



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

RAFAEL SOUZA CRUZ

OBTENÇÃO DE SCOPY DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE
SUBPRODUTOS DE FRUTAS E APLICAÇÃO EM SMOOTHIE

FORTALEZA

2023

RAFAEL SOUZA CRUZ

OBTENÇÃO DE SCOBY DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE
SUBPRODUTOS DE FRUTAS E APLICAÇÃO EM *SMOOTHIE*

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Larissa Morais Ribeiro da Silva.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giovana Matias do Prado.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

C964o Cruz, Rafael Souza.
Obtenção de SCOBY de celulose bacteriana a partir de subprodutos de frutas e aplicação em smoothie /
Rafael Souza Cruz. – 2023.
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2023.

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

Coorientação: Profa. Dra. Giovana Matias do Prado.

1. Kombucha. 2. Subproduto. 3. Aproveitamento. I. Título.

CDD 664

RAFAEL SOUZA CRUZ

OBTENÇÃO DE SCOPY DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE SUBPRODUTOS
DE FRUTAS E APLICAÇÃO EM *SMOOTHIE*

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

Aprovada em: 17/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Giovana Matias do Prado (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Eveline de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Ana Paula Colares de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – Campus - Acaraú

A Deus.

Aos meus pais, Maria de Jesus Souza Peixoto, Manoel Domingos Peixoto e Josefa Souza Peixoto.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva, pela excelente orientação, que me acolheu como seu orientando, que me proporcionou participações em bancas de defesas de TCCs, que me incentivou a participar de eventos acadêmicos e, que nunca me deixou cair, mesmo nos últimos minutos desta caminhada árdua.

À Profa. Dra. Giovana Matias do Prado, pela excelente orientação e por sempre está presente na minha caminhada, que me ajudou também a chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Machado, por está junto nas orientações desta pesquisa.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas. Agradeço a toda minha família, por sempre me ajudarem quando precisei e por compreender as minhas constantes mudanças de humor, a ausência em suas vidas, por nunca deixarem faltar o de mais essencial em minha vida.

Aos amigos Marcos Venícius Nunes, Elisabeth Mariano Batista, Lucas Pacheco Cavalcante, Kênia Bezerra, Erilane Girão, Madeline Girão, Maria Helena, Carlos Fídel, Sherlene Lira, Kaline, Carlos Adriano, Mírian Rebouças, Márcia, que se fizeram presente, ensinando-me o sentido da verdadeira amizade.

Às minhas mães Maria de Jesus e Zuleide pelo apoio até o prezado momento, aos meus tios Fatima e Francisco pelo apoio.

Aos meus orientadores(as) Larissa Morais Ribeiro da Silva, Giovana Matias do Prado e Paulo Henrique Machado por ter sido paciente e ter aceitado o desafio, dispondo-se sempre a me ajudar, orientando e me ensinando muito além do conhecimento acadêmico. A todos os meus professores, desde os da educação infantil aos da pós-graduação, que sempre acreditaram em meu potencial.

Aos servidores e profissionais da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici por se disporem a ajudar, contribuindo para uma educação de qualidade nesta instituição.

Não menos importante, a mim mesmo. Por tudo o que passei e pela forma que me

deixei fortalecer. Por nunca ter desistido, mas por ter consciência que as quedas foram necessárias. Por me aceitar não ser forte o tempo todo, e retirar pesos e pressões sobre meus ombros sozinho. Por me amar a ponto de conquistar meus sonhos. Por estar comigo mesmo sempre que eu precisei.

A todos que direta, ou indiretamente, participaram deste trabalho e se fizeram presentes em minha vida para a realização e conquista deste sonho!

A todos tenho gratidão!

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Autor: **Charles Darwin.**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver pós de celulose bacteriana (SCOBY) a partir da fermentação do kombuchá com subprodutos de frutas tropicais, como acerola e maracujá, selecionando os de melhor rendimento. Esses pós foram liofilizados e caracterizados quanto a parâmetros físico-químicos e composição centesimal, FTIR, TGA e Toxicidade. Em seguida, foram utilizados na elaboração de *smoothies*, que foram avaliados e caracterizados também. Os resultados iniciais foram obtidos durante a fermentação de sete dias, com valores de pH variando de 4,5 a 2,49. Os pó de SCOBY de acerola apresentou melhor rendimento (6,25%) e maior teor de cinzas (2,58%) quando comparado aos demais. Em relação a acidez, o pó de SCOBY de acerola apresentou menor acidez (3,19 meq.L⁻¹), seguido do pó de maracujá (3,77 meq.L⁻¹) e o de chá verde (4,15 meq.L⁻¹). Para o teor de vitamina C o pó de SCOBY de acerola apresentou destaque na composição dessa substância (1998,04 ± 50,75 mg/100 g). O teor de sólidos solúveis foi semelhante para os pós de SCOBY de acerola (6,67 ± 0,32 °Brix) e pó de SCOBY de maracujá (6,13 ± 0,06), sendo inferiores ao pó de SCOBY controle (8,13 ± 0,06 °Brix). O teor de proteínas foi inferior a 2% e a atividade de água foi inferior a 0,3 para todos os pós de SCOBY avaliados. No que diz respeito às contagens microbianas, foram constatadas contagens de bactérias ácido lácticas de 2log e mesófilos de 3log. Não foram detectadas colônias para as análises de bactérias acéticas e leveduras totais. Os pós de SCOBY de acerola, maracujá e chá verde mostraram-se promissores, com características físico-químicas adequadas, teores significativos de vitamina C e segurança microbiológica. Na aplicação dos pós em *smoothie*, para a análise reológica dos *smoothies*, observou-se um comportamento pseudoplástico, com maior viscosidade para o *smoothie* adicionado de pó de maracujá. Ao serem adicionados aos *smoothies*, esses pós enriqueceram significativamente o valor nutricional dos produtos. Além disso, as análises de FTIR e TG proporcionaram *insights* valiosos sobre as mudanças químicas nos *smoothies* devido à adição de SCOBY, aprimorando nossa compreensão sobre sua composição e qualidade. Os testes em zebrafish não indicaram efeitos negativos nas formulações, enquanto os testes de toxicidade confirmaram a segurança dos *smoothies* para o consumo humano, tanto puros quanto diluídos. Esses resultados abrem oportunidades empolgantes na indústria de alimentos, oferecendo opções nutricionais e sustentáveis aos consumidores.

Palavras-chave: Kombucha; suproduto; aproveitamento.

ABSTRACT

The purpose of this research was to develop bacterial cellulose powders (SCOBY) from the fermentation of kombucha with by-products of tropical fruits, such as acerola and passion fruit, selecting those with the best yield. These powders were freeze-dried and characterized in terms of physical-chemical parameters and proximate composition, FTIR, TGA and Toxicity. They were then used in the preparation of smoothies, which were also evaluated and characterized. Initial results were obtained during seven-day fermentation, with pH values ranging from 4.5 to 2.49. Acerola SCOBY powder showed better yield (6.25%) and higher ash content (2.58%) when compared to the others. Regarding acidity, acerola SCOBY powder had the lowest acidity (3.19 meq.L⁻¹), followed by passion fruit powder (3.77 meq.L⁻¹) and green tea powder (4.15 meq.L⁻¹). For vitamin C content, acerola SCOBY powder presented higher level this compound (1998.04 ± 50.75 mg/100 g). The soluble solids content was similar for acerola SCOBY powder (6.67 ± 0.32 °Brix) and passion fruit SCOBY powder (6.13 ± 0.06), being lower than the control SCOBY powder (8.13 ± 0.06 °Brix). The protein content was less than 2% and the water activity was less than 0.3 for all SCOBY powders evaluated. Regarding microbial counts, lactic acid bacteria counts of 2log and mesophiles of 3log were found. No colonies were detected for the analyzes of acetic bacteria and total yeasts. Acerola, passion fruit and green tea SCOBY powders showed promise, with adequate physicochemical characteristics, significant vitamin C content and microbiological safety. When applying the powders in smoothies, for the rheological analysis of the smoothies, a pseudoplastic behavior was observed, with greater viscosity for the smoothie added with passion fruit powder. When added to smoothies, these powders significantly enriched the nutritional value of the products. Furthermore, FTIR and TG analyzes provided valuable insights into the chemical changes in smoothies due to the addition of SCOBY, enhancing our understanding of their composition and quality. Tests on zebrafish indicated no negative effects on the formulations, while toxicity tests confirmed the safety of the smoothies for human consumption, both pure and diluted. These results open up exciting opportunities in the food industry, offering nutritional and sustainable options to consumers.

Keywords: Kombucha; by-product; utilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Fluxograma do preparo do líquido do kombuchá com o Start e obtenção da celulose para as formulações.....	34
Figura 2	– Processo fermentativo, recipientes com subprodutos de maracujá (a), acerola e chá verde (c) em repouso.....	43
Figura 3	– Obtenção da celulose bacteriana de acerola, maracujá e chá verde.....	44
Figura 4	– Obtenção dos pós de SCOBY's obtidos com os subprodutos de acerola, maracujá e chá verde, respectivamente.....	45
Figura 5	– Efeito da amostra A (pó de scoby de acerola); efeito da amostra B (pó de scoby de maracujá) e efeito da amostra C (pó de scoby de cha verde) sob a atividade locomotora do zebrafish (Danio rerio) adulto no Teste de Campo Aberto.....	55
Figura 6	– FTIR no pó de SCOBY de acerola, maracujá e chá verde.....	57
Figura 7	– Análise termogravimétrica nos pó de SCOBY's de acerola, maracujá e chá verde.	59
Figura 8	– Processamento das bebidas com a aplicação dos pós desenvolvidos.	60
Figura 9	– Reogramas do smoothie das formulações F0 (controle), F1 (scoby de acerola), F2 (scoby de maracujá) e F3 (scoby de chá verde). Viscosidade em função da taxa de cisalhamento.	65
Figura 10	– Efeito das Formulações (F0;F1; F2 e F3) dos smoothies sob a atividade locomotora do zebrafish (Danio rerio) adulto no Teste de Campo Aberto.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação da aplicação da celulose bacteriana (SCOBY) do kombuchá..	29
Tabela 2	– Formulações dos sistemas fermentativos na obtenção dos SCOBYs.	35
Tabela 3	– Formulações da bebida tipo smoothie adicionada de pó de SCOBY.	40
Tabela 4	– Peso úmido das membranas de celulose produzidas ao final da fermentação.	41
Tabela 5	– Parâmetros de controle durante o período fermentativo avaliado.	42
Tabela 6	– Peso úmido, peso seco da celulose bacteriana e o rendimento após desidratação.	46
Tabela 7	– Caracterização Físico-química dos pós de SCOBY's de kombuchá.	47
Tabela 8	– Caracterização da Composição proximal dos pós de SCOBYs de bombuchá.	48
Tabela 9	– Quantificação de microrganismos presentes nas amostras de pós.	51
Tabela 10	– Mortalidade por dose analisa para o teste de toxicidade aguda das amostras A, B e C dos pós de SCOBY frente ao organismo modelo zebrafish.	56
Tabela 11	– Análises físico-químicas, centesimal e Vitamina C das bebidas tipo smoothie com e sem adição de pó de SCOBY.	61
Tabela 12	– Análises microbiológicas das bebidas tipo smoothie sem e com adição de pó de SCOBY.	64
Tabela 13	– Mortalidade por dose analisada para o teste de toxicidade aguda das formulações de smoothies.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aw	Atividade de água
CB	Celulose Bacteriana
F0	Formulação Controle
F1	Formulação um
F2	Formulação dois
F3	Formulação três
FEXAB	Formulação com Extrato de Abacaxi
FEXAC	Formulação com Extrato de Acerola
FEXCA	Formulação com Extrato de Caju
FEXGO	Formulação com Extrato de Goiaba
FEXGR	Formulação com Extrato de Graviola
FEXMA	Formulação com Extrato de Maracujá
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
SCOPY	Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts
TGA	Termogravimetria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivo Específicos.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Surgimento e caracterização do kombuchá	20
3.3.1	<i>Chá</i>	23
3.3.3	<i>pH</i>	24
3.3.4	<i>Substrato</i>	25
3.3.5	<i>SCOBY</i>	26
3.4	Aproveitamento dos coprodutos de frutas tropicais como substrato na formação do SCOBY	26
3.5	Cultivo e formação de SCOBYs.....	27
3.6	Aproveitamento dos SCOBYs.....	28
3.7	Shake alimentar do tipo <i>Smoothie</i>	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Local de execução do experimento	32
4.2	Matérias-primas utilizadas na pesquisa	33
4.2.1	<i>Coprodutos de frutas tropicais</i>	33
4.2.2	<i>Açúcar</i>	33
4.2.3	<i>SCOBY</i>	33
4.2.4	<i>Shake tipo Smoothie</i>	33
5	METODOLOGIA	34
5.1	Obtenção do líquido para fermentação a partir dos coprodutos de frutas tropicais.....	34

5.2	Utilização dos coprodutos como substrato alternativo na fermentação do kombuchá .	34
5.3	Elaboração e determinação das formulações dos SCOBYs com extratos de coprodutos de frutas tropicais.....	34
5.4	Obtenção dos pós dos SCOBYs selecionados.....	35
5.5	Caracterização dos pós do SCOBY do kombuchá	36
5.5.1	<i>Análises Físico-químicas</i>	36
5.5.2	<i>Determinação de umidade</i>	36
5.5.3	<i>Determinação do pH</i>	36
5.5.4	<i>Determinação de Sólidos Solúveis</i>	36
5.5.5	<i>Determinação da Acidez Titulável</i>	36
5.5.6	<i>Determinação da vitamina C</i>	36
5.5.7	<i>Atividade de água (Aw)</i>	37
5.5.8	<i>Microbiológica</i>	37
5.6	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).....	37
5.7	Análise termogravimétrica (TGA).....	38
5.8	Avaliação da toxicidade aguda e por locomoção dos pós de SCOBYs utilizando Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo <i>in vivo</i>	38
6	DESENVOLVIMENTO DO SMOOTHIE	39
6.1	Processamento da bebida tipo <i>smoothie</i>	39
6.2	Análises físico-químicas.....	40
6.3	Composição Centesimal	40
6.4	Análise microbiológica dos <i>smoothies</i>	40
6.5	Análise Reologia dos <i>smoothie</i> adicionado do pó dos SCOBYs.....	40
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
8.1	Testes preliminares	41

8.2	Obtenção da celulose bacteriana.....	43
8.3	Rendimento em peso dos pós de SCOBY	44
8.4	Análise Microbiológica	51
8.5	Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)	53
8.6	Teste de Toxicidade aguda por 96 h dos pós de SCOBYs kombucha	55
8.7	Análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	56
8.8	Análise Termogravimétrica (TGA)	58
9	PROCESSAMENTO DOS <i>SMOOTHIES</i>.....	60
10	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, CENTESIMAL, VITAMINA C E MICROBIOLÓGICAS DAS FORMULAÇÕES DOS <i>SMOOTHIES</i>.....	61
11	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	64
12	ANÁLISE REOLÓGICA	65
13	ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DE CAMPO ABERTO).....	66
14	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA POR 96 H DOS <i>SMOOTHIES</i>.....	68
15	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
16	SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – CADASTRO NO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO	82
	ANEXO B – CERTIFICADO DO CEUAP-UFC	83

1 INTRODUÇÃO

O kombuchá é uma bebida gaseificada e refrescante, levemente adocicada e ácida, que é obtida por meio da fermentação da infusão das folhas de chá verde ou chá preto adoçado com açúcar. A origem do nome kombuchá é asiática, com relatos na China por volta de 2000 anos atrás, e hoje encontra-se difundido pelo Oriente e Ocidente devido à popularidade de seus benefícios terapêuticos, como antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno, antidiabético, combate a úlceras e colesterol (DAN, 2018). As características do kombuchá são dependentes de diversos fatores, tais como: o tipo de chá utilizado; os microrganismos formadores da *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts* (SCOBY) o tempo e a temperatura de fermentação, que dura em média de 7 a 10 dias (LEAL *et al.*, 2018).

