquer novos ingredientes aprovados pela ANVISA.



### 3.5 Bebida de amêndoas de castanha de caju

O gênero botânico *Anacardium* tem mais de 400 espécies descritas, todas endêmicas no Brasil, mas o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é a única espécie com importância comercial, inclusive com relevância mundial. Embora nativa da América do Sul, a espécie foi levada a países da África e Ásia por exploradores europeus no século XVI, onde se adaptaram bem e hoje chegam a ter protagonismo econômico (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A cajucultura é uma das atividades socioeconômicas mais importantes para a região Nordeste do Brasil. Em 2015, 99,4% da área ocupada por cajueiros no Brasil concentrava-se no Nordeste e, desse montante, 62,9% ficava no Ceará (VIDAL, 2016). Os principais produtos extraídos dessa espécie são o pedúnculo da fruta, a amêndoa da castanha de caju (ACC) e o líquido da castanha de caju (LCC). A amêndoa, em especial, tem boa parte da sua produção voltada para consumo interno. Embora o Brasil esteja a entre as nações que tem maior área de cultivo e que mais produzem a ACC no mundo, aproximadamente 85% desse volume é destinado à importação (ALENCAR; ESPÍNDOLA; CARNEIRO, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Trabalhos científicos descrevem a ACC como uma boa fonte de nutrientes. Já foram relatadas composições de até 23% de proteínas, com quantidades significantes de todos os aminoácidos essenciais, 44% de ácidos graxos essenciais, 82% de gorduras insaturadas e boas concentrações de cálcio, potássio e ferro (SHORI *et al.*, 2022). Devido ao seu perfil de lipídios, a ACC é considerada como “saudável ao coração” por ter efeitos positivos na pressão arterial e por ajudar a controlar os níveis de colesterol sanguíneo (MATTISON *et al.*, 2020).

Relembrando dos conceitos propostos por Aschemann-Witzel *et al.* (2020) e Asioli *et al.* (2017) para alimentos *clean label*, nota-se que a ACC tem um enorme potencial de atuação no mercado *plant-based*: se a matéria prima provém de uma fonte natural e familiar ao consumidor, a aquisição do produto se torna mais provável.

Os produtos vegetais à base de ACC tem se tornado populares e já ganham competitividade no mercado (OYEYINKA; ODUKOYA; ADEBAYO, 2019; AYDAR; TUTUNCU; OZCELIK, 2020; SHORT; KINCHLA; NOLDEN, 2021). Os produtos desenvolvidos também já começam a abranger a esfera da fermentação, especialmente no ramo dos iogurtes, e alguns trabalhos sugerem a ACC como boa matriz para manutenção de probióticos (TANGYU *et al.*, 2019; AYDAR; TUTUNCU; OZCELIK, 2020; SHORI *et al.*, 2022).

Bruno *et al.* (2019), pesquisadores da EMBRAPA Agroindústria Tropical, submeteram uma bebida de castanha de caju a testes com probióticos e descobriram que o produto foi capaz de manter a atividade funcional dos microorganismos durante 30 dias sob refrigeração, indicando esse insumo como boa matriz de manutenção microbiológica. Os autores ainda apontam que é possível obter uma bebida probiótica de castanha de caju sem perda significativa na cor e com boa aceitação sensorial.

A base de dados virtual do Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) disponibiliza a listagem de patentes reconhecidas no Brasil. Quando se pesquisa por “castanha de caju” nos títulos das patentes registradas no INPI, encontram-se 82 resultados. Destes, quatro pedidos são referentes a bebidas feitas com essa matéria prima (BR 10 2013 001906 2 A2, BR 10 2013 003267 0 A2, BR 10 2014 023573 6 A2, BR 10 2018 007898 4 A2), mas todos são apenas extratos hidrossolúveis deste insumo adicionados ou não de outros ingredientes, ou seja, sem fazer uso da fermentação como etapa de processamento. Existe ainda a patente de número BR 10 2020 004172 0 A2 que descreve um produto tipo “iogurte”, onde a fermentação é etapa inerente desse tipo de alimento, mas o processo descrito aponta para uma fermentação em leite bovino e apenas uma suplementação posterior do produto com extrato em pó de castanha de caju.

Ao pesquisar por patentes com “kefir” no título, encontram-se 21 delas das quais apenas uma propõe desenvolver uma bebida vegetal fermentada (pedido número BR 10 2020 014285 2 A2), mas utiliza inhame como insumo-base. Em relação às patentes com “kombucha” no título, são encontrados apenas dois registros que não intentam desenvolver bebidas ou sequer envolvem amêndoas de castanha de caju.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

No presente tópico, serão descritos todos os métodos utilizados durante a pesquisa para o estudo cinético desde o preparo da bebida às análises toxicológicas.

### **4.1 Matéria prima e reagentes químicos**

As amêndoas de castanha de caju secas e cruas foram doadas pela unidade Agroindústria Tropical da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sediada em Fortaleza, Ceará, em setembro de 2021. As culturas de microrganismos utilizadas neste trabalho (kefir de

água e kombucha) também foram adquiridas por meio de doações de usuários locais que as mantinham para uso doméstico e pessoal (Fortaleza, Ceará).

Todos os reagentes sólidos de grau P.A. utilizados foram da marca Dinâmica©. Todos padrões de HPLC utilizados foram da marca Sigma-Aldrich©. O metanol utilizado foi da marca Merck© e a acetonitrila da marca JT Baker ©.

As amostras foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob número de acesso AA72205, por meio da Universidade Federal do Ceará. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), sob protocolo nº 1806202101.

#### **4.2 Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com parcelas subdivididas (“*split plot*”), compreendendo dois lotes de extrato hidrossolúvel pasteurizado de amêndoas de castanha de caju (apenas “extrato”, “bebida de castanha de caju” ou “leite de castanha”, “LC”) e três replicatas de cada amostra. O estudo cinético de cada amostra foi feito em 8 tempos de análise em intervalos crescentes (0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 horas).

As amostras produzidas foram diferenciadas e identificadas de acordo com o inóculo que receberam, sendo produzidos três tipos de amostras: a primeira amostra que recebeu apenas kefir (amostra LC-F), a segunda que recebeu apenas kombucha (LC-B) e a terceira que recebeu 50% de kefir e 50% de kombucha (amostra LC-FB).

Assim, para cada lote foram produzidas e analisadas 72 repetições, considerando 3 amostras em triplicata para cada tempo de fermentação.

#### **4.3 Preparo do extrato hidrossolúvel pasteurizado de amêndoas de castanha de caju**

As castanhas de caju secas e cruas foram selecionadas manualmente para remoção de possíveis cascas aderidas e, em seguida, foram lavadas exaustivamente em água corrente para remoção de impurezas.

Para a produção do extrato hidrossolúvel pasteurizado (LC) utilizou-se uma metodologia adaptada a partir do comunicado técnico número 232 de 2017 da EMBRAPA Agroindústria Tropical (LIMA *et al.*, 2017). As amêndoas lavadas e selecionadas foram

trituras com água potável na proporção de 1:10 (p/v) em processador Philco PMP 1600 na potência máxima durante 3 minutos. O líquido foi pasteurizado pelo método de longo tempo e baixa temperatura (HTLT) em fogão e panela de fundo triplo, sob agitação e utilizando termômetro culinário de imersão para garantir que o centro geométrico deste permanecesse a 63 °C durante 30 minutos.

Por fim, frascos de vidro esterilizados por fervura durante 15 minutos receberam 100 mL do extrato finalizado (LC) e foram acondicionados em refrigerador por no máximo 12h antes de receber os inóculos para fermentação.

#### **4.4 Preparo e aplicação dos inóculos**

Os SCOBYs doados foram submetidos a repetidos ciclos de fermentação para aclimatação das colônias. Para o kefir, foram feitos 5 ciclos fermentativos em água potável com 10% de açúcar mascavo e 10% de grãos de kefir de água, conduzindo cada ciclo em temperatura ambiente durante 24 horas. Para a kombucha, a fermentação aconteceu em chá verde preparado com água potável fervente e 7g de *Camellia sinensis* infundada durante 2 minutos e, após filtrado e em temperatura ambiente, o chá recebeu 10% de açúcar mascavo, 15% de kombucha do líquido-matriz. Na kombucha, foram conduzidos três ciclos de 7 dias em temperatura ambiente. No início de cada ciclo, foram utilizados grãos ou líquido-matriz do ciclo anterior, semelhante à técnica de *blackslopping* (LAUREYS & de VUYST, 2014; KIM *et al.*, 2018).

Para a inoculação dos microorganismos na bebida de amêndoas de castanha de caju, conduziu-se um novo ciclo para cada fermentação, com a diferença de que na kombucha o ciclo foi de apenas 72 horas. Antes da inoculação, cada meio fermentado foi agitado mecanicamente durante 30 segundos para remoção de parte do gás dissolvido e para ressuspensão dos teores decantados, além de também terem sido filtrados para remoção dos SCOBYs.

Cada frasco com 100 mL de LC recebeu 10% de inóculo: 24 replicatas da amostra LC-F receberam 10 mL de kefir cada, as outras 24 replicatas de LC-B receberam a mesma quantidade de kombucha e, por fim, cada replicata de LC-FB recebeu 5 mL de kefir e 5 mL de kombucha. Cada grupo de 24 replicatas foi dividido em 8 tempos, deixando 3 replicatas para análise em cada tempo. Cada frasco foi fechado com um tecido respirável a fim de permitir as trocas gasosas durante a fermentação e impedir a contaminação com material exterior. Todas as amostras foram incubadas em BOD (Tecnal, TE371) 28 °C.

#### 4.5 Análises físico-químicas

Todas as amostras em todos os tempos de fermentação foram submetidas a análises de pH, acidez titulável e sólidos solúveis. Todas as metodologias foram realizadas segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008).

O pH foi quantificado por método eletrométrico em pHmetro digital (Kasvi, K39), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, onde os valores foram expressos em unidade de pH. A acidez titulável total (ATT) foi medida por neutralização da amostra com solução de NaOH 0,1M padronizado com biftalato de potássio e titulado em bureta de vidro, expressando o resultado em solução molar por cento. Para a medição dos sólidos solúveis totais (SST), as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 25 °C (Hettich Zentrifugen, Rotina 420) e três gotas do sobrenadante foram diretamente postas sob o prisma de refratômetro eletrônico (Milwaukee, MA871) para leitura do teor de sólidos solúveis.

#### 4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram injetadas em equipamento de CLAE (Shimadzu) alíquotas de 100 µL dos tempos 0, 24, 48 e 72h de todas as três amostras para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos dissolvidos. Todas as amostras foram filtradas em filtros de PVDF nos poros de 0,45 e 0,22 µm antes da injeção. Todas as fases móveis passaram por filtro de acetato de celulose de 0,22 µm. Todas as quantificações foram feitas baseadas em curvas-padrão delineadas previamente para cada substância. Em todas as análises, o forno da coluna permaneceu a 40 °C e o *loop* de injeção era de 20 µL. Todos os padrões foram avaliados quanto aos limites de detecção e de quantificação do equipamento. Demais especificidades de cada procedimento serão descritas a seguir.

##### 4.6.1 Determinação de açúcares

Foi acoplado ao cromatógrafo um detector de índice de refração por infravermelho (RID-10A) e coluna Kromasil® NH2 4,6 x 150 mm, com partícula de 5 µm. A coluna foi equilibrada com uma solução de 85% de acetonitrila e 15% de água ultra pura (MilliQ®), que também atuou como fase móvel da análise. Cada análise foi realizada com tempo de corrida de 20 minutos e a vazão de 1 mL/min. Foram determinados os perfis de sacarose, glicose, frutose e rafinose em todas as amostras.

#### **4.6.2 Determinação de ácidos orgânicos**

Foi acoplado ao cromatógrafo um detector UV-Vis a 214nm (SPD-M10AVP) e coluna LiChrospher® 100 RP-18 4,6 x 250mm, com partículas de 5µm. A solução de equilíbrio da coluna e de corrida da análise foi o tampão de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,2 M com pH corrigido para 2,4. O tempo de análise foi de 15 minutos e a vazão foi de 0,8 mL/min. Foram determinados os perfis de ácido acético, ácido lático, ácido cítrico e ácido D-glucurônico.

#### **4.7 Análises toxicológicas**

Para as análises de toxicidade, foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio*, chamados de “zebrafish” ou “paulistinha”. Todos os animais eram selvagens, de ambos os sexos, com idade entre 60 e 90 dias, tamanhos de 3,5 ± 0,5 centímetros e peso 0,4 ± 0,1 gramas, fornecidos pela Agroquímica Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Fortaleza, Ceará).

Todos os animais foram aclimatados por 24 horas em aquários de vidro (40x20x25 cm), com água desclorada (anticloro *ProtecPlus*®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7,0, com ciclo circadiano de 14:10 horas de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*®) *ad libitum* 24 horas antes dos experimentos. Após as análises, os animais foram eutanasiados por imersão em água gelada (2-4 °C), até perda de mobilidade opercular (CONCEA, 2018).

As três amostras (LC-F, LC-B e LC-FB) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas foram submetidas aos testes toxicológicos, estas sendo aplicadas de maneira integral. Para o tratamento dos peixes, os indivíduos foram selecionados aleatoriamente, imobilizados em esponja úmida e receberam, via oral, 20 µL de cada formulação ou veículo (água destilada) com o auxílio de uma pipeta automática regulável equipada de ponteira estéril. As etapas seguintes das análises variaram de acordo com as descrições a seguir.

##### **4.7.1 Atividade locomotora**

As amostras foram submetidas ao teste de atividade locomotora, ou teste de campo aberto, para verificar a alteração da coordenação motora dos animais (AHMAD & RICHARDSON, 2013), utilizando grupos de 06 animais. Após a administração oral das alíquotas, cada indivíduo foi posto separadamente em béquer de vidro com água do aquário e

aguardou-se 1 hora. Dado o tempo de espera, os animais e a água em que estavam foram transferidos para placas de Petri de vidro (100 x 20 mm) marcadas em quatro quadrantes. Durante 5 minutos, contou-se quantas vezes cada peixe efetuava um cruzamento de linha (CL), avaliando, assim, a atividade locomotora destes. Um grupo de animais não recebeu tratamento e funcionou como grupo-controle (*naive*) do campo aberto, tomando-se valor de CL desse grupo como referência a 100% de atividade locomotora.

#### **4.7.2 Toxicidade aguda**

As mesmas amostras analisadas no campo aberto foram submetidas à análise de toxicidade aguda para verificar a taxa de morte dos animais ao ingerir as bebidas fermentadas (MAGALHÃES *et al.*, 2017). Grupos de 06 indivíduos receberam as amostras via oral e foram mantidos juntos em aquário exclusivo durante 96 horas. A cada 24 horas, a água do aquário foi parcialmente trocada e os animais receberam ração *ad libitum*. Um grupo recebeu apenas água destilada e foi considerado como grupo-controle. Ao final do tempo previsto, foi contabilizado o número de animais mortos em cada grupo e determinadas as amostras letais, com capacidade de matar pelo menos 50% dos animais (CL<sub>50</sub>), por meio do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

#### **4.8 Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 3.6.1) utilizando recursos próprios do software e do pacote estatístico ExpDes.pt (versão 1.2.0). Os dados coletados foram submetidos a Análise de Interação entre tratamentos e tempos e, quando convenientes, foram realizados Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e análise de regressão.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Nesta sessão serão apresentados os resultados do estudo cinético da fermentação da bebida de amêndoas de castanha de caju, sempre em discussão com literaturas internacionais.

## 5.1 Análises físico-químicas

Nas legislações brasileiras para kefir (BRASIL, 2007) e para kombucha (BRASIL, 2019), alguns parâmetros físico-químicos são exigidos e, desses, apenas pH e acidez foram abordados no estudo cinético. Somente a legislação de kombucha define um intervalo para pH, sendo de 2,5 a 4,2. Em relação a acidez, a Instrução Normativa para kombucha se limita a valores de acidez volátil, que não foi objeto de estudo neste trabalho, enquanto a Instrução para kefir exige valores em gramas de ácido láctico para cada 100 gramas de amostra.

Para o cálculo da acidez durante a condução do estudo cinético, optou-se pelo uso de metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008) que gera valores na unidade “acidez em solução molar por cento”, ou seja, sem cálculo baseado na molaridade de ácidos específicos. Essa fórmula foi mais adequada ao trabalho por dois motivos: primeiro, para centralizar os resultados em uma única unidade, sabendo que kombucha e kefir apresentam diferentes majoritiedades de ácidos orgânicos como reflexo das suas dinâmicas microbiológicas distintas; segundo, notou-se que as concentrações de ácidos mudam de predominância com o tempo de fermentação, aumentando a complexidade das misturas de ácidos orgânicos nas bebidas (este tópico será melhor abordado no item 5.2.2.2). Assim, apenas os valores de pH obtidos neste trabalho poderiam ser discutidos à luz da legislação nacional.

A Tabela 01 apresenta todos os valores obtidos para pH, sólidos solúveis totais e acidez titulável total das três amostras (LC-F, LC-FB, LC-B) nos oito tempos de análise (0, 4, 8, 12, 24, 26, 48, 72 horas). Houve interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações e os tempos de fermentação para todas as análises conduzidas, portanto, esses parâmetros também foram submetidos a análises de regressão (APÊNDICE A). Todos os valores de pH foram dispersos na Figura 01 para melhor visualização das diferenças entre cada amostra.

Os valores de pH durante as 72 horas de experimento variaram entre 6,20 a 3,90 para a amostra LC-F, 6,26 a 3,96 para a amostra LC-FB e 6,33 a 4,75 para a amostra LC-B. O pH do alimento é considerado um indicador de segurança alimentar. Um pH dentro da faixa de acidez, menor que 4,5, inibe o crescimento dos principais microrganismos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (SILVA *et al.*, 2018). Por isso, ainda que não seja análise obrigatória em todas as legislações, ele é uma variável importante para a qualidade do produto.



Tabela 01 – Caracterização físico-química dos produtos fermentados, quanto à pH, sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável total (ATT).

TEMPO (horas)	AMOSTRA	AVALIAÇÕES		
		pH*	SST (°BRIX)*	ATT (g/100 mL)*
0	LC-F	6,20 <sup>b</sup>	2,13 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>
	LC-FB	6,26 <sup>ab</sup>	2,15 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>
	LC-B	6,33 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>
4	LC-F	6,11 <sup>b</sup>	1,93 <sup>b</sup>	0,13 <sup>a</sup>
	LC-FB	6,16 <sup>ab</sup>	2,08 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>
	LC-B	6,22 <sup>a</sup>	2,31 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>
8	LC-F	5,89 <sup>c</sup>	1,98 <sup>c</sup>	0,19 <sup>a</sup>
	LC-FB	6,00 <sup>b</sup>	2,26 <sup>b</sup>	0,18 <sup>a</sup>
	LC-B	6,20 <sup>a</sup>	2,43 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>
12	LC-F	5,58 <sup>c</sup>	1,63 <sup>c</sup>	0,29 <sup>a</sup>
	LC-FB	5,75 <sup>b</sup>	1,95 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>
	LC-B	6,19 <sup>a</sup>	2,16 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>
24	LC-F	4,91 <sup>c</sup>	1,18 <sup>c</sup>	4,45 <sup>a</sup>
	LC-FB	5,06 <sup>b</sup>	1,38 <sup>b</sup>	4,41 <sup>a</sup>
	LC-B	5,92 <sup>a</sup>	2,43 <sup>a</sup>	1,69 <sup>b</sup>
36	LC-F	4,15 <sup>b</sup>	1,08 <sup>b</sup>	7,03 <sup>a</sup>
	LC-FB	4,23 <sup>b</sup>	1,13 <sup>b</sup>	6,37 <sup>b</sup>
	LC-B	5,65 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup>	2,96 <sup>c</sup>
48	LC-F	4,01 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>	9,23 <sup>a</sup>
	LC-FB	4,01 <sup>b</sup>	1,08 <sup>b</sup>	9,76 <sup>b</sup>
	LC-B	5,41 <sup>a</sup>	1,93 <sup>a</sup>	4,28 <sup>c</sup>
72	LC-F	3,90 <sup>b</sup>	0,96 <sup>b</sup>	12,61 <sup>a</sup>
	LC-FB	3,96 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>	11,71 <sup>b</sup>
	LC-B	4,75 <sup>a</sup>	1,56 <sup>a</sup>	5,27 <sup>c</sup>

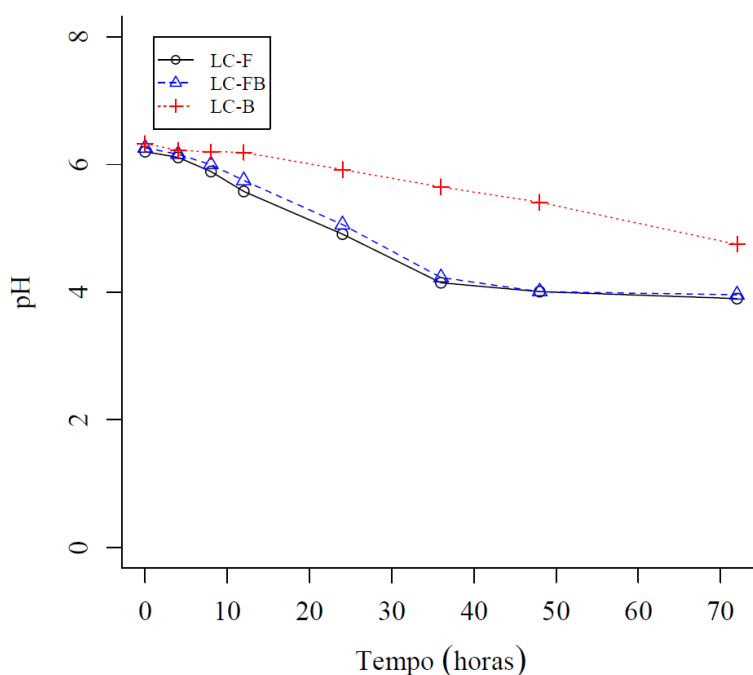
As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ), para as diferentes amostras de um mesmo tempo. Coluna indicada por asterisco (\*) apresenta interação entre amostra e tempo, sendo submetida ao teste de regressão: os efeitos simples das médias são significativamente diferentes entre si a 5% de significância entre amostras iguais em diferentes tempos.

Assim, tanto a amostra LC-F quanto a amostra LC-FB estariam dentro da faixa segura de acidez para alimentos a partir das 36 horas de fermentação, com pH de 4,15 e 4,23 respectivamente. Já a amostra LC-B teve seu menor pH no tempo máximo do experimento, atingindo 4,75 na escala de acidez, sendo um valor ainda alto e apontando a necessidade de maior tempo para atingir a faixa de segurança contra patógenos. De maneira análoga, apenas a amostra LC-FB, dentre as formulações com kombucha, estariam de acordo com os limites exigidos na Instrução Normativa para bebidas fermentadas com o referido SCOBY (BRASIL, 2019).

Os pHs dos últimos dois tempos de LC-F e LC-FB, entre 4,01 e 3,90, estão próximos dos valores encontrados por Shori *et al.* (2022) na produção de iogurte de ACC. Os autores fermentaram extrato hidrossolúvel da amêndoa (“leite de castanha”) com cepas isoladas de BALs a 42 °C durante 3h e atingiram um produto com pH na faixa de 4,06, mantendo-se com pouca variação após refrigeração e armazenamento por 21 dias.

Ao analisar a Figura 01, é possível perceber um comportamento semelhante entre os decréscimos de pH para as amostras com kefir, LC-F e LC-FB. O teste de médias de Tukey indica também que essas mesmas amostras não diferiram nos valores de acidez entre 0 e 8h de fermentação, sendo que o pH de LC-F caiu mais velozmente entre 12 e 24 horas, mas foi equiparado novamente por LC-FB das 36 horas em diante.

Figura 01 - Variação dos valores de pH para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C.



LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.

A acidificação mais veloz do kefir em relação à kombucha é algo facilmente verificável na literatura científica. Os processos tradicionais de fermentação já evidenciam a velocidade com que as reações acontecem, sendo um tempo médio de 24 horas para o kefir e até 15 dias para a kombucha (VILLARREAL-SOTO, *et al.* 2018; EGEA *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2020). Estudos como o de Costa *et al.* (2018) também ilustram esse processo ao demonstrar

que uma bebida vegetal fermentada com kefir pode ter redução de mais de 1,8 pontos de pH rapidamente, reduzindo de 6 para abaixo de 4,5 em 24 horas, a depender do substrato utilizado. Em paralelo, Amarasinghe, Weerakkody e Waisundara (2017) apontam um decréscimo de apenas 0,5 no pH de bebidas fermentadas com kombucha nas primeiras 24 horas, podendo variar de acordo com o chá utilizado.

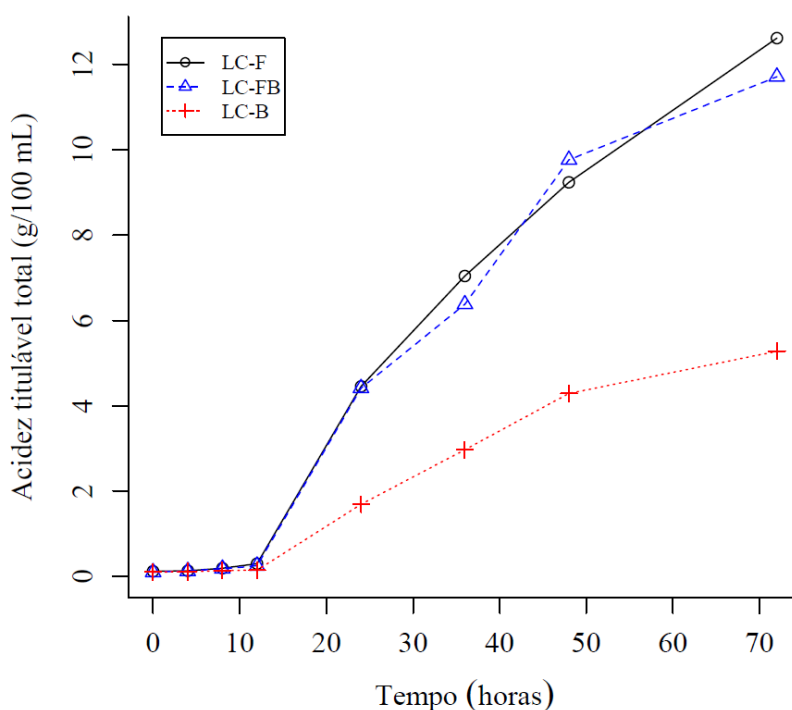
A Figura 02 aponta graficamente as variações nos valores de acidez titulável total. Novamente, é possível perceber um comportamento semelhante entre LC-F e LC-FB, destoando nitidamente da curva de LC-B. Esse desempenho dá suporte aos valores encontrados de pH, uma vez que o aumento da concentração de ácidos orgânicos no meio é consequência inerente do processo fermentativo, aumentando os valores de ATT ao mesmo tempo que reduz o pH das formulações (PAREDES; ESCUDERO-GILETE; VICARIO, 2022).

Enquanto o pH tem maior influência no desenvolvimento de microrganismos, a acidez titulável tem maior impacto no sabor e no aroma dos alimentos. Contudo, a titulação de ácidos de um alimento não é capaz de diferenciar entre os compostos acidificantes e, por isso, o cálculo costuma ser feito em cima de um ácido conhecidamente predominante. Ainda assim, a mistura desses compostos costuma ser bastante complexa, podendo contar com múltiplos ácidos em larga quantidade ou, ainda, contar com mudança de protagonismo desses com o tempo (TYL & SADLER, 2017).

Li *et al.* (2022) conduziram pesquisa correlacionando ácido glucônico e sua percepção sensorial em kombucha. Primeiro, os autores concluem que a maior concentração do referido ácido está diretamente ligada à melhor pontuação para “sabor” entre os provadores. Depois, eles reconstróem a comunidade microbiológica de um SCOBY de kombucha com a suplementação de duas cepas específicas, uma de BAA e outra de levedura, isoladas do próprio consórcio original. A técnica fez com que a produção de ácido glucônico aumentasse em mais de 4 vezes em relação à fermentação tradicional, impactando muito positivamente na aceitação da bebida fermentada.

A Figura 03 traz o gráfico da variação de sólidos solúveis durante as 72 horas de fermentação para todas as amostras. O teor de sólidos solúveis no tempo 0 foi baixo para as três amostras, variando entre 2,13 e 2,38 °Brix. Isso provavelmente foi influenciado pela metodologia de obtenção do extrato de ACC, já que foi utilizado um processador de grau doméstico ao invés de um equipamento mais eficiente, como um moinho coloidal.

Figura 02 - Variação dos valores de ATT para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C.