A apreciação do kombuchá expandiu-se, principalmente, devido aos seus benefícios para a saúde humana e sua facilidade de preparo artesanal, já que a bebida é composta apenas por açúcar, chá e SCOBY. A exata composição microbiana do kombuchá não pode ser especificada por conta da variação de sua composição, o que a difere entre os lugares de onde foi formada, dependendo assim da fonte do inóculo para que o chá seja fermentado (WATAWANA *et al.*, 2015).

A formação do SCOBY decorre em condições regulares de temperatura e pH, em que as bactérias utilizam o oxigênio presente no meio, estimulando a multiplicação e favorecendo a síntese da celulose bacteriana, que se sobrepõem a superfície do líquido durante a fermentação (SCHROEDER, 2019; WATAWANA *et al.*, 2015).

O SCOBY é constituído por uma gama de microrganismos que pertencem a diferentes gêneros, como *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* (JAYABALAN *et al.*, 2014). Durante a fermentação, as leveduras consomem a sacarose, hidrolisando-a em glicose e frutose, que são convertidos em etanol e gás carbônico, enquanto as bactérias estão associadas com a produção de ácido glucônico e ácido acético. Encontra-se presente nessa bebida uma variedade de compostos como vitaminas hidrossolúveis, aminoácidos, pigmentos, lipídios, proteínas, enzimas hidrolíticas, etanol, polifenóis, minerais, produtos metabólicos de leveduras e bactérias (LEAL *et al.*, 2018; MIRANDA *et al.*, 2022), que podem permanecer agregados na celulose bacteriana.

Pelo fato de a fermentação estar baseada no consumo do açúcar pela associação de bactérias e leveduras, é possível imaginar que o preparo do kombuchá pode acontecer em diferentes meios além do chá, como relatam Jayabalan *et al.* (2014), fazendo referências a estudos anteriores sobre tentativas de aplicação de substratos diferentes do tradicional para a

primeira fermentação do kombuchá, até mesmo a aplicação de resíduos de frutas tropicais.

A elaboração de novos produtos à base do SCOBY, produzido com resíduos de frutas tropicais (polpas e cascas) que compreendem os coprodutos, é uma alternativa tecnológica que traz benefícios ambientais que está ao alcance de todos, podendo ser aplicada tanto no ambiente industrial como residencial. Pensando nisso, a seleção dos coprodutos será feita de acordo com as frutas mais comercializadas, nas quais geram um maior volume de resíduos. Além disso, a utilização do alimento, de forma sustentável, reduz a produção de lixo orgânico e pode estar associada à geração de novos alimentos, apresentando-se como uma promissora alternativa para diferentes áreas da indústria alimentícia.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de pó obtido a partir da liofilização dos SCOBYs de kombuchá elaborado com coprodutos de frutas tropicais (acerola, caju, goiaba e maracujá) selecionando dois deles a partir dos melhores rendimentos, e empregado em um *smoothie*, a fim de potencializar os constituintes nutricionais e funcionais da bebida, tornando-o um alimento atrativo para consumidores que buscam uma alimentação mais saudável em suas dietas, constituindo, assim, uma opção de novo alimento para as indústrias de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver pós de celulose bacteriana (SCOOPY) a partir da fermentação do kombuchá com subprodutos de frutas tropicais selecionando os de melhor rendimento para posterior aplicação na elaboração de shake tipo smoothie.

2.2 Objetivo Específicos

- ✓ Elaborar kombuchás, fermentadas a partir de subprodutos de frutas tropicais (acerola, e maracujá), para obtenção de SCOBYs visando selecioná-los baseado em seus rendimentos;
- ✓ Liofilizar os SCOBYs selecionados;
- ✓ Caracterizar os pós por meio dos parâmetros físico-químicos, composição centesimal e vitamina C dos *smoothies* elaborados;
- ✓ Avaliar microbiologicamente os *smoothies* obtidos
- ✓ Avaliar as propriedades do material em pó através de análises de Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), Umidade e Atividade de água (aw);
- ✓ Avaliar a atividade locomotora dos pós obtidos;
- ✓ Desenvolver *smoothie* utilizando o pó do *SCOBY* na sua formulação visando agregar valor nutricional;
- ✓ Avaliar a reologia de todos os *Smoothie*;
- ✓ Avaliar a toxicidade *in vivo* dos *Smoothies* obtidos;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Surgimento e caracterização do kombuchá

O kombuchá tem origem asiática, com relatos na China por volta de 2000 anos atrás, e hoje encontra-se difundido pelo Oriente e Ocidente (BATISTA, 2019; SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000; MARSH *et al.*, 2014). O kombuchá se tornou bastante apreciado por ser uma bebida doce fermentada à base de chá verde ou preto. De acordo com Santos (2016), era conhecido como “o chá da imortalidade”, no Nordeste da China.

Por volta de 414 d. C., um médico de nome Kombu, teria levado a bebida, considerada o “chá da imortalidade, da Coreia até o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador Inkyo (JAYABALAN, 2014), e surgiu então a nova classificação, que ficou conhecida como “Kombu chá” ou “chá do kombu” (KAUNFMANN, 2013).

Segundo Batista (2019) e Marsh *et al.* (2014), o kombuchá tornou-se conhecido popularmente devido aos relatos e indícios dos seus benefícios ocasionados a saúde da população com propriedades antimicrobiana, desintoxicação do fígado, hipercolesterolemia, antioxidante, anticancerígena e hipoglicêmica, segundo estudos feitos com ratos e em indivíduos com diabetes induzido por aloxana (SANTOS, 2016). De acordo com a Instrução Normativa de nº 41 de 17 de setembro de 2019 (BRASIL, 2019), que regulamenta o kombuchá como uma bebida fermentada obtida pela respiração aeróbia e anaeróbia dos microrganismos presentes no chá, obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* (chá verde ou chá preto) com adição de açúcares para a cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas com tempo de fermentação recomendado entre 1 a 2 semanas.

Ao retirar a película celulósica (SCOBY), após o período indicado, obtêm-se uma bebida fermentada com sabor levemente ácido, que pode ser consumida dessa forma ou passar por uma segunda fermentação visando carbonatar e saborizar, para tal, transfere-se a bebida para uma garrafa de plástico vazia com tampa, adiciona-se açúcar ou frutas e aguarda-se de 1 a 3 dias até a garrafa ficar firme devido à produção de gás (SANTOS, 2016).

Muitas vezes, a produção do Kombuchá realiza-se em ambiente não fabril (caseiro) com isso o risco de contaminação aumenta. Porém, os microrganismos presentes no chá podem influenciar no crescimento de microrganismos contaminantes, tendo em vista a alta carga microbiana e a competição por nutrientes do meio, além disso, os compostos formados, como ácido acético e etanol, podem apresentar ação antimicrobiana capaz de impedir o crescimento de contaminantes do chá (MARSH *et al.*, 2014).

No Brasil, a produção da bebida cresceu no último ano, com o surgimento de diversas marcas, conforme a revista Casa Vogue (2018). No Paraná, uma das fábricas onde a bebida é produzida é a Campo Largo, além da Biozen e de outras fabricantes artesanais. Como já existe em outros lugares do mundo, foi inaugurado em janeiro de 2017 o primeiro bar especializado em Kombuchá do Brasil, localizado em São Paulo, onde o cliente pode consumir a bebida na loja, direto de barris de chope ou adquirir as garrafinhas.

3.2 Propriedades biológicas do kombuchá

O kombuchá se destaca por ser uma bebida refrescante e com a combinação da riqueza de nutrientes e a diversidade de microrganismos, que auxiliam no controle e equilíbrio da microbiota intestinal, despertando assim o interesse da população que almeja uma melhoria na qualidade de vida (MAIA *et al.*, 2020).

O equilíbrio da microbiota torna-se uma proteção contra invasores, na medida em que fortalece o nosso sistema imunológico. Isso se deve aos benefícios associados ao consumo do chá fermentado, por apresentar em sua composição uma carga de bactérias e leveduras responsáveis por essa regulação. Além deste controle, os microrganismos presentes em sua composição, também agem na prevenção da intolerância à lactose, síndrome do intestino irritado, síndrome de Crohn e atuam também no controle glicêmico. Por isso, o grande atributo a nível biológico do kombuchá é promover o bem estar, através de seus princípios ativos (BRUSCHI; SOUSA; MODESTO, 2018).

A justificativa sobre a atividade antimicrobiana e antifúngica associada ao consumo de kombuchá se dá de acordo com a formação de ácidos orgânicos e catequinas durante a fermentação que atuam na inibição do crescimento dos agentes patogênicos como *Helicobacter pylori*, *Leuconostoc monocytogenes*, *Yersinia entero colitica*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* (WATAWANA *et al.*, 2015).

De acordo com Medeiros e Cechinel-Zanchett (2019), o consumo do kombuchá também está associado à prevenção de câncer, devido à presença de compostos químicos como: ácido acético, glicônico e glicurônico, além dos polifenóis que são formados durante o processo fermentativo. Tais compostos estimulam a capacidade da programação da morte de células cancerígenas, sendo essa, evidenciada em testes *in vivo*, sendo demonstrada a diminuição da replicação das células carcinogênicas. Os compostos bioativos presentes na bebida, aparentemente, auxiliam nos tratamentos utilizados nessa enfermidade, como

quimioterapia e radioterapia (MEDEIROS; CECHINEL- ZANCHETT, 2019).

Para pessoas portadoras de diabetes tipo *mellitus* (que ao longo prazo acarreta em diversos problemas como: nefropatia, glaucoma e neuropatia), o consumo dokombuchá torna-se interessante pelo seu efeito hipoglicêmico. Essas complicações podem ser evitadas fazendo-se o controle da glicemia. Durante pesquisas feitas em animais, observou-se um controle nos níveis de glicose circulante no organismo, visto que ocorreu uma redução do nível glicêmico, como também ocorreu à redução da lentificação do esvaziamento gástrico, tornando-se possível também à observação da regeneração das células β -pancreáticas e inibição da enzima α -amilase, auxiliando na melhoria da distribuição da glicose e aumentando o estímulo da secreção de insulina, ação efetiva associada aos compostos fenólicos e ácidos orgânicos presentes (ALOULOU; HAMDEN; ELLOUM, 2012).

Outro benefício que está associado à ação biológica decorrente do consumo do kombuchá é a redução do colesterol, processo ocasionado pela ação dos polifenóis, nos quais atuam na inibição da ação das lipases pancreáticas, diminuindo a concentração dos ácidos graxos livres, LDL-c, triglicerídeos totais (devido à ação antioxidante, a sua influência a redução da atividade aterogênica) e atuam no aumento do HDL-c. Devido à redução do LDL-c, a ação antioxidante atua também na redução de atividade aterogênica (MEDEIROS; CECHINEL-ZANCHETT, 2019).

Outra potencialidade do kombuchá está na redução do estresse oxidativo, colaborando com a melhoria da saúde física e mental da população consumidora dessa bebida, diminuindo as incidências de doenças autoimunes inflamatórias, prevenindo doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), problemas cardiovasculares, melhorando a digestão e aumentando a função hepatoprotetora, onde esses benefícios se associam a presença dos flavonoides presentes na bebida (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2011; WANG *et al.*, 2014)

Por meio de informações disponibilizadas ao longo dos anos, o consumo do kombuchá se intensificou devido às suas propriedades profiláticas e terapêuticas, de modo que, as ações de suas propriedades estão baseadas em observações, depoimentos e resultados demonstrados cientificamente (ALOULOU; HAMDEN; ELLOUM, 2012).

Jayabalan *et al.* (2008) demonstraram a ação do potencial de eliminação dos radicais livres *in vivo* devido ao consumo de kombuchá, como também os benefícios da sua atividade antioxidante que está correlacionada com o aumento da imunidade, o alívio de inflamações e artrites. Ainda fazendo referência a pesquisa dos autores, eles avaliaram os compostos fenólicos presentes na bebida e observaram um aumento da atividade de reação com o radical DPPH e o radical superóxido durante o período fermentativo, enquanto a ação de redução, capacidade

eliminatória de radicais hidroxílicos e a capacidade de peroxidação que obtiveram reduções (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

A capacidade energizante também é uma das propriedades promovidas pelo consumo do fermentado, essa habilidade é explicada pela formação de complexo quelante e ferro, que são sintetizados com ácido glucônico, aumentando assim os níveis de hemoglobina no sangue, fornecendo com maior rapidez o oxigênio para os tecidos, estimulando assim, a síntese de ATP. O aumento da absorção do ferro derivadas plantas, está associado a presença dos ácidos orgânicos e demais produtos formados que interagem com compostos do chá e formam uma diversidade de compostos ativos e vitaminas (ADRIANI *et al.*, 2011).

3.3 Variáveis que influenciam o processo de produção do kombuchá

3.3.1 Chá

A base de cultivo do kombuchá é feita a partir do chá produzido utilizando folhas de *Camellia sinenses*, diferenciando seus benefícios de acordo com as propriedades de suas folhas, que tanto pode ser para chá verde ou preto. O chá verde atua na redução de incidências de doenças crônicas, apresentando capacidade antioxidante e atuando como antialérgico e antibacteriano. O chá preto, além de atuar na redução de doenças crônicas, também tem funções como anticarcinogênico, antimutagênico, na melhoria na função vasomotora e auxiliando na redução de peso.

O chá teve origem na China, há 5000 anos atrás, sendo considerado pelos orientais como uma bebida saudável devido aos efeitos associados a saúde, com produção inicial no Sudeste asiático, China, Índia, Japão, Tailândia, Sri Lanka e Indonésia (PALUDO, 2017; RIETVELD; WISEMAN, 2003; TANAKA; KOUNO, 2003). Sendo que, no Ocidente o consumo de chá preto é maior, enquanto no Oriente é o chá verde que ganha destaque (PALUDO, 2017).

A produção do chá verde se dá pela colheita de suas folhas ainda frescas, passando por um processo de aquecimento em água fervida para inativação de enzimas responsáveis pela sua oxidação (polifenol oxidase), promovendo uma duração maior e mantendo sua concentração de polifenóis, tornando-a rica em catequinas e compostos com ações funcionais, já o chá preto é proveniente de folhas envelhecidas pela oxidação das catequinas (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006; CHENG, 2006; TANAKA; KOUNO, 2003).

De acordo com Yanagimoto *et al.* (2003), na composição química dos chás estão presentes os compostos fenólicos ou flavonoides, flavonóis, monômeros de catequinas, ácidos

fenólicos, cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos, vitaminas B, E e C, minerais como o cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro.

Diante de suas propriedades, a atividade antioxidante é a mais conhecida presente no chá verde e está relacionada como um fator primordial na preservação dos riscos a diversas doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e a *diabetes mellitus*. O chá preto apresenta propriedades antioxidantes, como também apresenta melhora da função vasomotora, redução de peso, diminuição do colesterol, reduz a incidência de doenças crônicas e é também um anticarcinogênico. Em alguns estudos são relatados a preferência do chá verde na elaboração do kombuchá devido ao sabor menos intenso e seu menor teor de inativação de enzimas (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997; RIETVELD; WISEMAN, 2003).

3.3.2 Microrganismos

Os microrganismos do kombuchá estão presentes no (SCOBY) em associação simbiótica de leveduras e bactérias, formando assim uma colônia em formato que varia de acordo com o recipiente na qual está inserida para fermentação (JARRELL; CAL; BENNETT, 2000).

As leveduras que compõem essa colônia são as *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii* e *Candida stellate* (BATTIKH; BAKHROUF; AMMAR, 2012; MAYSER *et al.*, 1995) as quais conferem aroma da bebida e o aumento da acidez conforme vão fermentando açúcar (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

As bactérias encontradas com predominância na colônia são dos gêneros *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*, sendo considerada como uma das mais importantes a *Xylinus/Komagataeibacter xylinus*, por ser responsável pela produção da celulose (SANTOS, 2016; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Porém, sua produção requer boas práticas de manipulação para evitar contaminações de microrganismos formadores de esporos, bem como matéria prima de qualidade.

3.3.3 pH

Durante a fermentação, o pH é fundamental para o controle do produto, tendo seu valor

decrecente ao longo da produção do kombuchá, tal decréscimo se dá pela presença de ácidos orgânicos produzidos na etapa fermentativa.

O pH do kombuchá está associado entre 2,5 e 4,2, conforme a Instrução Normativa nº 41/2019, o que confere a bebida uma capacidade inibitória do crescimento de bactérias contaminantes (CHAWLA *et al.*, 2009; BRASIL, 2019).

3.3.4 Substrato

O principal substrato que vem sendo empregado para o desenvolvimento dos microrganismos é a sacarose, onde a mesma passa por uma hidrólise e é convertida em glicose e frutose, mediante ação das leveduras. A glicose e a frutose são convertidas em etanol e CO₂, enquanto as bactérias convertem glicose em ácido glucónico e a frutose em ácido acético (REISS, 1994).

Em estudo realizado por Batista (2019), utilizando o melão de beterraba e a sacarose como substrato para produção do kombuchá, o autor observou uma variação da biomassa microbiana nove vezes maior que o substrato tradicional (chá), com preservação das características organolépticas (MALBASA; LONCAR; DJURIC, 2008).

Os substratos empregados, diferenciam-se com relação ao grau de oxidação na sua produção devido às diferenças de compostos presentes na sua composição química (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

De acordo com estudos relatados por Jayabalan *et al.* (2014), empregando meios alternativos de substratos, é possível obter uma fermentação de qualidade utilizando meios de cultivo que contenham açúcares, e para isso os autores aplicaram como substratos o refrigerante Coca-Cola, vinho tinto, vinho branco, vinagre, extrato de alcachofra de Jerusalém, leite, soro doce fresco, soro doce reconstituído, soro ácido, equinácea, menta, e entre outros na obtenção do produto. Isso leva a uma variação na composição do SCOBY, tornando difícil o conhecimento da sua composição exata.

Azevedo (2020), utilizando resíduos de frutos como substrato, mostrou interesse em se aplicar meios alternativos de cultivo, pois a utilização de substratos diferentes potencializa a bebida e cria uma gama de diversificação para a produção do kombuchá, tendo em vista a agregação e preservação de uma maior concentração de compostos benéficos à saúde, auxiliando também na diversificação de acordo com sua origem, substratos e condições de produção.

3.3.5 SCOBY

O SCOBY, *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*, é conhecido cientificamente como um biofilme de característica celulósica obtido pela ação da *Acetobacter xylinum*. Seu crescimento está associado aos níveis de temperatura, pH, nutrientes, tempo de fermentação, tipo de chá utilizado que são parâmetros cruciais que interferem no seu crescimento, onde a falta de controle desses parâmetros pode inibir a elaboração de uma nova camada, formada a cada fermentação (SCHROEDER, 2019; CHAWLA *et al.*, 2009).

A nova película formada se dispõe na superfície do líquido, constituída por celulose, leveduras e bactérias. O desconhecimento da sua composição exata, apresentando variações na microbiota, está relacionado ao local de origem, tipo de inóculo que está sendo empregado, assim como, ao substrato fornecido para o cultivo (PALUDO, 2017; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Os microrganismos fazem o processo de síntese da celulose, a medida em que a bebida é fermentada e a membrana vai ganhando espessura no meio de cultura.

3.4 Aproveitamento dos coprodutos de frutas tropicais como substrato na formação do SCOBY

Segundo os dados da EMBRAPA (2020), as fruticulturas apresentam forte importância no desenvolvimento econômico para diversas regiões do Brasil, vindo a ocupar a terceira posição como maior produtor de frutas do mundo em 2019, ficando atrás para China e Índia, entre os 10 maiores exportadores com valores elevados de US\$ 1 bilhão em 2018, dados esses que não podem ser medidos apenas em estatísticas, mas também na relevância por serem geradores de renda, de empregos e de desenvolvimento rural.

A utilização dos subprodutos de frutas (resíduos provenientes do processamento, mas com potencial de aproveitamento) torna-se uma contribuição para utilização deste subproduto por meio da transformação em pós alimentícios ou farinhas, que além de possuírem diversos componentes funcionais, tais como: fibra, vitaminas, minerais, substâncias fenólicas e flavonoides, também apresentam efeitos benéficos à saúde, podendo assim serem empregados como ingrediente na produção de produtos como bebidas, sobremesas, derivados do leite, biscoitos, massas e pães (CAVALCANTI *et al.*, 2010). Possibilita o aumento da economia e viabilidade de suas aplicações em estudos com a finalidade de se obter extratos de resíduos de frutas tropicais desidratados (SANCHO *et al.*, 2015). Além de conferir maior valor agregado ao produto final, colabora para o aproveitamento dos coprodutos, diminuindo assim, o seu desperdício (MENESES *et al.*, 2018) e possibilitando a sua aplicabilidade na elaboração do kombuchá.

Os coprodutos de frutas tropicais apresentam valores nutricionais, conteúdo de compostos bioativos, compostos antioxidantes e teores consideráveis de açúcares, tornando-se um substrato alternativo no processo de obtenção da bebida fermentada. Por se basear no consumo de açúcar, a produção do kombuchá está relacionada com o consórcio de bactérias e leveduras que se alimentam de sacarose, que é a fonte de carbono mais empregada nesse processo, promovendo o crescimento desses microrganismos em diferentes meios de cultivos, além do chá (SCHROEDER, 2019).

Em estudos relatados por Ayed, Abid e Hamdi (2017), utilizando outros meios de cultivos, como substrato alternativo para o kombuchá, mostraram um crescente interesse na produção de kombuchá em diferentes meios, de maneira a potencializar e criar bebidas alternativas explorando o potencial do extrato dos coprodutos/resíduos de frutas tropicais para a fermentação do kombuchá.

3.5 Cultivo e formação de SCOBYs

O SCOBY, *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*, é um biofilme de característica celulósica obtido pela ação da *Acetobacter xylinum*, onde os microrganismos se alimentam do açúcar que é inserido no preparo do meio de cultivo. O substrato mais empregado nessa associação é o chá, podendo ocorrer meios alternativos utilizando resíduos de frutas tropicais para os mesmos fins (SCHROEDER, 2019). Preferindo a glicose à frutose, o resultado de seu metabolismo é a produção de álcool, ácidos em diversas quantidades, liberação de CO₂ que dependem do período fermentativo, ocorrendo uma alteração em seu pH de 5 para 2,5, aproximadamente, o que colabora para a inibição do crescimento de contaminantes, conferindo a presença apenas das bactérias e leveduras do seu consórcio (MAIA *et al.*, 2020; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Inicialmente, ao ser adicionado a cultura mãe no novo substrato, ocorre o consumo de sacarose pelo consórcio de leveduras (SCHROEDER, 2019; WATAWANA *et al.*, 2015) e bactérias responsáveis pela produção da celulose, mediante a multiplicação de *Acetobacter xylinum*. Em condições regulares de temperatura e pH, as bactérias utilizam o oxigênio presente no meio para geração de energia, o que impulsiona a sua multiplicação, sintetizando uma quantidade de celulose que se sobrepõem a superfície do líquido. Durante o período fermentativo, o SCOBY vai ganhando espessura mediante a formação de novas camadas celulósicas na superfície do recipiente (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

O período fermentativo ocorre de 7 a 15 dias com temperaturas que podem variar em

22 a 30 °C (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). Chawla *et al.*, (2009), na maioria de seus experimentos, observaram a produção máxíma da película celulósica ocorrendo em associação com dois parâmetros cruciais, o pH e a temperatura,

Para iniciar um novo kombuchá é ideal que se realize o cultivo sem adição do SCOBY, apenas com líquido mãe (proveniente de uma fermentação anterior), a fim de promover a formação de uma nova celulose bacteriana (CB). Então, após o preparo do novo substrato, é de fundamental importância que ele atinja a temperatura ambiente para posterior inóculo, que deverá já estar composto com o líquido do kombuchá fermentado com 10 a 20% da ocupação do recipiente onde irá ocorrer a formação do SCOBY. O recipiente deve ser escolhido levando em consideração o seu tamanho e largura, sendo coberto com gaze limpa ou pano poroso, evitando possíveis contaminações por insetos e a presença de sujidades indesejadas, como também facilitará a troca de ar com o meio ambiente, a formação da nova película e a sua manipulação (MOURA, 2019; PALUDO, 2017).

A liberação de CO₂, e uma cultura grande no meio do inóculo tem influência na regulação da formação da CB, pois estão associadas com o excesso de açúcar (COSTA; BIZ, 2017).

De acordo com os argumentos de Donini *et al.*, (2010), a produção de CB pode ser uma opção ecologicamente sustentável, quando comparada com a produção e extração de outros tipos de celulose, como a vegetal, que demanda uma grande área de árvores para sua extração, além dos impactos que isso ocasiona ao meio ambiente devido à produção de resíduos e poluentes durante o processo de obtenção da celulose pura durante o processo de separação. Desse modo, os SCOBY, que até então são simplesmente descartados, podem ser empregados em diversas áreas, incentivando assim o aproveitamento total do material.

Considerando as suas vantagens de empregabilidade, o mais interessante desse material está em sua transformação como um substituinte do couro animal (que tem sua origem eticamente questionável) e na alimentação humana como fonte complementar de nutrientes e fortalecimento do organismo devido as propriedades presentes em sua composição (COSTA; BIZ, 2017).

3.6 Aproveitamento dos SCOBYs

Diante da grande geração de CB em um curto tempo, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de novas aplicações, visando a diminuição do desperdício durante a produção do kombuchá, a medida em que, colabora com o meio ambiente. Em virtude disso, os tipos

mais comuns de aproveitamentos estão na transformação e aplicação para proteção, conservação, estabilização de emulsão, condução elétrica e mecânica, absorção de poluidores, filtração, vestimenta, área alimentícia, indústria têxtil e biomedicina (COSTA; BIZ, 2017).