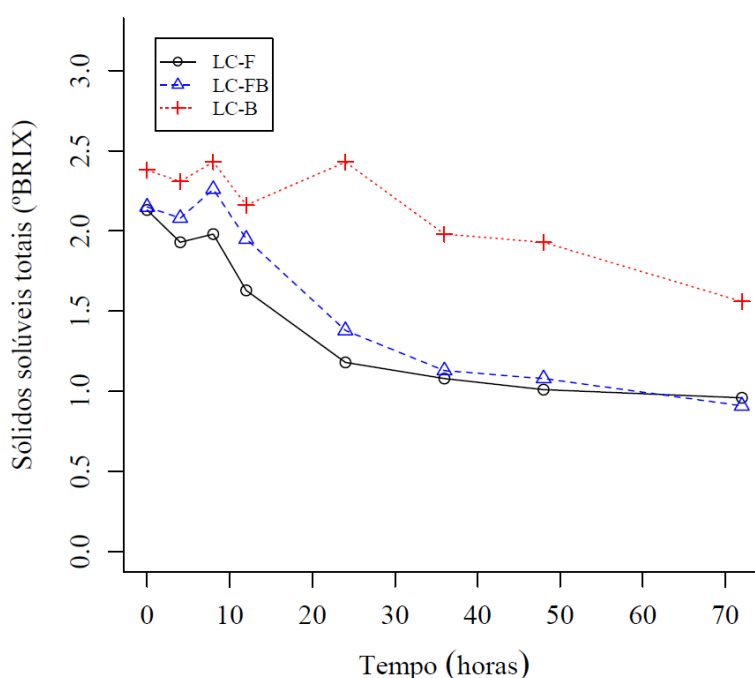
LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.

A redução dos SST também está associada ao aumento de ATT e conseqüente redução de pH, pois os microrganismos fermentadores precisam consumir açúcares para dar continuidade ao seu metabolismo. De acordo com De-Vuyst & Leroy (2020), as leveduras consomem glicose para secretar etanol, enquanto as LABs preferem frutose e produzem principalmente ácido lático. As BAAs além de metabolizarem o etanol provido pelas leveduras, também consomem glicose, especialmente as bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, para produzir ácido glucônico e glucurônico (LI *et al.*, 2022). O balanço final entre sólidos solúveis e acidez é um dos melhores parâmetros para predição do *flavor* final de uma bebida, melhor do que analisar isoladamente cada parâmetro (TYL & SADLER, 2017).

Notam-se, mais uma vez, curvas de redução de SST semelhantes entre LC-F e LC-FB, reforçando as diferentes velocidades de fermentação entre kefir e kombucha. Considerando os padrões cinéticos nas análises de pH, ATT e SST, é possível inferir que o uso de kefir é o maior responsável pelo consumo de açúcares e acidificação das bebidas dentro das misturas analisadas. Ao mesmo tempo que as amostras com kefir (LC-F e LC-FB) apresentam comportamentos semelhantes nos testes descritos, especialmente para pH e SST onde terminam as 72 horas sem diferença estatística, elas igualmente se afastam das curvas delineadas pela

amostra inoculada apenas com kombucha (LC-B). É interessante salientar também que a amostra LC-FB recebeu apenas metade do volume de kefir que a amostra LC-F recebeu e, mesmo assim, ela foi capaz de se equiparar à essa última formulação dentro dos parâmetros discutidos. A semelhança entre essas eficiências sugere uma evidência de potencial simbiótico entre culturas mistas de kefir e kombucha, onde as interações entre BAL, BAA e leveduras pode ter compensado o metabolismo de açúcares e ácidos orgânicos apesar das menores concentrações iniciais dos inóculos de LC-FB.

Figura 03 - Variação dos valores de SST para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C.



LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.

## 5.2 Análises cromatográficas

Nessa seção serão apresentados os dados obtidos de açúcares e ácidos orgânicos para as três amostras nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de fermentação. Todos os parâmetros apresentaram interação significativa entre formulações e tempo, portanto, foram submetidos a análises de regressão (APÊNDICES B e C). A Tabela 02 informa os limites e detecção e quantificação para glicose (GLI), frutose (FRU), sacarose (SAC), rafinose (RAF), ácido glucurônico (GLU), ácido lático (LAT), ácido acético (ACE) e ácido cítrico (CIT).

Tabela 02 – Limites de detecção e quantificação do equipamento de CLAE para as substâncias padrões utilizadas.

Limites (mg/mL)	Açúcares				Ácidos orgânicos			
	GLI	FRU	SAC	RAF	GLU	LAT	ACE	CIT
<b>Deteção</b>	0,1	0,1	0,1	0,07	0,001	0,001	0,01	0,01
<b>Quantificação</b>	0,3	0,5	0,25	0,1	0,005	0,001	0,03	0,05

GLI: glicose. FRU: frutose. SAC: sacarose. RAF: rafinose. GLU: ácido glucurônico. LAT: ácido láctico. ACE: ácido acético. CIT: ácido cítrico.

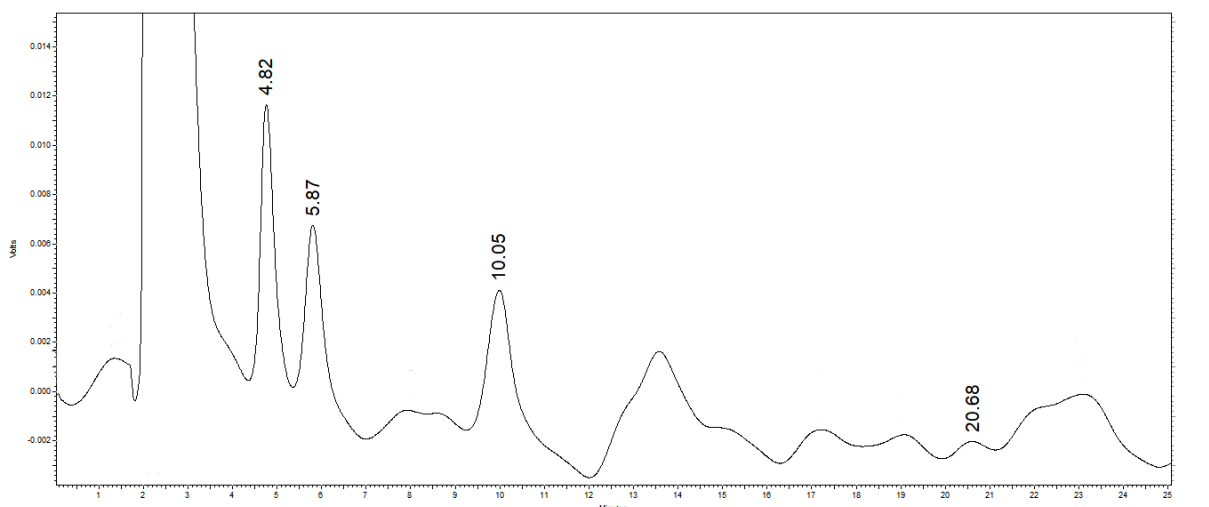
Os limites de detecção e quantificação são características fundamentais da performance de um equipamento analítico. Esses limites estimam os valores mínimos que o equipamento é capaz de detectar e quantificar, levando em consideração todos os possíveis ruídos e interferências do processo. Esses dados são considerados críticos e, por isso, reais. Por outro lado, os dados encontrados para uma amostra durante a experimentação são obtidos comparando os valores experimentais com os valores críticos, estimando o valor mínimo significativo para o composto de interesse. Dessa maneira, entendemos que nem todo composto detectado é quantificável, bem como a não detecção deste não significa sua completa ausência no meio, mas sim uma incapacidade de identificação por parte da máquina (CURRIE, 1999).

### 5.2.1 Determinação de açúcares

A Figura 04 apresenta o cromatograma dos padrões de açúcares. A ordem de eluição e os respectivos tempos de retenção deram-se da seguinte maneira: frutose (4,82 minutos), glicose (5,87 minutos), sacarose (10,05 minutos) e rafinose (20,68 minutos).

A Tabela 03 apresenta todos os valores encontrados para glicose (GLI), frutose (FRU), sacarose (SAC) e rafinose (RAF) nos tempos analisados das três amostras. Os mono, di e trissacarídeos encontrados no tempo 0 também foram relatados por Griffin e Dean (2017) ao caracterizarem os açúcares de ACC *in natura*, mas as autoras ainda descreveram a presença de inositol e estaquiose. Os valores aqui encontrados naturalmente diferem dos relatados por Griffin e Dean (2017), uma vez que elas trabalharam com o produto integral e aqui pesquisou-se em cima do extrato hidrossolúvel. Contudo, foi comum aos dois trabalhos a predominância de sacarose seguida por rafinose.

Figura 04 – Cromatograma dos padrões de açúcares pesquisados por CLAE.



Ordem de eluição de picos: frutose (4,82), glicose (5,87), sacarose (10,05) e rafinose (20,68).

De acordo com a Tabela 03 e com a Figura 05, notam-se valores iniciais baixos para os monossacarídeos (glicose e frutose) e valores mais altos para o dissacarídeo (sacarose) e para o trissacarídeo (rafinose) encontrados. Durante as primeiras 24 horas, existe um aumento de glicose e frutose em paralelo ao decaimento de sacarose e rafinose. Sabendo que a molécula de sacarose é composta por glicose e frutose e a rafinose, por sua vez, é a junção de galactose, frutose e glicose, esse aumento de monossacarídeos possivelmente se justifica pela quebra dos açúcares maiores sob ação dos microrganismos fermentadores.

A metabolização de sacarose durante processos fermentativos é bem discutida na literatura, especialmente em relação às BALs e kefir, e a sua disponibilidade no meio costuma influenciar positivamente a produção de ácido láctico (DE-ROOS; DE-VUYST, 2018; LAUREYS *et al*, 2018; PATO *et al*, 2019). Leveduras do gênero *Saccharomyces*, presentes em kefir e em kombucha, também hidrolisam sacarose em glicose e frutose com o uso da enzima invertase (PAREDES; ESCUDERO-GILETE; VICARIO, 2022).

Grãos e legumes costumam ter conteúdos relevantes de oligossacarídeos que não são digeridos pelos humanos e chegam intactos no trato intestinal, onde são metabolizados pela microbiota do indivíduo, podendo gerar gases e desconfortos. No entanto, a comunidade científica tem levantado seu potencial como moléculas prebióticas, uma vez que diversas cepas de probióticos, especialmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, são capazes de consumir rafinose, estaquiose e outros oligossacarídeos (ABRIOUEL *et al*, 2012; ZARTL *et al.*, 2018).

Tabela 03 – Quantificações dos açúcares presentes em cada tempo de fermentação das bebidas fermentadas de ACC.

TEMPO (horas)	AMOSTRA	QUANTIFICAÇÕES (mg/100 mL)			
		GLI*	FRU*	SAC*	RAF*
0	LC-F	0,0222 <sup>a</sup>	0,0597 <sup>a</sup>	0,2466 <sup>a</sup>	0,1311 <sup>a</sup>
	LC-FB	0,0592 <sup>b</sup>	0,0461 <sup>b</sup>	0,2454 <sup>a</sup>	0,1407 <sup>a</sup>
	LC-B	0,0300 <sup>c</sup>	0,0096 <sup>c</sup>	1,0675 <sup>b</sup>	0,1377 <sup>a</sup>
24	LC-F	0,0496 <sup>a</sup>	0,0718 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,1107 <sup>a</sup>
	LC-FB	0,1870 <sup>b</sup>	0,1692 <sup>b</sup>	0,0332 <sup>b</sup>	0,0795 <sup>b</sup>
	LC-B	0,1881 <sup>b</sup>	0,1318 <sup>c</sup>	0,7655 <sup>c</sup>	0,0277 <sup>c</sup>
48	LC-F	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0437 <sup>a</sup>
	LC-FB	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
	LC-B	0,2664 <sup>b</sup>	0,2250 <sup>b</sup>	0,2303 <sup>b</sup>	0,0905 <sup>c</sup>
72	LC-F	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	LC-FB	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	LC-B	0,2589 <sup>b</sup>	0,1963 <sup>b</sup>	0,1010 <sup>b</sup>	0,0602 <sup>b</sup>

GLI: glicose. FRU: frutose. SAC: sacarose. RAF: rafinose. As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ), para as diferentes amostras de um mesmo tempo. Coluna indicada por asterisco (\*) apresenta interação entre amostra e tempo, sendo submetida ao teste de regressão: os efeitos simples das médias são significativamente diferentes entre si a 5% de significância pelo teste de F entre amostras iguais em diferentes tempos.

Zartl *et al.* (2018) testaram o consumo de açúcares da família da rafinose por parte de 20 cepas isoladas de bactérias probióticas, sendo a maioria bactérias ácido lácticas, e descobriram que 15 dessas fermentavam rafinose e 14 fermentavam estaquiase. Entendendo a kombucha e, principalmente, o kefir como consórcios ricos em BALs, fica evidente que a redução de rafinose nas amostras LC-F, LC-FB e LC-B está relacionada ao metabolismo das suas misturas complexas de bactérias.

Ainda discutindo a Figura 05, no ponto de 24 horas, observa-se a maior concentração de monossacarídeos em LC-FB em comparação com LC-F, bem como seu consumo mais rápido de rafinose. Essa diferença sugere que a mistura de kefir e kombucha é mais eficiente do que apenas o kefir isolado para a metabolização do trissacarídeo e a consequente liberação dos açúcares menores no meio. O consumo de açúcares por LC-FB equipara-se, ou até supera, ao de LC-F, apontando novamente uma cooperação entre kefir e kombucha, compensando os menores volumes inoculados.

Analisando a Figura 06, pode-se avaliar melhor o consumo de açúcares por cada formulação individualmente. É notável o veloz consumo de sacarose nas três amostras, embora nas formulações com kefir (LC-F e LC-FB) isso aconteça mais rápido, logo nas primeiras 24



horas. Com dois dias de fermentação, as amostras com kefir já haviam esgotado todo o estoque de glicose, frutose e sacarose, restando apenas resíduos de rafinose na amostra LC-F. Já na amostra LC-B, mesmo ao final das 72 horas de experimentação, ainda havia presença dos açúcares maiores e um conteúdo relevante de monossacarídeos.

As curvas de consumo de açúcares estão em concordância com as curvas de pH, SST e ATT. Nota-se que os valores de SST para LC-F e LC-FB tem maior queda entre 12 e 24 horas de fermentação, momento este em que os resultados cromatográficos apontam para o decaimento parcial ou total do açúcar em maior concentração inicial, a sacarose. Das 24 horas em diante, os valores de sólidos solúveis começam a estabilizar em paralelo com o esgotamento do estoque de açúcares das amostras com kefir. Uma estabilização análoga acontece com os valores de pH, podendo também ser relacionado ao fim da digestão de açúcares e a redução da produção ácidos. Em contrapartida, os valores de ATT permaneceram em ascensão, possivelmente por influência das BAAs que não metabolizam exclusivamente açúcares, mas também etanol e lactato, para produzir ácido acético (DE-VUYST & LEROY, 2020). A contínua produção de ácido acético pode ter menor interferência no pH devido ao fato de este ser um ácido fraco, com baixa taxa de ionização no meio (TYL & SADLER, 2017).