Durante pesquisas desenvolvidas para analisar a composição química do SCOBY, foi possível observar valores de compostos que colaboram para a utilização desse material no desenvolvimento de novos produtos. Por isso, torna-se uma alternativa que pode ser pesquisada em diferentes tipos de segmentos alimentícios, colaborando com seu enriquecimento (DOMENEGHETTI; SOARES; SCHMIDT, 2019).

Dessa forma, as indústrias em conjunto com seus colaboradores têm procurado alternativas para o desenvolvimento e elaboração de novos produtos a medida em que a caminhada segue em direção a minimização de impactos ambientais, devido à viabilidade técnica e econômica dos subprodutos (DOMENEGHETTI; SOARES; SCHMIDT, 2019; BRITO *et al.*, 2011).

Assim, nesse seguimento, o aproveitamento do SCOBY é uma alternativa de transformação de sua massa celulósica, kombuchá (PALUDO, 2017). Durante o processo de formação, diversas transformações bioquímicas são realizadas até a formação completa da celulose, e posteriormente a mesma pode ser retirada para devido fim como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da aplicação da celulose bacteriana (SCOBY) do kombuchá.

Aplicações da (CB) classificada pelas suas áreas de aplicações		
Área	Aplicações	Exemplos
Alimentos	Embalagens antibacterianas e biodegradáveis, biofilmes,	Nata de coco e embalagens para salgadinhos.
	Emulsificantes, celulose comestível.	
Eletrônica	Nanoplacas de grafites, substrato de filme de luz de diodo, membranas decélula combustível.	Fone everglide s-500 e baterias.

Biomedicina	Nanofilmes, estruturas para regeneração de ossos, pele artificial curativa, absorvente feminino.	Reprodução de tecidos, absorvente feminino e curativos.
Cosméticos	Máscaras faciais, emulsificantes, condicionadores, polidores de unhas.	Máscara Bel mondo.
Indústria têxtil	Vestuário, bolsas, calçados, tendas e equipamentos de camping.	Jaqueta, sapato, bolsa, luva, brinco.
Produtos	Capas de celulares, luminária, tigelas.	Capas de celulares, tigelas e luminárias.
Arte	Artefatos conceituais, esculturas.	Escultura, Cones xylinume kernels of chimaera

Fonte: Adaptado de Costa e Biz 2017.

Diante das propriedades e aplicações acima referidas, a celulose bacteriana está sendo empregada em diversos produtos, tanto em fase ainda de pesquisa como já existem alguns produtos disponíveis para consumo (COSTA; BIZ, 2017).

3.7 Shake alimentar do tipo *Smoothie*

O Shake *smoothie* se diferencia do Shake tradicional pois apresenta em sua composição uma concentração de frutas e vegetais. Levando em consideração o valor nutricional da fruta, que tem valores de calorias que variam de 45 a 88 kcal para 100 mL, tornando-se assim, uma bebida altamente nutritiva com uma combinação variada de frutas adicionadas ao leite e sem adição de açúcar e água, diferenciando-a de outros Shakes (IASSIN, 2019; SILVA, 2017; PORTES, 2009).

O *smoothie* é de simples preparo e a matéria-prima é bem acessível e de baixo custo de processamento, constituindo uma alternativa viável para o mercado de alimentos (SILVA, 2017).

De acordo com Paiva *et al.*, (2015), o Brasil tem uma variedade de frutas e hortaliças

que vem crescendo muito, apresentando importância econômica em diversas regiões do país por ter sua relevância na geração de rendas, empregos e no desenvolvimento rural, podendo então, colaborar para a elaboração e comercialização dos *smoothies*, que devido ao seu apelo funcional promovidos pelas frutas ricas em compostos antioxidantes, bioativos que proporcionam a melhoria da saúde.

Os *smoothies* não têm uma legislação dependente, sendo que as resoluções para os sucessos são as mesmas que regem essa bebida. A legislação brasileira e as normas determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são as que estabelecem detalhadamente os padrões para aplicação em sucos, como também na utilização de microrganismos no desenvolvimento de novos alimentos e produtos.

A definição de *smoothie* é considerada pela consistência/viscosidade, onde é composta em partes por frutas, vindo a conter poucas porções de outras misturas como hortaliças, leites e outros ingredientes misturados em sua composição. O preparo envolve o corte das frutas para romper com os parênquimas, liberando pectinas e outros sólidos solúveis dispersantes na solução, e uma outra parte sendo sólida, representada pelos sólidos insolúveis constituídos pela parede celular da planta (RODRÍGUEZ- VERÁSTEGUI *et al.*, 2016).

O que diferencia o *smoothie* de outras bebidas é a sua característica viscosa e sua alta composição de partes de frutas. De acordo com Smith *et al.*, (2013) o melhor critério utilizado para a caracterização de *smoothies*, é o conteúdo de frutas presentes em sua composição. O *smoothie* está classificado como uma bebida não alcoólica, atendendo a diversos públicos, desde crianças a pessoas idosas que tenham dificuldades em digerir alimentos pela mastigação, como também para as pessoas que não gostam de consumir frutas *in natura*. A indicação para o consumo está relacionada como um substituinte de uma refeição, sobremesa ou café da manhã (BAIANO; MASTROMATTEO; DEL NOBILE, 2012).

É encontrada na forma processada ou elaborada instantaneamente, sendo esse segundo o mais indicado, devido à presença de enzimas peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) e a pectina metil esterase (PME) (IASSIM, 2019; CHAKRABORTY *et al.*, 2014). Portanto, estudos envolvendo objetivos de manter a presença desses compostos já é base de diversas pesquisas (WALKLING-RIBEIRO *et al.*, 2010; KHANDPUR; GOGATE, 2015; ANDRÉS; VILANUEVA; TENORIO; 2016; CONEGERO *et al.*, 2017; ADIAMO *et al.*, 2018) para técnicas na preservação dos compostos bioativos durante o prazo de validade. Sendo ainda um desafio para os fabricantes de *smoothies*, por se tratar da preservação de características sensoriais de um produto fresco e natural.

Devido à presença dessas enzimas que conferem a diminuição do valor nutricional, um outro fator que pode ser agregado para a preservação dos compostos fenólicos, bioativos e vitamínicos (IASSIN, 2019) é a adição do pó do SCOBY devido a sua composição, podendo assim preservar as substâncias citadas.

Diante dos tipos de refeições saudáveis, essas bebidas viraram tendência na área alimentícia, podendo ser servidas em diferentes estilos ao gosto do consumidor. Vindo a ser empregada no planejamento alimentar de atletas e pessoas que buscam uma melhor qualidade de vida através do consumo de alimentos naturais (JASA, 2016).

Devido à bebida estar sendo considerada a nova tendência em termos de refeição líquida para o futuro, a crescente busca por um estilo de vida mais saudável é o que vem despertando a curiosidade e o consumo para este alimento, pois os consumidores não estão mais apenas priorizando a sensorialidade de um determinado produto, como também, buscam benefícios que possam ser acrescentados em sua vida no dia a dia (IASSIN, 2019).

Uma publicação do Brasil Food Trends (2020), mostra que a tendência em “Saudabilidade e bem-estar” desencadeia numa gama de segmentos para o mercado consumidor, entre os quais estão os alimentos funcionais, com diferencial no auxílio da saúde mental, física, cardiovascular, intestinal e entre outros (FIESP, 2010). Tendo o *marketing* como fator importante para o crescimento desde o ano de 2016 até 2021, focado na saúde e no interesse do consumidor para refeições saudáveis (MINTEL, 2016).

Para Mintel (2016), o mercado para *smoothies* está estimado na produção de 4 milhões de litros ao ano, com elevado crescimento na Irlanda, correspondendo a 214% entre 2002 e 2006. A mesma pesquisa estima um valor de \$17 bilhões até o ano de 2024, onde 45,7% desse valor está direcionado aos Estados Unidos da América; 9,1% pela Ásia e o restante dividido entre as demais regiões do mundo (GLOBAL, 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de execução do experimento

As formulações dos SCOBYs, das bebidas, assim como as análises foram realizadas na Universidade Federal do Ceará (UFC) em parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – *Campus Jaguaribe*. Para manipulação dos microrganismos da pesquisa, um comprovante de cadastro de acesso nº AA72205 do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético está a disposição em ANEXO A. A pesquisa

envolvendo a análise de toxicidade de produtos alimentícios e farmacêuticos de origem natural utilizando Zebrafish (*Danio rerio*) está protocolado sob o Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA)nº 1806202101 (ANEXO B), sob a responsabilidade da professora Larissa Moraes Ribeiro da Silva e a equipe que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

4.2 Matérias-primas utilizadas na pesquisa

4.2.1 Coprodutos de frutas tropicais

Os coprodutos de acerola e maracujá que foram disponibilizados por uma Indústria de Fortaleza - CE, safra de 2021/2022 e coletados em embalagens plásticas logo após o processamento das polpas, já a água de coco foi coletada de cocos comerciais, o chá verde foi adquirido de supermercado com posterior direcionamento ao Laboratório de frutos da Universidade Federal do Ceara (UFC), e os demais subprodutos utilizados como araçá, abacaxi, goiaba e manga foram adquiridos em supermercado e processo em ambiente residencial.

4.2.2 Açúcar

Foi utilizado como fonte de sacarose no preparo da kombuchá o açúcar cristal adquirido em comércio local da região de Fortaleza - CE.

4.2.3 SCOBY

A película celulósica utilizada neste estudo foi doada de um produtor caseiro de Fortaleza - CE, não sendo possível identificar as características de produção da “mãe da kombuchá”. A celulose bacteriana foi mantida imersa na própria kombuchá no recipiente de vidro até a sua utilização. No decorrer do experimento, o SCOBY foi dividido em subpartes para compor cada recipiente com seus referidos extratos dos coprodutos de frutas tropicais.

4.2.4 Shake tipo *Smoothie*

Para a elaboração do smoothie foram utilizados, o açúcar, o leite e as polpas de frutas (morango e banana), adquiridos do mercado local na cidade de Fortaleza/CE.

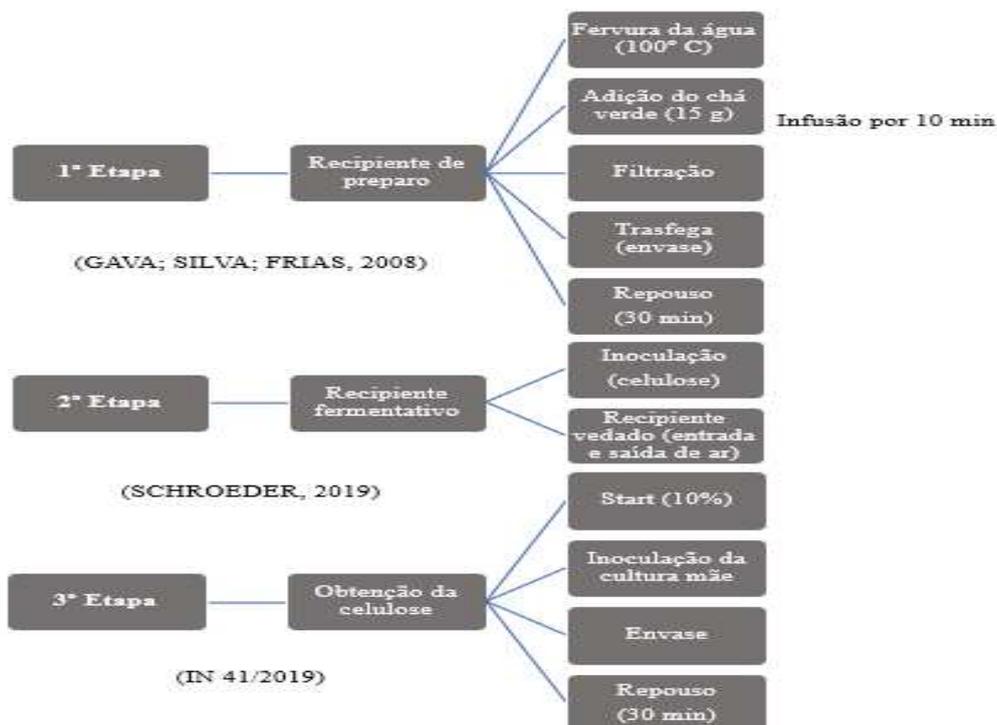
5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção do líquido para fermentação a partir dos coprodutos de frutas tropicais

Para a obtenção da celulose com o subproduto para a fermentação, foi realizado a extração por aquecimento dos coprodutos em água potável nas proporções de 8, 10 e 15% (m/v), passando por filtragem no final, em seguida, o líquido foi transferido para um recipiente teste e deixado em repouso.

5.2 Utilização dos coprodutos como substrato alternativo na fermentação do kombuchá

Figura 1 - Fluxograma do preparo do líquido do kombuchá com o Start e obtenção da celulose para as formulações.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2023.

5.3 Elaboração e determinação das formulações dos SCOBYs com extratos de coprodutos de frutas tropicais

Para a obtenção dos SCOBYs foram desenvolvidas formulações utilizando coprodutos dos frutos: araçá, abacaxi, acerola, goiaba, manga, maracujá, água de coco e chá-verde, selecionando os melhores de acordo com os pré-testes realizados.

Os coprodutos provenientes do processamento de frutas na indústria foram escolhidos

de acordo com a sua disponibilidade no mercado, ou seja, as polpas que são mais consumidas pela população são as que mais produzem acúmulo de matéria orgânica, e que podem ser aproveitados para a produção de outros alimentos, diminuindo assim o impacto ambiental e a produção de lixo orgânico (SILVA; RAMOS, 2009; BATISTA, 2013). O aproveitamento desses subprodutos para a obtenção dos extratos foram elaboradas conforme apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações dos sistemas fermentativos na obtenção dos SCOBYs

Ingredientes	Formulações (%)			
	ACEROLA	CAJU	GOIABA	MARACUJÁ
Açúcar	7	7	7	7
Extrato de subproduto	13	13	13	13
Água potável	30	30	30	30
SCOBY	40	40	40	40
Star do kombuchá	10	10	10	10
Total	100	100	100	100

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Diante das formulações apresentadas, um sistema foi feito conforme Schroeder (2019). Para cada formulação seguiu em um recipiente de vidro que ficou em descanso até o final do processo fermentativo.