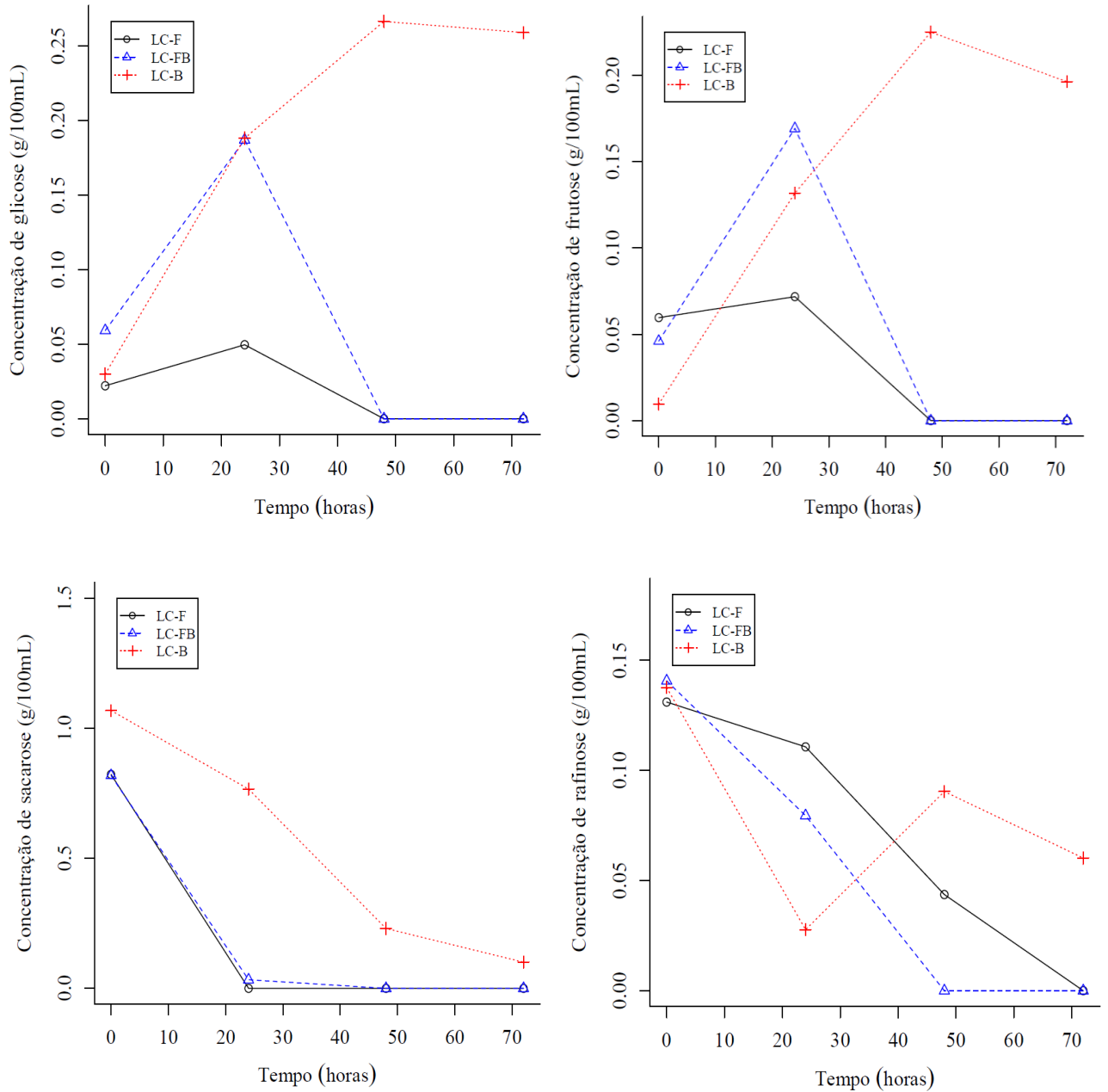
Por fim, a demora em consumir os açúcares percebida na amostra LC-B reafirma a menor velocidade de fermentação inerente ao consorcio de microrganismos provenientes do scoby de kombucha, possivelmente pela menor proporção de BALs e leveduras, que são as principais responsáveis por hidrólise de carboidratos do meio, enquanto as BAAs tem preferência por etanol, lactato e outros metabólitos secundários.

### **5.2.2 Determinação de ácidos orgânicos**

A Figura 07 apresenta o cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos. A ordem de eluição e os respectivos tempos de retenção deram-se da seguinte maneira: ácido glucurônico (2,67 minutos), ácido láctico (5,05 minutos), ácido acético (5,69 minutos) e ácido cítrico (6,34 minutos).

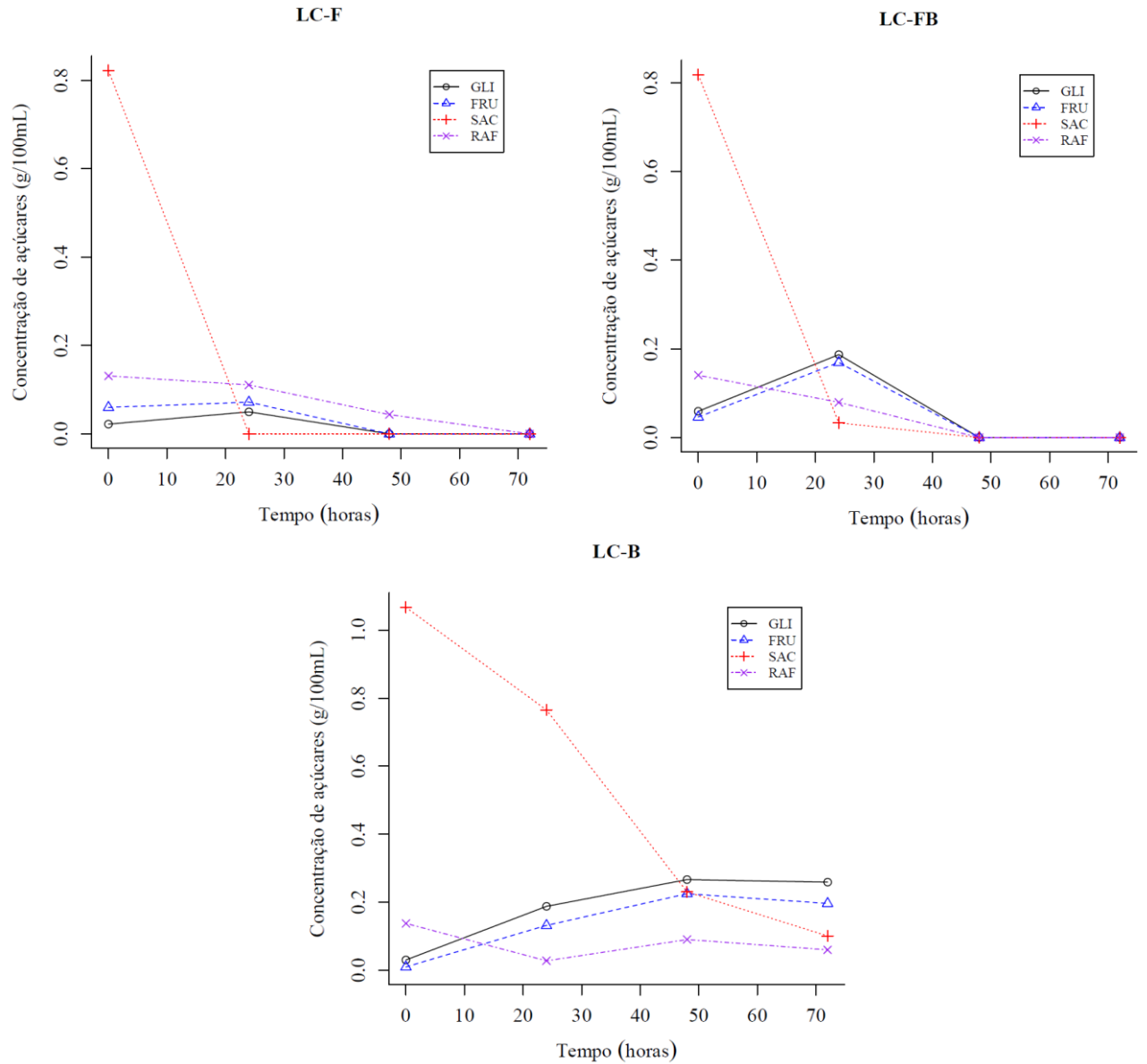
A Tabela 04 traz todos os valores quantificados para as concentrações de ácido glucurônico (GLU), ácido láctico (LAT), ácido acético (ACE) e ácido cítrico (CIT). No tempo 0, o ácido de maior presença foi o glucurônico, proveniente das alíquotas de inóculos previamente fermentadas. O ácido cítrico, que tem presença registrada em vários tipos de amêndoas (YUKSEL *et al.*, 2017), vem em segunda maior concentração, proveniente do extrato hidrossolúvel de ACC.

Figura 05 - Variação das concentrações de glicose, frutose, sacarose e rafinose (g/100 mL) para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C.



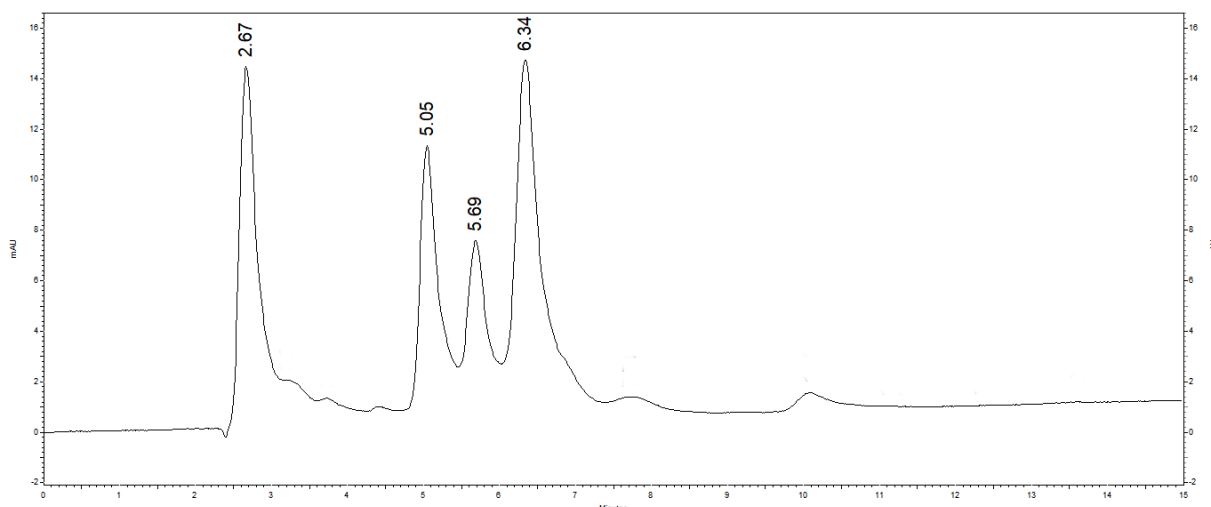
LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.

Figura 06 – Variação das concentrações de açúcares dentro de cada amostra analisada (LC-F, LC-FB e LC-B).



GLI: glicose. FRU: frutose. SAC: sacarose. RAF: rafinose. LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.

Figura 07 – Cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos pesquisados por CLAE.



Ordem de eluição dos picos: ácido glucurônico (2,67), ácido láctico (5,05), ácido acético (5,69) e ácido cítrico (6,34).

Embora a produção de ácido glucurônico por SCOBYs de kefir não seja comumente relatada na literatura científica, a amostra LC-F apresentou uma concentração desse ácido próxima à encontrada em LC-B. A maioria dos estudos metagenômicos de kefir costumam encontrar apenas cepas de *Acetobacter* representando o grupo das BAA nesses consórcios (FIORDA *et al.*, 2017), contudo, alguns esforços pontuais já catalogaram *Gluconacetobacter* em kefir brasileiro (MIGUEL *et al.* 2010) e tailandês (SARIKKHA *et al.*, 2015). As espécies desse último gênero são as responsáveis por maior parte da colonização dos SCOBYs de kombucha, bem como pela produção de ácido glucurônico (NGUYEN *et al.*, 2015b). Dessa maneira, a quantificação de GLU em LC-F é um indício da presença de *Gluconacetobacter* em consórcios de kefir brasileiro.

Ao observar a Tabela 04 e a Figura 08, podemos notar que todas as amostras têm uma diminuição da concentração de GLU no tempo de 24 horas. No tempo seguinte, 48 horas, LC-F continua em baixa, LC-FB tem um sutil aumento enquanto LC-B tem uma produção mais expressiva do ácido. No último tempo, nota-se uma mudança muito sensível nos valores para LC-FB e LC-B, enquanto LC-F já tem uma recuperação mais efetiva. Dado o exposto, não é possível afirmar que a mistura de kefir e kombucha foi responsável por um aumento significativo da produção de ácido glucurônico dentro dos parâmetros de fermentação pesquisados.

Tabela 04 – Quantificações dos ácidos orgânicos presentes em cada tempo de fermentação das bebidas fermentadas de ACC.

TEMPO (horas)	AMOSTRA	AVALIAÇÕES			
		GLU*	LAT*	ACE*	CIT*
0	LCF	3,3519 a	0,3068 a	0,4847 a	0,8113 a
	LCFB	3,3497 a	0,1792 b	0,4955 a	0,7304 b
	LCB	3,5728 b	0 c	0,6068 a	0,7821 a
24	LCF	2,2966 a	2,4012 a	1,5584 a	0,8676 a
	LCFB	1,9359 b	1,8742 b	1,3764 b	0,7069 b
	LCB	2,7779 c	0,1949 c	1,0684 c	0,7119 b
48	LCF	1,7234 a	2,0340 a	5,6478 a	0 a
	LCFB	2,0352 b	2,1498 b	5,2137 b	0 a
	LCB	3,0310 c	0,1785 c	2,6938 c	0,6305 b
72	LCF	1,9533 a	1,4578 a	6,4612 a	0 a
	LCFB	2,0528 a	2,2050 b	4,9468 b	0 a
	LCB	2,9788 b	0,1740 c	2,9902 c	0,7026 b

GLU: ácido glucurônico. LAT: ácido láctico. ACE: ácido acético. CIT: ácido cítrico. As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ), para as diferentes amostras de um mesmo tempo. Coluna indicada por asterisco (\*) apresenta interação entre amostra e tempo, sendo submetida ao teste de regressão: os efeitos simples das médias são significativamente diferentes entre si a 5% de significância pelo teste de F entre amostras iguais em diferentes tempos.