Após o período do processo fermentativo das formulações, observou-se a formação das celulosas, que seguiu para a etapa de desidratação, para obtenção do rendimento dos pós.

5.4 Obtenção dos pós dos SCOBYs selecionados

Para o processo de liofilização dos SCOBYs, a metodologia aplicada seguiu a descrita por Nunes (2020), onde as amostras foram ser congeladas em temperatura a - 20 °C e liofilizadas por 48 horas com temperatura de -50 °C. O material liofilizado foi triturado em almofariz com aplicação de Nitrogênio líquido (N₂), em decorrência do processo de liofilização não ter sido eficiente devido a grande concentração açúcares presentes na celulose. Para a conservação do material, sacos de polietileno de baixa densidade envolvidos em papel alumínio foram utilizados e direcionados para um dessecador até o momento das análises.

5.5 Caracterização dos pós do SCOBY do kombuchá

5.5.1 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas logo após o processo de maceração, sendo estas submetidas às análises microbiológicas após 1 e 7 dias de armazenamento sob refrigeração com temperatura de 6 ± 2 °C, a fim de analisar eventuais mudanças microbiológicas durante esse período de armazenamento.

5.5.2 Determinação de umidade

A determinação de umidade foi baseada na perda de umidade da amostra em estufa a temperatura de 105 °C até peso constante (IAL, 2008).

5.5.3 Determinação do pH

Para a análise do potencial hidrogeniônico, foi medido sob agitação em potenciômetro de bancada com eletrodo de vidro, calibrado regularmente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (IAL,2008).

5.5.4 Determinação de Sólidos Solúveis

Os sólidos solúveis foram medidos em refratômetro digital portátil Atago®, e os resultados serão expressos em °Brix (IAL, 2008).

5.5.5 Determinação da Acidez Titulável

A determinação da acidez titulável foi realizada por titulação potenciométrica com solução de NaOH 0,1 M sob agitação até pH 8,1 e os resultados expressos em % de ácido málico (IAL,2008).

5.5.6 Determinação da vitamina C

Para determinação de Vitamina C, foi utilizado o método titulométrico com solução de DFI (2,6 diclorofenolindofenol 0,02 %) até a coloração rósea claro permanente, utilizando-se 5g da amostra diluída em 50 mL de ácido oxálico (0,5%), deacordo com Strohecker Henning (1967). Os resultados foram expressos em mg.100g-1 de ácido ascórbico (IAL, 2008).

5.5.7 Atividade de água (Aw)

A determinação da Atividade de água (Aw) ocorreu em aparelho medidor de Aw da marca AQUALAB LITE, utilizando-se uma amostra controle de carvão ativado como branco.

5.5.8 Microbiológica

Os pós de SCOBYS obtidos foram submetidos à análise microbiológica, sendo avaliados quanto a presença de leveduras, bactérias do ácido-lático, bactérias do ácido-acéticos, *Coliformes totais*, *coliformes termotolerantes*, *Mesófilos* e *Escherichia. coli* conforme metodologia descrita por (SILVA *et al.*, 2010).

5.5.8.1 Contagem de leveduras

A contagem de leveduras foi realizada através da inoculação de 0,1 mL de cada diluição (102 a 105) em meio Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (SABC) e espalhamento em superfície, seguido de incubação a 22° C por cinco dias (KIM, D. H. *et al.*, 2019).

5.5.8.2 Contagem de bactérias ácido-láticas

A quantificação de bactérias ácido-láticas foi realizada através do método de plaqueamento em profundidade (pour plate), com a inoculação de 1 mL de cada diluição (102 a 105) em meio MRS (Agar para Lactobacillus de Man, Rogosa e Sharpe) por 72 horas a 32°C (APHA, 2015).

5.5.8.3 Contagem de bactérias ácido-acéticas

A contagem de bactérias ácido-acéticas foi realizada através da inoculação de 0,1 mL de cada diluição (102 a 105) em meio GYC (Glucose Yeast Extract Carbonate) pela técnica de spread plate a 30°C por 72 horas (KIM, D. H. *et al.*, 2019).

5.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi realizada para verificar as semelhanças na composição das amostras, que seguiu a metodologia descrita por Fontes *et al.*

(2020). As amostras (em triplicatas) foram divididas em dois grupos, de acordo com as formulações pré-estabelecidas pelos rendimentos de massa produzidas dos SCOBYs.

Foi estabelecido faixa de 400 a 450 cm^{-1} (região do infravermelho médio – MIR) com resolução de 4 cm^{-1} em temperatura ambiente, e com o auxílio do software IBM SPSS *Statistics* 22 versão 22.0.0.0, os espectros infravermelhos absorvidos foram submetidos à análise multivariada para verificar a similaridade nas diferentes amostras (FONTES *et al.*, 2020).

5.7 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi realizada para verificar a estabilidade térmica dos componentes, destacando perdas de massa em diferentes faixas de temperatura. As curvas de TGA foram obtidas com um STA-6000 (Perkin Elmer), a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em uma variação de temperatura de 25 a 900°C , onde a taxa de ar foi mantida a $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o peso inicial da amostra utilizada foi em torno de 18 mg.

5.8 Avaliação da toxicidade aguda e por locomoção dos pós de SCOBYs utilizando Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo *in vivo*

Para avaliação da toxicidade, os testes foram realizados em Zebrafish, com base nas metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017). Para a realização dos testes utilizou-se zebrafishes (ZF) (*Danio rerio*) adultos, selvagens, de ambos os sexos e com idade de 60 a 90 dias, tamanho de $3.5 \pm 0.5\text{ cm}$ e peso $0.4 \pm 0.1\text{ g}$. Os peixes foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Após a obtenção dos modelos *in vivo*, grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25°C e pH 7.0, com ciclo circadiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*®) *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC).

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar a alteração ou não da coordenação motora dos peixes, seja por sedação e/ou relaxamento muscular (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Os animais ($n=6/\text{grupo}$) foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida e tratados com 20 μL , via oral, dos pós de SCOBYs (grupo veículo) (COLLYMORE, RASMUSSEM; TOLWANI, 2013). Incluiu-se um grupo de animais sem tratamento, denominado de Naíve. Após os tratamentos os animais foram acondicionados

individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Após uma hora, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes para análise da atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Usando o valor de CL do grupo Naíve como linha de base (100%), será calculado porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 1992) e Huang *et al.* (2014). Os animais (n=6/cada grupos) foram tratados com as mesmas concentrações dos pós a que foram submetidos no teste de campo aberto, porém os peixes foram deixados em repouso por 96 horas para analisar a taxa de mortalidade. O grupo veículo (água destilada estéril) foi utilizado como controle. Após 96 horas, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo para determinação da concentração letal capaz de matar 50% dos animais (DL50) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

6 DESENVOLVIMENTO DO SMOOTHIE

6.1 Processamento da bebida tipo *smoothie*

As formulações da bebida foram definidas em quatro concentrações mistas de polpa de fruta de morango e banana, onde uma ficou estabelecida com a F0, F1, F2 e F3. Para as formulações dos pós de cada SCOPY, foi selecionado de acordo com seu rendimento durante a fermentação, conforme descrito na Tabela 3. O preparo foi obtido com a mistura do leite com polpa das frutas congeladas e a homogeneização se deu através do uso de um liquidificador doméstico (potência de 300 W).

As quantidades foram definidas tomando como base o Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, na qual estabeleceu quantidades mínimas para as formulações de bebidas à base de polpa de frutas (BRASIL, 2009). Os ingredientes selecionados para a elaboração do *smoothie* estão apresentados conforme Tabela 3.

Após a homogeneização dos ingredientes, a bebida foi envasada em garrafas de PVC de 1000 mL, lacradas e armazenadas sob refrigeração (6 ± 2 °C) até o momento das análises.

Tabela 3 - Formulações da bebida tipo *smoothie* adicionada de pó de SCOBY.

Ingredientes	Formulações (%)			
	F0	F1	F2	F3
Leite	40	30	30	30
Açúcar	10	5	5	5
*MO	30	30	30	30
*BA	20	20	20	20
SCOBY de kombuchá	0	15	15	15
TOTAL	100	100	100	100

Fonte: Autor da pesquisa, 2023. F0 = 0% de SCOBY e com valores de leite e açúcar diferente das demais formulações. F1 a F4 = 15% de pó de SCOBY. *MO = Morango. *BA = Banana.

Para o delineamento experimental, aplicou-se o do tipo fatorial 5x3x4 (quatro formulações F0, F1, F2 e F3), avaliadas quimicamente e microbiologicamente em triplicata.

6.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas para os *smoothies* seguiram as mesmas metodologias descritas no item 5.5.

6.3 Composição Centesimal

Para o desenvolvimento desse estudo nos *smoothies*, foram realizadas análises de proteínas pelo método *Kjeldahl* (IAL, 2008), lipídios pelo método de *Soxhlet* (IAL, 2008), teor de cinzas, quantidade de fibra bruta, e de carboidrato, determinados por diferença e o valor energético por uma bomba calorimétrica (Kcal/100 g), seguindo a metodologia descrita por IAL, 2008.

6.4 Análise microbiológica dos *smoothies*

As análises microbiológicas das formulações dos *smoothies* foram desenvolvidas empregando-se as metodologias descrita anteriormente por Silva *et al.* (2010) no subtópico 5.5.8.

6.5 Análise Reologia dos *smoothie* adicionado do pó dos SCOBYs

O comportamento reológico dos *smoothies* foi determinado através de um reômetro rotacional de cilindros concêntricos tipo Searle da Brookfield, modelo R/S plus SST 2000. Foi utilizado o sensor DG-DIN. As análises reológicas foram obtidas com variação da taxa de deformação de 108 a 500 s⁻¹ (curva ascendente) e de 500 a 100 s⁻¹ (curva descendente), com o tempo de 1 minuto e leitura de 25 pontos para cada curva. As leituras foram realizadas em triplicata e em cada medida foi utilizada uma nova amostra.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises físico-químicas, composição centesimal e sensorial foram expressos em média e desvio padrão, submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa *Statistc7*®, IBM SPSS *Statistics* 22 versão 22.0.0.0 com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), e com a utilização do Excel (2015) para tabulação dos dados obtidos.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Testes preliminares

Os recipientes-testes do experimento inicial caracterizaram-se por um preparo realizado utilizando os seguintes meios alternativos de fermentação: araçá; abacaxi; acerola; goiaba; manga; maracujá e água de coco.

A celulose microbiana é produzida e liberada da célula na forma de fibrilas, e uma das principais características da celulose é sua capacidade de absorver água. Na Tabela 4, é possível comparar a diferença do peso úmido das membranas de celulose produzidas ao final da fermentação utilizando apenas 4% do SCOBY inicial start.

Tabela 4 - Peso úmido das membranas de celulose produzidas ao final da fermentação.

Desenvolvimento das celulosas bacterianas com 4% de cultura Start								
Substrato	Araçá	Abacaxi	Acerola	Goiaba	Manga	Maracujá	Água de coco	Chá verde
Peso úmido (g)	57,00	39,50	66,70	41,22	25,40	81,90	42,10	60,80

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Os substratos que apresentaram melhor rendimento na formação da celulose foram os substratos de maracujá, acerola, araçá e o tradicional chá verde, ficando com menores pesos os substratos de manga, abacaxi, goiaba e água de coco, respectivamente.

Os dados analisados amostam a evolução do desenvolvimento das celuloses bacterianas produzidas com substratos alternativos ao longo do processo e, em seguida, foram selecionados três melhores substratos baseados no peso da celulose produzida.

Portanto, os resultados foram padronizados relacionando os dados obtidos durante o controle do processo fermentativo baseado nos parâmetros de sólidos solúveis totais (°Brix) e pH durante sete dias, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de controle durante o período fermentativo avaliado.

Substratos/Parâmetros								
Dias	Acerola		Dias	Maracujá		Dias	Chá-verde	
	°Brix	pH		°Brix	pH		°Brix	pH
0°	12,6	3,50	0°	11,8	3,80	0°	30	4,50
1°	12,6	3,50	1°	11,8	3,80	1°	30	4,50
2°	11	3,00	2°	10,9	3,20	2°	27,5	4,20
3°	11	2,82	3°	10,1	2,80	3°	25	3,80
4°	10,4	2,67	4°	9,7	2,65	4°	19,8	3,50
5°	10,1	2,50	5°	9,5	2,60	5°	19,3	3,20
6°	9,5	2,49	6°	9,5	2,50	6°	18	2,90
7°	9,5	2,49	7°	8,8	2,50	7°	17,2	3,00

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Durante o período de sete dias de fermentação, foi realizado um acompanhamento diário dos parâmetros de sólidos solúveis totais (°Brix) e pH, para nível de controle. Desta forma sete a 10 dias são suficientes para a coleta da celulose bacteriana (SANTOS, 2019). Na Tabela 5 observa-se valores de pH que vai de 4,5 a 2,49 para as amostras fermentadas com coprodutos de acerola, maracujá e chá-verde e é um parâmetro importante a ser controlado (Oliveira *et al.*, 2012). De acordo com Bruini (2019), as bactérias acéticas pertencem aos gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* que estão presentes no meio converte a glucose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético. O melhor rendimento da

reação ocorre em uma temperatura entre os 18 a os 30°C (SANTOS, 2016).

8.2 Obtenção da celulose bacteriana

As leveduras e bactérias, que são inoculadas na bebida para processo de fermentação, são as responsáveis pelo crescimento do que é conhecido como fungo do chá, ou SCOBY. Bactérias acéticas produzem uma rede de celulose como metabólito secundário da fermentação dando origem a essa estrutura que se assemelha a um cogumelo (JAYABALAN *et al.*, 2014). Inicialmente, os microrganismos produtores de celulose aumentam sua população, além de consumir o oxigênio dissolvido. Após o aumento da população de microrganismos a produção da celulose vai aumentando na superfície do recipiente. À medida que o tempo avança, a espessura da membrana é aumentada pela geração de novas camadas na superfície, formando estruturas suspensas.