Neffe-Skocinska *et al.* (2017) avaliam os impactos das temperaturas de fermentação nos conteúdos de ácidos orgânicos em kombucha tradicional adoçada com 10% de açúcar. Para GLU, as autoras descrevem 0,3 mg/mL no tempo 0 de fermentação, valor próximo do encontrado no presente trabalho para LC-F ou LC-FB no mesmo tempo. Contudo, até o terceiro dia de fermentação esses valores encontrados pelos autores saltaram para 17 mg/mL na amostra fermentada a 30 °C e 18 mg/mL na amostra de 25 °C, muito maiores do que os quantificados no presente trabalho. As diferenças nas concentrações de ácido glucurônico entre os trabalhos pode apontar uma dificuldade de adaptação das BAA produtoras desse ácido no extrato hidrossolúvel de ACC.

Em relação ao ácido cítrico, nota-se uma queda drástica da sua concentração entre 24 e 48 horas nas amostras com kefir. De Vuyst & Leroy (2020), ao discorrerem sobre as sucessões de leveduras, BALs e BAAs em processos fermentativos de frutos, afirmam que as BAL são capazes de metabolizar glicose, frutose e ácido cítrico para a produção de ácido láctico, acético e outros metabólitos que irão criar um ambiente favorável para o desenvolvimento de BAA. O ácido cítrico, especificamente, é convertido em ácido acético pelas BAL. Assim, é interessante notar que o salto na concentração de ACE nas amostras com kefir acontece no mesmo período

de maior redução do CIT, de glicose e de frutose, sugerindo a conversão desses três últimos em ácido acético. Em contrapartida, na amostra LC-B há pouca alteração nas taxas de CIT, o que reforça a baixa presença de BAL na kombucha e sugere que o aumento de ACE acontece apenas pela metabolização de açúcares.

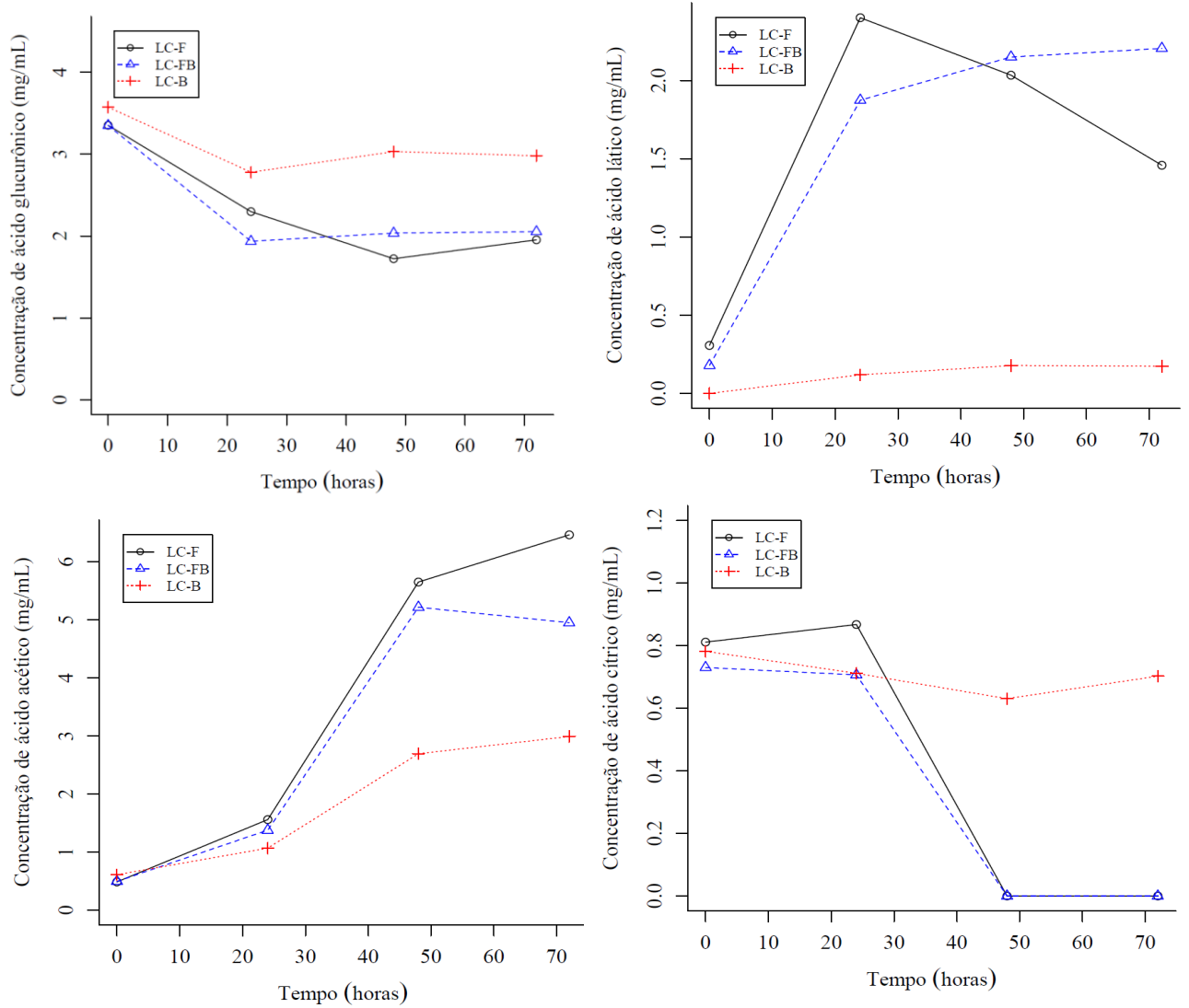
Analisando a Figura 09, temos que as concentrações de ácido láctico nas três formulações começam a se estabilizar após 24 horas de fermentação, enquanto o ácido acético tem um salto de produção depois desse período. Nas amostras com kefir, LAT predomina até as 24 horas e depois perde espaço para ACE. Esses últimos dados servem para contextualizar os valores obtidos nas análises físico-químicas e no consumo de açúcares. Sabendo que leveduras e BALs utilizam açúcares como substrato de fermentação, o predomínio da concentração de LAT faz sentido enquanto ainda há açúcar disponível no meio e este é o caso das amostras de kefir até o ponto de 24 horas.

A principal característica metabólica das bactérias ácido lácticas é conhecida como “processo de acidificação primária”, que é justamente o consumo de carboidrato para a produção de ácido. Essa atuação é muito importante para diminuição rápida do pH, preservando o alimento contra microrganismos deteriorantes e patogênicos (GRUJOVIC *et al.*, 2021).

Analisando os valores de sólidos solúveis e pH, Figuras 01 e 03, esses parâmetros começam a se estabilizar com 36 horas em LC-F e LC-FB, provavelmente pelo fim de açúcar livre. Após o esgotamento de carboidratos, espera-se que as leveduras e BALs diminuam gradativamente sua atuação enquanto as BAA entram na sucessão consumindo principalmente etanol e lactato secretados pelos primeiros microrganismos. Conforme a atividade de BAA aumenta, é natural que cresça a concentração de ácido acético no meio como foi observado em todas as amostras no ponto de 48 horas.

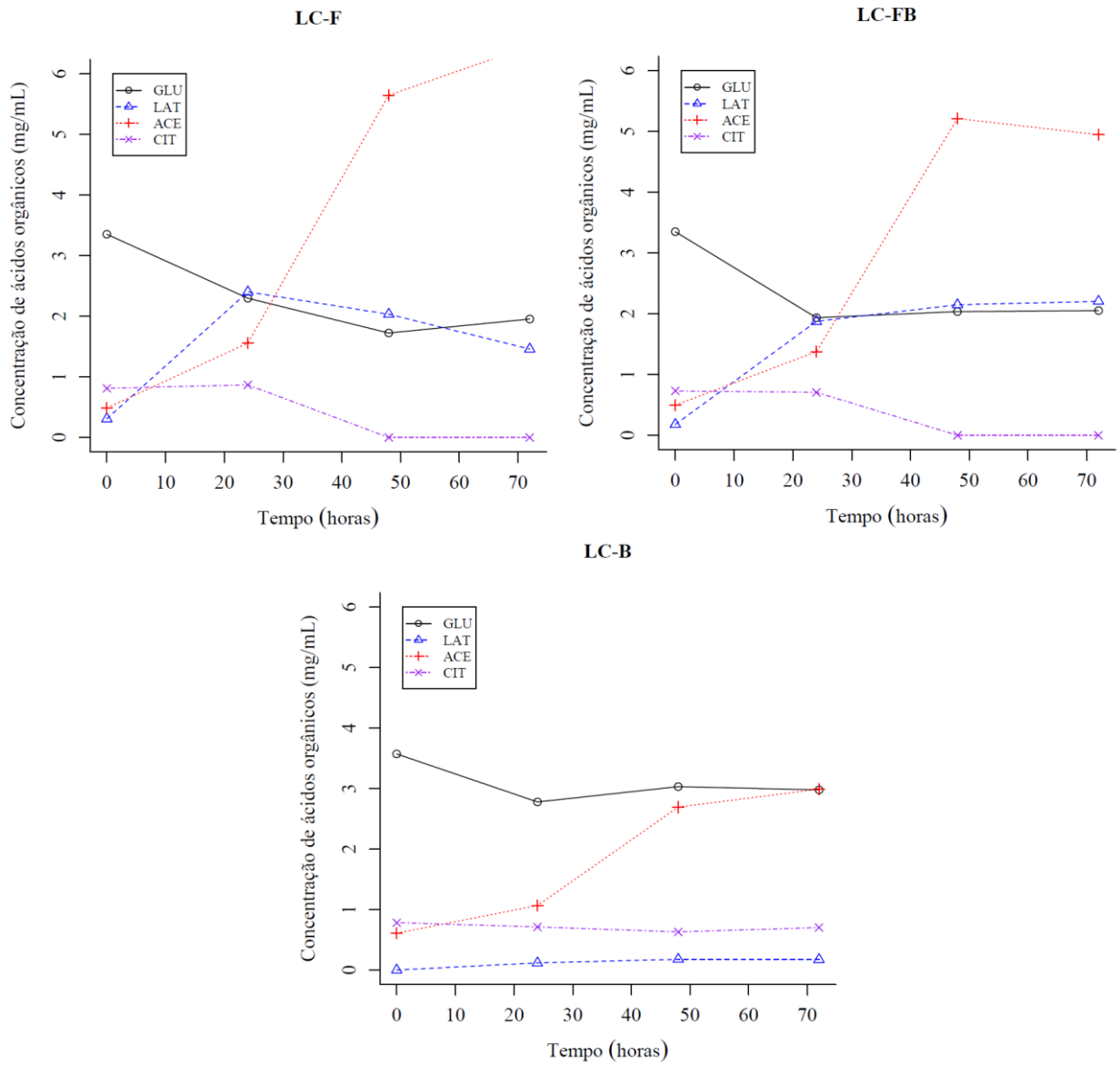
O perfil cinético de ácidos orgânicos de LC-FB ilustrado na Figura 09, quando em comparação com os perfis das outras duas amostras, nos sugere uma maior estabilidade nas concentrações de ácido láctico. Enquanto LC-F segue com perda gradual de LAT após 24 horas de fermentação, os dados de LC-B permanecem inexpressivos. Essa investigação sugere uma melhor manutenção da BALs em LC-FB com o tempo, mas não nos fornece informações suficientes para maiores inferências sobre a simbiose entre kefir e kombucha.

Figura 08 - Variação das concentrações dos ácidos glucurônico, láctico, acético e cítrico (mg/mL) para bebidas de castanha de caju fermentadas com kefir e kombucha durante 72 horas a 28 °C.



LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.

Figura 09 – Variação das concentrações de ácidos orgânicos dentro de cada amostra analisada (LC-F, LC-FB e LC-B).



GLU: ácido glucurônico. LAT: ácido lático. ACE: ácido acético. CIT: ácido cítrico. LC-F: amostra inoculada com 100% de kefir. LC-FB: amostra inoculada com 50% kefir e 50% kombucha. LC-B: amostra inoculada com 100% kombucha.



### 5.3 Análises toxicológicas

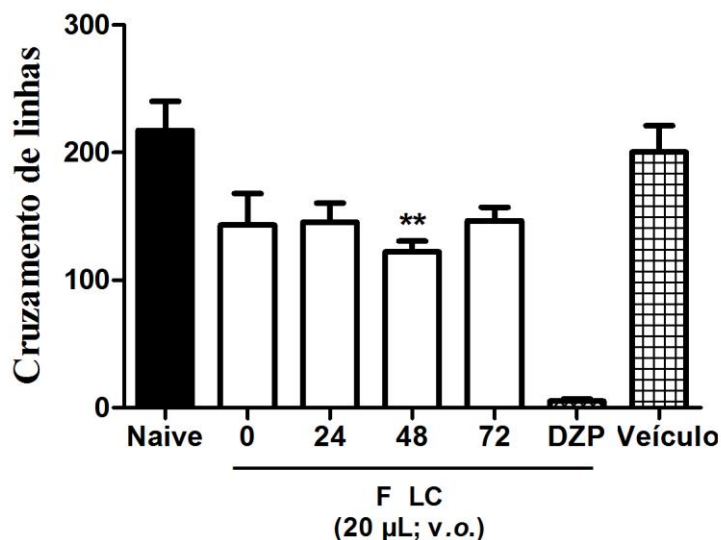
A seguir serão apresentados os dados encontrados para as análises de atividade locomotora e toxicidade aguda, conduzidas com *zebrafish* (*D. rerio*). Essa espécie tem se tornado um modelo animal muito popular em pesquisas acadêmicas por dois motivos principais: seu tamanho na fase adulta facilita sua manutenção, reprodução e economiza reagentes; também, os padrões de colonização da microbiota intestinal e algumas das vias neurológicas do animal de assemelham às dos mamíferos (OLIVEIRA, 2013; GIOACCHINI *et al.*, 2014; MAXIMINO *et al.*, 2015).

#### 5.3.1 Atividade locomotora

O teste da atividade locomotora, ou campo aberto, avalia o comprometimento da capacidade natatória do animal após administração de uma substância. O efeito dessa substância no sistema nervoso central do *zebrafish* vai influenciar sua resposta à estresses, estimulando ou não seu comportamento de fuga e, portanto, oferecendo indícios de ação ansiolítica ou ansiogênica por parte da solução administrada (SIREENI *et al.*, 2020). As Figuras 10, 11 e 12 apontam como se deu a movimentação desses animais após administração das formulações, por meio da contagem de cruzamento de linhas.

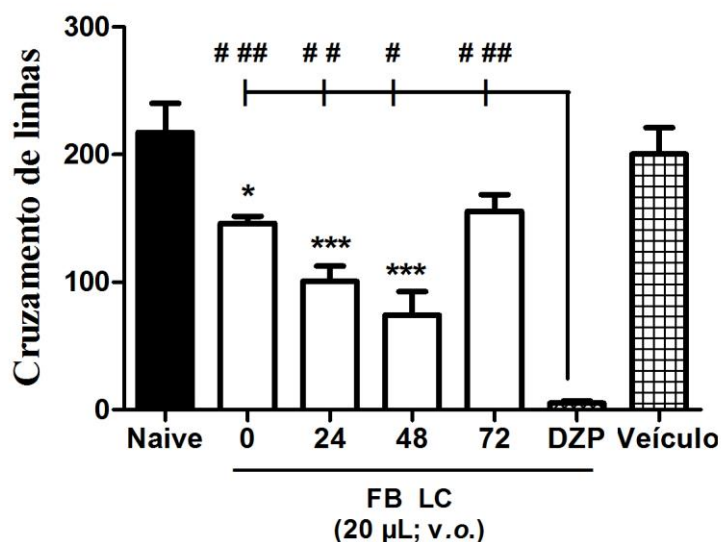
Todos os grupos apresentação redução da capacidade natatória em relação ao grupo Naive. Em LC-F, apenas a amostra com 48 horas de fermentação apresentou diferença estatística entre os grupos que receberam bebida fermentada. Já em LC-FB, a atividade locomotora foi gradativamente reduzida entre os tempos 0 e 48, sendo os valores desse último tempo estatisticamente iguais ao tratamento com diazepam. Para LC-B, as amostras com 24, 48 e 72 horas de fermentação refletiram em redução da atividade natatória dos animais igualmente ao controle com fármaco ansiolítico, o Diazepam.

Figura 10 – Cruzamento de linhas referente à amostra LC-F nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.



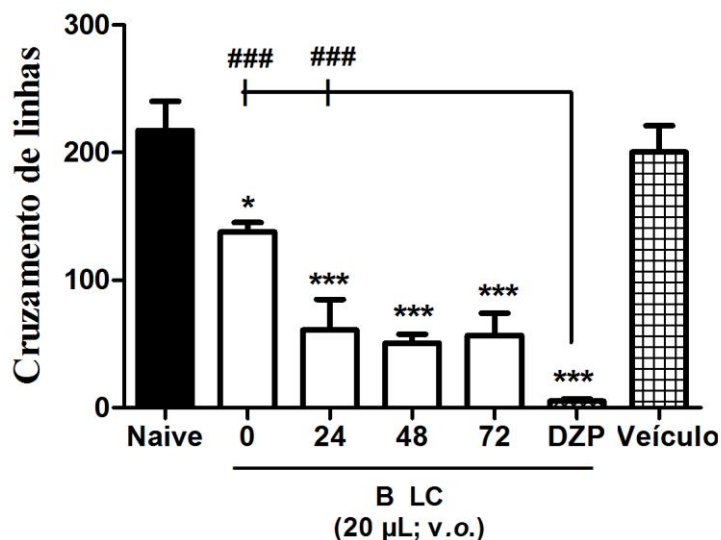
Os resultados são expressos como valores médios com erro padrão da média (n=6/grupo). Naive: animais não tratados. DZP: Diazepam (5 mg/mL). Veículo: água destilada. V.O.: via oral. As diferenças foram analisadas com análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey [\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 em relação ao grupo Naive (controle); # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001 em relação ao grupo tratado com DZP].

Figura 11 – Cruzamento de linhas referente à amostra LC-FB nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.



Os resultados são expressos como valores médios com erro padrão da média (n=6/grupo). Naive: animais não tratados. DZP: Diazepam (5 mg/mL). Veículo: água destilada. V.O.: via oral. As diferenças foram analisadas com análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey [\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 em relação ao grupo Naive (controle); # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001 em relação ao grupo tratado com DZP].

Figura 12 – Cruzamento de linhas referente à amostra LC-B nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.



Os resultados são expressos como valores médios com erro padrão da média ( $n=6/\text{grupo}$ ). Naive: animais não tratados. DZP: Diazepam (5 mg/mL). Veículo: água destilada. V.O.: via oral. As diferenças foram analisadas com análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey [ $* p < 0.05$ ;  $** p < 0.01$ ;  $*** p < 0.001$  em relação ao grupo Naive (controle);  $\# p < 0.05$ ;  $\#\# p < 0.01$ ;  $\#\#\# p < 0.001$  em relação ao grupo tratado com DZP].

A redução da atividade locomotora dos animais após administração das bebidas fermentadas sugere atividade probiótica. Esse efeito já tem sido relatado em *zebrafish* após a aplicação de probióticos com diferentes matérias primas. Valcarce *et al.* (2020) demonstraram que a exposição prolongada dos peixes à soluções probióticas de bactérias ácido lácticas afetava diretamente o eixo intestino-cérebro, conferindo menores padrões de ansiedade. De Melo *et al.* (2020) também apontam efeito ansiolítico e antidepressivo em *zebrafish* após exposição prolongada com fermentados de kefir de água e de bebida de soja.

A alta atividade locomotora remanescente em LC-F pode representar perda na contagem de probióticos do grupo das bactérias ácido lácticas, provavelmente pelo rápido esgotamento dos seus substratos metabolizáveis. A amostra LC-FB teve uma melhor manutenção dos seus níveis de ácido láctico do que LC-F (Figura 09), podendo estar relacionado à sobrevivência de BALs probióticas. Contudo, a não disponibilidade de carboidratos com 72 horas de fermentação afeta diretamente a viabilidade dessas bactérias, voltando a aumentar a atividade locomotora de *D. rerio*. Por fim, em LC-B foi percebida uma redução da motricidade dos peixes igual ao efeito de Diazepam em todos os tempos a partir de 24 horas. Essa última amostra, como já discutido, apresenta uma cinética fermentativa mais lenta e manteve reservas de açúcares até o final do experimento. A constância de carboidratos associada à menor concentração de BALs em

kombucha, pode influenciar positivamente uma possível ação probiótica prolongada em bebida de ACC fermentada com kombucha.

Complementando as discussões, Bruno *et al.* (2020) demonstraram que o extrato hidrossolúvel de amêndoas de castanha de caju é uma matriz adequada para a manutenção de bactérias ácido lácticas probióticas. Os pesquisadores inocularam os extratos com *Lactobacillus acidophilus* e *L. plantarum* e, mesmo após 30 dias de armazenamento refrigerado, não observaram perdas significativas na contagem de bactérias viáveis. Esses resultados podem reforçar o suposto potencial probiótico encontrado para LC-FB e LC-B em modelo de *D. rerio*, mas fica clara a necessidade do controle de temperatura e da maior disponibilidade de açúcares para a sobrevivência das bactérias nas bebidas.

### 5.3.2 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade da dose de uma substância pode ser acessada pelos seus efeitos crônicos, quando cumulativos após exposição prolongada, ou agudos, quando letais após um único contato (FERNANDES; FELIX; NOBRE, 2016). A Tabela 05 demonstra que nenhuma das amostras estudadas (LC-F, LC-FB e LC-B, em qualquer tempo) foi responsável pela morte de animais após administração única, indicando baixa toxicidade aguda.

Não foram encontrados relatos em literatura para a avaliação de toxicidade aguda em *zebrafish* para fermentados de kefir ou kombucha.

Tabela 05 – Mortalidade de zebrafish por tempo de fermentação nas amostras LC-F, LC-FB e LC-B.

Amostras	Mortalidade de Zebrafish adulto					CL <sub>50</sub> 96 (mg/mL) /IV
	CN	0 H	24 H	48 H	72 H	
LC-F	0	0	0	0	0	> 0,25
LC-FB	0	0	0	0	0	> 0,25
LC-B	0	0	0	0	0	> 0,25

CN: grupo controle negativo recebeu água destilada estéril. CL<sub>50</sub>: concentração letal para matar 50% dos animais adultos. IV: intervalo de confiança.

## 6 CONCLUSÕES

Para todos os perfis cinéticos pesquisados, as amostras com kefir sempre mantiveram maiores ritmos de consumo de açúcar, produção de ácidos orgânicos e consequentes alterações de parâmetros físico-químicos. Em relação à amostra com mistura de SCOBYs, LC-FB, foi possível perceber que o menor volume de inóculo de kefir não diminuiu o consumo de açúcares, mas que o seu contato com o ecossistema microbiológico da kombucha permitiu manter as taxas de hidrólise de carboidratos comparáveis às da amostra que só recebeu kefir, além de ter sido mais eficiente na quebra de rafinose que LC-F.

As quantificações de açúcares e ácidos orgânicos permitiram confirmar muitas das dinâmicas envolvendo as sucessões fermentativas entre leveduras, bactérias ácido lácticas e bacterias ácido acéticas propostas em literatura acadêmica. O perfil de consumo de açúcares de LC-FB pode sugerir atividade simbiótica entre kefir e kombucha, mas os dados coletados não ofereceram informações suficientes acerca da cooperação entre microrganismos otimizando a produção de ácidos orgânicos funcionais em extrato hidrossolúvel de amêndoa de castanha de caju.

É possível, também, que o extrato de ACC tenha influenciado o desenvolvimento dos microrganismos e sua consequente secreção de compostos funcionais. Os baixos níveis de sólidos solúveis podem ter sido responsáveis pelos resultados pouco expressivos da produção de ácido glucurônico, sendo recomendável o uso de moinhos coloidais no processamento da bebida para maior dissolução de açúcares das amêndoas, especialmente sacarose e glicose. Em trabalhos futuros, também se faz interessante o uso de amostras-controle fermentadas em solução de água e sacarose para avaliação da influência dos meios de fermentação e seus possíveis antinutrientes.

As análises de toxicidade deram indícios de que bebidas de ACC fermentadas com kefir e kombucha podem trazer benefícios à saúde de consumidor. Além da ausência de letalidade aguda em todas as formulações, as amostras LC-FB e LC-B apresentaram potencial probiótico, que provavelmente pode ser otimizado com disponibilidade de carboidratos no meio. É importante conduzir análises microbiológicas de contagem de colônias para confirmar esse efeito.

Dadas as literaturas bastante escassas, este trabalho foi pioneiro no estudo das cinéticas e toxicidades de produtos fermentados por kefir e kombucha à base de extrato hidrossolúvel de amêndoas de castanha de caju. Essa esfera da pesquisa acadêmica ainda não se faz tão robusta quanto outras temáticas da Microbiologia, mas os esforços trazidos nessa pesquisa oferecem

novos *insights* quanto à simbiose de BALs e BAAs em alimentos ou, mais especificamente, em kefir e kombucha.

## REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H.; N. Benomar, A. Cobo, N. Caballero, M. Á. Fernández Fuentes, R. Pérez-Pulido and A. Gálvez, Characterization of lactic acid bacteria from naturally fermented Manzanilla Aloreña green table olives, **Food Microbiol.**, 2012, 32, 308–316.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural processes**, v. 92, p. 88-98, 2013.
- ALEIXO, Marina G.B.; SASS, Carla A.B.; LEAL, Rafael M.; DANTAS, Tiago M.; PAGANI, Mônica M.; PIMENTEL, Tatiana C.; FREITAS, Mônica Q.; CRUZ, Adriano G.; AZEREDO, Denise R.P.; ESMERINO, Erick A.. Using Twitter® as source of information for dietary market research: a study on veganism and plant-based diets. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 61-68, set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.14743>.
- ALENCAR, Paulo Gustavo de; ESPINDOLA, Giovana Mira de; CARNEIRO, Eduilson Lívio Neves da Costa. Dwarf cashew crop expansion in the Brazilian semiarid region: assessing policy alternatives in piauí, piauí. **Land Use Policy**, [S.L.], v. 79, p. 1-9, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.07.042>.
- ALVES, Vanessa; SCAPINI, Thamaris; CAMARGO, Aline Frumi; BONATTO, Charline; STEFANSKI, Fábio Spitz; JESUS, Eliane Pompeu de; DINIZ, Luan Gabriel Tech; BERTAN, Larissa Canhadas; MALDONADO, Rafael Resende; TREICHEL, Helen. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. **Lwt**, [S.L.], v. 145, p. 111364, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111364>.
- AMARASINGHE, Hashani; WEERAKKODY, Nimsha S.; WAISUNDARA, Viduranga Y.. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science & Nutrition**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 659-665, 20 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.605>.
- ARELLANO-AGUILAR, O. et al. Uso do teste de toxicidade embrionário do peixe-zebra para fins de avaliação de risco: estudo de caso. *Revista de Ciências da Pesca*, v. 9, n. 4, pág. 52, 2015.
- ASCHEMANN-WITZEL, Jessica; GANTRIIS, Rebecca Futtrup; FRAGA, Paola; PEREZ-CUETO, Federico J. A.. Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 61, n. 18, p. 3119-3128, 13 jul. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1793730>.
- ASIOLI, Daniele; ASCHEMANN-WITZEL, Jessica; CAPUTO, Vincenzina; VECCHIO, Riccardo; ANNUNZIATA, Azzurra; NÆS, Tormod; VARELA, Paula. Making sense of the “clean label” trends: a review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, [S.L.], v. 99, p. 58-71, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>.

ATIK, Didem Sözeri; GÜRBÜZ, Başak; BÖLÜK, Esra; PALABĐYĐK, İbrahim. Development of vegan kefir fortified with *Spirulina platensis*. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 42, p. 101050, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101050>.

AYDAR, Elif Feyza; TUTUNCU, Sena; OZCELIK, Beraat. Plant-based milk substitutes: bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 70, p. 1-15, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2020.103975>.

AYED, L., HAMDI, M. Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. **Annals of Microbiology**, 65(4), 2293–2299. 2015 <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1071-8>

AYED, L.; BEN ABID, S.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, 67(1), 111–121. 2016 <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>

BHUPATHIRAJU, Shilpa N.; HU, Frank B.. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. **Circulation Research**, [S.L.], v. 118, n. 11, p. 1723-1735, 27 maio 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.115.306825>

BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. 2019

BRASIL. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. 2007.