O SCOBY e/ou o líquido resultante de uma fermentação anterior, a uma concentração de 10%, podem ser usados como cultura starter ou inóculo para dar início a uma segunda fermentação (VĨNA *et al.*, 2013).

Após o preparo dos recipientes, os mesmos foram colocados em repouso para fermentarem (Figura 2).

Figura 2 - Processo fermentativo, recipientes com subprodutos de maracujá (a), acerola e chá

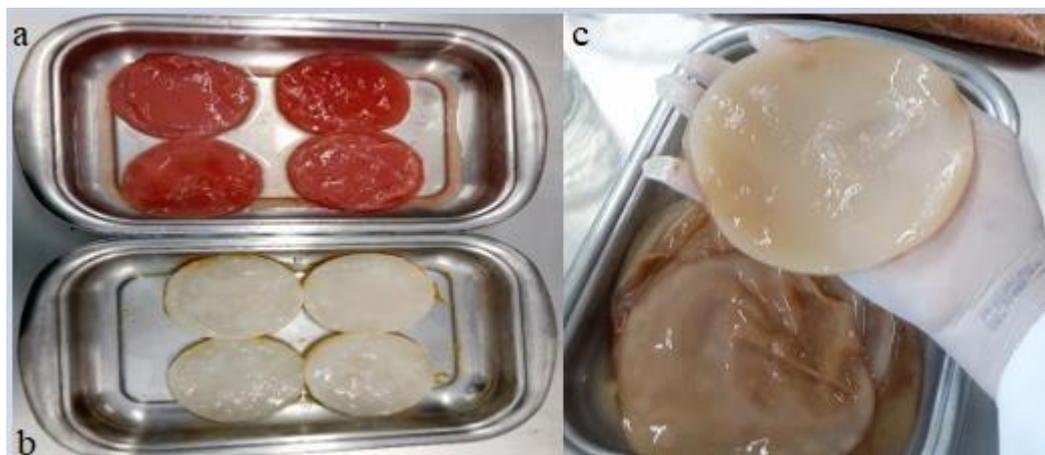


Fonte: Dados da pesquisa, 2022. (a) fermentação inicial com substrato de maracujá; (b) fermentação inicial com substrato de acerola e (c) fermentação inicial com substrato de chá verde.

Após 24 horas observou-se a formação de películas nas superfícies dos recipientes, evidenciando assim os melhores resultados baseados no rendimento e no curto período de tempo para a formação da película celulósica. De acordo com Goh *et al.* (2012a/2012b), essas variações na produção de SCOBYs dependem muito das cepas utilizadas, tempo de fermentação e compostos químicos presentes no meio de fermentação.

Ao final do período de fermentação, a produção de celulose foi avaliada por meio da massa de SCOBY produzida. Os biofilmes foram retirados dos recipientes para posterior limpeza com água destilada para remoção de impurezas e microrganismos fixados (Figura 3).

Figura 3 - Obtenção da celulose bacteriana de acerola, maracujá e chá verde.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023. (a) SCOBY obtido com substrato de acerola; (b) SCOBY obtido com substrato de maracujá e (c) SCOBY obtido com substrato de chá verde.

Depois de lavadas e removido o excesso de água, as membranas foram direcionadas para a etapa de desidratação, para posterior obtenção dos rendimentos dos pós.

8.3 Rendimento em peso dos pós de SCOBY

O desperdício de alimentos não é um problema único do consumidor. É uma questão ampla que afeta, diretamente, os índices de desenvolvimento econômico dos países e causa impacto na sociedade e no meio ambiente (GONDIM *et al.*, 2005). Segundo Batista *et al.* (2021), uma maneira de combater o desperdício é o aproveitamento por meio da utilização de partes não aproveitadas, antes desprezadas (cascas, talos, folhas e outros resíduos) na elaboração de novos produtos. Estudos sobre aproveitamento de resíduos e subprodutos apresentam resultados relevantes para diversificar e agregar valor nutricional às preparações (DAMIANI *et al.*, 2011; SILVA; RAMOS, 2009; VALENÇA; SANTANA; FREITAS, 2008).

Reconhecendo o crescimento do mercado em 2016, as vendas no varejo de kombucha e outras bebidas fermentadas aumentaram 37,4% (WATSON, 2018). Esta bebida ganhou notoriedade em razão dos seus benefícios à saúde, pois ajuda a estimular sistemas glandulares, a proteger contra o diabetes, a facilitar a excreção de toxinas e a prevenir infecções (JAYABALAN *et al.*, 2014). Além disso, estudos indicam que a kombucha pode agir como bebida probiótica, ajudando a equilibrar a microbiota intestinal, facilitando, assim, a

normalização das atividades intestinais (WATAWANA *et al.*, 2015). A cada fermentação uma nova camada celulósica é formada na superfície do recipiente, aumentando assim a sua biomassa.

A Matriz de celulose tem se mostrado como um biopolímero com amplas possibilidades de aplicações, devido as suas características como a biodegradabilidade, pureza e biocompatibilidade que permitem sua aplicação em diversas áreas (KESHK, 2014). Os usos potenciais para uso da celulose bacteriana são nas áreas de cosmético, eletrônica, tratamento de efluentes, biomédica e na área alimentícia com o aproveitamento de resíduos.

Na produção industrial de kombucha especificamente, muitos dos resíduos podem ser aproveitados de forma a se obter novos produtos como os resíduos do chá. Os resíduos do chá, que são basicamente folhas trituradas e molhadas, os resíduos de frutos tropicais, são, portanto, resíduos orgânicos e compostáveis. O SCOBY (cultura simbiótica de leveduras e bactérias, responsável pela fermentação da bebida) cresce a cada fermentação, de forma que não se faz necessário utilizá-lo todo, e este, também pode ser destinado a diversos fins, como produção de couro vegetal, para fins têxteis ou ainda para fins alimentícios, como petisco, visto que sua composição é basicamente uma grande camada celulósica cheia de probióticos, sendo seguro para consumo humano, conforme a Tabela 1 (COSTA; BIZ, 2017).

Durante o processo fermentativo, observou-se a produção de celulose nos meios em um período de duas semanas de fermentação. Esse resultado está de acordo com o indicado na literatura. Jayabalan (2014) observaram uma elevada produção de celulose bacteriana nesse mesmo período (DUTTA; PAUL, 2019). Já na referida pesquisa, observou-se a formação da celulose bacteriana em um período de 7 dias, conforme a Tabela 5.

A etapa de rendimento foi determinada após o período de fermentação, onde a celulose produzida foi retirada do meio (FIGURA 2), lavada em água destilada e em seguida cortada em pequenos cubos, utilizando-se faca de cozinha. Posteriormente, aplicou-se Nitrogênio Líquido (N₂) para tornar possível a obtenção dos pós, em suas respectivas codificações (Figura 4).

Figura 4 - Obtenção dos pós de SCOBY's obtidos com os subprodutos de acerola, maracujá e chá verde, respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023. (a) Pó de SCOBY de acerola; (b) Pó de SCOBY de SCOBY de maracujá e (c) Pó de SCOBY de chá verde.

Durante a obtenção do material em pó, o rendimento foi determinado utilizando a Equação 1 descrita por Andrade *et al.* (2018), com modificações:

$$R = F/S.100 \quad (1)$$

Onde R é o rendimento (%), F é o peso seco (g) e S é o peso do subproduto antes de secar (g). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Peso úmido, peso seco da celulose bacteriana e o rendimento após desidratação.

SCOBY	Rendimento em peso dos SCOBY's		
	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Rendimento (%)
Acerola	1200	74,96	6,25
Maracujá	1200	46,03	3,84
Chá verde	1200	47,47	3,95

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Em relação ao rendimento dos pós produzidos, observou-se que o pó de SCOBY de acerola apresentou um rendimento de 6,25 %, em seguida o SCOBY de maracujá com 3,84 % e o SCOBY de chá verde com 3,95 %. Observa-se que o rendimento de SCOBY de acerola apresentou melhor produtividade no que diz respeito ao peso, o que pode estar associado a composição do subproduto de acerola, que é rico em fibras dietéticas, incluindo celulose, hemicelulose e pectina, que contribuiu para um melhor rendimento de SCOBYs, tendo em vista que todas as amostras foram submetidas as mesmas condições de incubação para fermentação, com valores de Sólidos solúveis totais iniciais de 12.5 °Brix para o substrato de acerola, 13.1 °Brix para maracujá e 11.3 °Brix para o substrato de chá verde.

A produtividade do SCOBY está diretamente ligada à razão de área de superfície: profundidade do recipiente fermentativo. A produção do SCOBY aumenta com o aumento da área superficial do recipiente contendo o meio de cultura (ABD EL-SALAM, 2012).

Os resultados envolvendo os aspectos Físico-químicos e composição proximal dos pós podem ser observados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 - Caracterização Físico-química dos pós de SCOBY's de kombuchá.

Pós dos SCOBY's	Parâmetros			
	Acidez (meq.L ⁻¹)	pH	Vit. C (mg/100g)	Sólidos Solúveis (SS/ATT)
SCOBY de Acerola	3,19 ± 0,30	2,77 ± 0,04	1998,04 ± 50,75	6,67 ± 0,32
SCOBY de Maracujá	3,77 ± 0,42	2,86 ± 0,10	163,29 ± 3,09	6,13 ± 0,06
SCOBY de Chá verde	4,15 ± 0,22	2,90 ± 0,00	393,46 ± 4,17	8,13 ± 0,06

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. Os resultados estão representados pela média ± desvio padrão.

Os valores de acidez dos pós dos SCOBYs durante as duas semanas de fermentação variaram entre 3,19 meq.L⁻¹ para o pó do SCOBY com acerola, 3,77 meq.L⁻¹ para o pó do SCOBY de maracujá e 4,15 meq.L⁻¹ para o pó do SCOBY de chá verde. 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), tornando-se uma variável importante para a qualidade do produto, o que se torna adequado com os valores estabelecidos na Tabela 7. Comparando os resultados obtidos dos pós com a Instrução Normativa para kombucha (BRASIL, 2019), as análises de acidez e pH estão de acordo com os achados nessa pesquisa, em um intervalo de 3,19 a 4,15 para acidez e 2,77 a 2,90 para pH, para os pós dos SCOBY's de acerola, maracujá e chá verde.

Para o parâmetro Vitamina C, observou-se maior teor para o pó do SCOBY de acerola, (1998,04 ± 50,75 mg/100 g), seguido do pó do SCOBY de chá verde (393,46 ± 4,17 mg/100 g) e por último o pó do SCOBY de maracujá (163,29 ± 3,09 mg/100 g). A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é um nutriente essencial que desempenha um papel importante no organismo humano. A sua presença no kombucha, especialmente quando proveniente do resíduo de acerola, pode conferir benefícios adicionais à bebida e contribuir para a sua classificação como uma bebida funcional. A presença de vitamina C pode ser um fator de crescimento microbiano a ser considerado no rendimento em peso do SCOBY (BRUNINI *et al.*, 2004).

O consumo de alimentos ricos em Vitamina C vem crescendo, isso se dá pela busca por alimentos mais saudáveis. A ação antioxidante dessa substância está associada diretamente ao retardo do envelhecimento celular, diminuindo, também, a incidência de doenças

degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares, inflamações, disfunções cerebrais e diversas outras. A vitamina C, também conhecida cientificamente por Ácido ascórbico, teve sua nomenclatura foi alterada pela IUPAC para ácido ascórbico, após estudos que demonstraram sua importância na prevenção e cura do escorbuto. Essa vitamina é um micronutriente essencial, ou seja, não é sintetizado pelo organismo humano, precisando ser ingerido pela dieta para exercer sua atividade funcional. Os valores recomendados de vitamina C para homens adultos e de 110 mg/dia e para mulheres adultas 95 mg/dia (BRUNINI *et al.*, 2004), esses valores são apenas referências gerais e podem variar de acordo com as necessidades individuais. Esta substância está envolvida na síntese e manutenção do colágeno, na síntese de importantes neurotransmissores, como a norepinefrina e serotonina. É essencial para oxidação da fenilalanina e tirosina e para a conversão de flavaína em ácido tetraidrofólico. Esta vitamina também facilita a absorção de minerais como ferro e zinco e auxilia a eliminação de metais como chumbo e níquel, além de promover resistência a infecções e ajudar em processos de cicatrização (TEIXEIRA; MONTEIRO, 2006; MENDONÇA; FONTANA, 2021).

Com relação aos sólidos solúveis, foram obtidos teores de $6,67 \pm 0,32$ °Brix para o pó do SCOBY de acerola, $6,13 \pm 0,06$ °Brix para o pó do SCOBY de maracujá e $8,13 \pm 0,06$ °Brix para o pó do SCOBY de chá verde. Durante esse processo de fermentação, os sólidos solúveis podem diminuir à medida que os açúcares são consumidos pelas bactérias e leveduras do SCOBY. Essa medição pode ser útil para controlar o teor de açúcares e nutrientes na bebida final (SOUZA *et al.*, 2017).

Os resultados dos parâmetros físico-químicos para a composição centesimal dos SCOBY's estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização da Composição proximal dos pós de SCOBYs de bombuchá.

Composição Centesimal				
Pós dos SCOBY's	Parâmetros			
	Proteínas	Cinzas	Lipídios	Aw
	(%)	(g.L⁻¹)	(%)	(%)
SCOBY de acerola	$1,37 \pm 0,20^a$	$2,58 \pm 3,31^a$	$0,56 \pm 0,00^a$	$0,22 \pm 0,00^a$
SCOBY de Maracujá	$1,39 \pm 0,19^a$	$1,08 \pm 0,47^a$	$0,23 \pm 0,00^a$	$0,28 \pm 0,01^a$
SCOBY de Chá verde	$0,63 \pm 0,26^a$	$2,19 \pm 0,20^a$	$0,6 \pm 0,00^a$	$0,24 \pm 0,01^a$

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. Os resultados estão representados pela média \pm desvio padrão.