BRUNO, Laura Maria; LIMA, Janice Ribeiro; WURLITZER, Nédio Jair; RODRIGUES, Thalita Cavalcante. Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science And Technology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 604-607, set. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/fst.14219>.

CAMPBELL-PLATT, G. Fermented Foods: a world perspective. **Food Research International**. V 27, p 253 – 257. 1994

CASTELLONE, Vincenzo; BANCALARI, Elena; RUBERT, Josep; GATTI, Monica; NEVIANI, Erasmo; BOTTARI, Benedetta. Eating Fermented: health benefits of lab-fermented foods. **Foods**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 2639, 31 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10112639>.

COELHO, Raquel Macedo Dantas; ALMEIDA, Aryelle Leite de; AMARAL, Rafael Queiroz Gurgel do; MOTA, Robson Nascimento da; SOUSA, Paulo Henrique M. de. Kombucha: review. **International Journal Of Gastronomy And Food Science**, [S.L.], v. 22, p. 1-1, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>.



CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa n. 37 de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da prática de eutanásia. 2018.

COSTA, Marina Rolim da; ALENCAR, Ernandes Rodrigues de; LEANDRO, Eliana dos Santos; MENDONÇA, Marcio Antonio; FERREIRA, Wallas Felipe de Souza. Characterization of the kefir beverage produced from yam (*Colocasia esculenta* L.), sesame seed (*Sesamum indicum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 55, n. 12, p. 4851-4858, 14 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-018-3419-0>.

CURRIE, Lloyd A.. Detection and quantification limits: origins and historical overview [adapted from the proceedings of the 1996 joint statistical meetings (American statistical association, 1997). original title. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 391, n. 2, p. 127-134, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670\(99\)00105-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670(99)00105-1).

CURTAIN, Felicity; GRAFENAUER, Sara. Plant-Based Meat Substitutes in the Flexitarian Age: an audit of products on supermarket shelves. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1-14, 30 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11112603>.

DARVISHZADEH, Pariya; ORSAT, Valérie; MARTINEZ, José Luis. Process Optimization for Development of a Novel Water Kefir Drink with High Antioxidant Activity and Potential Probiotic Properties from Russian Olive Fruit (*Elaeagnus angustifolia*). **Food And Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 248-260, 6 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-020-02563-1>.

DELIENS, Tom; MULLIE, Patrick; CLARYS, Peter. Plant-based dietary patterns in Flemish adults: a 10-year trend analysis. **European Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 561-565, 2 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-021-02630-z>.

DERBYSHIRE, Emma J.. Flexitarian Diets and Health: a review of the evidence-based literature. **Frontiers In Nutrition**, [S.L.], v. 3, p. 1-8, 6 jan. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2016.00055>

DE-VUYST, Luc; LEROY, Frédéric. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 432-453, 18 maio 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>

EGEA, Mariana Buranelo; SANTOS, Daiane Costa dos; OLIVEIRA FILHO, Josemar Gonçalves de; ORES, Joana da Costa; TAKEUCHI, Katiuchia Pereira; LEMES, Ailton Cesar. A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], p. 1-17, 5 nov. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1844140>

EUROMONITOR. **10 Tendências Globais de Consumo 2019**. 2019b. Disponível em: [https://go.euromonitor.com/white-paper-ec-2019-10-Tendencias-Globais-de-Consumo-2019.html?utm\\_campaign=Content%20Distribution&utm\\_medium=PR&utm\\_source=Event&utm\\_content=AnuFood%20Brazil](https://go.euromonitor.com/white-paper-ec-2019-10-Tendencias-Globais-de-Consumo-2019.html?utm_campaign=Content%20Distribution&utm_medium=PR&utm_source=Event&utm_content=AnuFood%20Brazil). Acesso em: 17 jan. 2022.

EUROMONITOR. **Consumidores Conscientes impulsionam vendas de produtos veganos.** 2019a. Disponível em: <https://www.euromonitor.com/article/consumidores-conscientes-impulsionam-vendas-de-produtos-veganos>. Acesso em: 17 jan. 2022

FEHÉR, András; GAZDECKI, Michał; VÉHA, Miklós; SZAKÁLY, Márk; SZAKÁLY, Zoltán. A Comprehensive Review of the Benefits of and the Barriers to the Switch to a Plant-Based Diet. **Sustainability**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 4136, 19 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su12104136>

FERNANDES, Ciciane Pereira Marten; FÉLIX, Samuel Rodrigues; NOBRE, Márcia de Oliveira. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 1-14, 24 nov. 2016. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2016v37n1p91>

FIORDA, Fernanda Assumpção; PEREIRA, Gilberto Vinicius de Melo; THOMAZ-SOCCOL, Vanete; RAKSHIT, Sudip Kumar; PAGNONCELLI, Maria Giovana Binder; VANDENBERGHE, Luciana Porto de Souza; SOCCOL, Carlos Ricardo. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 66, p. 86-95, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>

FURUKAWA, Soichi; WATANABE, Taisuke; TOYAMA, Hirohide; MORINAGA, Yasushi. Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 116, n. 5, p. 533-539, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.017>

GARCÍA-DÍEZ, Juan; SARAIVA, Cristina. Use of Starter Cultures in Foods from Animal Origin to Improve Their Safety. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 2544-2569, 4 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18052544>

GFI. **Consumer Research: plant-based market - brazil.** Plant-based market - Brazil. 2018. Disponível em: <https://gfi.org/images/uploads/2018/10/GFI-Brazil-Plant-Based-Market-Consumer-Research-2018.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2022.

Gioacchini, G., Giorgini, E., Olivotto, I., Maradonna, F., Merrifield, D.L., Carnevali, O., 2014. The influence of probiotics on zebrafish *Danio rerio* innate immunity and hepatic stress. *Zebrafish* 11 (2), 98–106.

GODFRAY, H. Charles J.; AVEYARD, Paul; GARNETT, Tara; HALL, Jim W.; KEY, Timothy J.; LORIMER, Jamie; PIERREHUMBERT, Ray T.; SCARBOROUGH, Peter; SPRINGMANN, Marco; JEBB, Susan A.. Meat consumption, health, and the environment. **Science**, [S.L.], v. 361, n. 6399, p. 1-9, 20 jul. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aam5324>

GRAÇA, João; GODINHO, Cristina A.; TRUNINGER, Monica. Reducing meat consumption and following plant-based diets: current evidence and future directions to inform integrated transitions. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 91, p. 380-390, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.046>

GRIFFIN, Laura Elizabeth; DEAN, Lisa Louise. Nutrient Composition of Raw, Dry-Roasted, and Skin-On Cashew Nuts. **Journal Of Food Research**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 1-16, 26 set. 2017. Canadian Center of Science and Education. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v6n6p13>

GRUJOVIĆ, Mirjana Ž.; MLADENOVIĆ, Katarina G.; SEMEDO-LEMSADDEK, Teresa; LARANJO, Marta; STEFANOVIĆ, Olgica D.; KOCIĆ-TANACKOV, Sunčica D.. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: potential use as starters or probiotics. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-21, 13 jan. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12897>

HASAN, M. N.; SULTAN, M. Z.; MAR-E-UM, M.. Significance of Fermented Food in Nutrition and Food Science. **Journal Of Scientific Research**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 373-386, 25 abr. 2014. Bangladesh Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3329/jsr.v6i2.16530>

HEMLER, Elena C; HU, Frank B. Plant-Based Diets for Personal, Population, and Planetary Health. **Advances In Nutrition**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 275-283, 1 nov. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/advances/nmy117>

Hutkins RW. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Hoboken: Wiley Blackwell, 2019.

IARC. Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat; IARC: Lyon, France, 2015. Disponível online em: [https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf). Acesso em: 22/12/2021.

IBGE (Brasil). **Estimativas da população residente com data de referência 1o de julho de 2021**. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ce/panorama>. Acesso em: 22 jan. 2022.

IBOPE. Pesquisa de opinião pública sobre vegetarianismo. IBOPE Inteligência, JOB0416/2018. Brasil, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. ODAIR ZENEON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p.1020, 2008.

KATZ, S. A arte da Fermentação. SESI-SP Editora. 2012.

KEMPER, Joya A.; WHITE, Samantha K.. Young adults' experiences with flexitarianism: the 4cs. **Appetite**, [S.L.], v. 160, p. 105073, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2020.105073>

KIM, D. *et al.* Comparison of traditional and backslopping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. **Lwt**, [S.L.], v. 97, p. 503-507, nov. 2018.

LARANJO, Marta; POTES, Maria Eduarda; ELIAS, Miguel. Role of Starter Cultures on the Safety of Fermented Meat Products. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-11, 26 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00853>

LAUREYS, D.; de-VUYST, LUC. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8. Belgium, 2014.

LAUREYS, David; AERTS, Maarten; VANDAMME, Peter; VUYST, Luc de. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 73, p. 351-361, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>

LEITE, Analy Machado de Oliveira; MIGUEL, Marco Antonio Lemos; PEIXOTO, Raquel Silva; ROSADO, Alexandre Soares; SILVA, Joab Trajano; PASCHOALIN, Vania Margaret Flosi. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000200001>

LEONARSKI, Eduardo; CESCO, Karina; ZANELLA, Eduardo; STAMBUK, Boris U.; OLIVEIRA, Débora de; POLETTO, Patrícia. Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. **Lwt**, [S.L.], v. 135, p. 1-8, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110075>

LI, Ruyi; XU, Yongquan; CHEN, Jianxin; WANG, Fang; ZOU, Chun; YIN, Junfeng. Enhancing the proportion of gluconic acid with a microbial community reconstruction method to improve the taste quality of Kombucha. **Lwt**, [S.L.], v. 155, p. 1-8, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112937>

LIMA, J. R. *et al.* Obtenção de extrato hidrossolúvel de amêndoa de castanha de caju. **EMBRAPA Agroindústria Tropical, Comunicado técnico 232**. Brasil, 2017.

LYNCH, Kieran M.; ZANNINI, Emanuele; WILKINSON, Stuart; DAENEN, Luk; ARENDT, Elke K.. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 587-625, 2 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12440>

MAGALHÃES, F. E. A. et al. Peixe-zebra adulto (*Danio rerio*): um modelo comportamental alternativo de nocicepção induzida por formalina. *Peixe-zebra*, v. 14, n. 5, p. 422-429, 2017.

MALIK, Vasanti S.; WILLETT, Walter C.; HU, Frank B.. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. **Nature Reviews Endocrinology**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 13-27, 20 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2012.199>

MARTÍNEZ-LEAL, Jessica; PONCE-GARCÍA, Nestor; ESCALANTE-ABURTO, Anayansi. Recent Evidence of the Beneficial Effects Associated with Glucuronic Acid Contained in Kombucha Beverages. **Current Nutrition Reports**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 163-170, 15 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13668-020-00312-6>

MATTISON, Christopher P.; ARYANA, Kayanush J.; CLERMONT, Kristen; PRESTENBURG, Eric; LLOYD, Steven W.; GRIMM, Casey C.; WASSERMAN, Richard L.. Microbiological, Physicochemical, and Immunological Analysis of a Commercial Cashew Nut-Based Yogurt. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 21, p. 1-14, 4 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21218267>

Maximino, C., Silva, R.X. do C., da Silva, S. de N.S., do Rodrigues, L.S.D.S., Barbosa, H., de Carvalho, T.S., Le~ao, L.K.D.R., Lima, M.G., Oliveira, K.R.M., Herculano, A.M., 2015. Non-mammalian models in behavioral neuroscience: consequences for biological psychiatry. **Front. Behav. Neurosci.** 9, 233.

MEDAWAR, Evelyn; HUHNS, Sebastian; VILLRINGER, Arno; WITTE, A. Veronica. The effects of plant-based diets on the body and the brain: a systematic review. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-17, 12 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-019-0552-0>

MELO, Ester Lopes de; PINTO, Aline Moreira; BAIMA, Camila Lins Bilby; SILVA, Heitor Ribeiro da; SENA, Iracirema da Silva; SANCHEZ-ORTIZ, Brenda Lorena; TEIXEIRA, Abrahão Victor Tavares de Lima; PEREIRA, Arlindo César Matias; BARBOSA, Raimundo da Silva; CARVALHO, Helison Oliveira. Evaluation of the in vitro release of isoflavones from soybean germ associated with kefir culture in the gastrointestinal tract and anxiolytic and antidepressant actions in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 70, p. 1-1, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2020.103986>

MIGUEL, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo; CARDOSO, Patrícia Gomes; LAGO, Lilian de Assis; SCHWAN, Rosane Freitas. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 1523-1528, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.031>

MIRANDA, Jeniffer Ferreira; RUIZ, Larissa Fernandes; SILVA, Cíntia Borges; UEKANE, Thais Matsue; SILVA, Kelly Alencar; GONZALEZ, Alice Gonçalves Martins; FERNANDES, Fabrício Freitas; LIMA, Adriene Ribeiro. Kombucha: a review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 503-527, 14 jan. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.16029>

NEFFE-SKOCIŃSKA, Katarzyna; SIONEK, Barbara; ŚCIBISZ, Iwona; KOŁOŚYN-KRAJEWSKA, Danuta. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **Cyta - Journal Of Food**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 601-607, 18 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>

NEJATI, Fatemeh; JUNNE, Stefan; NEUBAUER, Peter. A Big World in Small Grain: a review of natural milk kefir starters. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 192-202, 30 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8020192>

NGUYEN, Nguyen Khoi; DONG, Ngan Thi Ngoc; NGUYEN, Huong Thuy; LE, Phu Hong. Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha. **Springerplus**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-6, 24 fev. 2015a. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-015-0872-3>.

NGUYEN, Nguyen Khoi; NGUYEN, Phuong Bang; NGUYEN, Huong Thuy; LE, Phu Hong. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 1149-1155, dez. 2015b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.018>

OLIVEIRA, Nathalia Nogueira; MOTHÉ, Cheila Gonçalves; MOTHÉ, Michelle Gonçalves; OLIVEIRA, Leandra Guimarães de. Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 12-21, 27 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-019-04051-7>

Oliveira, R.F., 2013. Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. *Front. Neural Circ.* 7 (August), 1–15.

OYEYINKA, Adewumi T.; ODUKOYA, Julianah O.; ADEBAYO, Yusuf S.. Nutritional composition and consumer acceptability of cheese analog from soy and cashew nut milk. **Journal Of Food Processing And Preservation**, [S.L.], v. 43, n. 12, p. 1-1, 3 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.14285>

ÖZDEMİR, Nilgün; KÖK-TAŞ, Tuğba; GUZEL-SEYDIM, Zeynep. Effect of Gluconacetobacter spp. on kefir grains and kefir quality. **Food Science And Biotechnology**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 99-106, fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-015-0015-1>

Paiva, L. C. R., & Luiz, G. V. (2020). Comprehending Vegan Identity Construction through Consumption: A qualitative meta-synthesis. *Consumer Behavior Review*, 4(3), 290-308.