Diversos estudos mostram a aplicação de novas matérias-primas como substratos alternativos para a fermentação de bebidas similares a kombucha. Na pesquisa desenvolvida por Câmara *et al.* (2022), utilizando como meio alternativo para obtenção da kombucha os coprodutos de goiaba vermelha, abacaxi, caju, manga e cajá, e através da análise da composição centesimal, os autores evidenciaram que o alto valor nutricional dessas matérias-primas influenciou na preparação das kombuchas, sendo assim uma excelente alternativa para os consumidores e indústria alimentícia, podendo atingir um público maior (LEONARSKI, *et al.*, 2021).

Vitas *et al.* (2013), em seus estudos utilizaram como substratos alternativos para obtenção da kombucha sucos de frutas, leite, vinho e cerveja. Assim, a utilização desses substratos vem recebendo atenção especial dos pesquisadores, devido às suas valiosas propriedades nutricionais e bioativas que são agregados aos produtos finais, tais como antioxidante e antimicrobiana (MACAGNAN, 2013).

Pesquisas sobre a produção de celulose bacteriana obtida pelo processo fermentativo da Kombucha, a fim de avaliar também o rendimento na produção da celulose bacteriana vem, sendo necessário para pesquisa de caracterização físico-química desse. Neste sentido, o SCOBY da Kombuchá surge como uma alternativa de baixo custo no desenvolvimento de matérias biodegradáveis a base de celulose.

A determinação da composição centesimal ou percentual dos componentes dos produtos alimentícios inclui a determinação de umidade, proteínas, cinzas, lipídios e atividade de água em 100 g do produto, estando associada a avaliação quantitativa dos nutrientes em um determinado produto e conseqüentemente seu valor nutritivo, proporcionando um mapeamento do produto, ou de um novo produto a fim de aprimorá-lo e fornecer aos consumidores as informações necessárias importantes para aquisição e consumo.

Os teores de proteínas das amostras de pós dos SCOBYs de acerola, maracujá e chá verde encontrados na pesquisa (Tabela 8), apresentaram resultados inferiores a 2 %, destacando-se o pó do SCOBY de maracujá com um maior teor de proteínas. Nos achados da pesquisa realizada por Moraes, Bender e Kottwitz (2020), foi encontrado um valor de proteínas de 0,20 g/100 mL na amostra de kombucha de maracujá, valor inferior ao resultado obtido nessa pesquisa. A diferença entre os resultados de proteínas obtidos nas diferentes amostras analisadas está associada ao fato das kombuchas serem acrescidas de polpas de frutas, colaborando assim para o aumento dos valores proteicos da bebida, apesar das frutas geralmente não serem consideradas fontes de proteínas. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição

de Alimentos – TACO (2011), em 100 g de maracujá é encontrado um valor de 0,8 g de proteínas, valor esse que agregou no pó de SCOBY de maracujá, e para acerola 0,4 g de proteínas. O SCOBY é constituído majoritariamente por proteína e fibras, as proteínas presentes na bebida têm solubilidade em diversos valores de pH, estabilidade e viscosidade (CÂMARA, 2022).

As amostras apresentaram baixos teores de lipídios (Tabela 8), sendo 0,56 para o pó do SCOBY de acerola, 0,23 para o pó do SCOBY de maracujá e 0,60 para o pó do SCOBY de cháverde. O baixo teor lipídico nas amostras dos pós dos SCOBY's está relacionado ao fato de que o chá verde e as frutas utilizadas são alimentos que apresentam baixas quantidades de lipídeos. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011) as frutas acerola e maracujá apresentam 0,20 % de lipídeos. Sendo assim, as frutas são as possíveis fontes de lipídios presentes nas amostras dos pós dos SCOBY's de kombucha (MORAES; BENDER; KOTTWITZ, 2020).

Os lipídios além de exercerem um papel importante como fonte de energia para o organismo ainda auxiliam na absorção de vitaminas lipossolúveis e carotenóides, mas em excesso podem ser prejudiciais à saúde, visto que, uma dieta rica em gorduras consiste em um dos principais fatores na prevalência de sobrepeso e obesidade na atualidade. A distribuição de gorduras, segundo a Ingestão Diária Recomendada, é de 20% a 35% do total de energia para indivíduos adultos e saudáveis (FNB, 2005). Desta forma, os pós dos SCOBYs gerados com adição de coprodutos de frutas contribuem com 0,66% no aporte de lipídios. Segundo a TACO (2011), o baixo teor de lipídios na kombucha está relacionado ao fato de que o chá verde e frutas são alimentos que apresentam baixas quantidades de lipídeos, considerando a maior porcentagem (35%) da distribuição deste macronutriente em uma dieta de 2000 Kcal, trazendo diversos benefícios a saúde do consumidor. Uma dieta de 2000 calorias é geralmente usada por pessoas que estão acima do peso e que desejam emagrecer, pois promove a diminuição na ingestão de calorias que estimula o organismo a usar as reservas de gordura corporal, favorecendo o emagrecimento (OMS, 2000). No entanto, a quantidade de calorias necessária varia de pessoa para pessoa, dependendo de fatores como idade, sexo, altura, peso, nível de atividade física e o objetivo de saúde. Ao desenvolver novos produtos contendo os pós de SCOBYs de kombucha, é importante considerar a quantidade de calorias presentes no produto final, isso é relevante para os consumidores que desejam controlar sua ingestão calórica.

Os valores referentes de cinzas obtidos neste estudo foram de 1,08 a 2,58% (Tabela 8), sendo o valor mínimo obtido no pó de SCOBY de maracujá e o valor máximo de 2,58 obtido no SCOBY de acerola. Os valores obtidos para cinzas estão abaixo dos encontrados nos estudos

de Silva, Silva, e Michelin. (2013), que encontraram valores entre 4,59% e 7%. Já nos estudos realizados por Ribeiro *et al.* (2014), os valores foram entre 0,63 e 0,66 (g.100 g⁻¹) na kombucha obtida com chá verde (*Camellia sinensis*), informando em seus achados que esses valores são independentes da concentração do chá ou tempo de fermentação, o que se aproximou um pouquinho valor mínimo encontrado nesse estudo.

A atividade de água (aw) é considerada um importante fator na avaliação da estabilidade de bebidas e alimentos, isso por corresponder a água termodinamicamente disponível para as reações químicas e bioquímicas (AZEREDO; BRITO; GARRUTI, 2012). Além disto, a (aw) é capaz de fornecer dados importantes sobre a umidade contida na matéria-prima.

Através da Tabela 8, pode-se observar que a atividade de água (aw) varia de 0,22 a 0,28%, isso indica a estabilidade do alimento, estando relacionando com o crescimento microbiano, uma vez que a água que está livre é responsável pelas atividades bioquímicas. Observa-se que, quanto menor essa atividade, mais lentas serão as reações bioquímicas e com isso, menor será a mobilidade da atividade enzimática (SILVEIRA *et al.*, 2016). De uma forma geral, quanto menor a aw, melhor, pois as condições do alimento encontram-se desfavoráveis para o crescimento microbiano, garantindo assim uma maior vida de prateleira, tornando o alimento mais estável microbiologicamente.

Para o parâmetro Atividade de água dos pós de SCOBY desenvolvidos nesta pesquisa, observou-se valores de $0,22 \pm 0,00$ para o pó do SCOBY de acerola, $0,28 \pm 0,01$ para o pó do SCOBY de maracujá e $0,24 \pm 0,01$ para o pó do SCOBY de chá verde. De acordo com Ribeiro e Seravalli (2007), a atividade de água é classificada em baixa (aw até 0,600), intermediária (entre 0,600 a 0,900) e alta (acima de 0,900). Diante disso, os valores encontrados apresentaram baixos valores de aw.

8.4 Análise Microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas estão expressos na Tabela 9. Os resultados obtidos indicam que os pós desenvolvidos são seguros para consumo, do ponto de vista microbiológico, tendo em vista que apresentaram contagens de *E.coli* < 3 NMP/mL.

Tabela 9 - Quantificação de microrganismos presentes nas amostras de pós.

Grupos microbianos	A	B	C
	(UFC.g)	(UFC.g)	(UFC.g)
Bactérias ácido-lácticas	$8,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$

Bactérias ácido-acéticas	< 10	< 10	< 10
Leveduras	< 10	< 10	< 10
Mesófilos aeróbios	2,2x10 ³	2,0x10 ³	4,0x10 ³
<i>Escherichia coli</i>	<3 NMP/ mL	<3 NMP/ mL	<3 NMP/ mL

Fonte: dados obtidos da pesquisa, 2023. Legenda: Amostra A (SCOBY de acerola), amostra B (SCOBY de maracujá) e Amostra C (SCOBY de chá verde).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer em quaisquer etapas de produção, desde a colheita até a chegada na mesa do consumidor. A ingestão de alimentos contaminados pode causar quadros infecciosos leves ou graves dependendo do tipo de micro-organismo e/ou toxina presente no alimento (SANTANA; VIEIRA; PINTO, 2015). A quantificação de microrganismos presentes nos pós de SCOBYs de kombuchá é um processo importante para determinar a concentração e proporção de bactérias e leveduras presentes nesses materiais.

De acordo com Santos *et al.*, (2017), o parâmetro físico-químico pH associado a fermentação da kombuchá, que está associado com os microrganismos responsável pela liberação de ácidos, tornar-se possível assim as altas contagens de bactérias ácido-acético e os mesófilos aeróbios. Devido a produção de ácidos no meio, esse parâmetro pH corrobora para a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis.

Para a contagem de bactérias do ácido-lático, obteve-se o resultado de 8,0x10² UFC/g para a amostra A, 3,0x10² UFC/g para a amostra B e 4,0x10² UFC/g para a amostra C, resultados esses que conciliam com os estudos de Binda *et al.* (2020).

Para a contagem de bactérias do ácido-acético, obteve-se o resultado de < 10 UFC/g nas amostras A, B e C. As bactérias do ácido acético desempenham um papel crucial na produção de kombuchá, pois são responsáveis pela produção do ácido acético. O ácido acético confere ao kombuchá seu sabor característico e também contribui para a preservação da bebida. Portanto, ao analisar as bactérias do ácido acético se pode avaliar a eficiência da fermentação, o controle de contaminação e a consistência na produção da bebida. A contagem das bactérias do ácido acético é de suma importância devido às propriedades funcionais atribuídas a elas. Essas bactérias têm sido associadas a diversos benefícios para a saúde (MENG; ZHANG; LU, 2017).

A contagem de leveduras resultou em <10 UFC/g para as amostras A, B e C. É importante ressaltar que diferentes leveduras podem estar presentes no SCOBY, contribuindo para o sabor, aroma e características da kombucha. No entanto, é

fundamental garantir que as leveduras presentes sejam seguras e não representem riscos à saúde. Para a contagem de mesófilos aeróbios, obteve-se valores de $2,2 \times 10^3$, $2,0 \times 10^3$, $4,0 \times 10^3$ para as amostras A, B e C, respectivamente. Esses microrganismos podem estar presentes naturalmente e nem sempre são considerados patogênicos. No entanto, em geral, espera-se que a contagem de mesófilos aeróbios seja mantida em níveis baixos para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos. Em pesquisas realizadas por Câmara (2022), os resultados obtidos para mesófilos aeróbios se assemelham aos dessa pesquisa.

A presença de *E. coli* em alimentos ou bebidas fermentadas, como a kombucha, pode ser preocupante, pois, podem causar doenças gastrointestinais em seres humanos. Ayed; Abid e Hamdi (2017), observaram nas kombuchas desenvolvidas com suco uma quantidade de 2,7 UFC/mL para *E. coli*, como também verificaram em suas kombuchas uma quantidade de 3,85 UFC/mL, resultados esses que se assemelham com os achados nessa pesquisa, estando todas as amostras seguras para o consumo, do ponto de vista microbiológico.

Os padrões microbiológicos estabelecido pela Resolução 724/2022 de 1º de julho de 2022 estabelece que a presença de contaminantes microbiológicos não deve ser superior ao estabelecido pela mesma (BRASIL, 2022), estando todas as amostras dentro dos padrões estabelecidos.

A Instrução Normativa nº 161/2022, determina alguns padrões microbiológicos para vários grupos de alimentos, visando a *Escherichia coli* um valor de até 10 UFC/mL, os demais grupos de microrganismos foi realizada com o intuito de fornecer mais informações sobre a microbiologia dos pós. Atualmente não existe nenhuma resolução vigente que determine como devem ser os padrões microbiológicos para kombucha (BRASIL, 2001).

8.5 Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Nativo do sudoeste da Ásia, o peixe da espécie *D. rerio*, conhecido popularmente por zebrafish, possui alta similaridade fisiológica com os seres humanos, apresenta respostas comportamentais robustas e tem seu genoma inteiramente sequenciado e caracterizado (CACHAT *et al.*, 2013).

O zebrafish adulto vem sendo empregado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, biologia do desenvolvimento, neurobiológicos e toxicológicos, pois apresenta baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto, alta fecundidade e embriões transparentes (BICHARA *et al.*, 2014; RESENDE; SOCCOL, 2015). Seu pequeno tamanho na fase adulta requer diminuição da quantidade das substâncias a serem testadas e dosadas, bem como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no

tratamento e manutenção dos animais (HILL *et al.*, 2005).

Assim, o zebrafish compreende um excelente modelo para a avaliação da toxicidade de compostos e a biossegurança de possíveis novos produtos farmacêuticos, além de ser menos dispendioso e pode ser realizado rapidamente em grandes números de compostos em paralelo.

Uma das vantagens do uso deste animal é que os produtos químicos ou as drogas novas são facilmente apresentados via oral através da adição à água ou no caso do presente estudo, a própria bebida fermentada administrada em sua totalidade ou diluída, sendo assim necessário muito pouco composto de teste quando comparado aos estudos de dosagem em mamíferos (LIU *et al.*, 2013).