PAREDES, Jorge Luís; ESCUDERO-GILETE, María Luisa; VICARIO, Isabel María. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: development and characterization. **Lwt**, [S.L.], v. 154, p. 1-10, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112728>

PATO, Usman *et al.* INFLUENCE OF SKIM MILK AND SUCROSE ON THE VIABILITY OF LACTIC ACID BACTERIA AND QUALITY OF PROBIOTIC COCOGHURT PRODUCED USING STARTERS *Lactobacillus casei* subsp. *casei* R-68 AND *Streptococcus thermophilus*. **Pakistan Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 13-20, 13 abr. 2019. Pakistan Journal of Biotechnology - PJBT. <http://dx.doi.org/10.34016/pjbt.2019.16.1.3>

ROOS, Jonas de; VUYST, Luc de. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 49, p. 115-119, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>

ROSELL, J. M. Yoghurt and kefir and their relation to health and therapeutics. University of Montreal. Quebec, 1932.

ROSENFELD, Daniel L.. The psychology of vegetarianism: recent advances and future directions. **Appetite**, [S.L.], v. 131, p. 125-138, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2018.09.011>

ŞANLIER, Nevin; GÖKCEN, Büşra Başar; SEZGIN, Aybüke Ceyhun. Health benefits of fermented foods. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 506-527, 20 out. 2017. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>

Sarikkha, P., Nitisoravut, R., Poljungreed, I., Boonyarattanakalin, S., 2015. Identification of bacteria and yeast communities in a Thai sugary kefir by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analyses. *J. Industrial Technol.* 11, 25e39.

SHORI, Amal Bakr; ALJOHANI, Ghadi Slman; AL-ZAHRANI, Ashwag Jaman; AL-SULBI, Ohoud Shami; BABA, Ahmad Salihin. Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. **Lwt**, [S.L.], v. 153, p. 1-8, jan. 2022. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112482>

SHORT, Erin C.; KINCHLA, Amanda J.; NOLDEN, Alissa A.. Plant-Based Cheeses: a systematic review of sensory evaluation studies and strategies to increase consumer acceptance. **Foods**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 725-737, 30 mar. 2021. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/foods10040725>

SILVA, Camilla Fernanda Godinho da; SANTOS, Ferlando Lima; SANTANA, Ligia Regina Radomille de; SILVA, Mariangela Vieira Lopes; CONCEIÇÃO, Taiana de Araujo. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. **Food Science And Technology**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 543-550, 22 mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.10617>

SIREENI, Jenni; BAKKER, Nina; JAIKUMAR, Gayathri; OBDAM, Daisy; SLABBEKOORN, Hans; TUDORACHE, Christian; SCHAAF, Marcel. Profound effects of glucocorticoid resistance on anxiety-related behavior in zebrafish adults but not in larvae. **General And Comparative Endocrinology**, [S.L.], v. 292, p. 113461, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113461>

TAMANG, Jyoti Prakash; COTTER, Paul D.; ENDO, Akihito; HAN, Nam Soo; KORT, Remco; LIU, Shao Quan; MAYO, Baltasar; WESTERIK, Nieke; HUTKINS, Robert. Fermented foods in a global age: east meets west. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 184-217, jan. 2020. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12520>

TANGYU, Muzi; MULLER, Jeroen; BOLTEN, Christoph J.; WITTMANN, Christoph. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 103, n. 23-24, p. 9263-9275, 4 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-10175-9>.

TAVARES, Pedro Paulo Lordelo Guimarães; ANJOS, Emanuele Araújo dos; NASCIMENTO, Renata Quartieri; CRUZ, Larissa Farias da Silva; LEMOS, Paulo Vitor França; DRUZIAN, Janice Izabel; OLIVEIRA, Thâmilla Thalline Batista de; ANDRADE, Roberta Barreto de; SOUZA, Adriana Lúcia da Costa; MAGALHÃES-GUEDES, Karina

Teixeira. Chemical, microbiological and sensory viability of low-calorie, dairy-free kefir beverages from tropical mixed fruit juices. **Cyta - Journal Of Food**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 457-464, 1 jan. 2021. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2021.1906753>

Tyl C., Sadler G.D. (2017) pH and Titratable Acidity. In: Nielsen S.S. (eds) Food Analysis. Food Science Text Series. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_22)

VALCARCE, David G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, Juan M.; RIESCO, Marta F.; ROBLES, Vanesa. Probiotics reduce anxiety-related behavior in zebrafish. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 1-4, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03973>

VARGAS, Bruna Krieger; FABRICIO, Mariana Fensterseifer; AYUB, Marco Antônio Záchia. Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: a bibliometric and systematic review. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 44, p. 101332, dez. 2021. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101332>

VIDAL, M. F. Situação da cajucultura nordestina após a seca. Caderno setorial da ETENE. Banco do Nordeste. Brasil, 2016.

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra; BEAUFORT, Sandra; BOUJILLA, Jalloul; SOUCHARD, Jean-Pierre; TAILLANDIER, Patricia. Understanding Kombucha Tea Fermentation: a review. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 580-588, mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2016). Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with Kombucha “tea fungus.” *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 490–498.  
<https://doi.org/10.1111/ijfs.13006>

WHITTINGTON, H. D.; DAGHER, S. F.; BRUNO-BARCENA, J. M. Production and Conservation of Starter Cultures: From “Backslopping” to Controlled Fermentations. In *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut*

WOLF, Christopher A.; MALONE, Trey; MCFADDEN, Brandon R.. Beverage milk consumption patterns in the United States: who is substituting from dairy to plant-based beverages?. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 103, n. 12, p. 11209-11217, dez. 2020. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18741>

WPP. **United Nations - World Population Prospects**. 2019. Disponível em:  
<https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>. Acesso em: 17 jan. 2022.

WU, Qun; ZHU, Yang; FANG, Cheng; WIJFFELS, Rene H.; XU, Yan. Can we control microbiota in spontaneous food fermentation? – Chinese liquor as a case example. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 110, p. 321-331, abr. 2021. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.011>

YANG, Zhiwei; ZHOU, Feng; JI, Baoping; LI, Bo; LUO, Yangchao; YANG, Li; LI, Tao. Symbiosis between Microorganisms from Kombucha and Kefir: potential significance to the



enhancement of kombucha function. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 160, n. 2, p. 446-455, 23 set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8361-6>

YUKSEL, A. K.; SAT, I. G.; YUKSEL, M.; CAKMAKCI, S. A COMPARATIVE STUDY ON THE PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS, ORGANIC ACID PROFILES, MINERAL COMPOSITIONS AND SENSORY PROPERTIES OF ICE CREAMS PRODUCED WITH DIFFERENT TYPES OF NUTS. **Carpathian Journal of Food Science and Technology** 9(3):137-151. Turquia, 2017

ZARTL, Barbara; SILBERBAUER, Karina; LOEPPERT, Renate; VIERNSTEIN, Helmut; PRAZNIK, Werner; MUELLER, Monika. Fermentation of non-digestible raffinose family oligosaccharides and galactomannans by probiotics. **Food & Function**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 1638-1646, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7fo01887h>

**APÊNDICE A – RESUMO DA TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E  
REGRESSÃO PARA PH, SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST) E ACIDEZ  
TITULÁVEL TOTAL (ATT).**

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		pH	SST	ATT
Amostra (A)	2	2,6315 *	1,9601 *	29,502 *
Erro (a)	3	0,0004	0,0012 *	0,066
Tempo (B)	7	4,0498 *	1,0827 *	91,931 *
Interação (A x B)	14	0,2017 *	0,0854 *	131,68 *
TE/LCF	7	1,8981 *	0,4661 *	48,2432 *
Linear	1	11,6867 *	2,5879 *	328,6741 *
Falta de ajuste	6	0,2667 *	0,1126 *	1,5048 *
Quadrática	1	1,4264 *	0,0529 *	0,8978 *
Falta de ajuste	5	0,0347 *	0,0225 *	1,6262 *
Cúbica	4	0,0633 *	0,0122 <sup>NS</sup>	4,4803 *
Falta de ajuste	1	0,0267 *	0,0251 *	0,09127 *
TE/LCFB	7	1,9671 *	0,5994 *	44,9564 *
Linear	1	12,1720 *	3,5977 *	301,6705 *
Falta de ajuste	6	0,2664 *	0,0998 *	2,1707 *
Quadrática	1	1,3290 *	0,3342 *	2,1877 *
Falta de ajuste	5	0,0538 *	0,0529 *	2,1673 *
Cúbica	1	0,1810 *	0,0263 *	7,8114 *
Falta de ajuste	4	0,0221 *	0,0596 *	0,7563 *
TE/LCB	7	0,5878 *	0,1880 *	8,8334 *
Linear	1	4,0569 *	1,0910	59,5886 *
Falta de ajuste	6	0,0097 *	0,0375 *	0,3743 *
Quadrática	1	0,0470 *	0,0426 *	0,2182 *
Falta de ajuste	5	0,0022 <sup>NS</sup>	0,0365 *	0,4055 *
Cúbica	1	0,0004 <sup>NS</sup>	0,0084 <sup>NS</sup>	1,8097 *
Falta de ajuste	4	0,0026 <sup>NS</sup>	0,0435 *	0,0545 <sup>NS</sup>

\* Significativo a 5% de probabilidade. NS – não significativo a 5% de probabilidade. TE – tempo.

**APÊNDICE B - RESUMO DA TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E  
REGRESSÃO PARA OS AÇÚCARES GLICOSE (GLI), FRUTOSE (FRU),  
SACAROSE (SAC) E RAFINOSE (RAF).**

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		GLI	FRU	SAC	RAF
Amostra (A)	2	0,607 *	0,0261 *	0,2938 *	0,0012 *
Erro (a)	3	0,000001	0,000005	0,00016	0,00005
Tempo (B)	3	0,0109 *	0,0077 *	0,9668 *	0,0151 *
Interação (A x B)	6	0,0149 *	0,0131 *	0,0545 *	0,0029 *
TE/LCF	3	0,0011 *	0,0029 *	0,3378 *	0,0073 *
Linear	1	0,0014	0,0063 *	0,6082 *	0,0212 *
Falta de ajuste	2	0,0010 *	0,0012 *	0,2027 *	0,0004 *
Quadrática	1	0,0004 *	0,0001 *	0,3379 *	0,0003 *
Falta de ajuste	1	0,0016 *	0,0024 *	0,0676 *	0,0005 *
Cúbica	1	0,0016 *	0,0024 *	0,0676 *	0,0005 *
Falta de ajuste	0	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>
TE/LCFB	3	0,0155 *	0,0127 *	0,3262 *	0,0093 *
Linear	1	0,0133 *	0,0095 *	0,6190 *	0,0252 *
Falta de ajuste	2	0,0167 *	0,0144 *	0,1798 *	0,0014 *
Quadrática	1	0,0082 *	0,0076 *	0,3080 *	0,0019 *
Falta de ajuste	1	0,0252 *	0,0213 *	0,0516 *	0,0010 *
Cúbica	1	0,0252 *	0,0213 *	0,0516 *	0,0010 *
Falta de ajuste	0	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>
TE/LCB	3	0,0240 *	0,0183 *	0,4117 *	0,0043 *
Linear	1	0,0585 *	0,0427 *	1,1797 *	0,0029 *
Falta de ajuste	2	0,0069 *	0,0061 *	0,0279 *	0,0051 *
Quadrática	1	0,0137 *	0,0114 *	0,0149 *	0,0032 *
Falta de ajuste	1	0 <sup>NS</sup>	0,0009 *	0,0408 *	0,0071 *
Cúbica	1	0 <sup>NS</sup>	0,0009 *	0,0408 *	0,0071 *
Falta de ajuste	0	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>

\* Significativo a 5% de probabilidade. NS – não significativo a 5% de probabilidade. TE – tempo.

**APÊNDICE C - RESUMO DA TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA E  
REGRESSÃO PARA OS ÁCIDOS GLUCURÔNICO (GLU), LÁTICO (LAT),  
ACÉTICO (ACE) E CÍTRICO (CIT).**

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		GLU	LAT	ACE	CIT
Amostra (A)	2	1,5113 *	5,6757 *	6,0363 *	0,2757 *
Erro (a)	3	0,0034	0,0015	0,0033	0,0005
Tempo (B)	3	1,8725 *	2,3398 *	28,5067 *	0,5974 *
Interação (A x B)	6	0,1503 *	0,5954 *	1,7469 *	0,1128 *
TE/LCF	3	1,0368 *	1,6753 *	17,4920 *	0,4708 *
Linear	1	2,2743 *	0,9522 *	48,4834 *	1,0900 *
Falta de ajuste	2	0,4181 *	2,0368 *	1,9963 *	0,1613 *
Quadrática	1	0,8259 *	3,5662 *	0,0339 *	0,0016 *
Falta de ajuste	1	0,0103 *	0,5075 *	3,9588 *	0,3210 *
Cúbica	1	0,0103 *	0,5075 *	3,9588 *	0,3210 *
Falta de ajuste	0	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>
TE/LCFB	3	0,9054 *	1,8414 *	11,7326 *	0,3445 *
Linear	1	1,4374 *	4,0361 *	29,5538 *	0,8399 *
Falta de ajuste	2	0,6395 *	0,7442 *	2,8220 *	0,0968 *
Quadrática	1	1,0246 *	1,3445 *	0,6587 *	0,0003 <sup>NS</sup>
Falta de ajuste	1	0,2544 *	0,1438 *	4,9854 *	0,1933 *
Cúbica	1	0,2544 *	0,1438 *	4,9854 *	0,1933 *
Falta de ajuste	0	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>
TE/LCB	3	0,2308	0,0138 *	2,7757 *	0,0076 *
Linear	1	0,2337 *	0,0339 *	7,6916 *	0,0102 *
Falta de ajuste	2	0,2295 *	0,0038 <sup>NS</sup>	0,3178 *	0,0064 *
Quadrática	1	0,2758 *	0,0076 <sup>NS</sup>	0,0134 *	0,0101 *
Falta de ajuste	1	0,1831 *	0 <sup>NS</sup>	0,6223 *	0,0027 *
Cúbica	1	0,1831 *	0 <sup>NS</sup>	0,6223 *	0,0027 *
Falta de ajuste	0	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>

\* Significativo a 5% de probabilidade. NS – não significativo a 5% de probabilidade. TE – tempo.