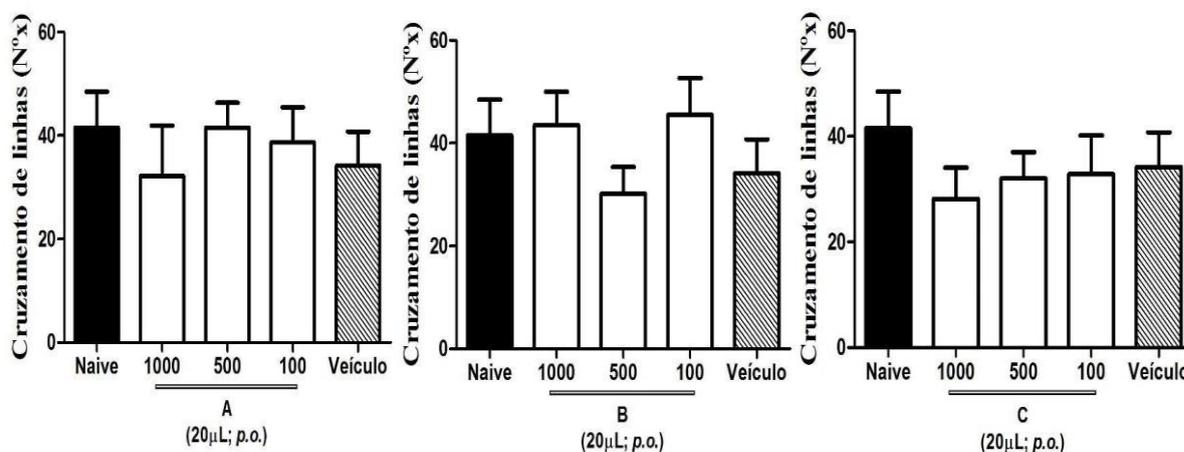
Um dos parâmetros utilizados para estudos comportamentais em animais adultos é a análise da atividade locomotora por exploração de um campo aberto (MAGALHÃES *et al.* 2017).

A análise da atividade locomotora em zebrafish adulto é um método comumente utilizado na pesquisa científica para avaliar os efeitos de substâncias no sistema nervoso central e no comportamento animal (TAYLOR *et al.* 2017). Essa abordagem pode ser aplicada para examinar os possíveis efeitos de drogas, incluindo compostos presentes em produtos alimentícios, como o consumo de kombucha.

Essa análise pode ajudar a identificar se a ingestão do produto pode estar associada a algum comprometimento locomotor ou alteração comportamental nos organismos estudados. Essas informações são relevantes para avaliar a segurança e os possíveis efeitos adversos do consumo do produto em questão.

As alterações no comportamento desses animais iniciam com o aumento ou redução da natação e são parâmetros que indicam o estado geral interno do animal (LITTLE; FAIRCHILD; DELONAY, 1993; SANTOS *et al.*, 2016). Nas Figuras 4, 5 e 6 é possível observar os resultados para o teste de campo aberto dos pós de SCOBYS de acerola, maracujá e chá verde.

Figura 5 - Efeito da amostra A (pó de SCOBY de acerola); efeito da amostra B (pó de SCOBY de maracujá) e efeito da amostra C (pó de SCOBY de chá verde) sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto.



Fonte: dados obtidos da pesquisa, 2023. Legenda - cruzamento de linhas referente à amostra A, B e C nas concentrações 1000, 500 e 100 ppm. Naive animais não tratados. v.o. – administração via oral. Veículo – água destilada estéril (20 µL; v.o.). Os valores representam a média ± desvio padrão da média para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey.

Os gráficos obtidos mostram que a administração dos pós por via oral nos animais não ocasionou um comprometimento motor dos mesmos. Isso sugere que, nas condições experimentais utilizadas, a ingestão dos pós de SCOBYs de kombucha não afetou a atividade locomotora dos animais. Embora tenha sofrido uma redução no número de cruzamentos de linhas na placa de petri pelos animais tratados com os pós de SCOBYs em comparação com o grupo controle e o grupo naïve, é relevante que essa redução não tenha sido estatisticamente significativa. Essa diferença observada pode ser devida à variação aleatória ou a outros fatores não relacionados diretamente à administração dos pós de SCOBYs de kombucha.

8.6 Teste de Toxicidade aguda por 96 h dos pós de SCOBYs kombucha

A toxicologia é responsável pelo estudo da interação do organismo vivo quando entra em contato com as substâncias químicas, podendo ter efeitos tóxicos leves ou permanentes (BRAUNBECK *et al.*, 2015).

Na Tabela 10 é possível observar para os pós de SCOBY de acerola, pó de SCOBY de maracujá e pó de SCOBY de chá verde do estudo não foi registrado nenhuma mortalidade durante o período analisado, já a amostra C, que é a amostra de SCOBY de chá-verde, apresentou uma porcentagem de 33,3% de morte dentro do grupo (mortalidade de 2 peixes). Diante disso, os pós desenvolvidos com substratos alternativos (acerola e maracujá) mostram-se seguros para o consumo humano, não apresentando toxicidade capaz de

comprometer a saúde humana.

Tabela 10 - Mortalidade por dose analisa para o teste de toxicidade aguda das amostras A, B e C dos pós de SCOBY frente ao organismo modelo zebrafish.

Amostras	Mortalidade do <i>Zebrafish</i> adulto				CL 50 (mg/mL) / IV
	CN	A	B	C	
Pó de SCOBY de acerola	0	0	0	0	> 1
Pó de SCOBY de maracujá	0	0	0	0	> 1
Pó de SCOBY de chá verde	0	0	0	2	> 1

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. CN: Grupo controle negativo - água destilada estéril; Amostra A: Pó de SCOBY de kombuchá de acerola; Amostra B: Pó de SCOBY de kombuchá de maracujá; Amostra C: Pó de SCOBY de kombuchá de chá-verde. C1: concentração 1 (100% de kombucha; 20 µL; v.o.); C2: concentração 2 (75% de kombucha; 20 µL; v.o.); C3 – concentração 3 (25% de kombucha; 20 µL; v.o.); CL₅₀: concentração letal para matar 50% dos *Zebrafish* adulto; IV – intervalo de confiança.

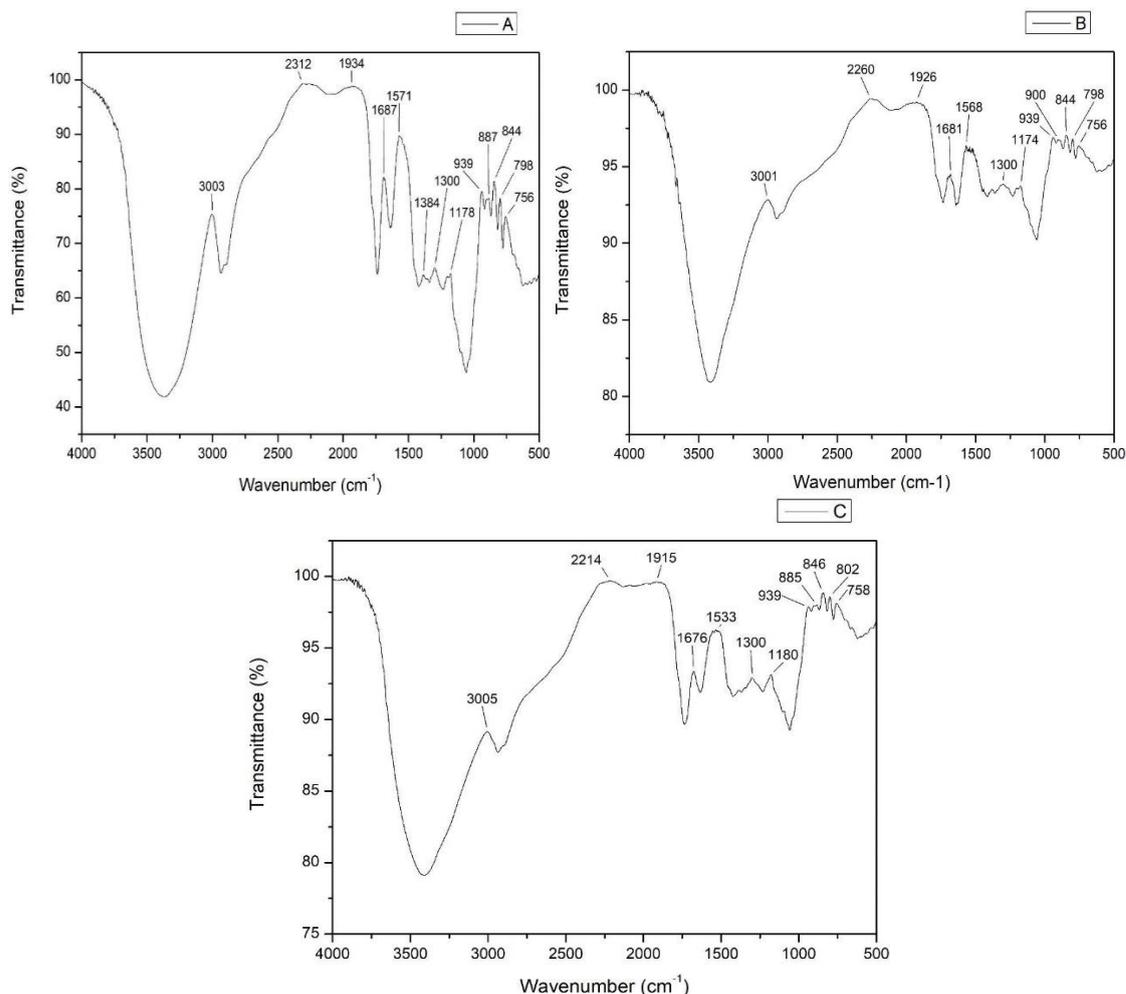
A partir dos resultados obtidos, as concentrações testadas para as três amostras são seguras, com valores de CL 50 (concentração letal para 50% dos organismos) acima de 1 mg/mL, isso indica que as amostras não causaram mortalidade significativa nos organismos testados durante o período de 96 horas.

Uma CL₅₀ acima de 1 mg/mL sugere que as concentrações não são letais para pelo menos metade dos organismos expostos. Isso é um indicativo positivo de segurança em relação aos efeitos agudos das amostras nos organismos analisados.

8.7 Análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) é uma técnica que ajudar a determinar a qualidade e a pureza do pó de SCOBY, bem como fornecer informações sobre a presença de compostos presentes em sua matriz, conforme ilustra a Figura 6. Além disso, uma análise FTIR também pode ser utilizada para comparar diferentes amostras de pós de SCOBY de kombucha, avaliar a estabilidade química do produto e auxiliar no controle de qualidade durante o processo de produção.

Figura 6 - FTIR no pó de SCOBY de acerola, maracujá e chá verde.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A análise de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier) pode revelar informações sobre os compostos funcionais presentes no pó de SCOBY de kombucha de acerola, maracujá e chá verde em uma ampla faixa de comprimentos de onda. Aqui estão alguns dos compostos funcionais comuns e suas respectivas regiões de absorção no espectro de infravermelho (Quadro 1):

Quadro 1 - Apresentação dos compostos funcionais identificados na análise de FTIR.

Caracterização das amostras de pós dos SCOBY's			
Amostra	Compostos funcionais	Comprimento de ondas	Região de ligação
A	Carboidratos	1000-1200 cm^{-1} e 3000-3600 cm^{-1}	C-O-C e O-H
	Proteínas	1650-1700 cm^{-1} e 3100-3500 cm^{-1}	C=O e N-H e O-H
	Lipídios	2800-3000 cm^{-1} e 1700-1750 cm^{-1}	C-H e C=O
	Polifenóis	1600-1700 cm^{-1} e 3200-3600 cm^{-1}	C=C e O-H
B	Carboidratos	1000-1200 cm^{-1} e 3000-3600 cm^{-1}	C-O-C e O-H

	Proteínas	1650-1700 cm^{-1} e 3100-3500 cm^{-1}	C=O e N-H e O-H
	Lípidios	2800-3000 cm^{-1} e 1700-1750 cm^{-1}	C-H e C=O
	Polifenóis	1600-1700 cm^{-1} e 3200-3600 cm^{-1}	C=C e O-H
C	Carboidratos	1000-1200 cm^{-1} e 3000-3600 cm^{-1}	C-O-C e O-H
	Proteínas	1650-1700 cm^{-1} e 3100-3500 cm^{-1}	C=O e N-H e O-H
	Lípidios	2800-3000 cm^{-1} e 1700-1750 cm^{-1}	C-H e C=O
	Catequinas	1600-1700 cm^{-1} e 3100-3500 cm^{-1}	C=C e O-H

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Os carboidratos, como a celulose e outros polissacarídeos, apresentam bandas características em torno de 1000-1200 cm^{-1} (região das ligações C-O-C) e 3000-3600 cm^{-1} (região das ligações O-H). As proteínas presentes no SCOBY podem exibir bandas características em torno de 1650-1700 cm^{-1} (região das ligações peptídicas C=O) e 3100-3500 cm^{-1} (região das vibrações N-H e O-H). Os lípidios podem apresentar bandas em diferentes regiões, dependendo de sua composição específica. Geralmente, podem ser observadas bandas de absorção em torno de 2800-3000 cm^{-1} (região das ligações C-H) e 1700-1750 cm^{-1} (região das ligações C=O dos ácidos graxos). Os polifenóis, como os ácidos fenólicos e flavonoides, podem exibir bandas características em torno de 1600-1700 cm^{-1} (região das ligações C=C aromáticas) e 3200-3600 cm^{-1} (região das vibrações O-H).

É importante ressaltar que os comprimentos de onda exatos das bandas podem variar dependendo da composição específica do SCOBY e de outros fatores experimentais tanto para as amostras A, B e C. No caso específico do pó de SCOBY de maracujá e chá verde (amostra B e C), a presença de compostos funcionais pode variar dependendo da composição química única do maracujá e das interações com o SCOBY.

Essas são apenas algumas diferenças gerais nos compostos funcionais encontrados nos diferentes pós de SCOBY. É importante notar que a composição específica pode variar dependendo do método de preparação, variedade da fruta ou chá utilizado e outros fatores. Uma análise de FTIR detalhada para cada amostra de pó de SCOBY de kombucha seria necessária para uma identificação precisa dos compostos e suas diferenças específicas.

8.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

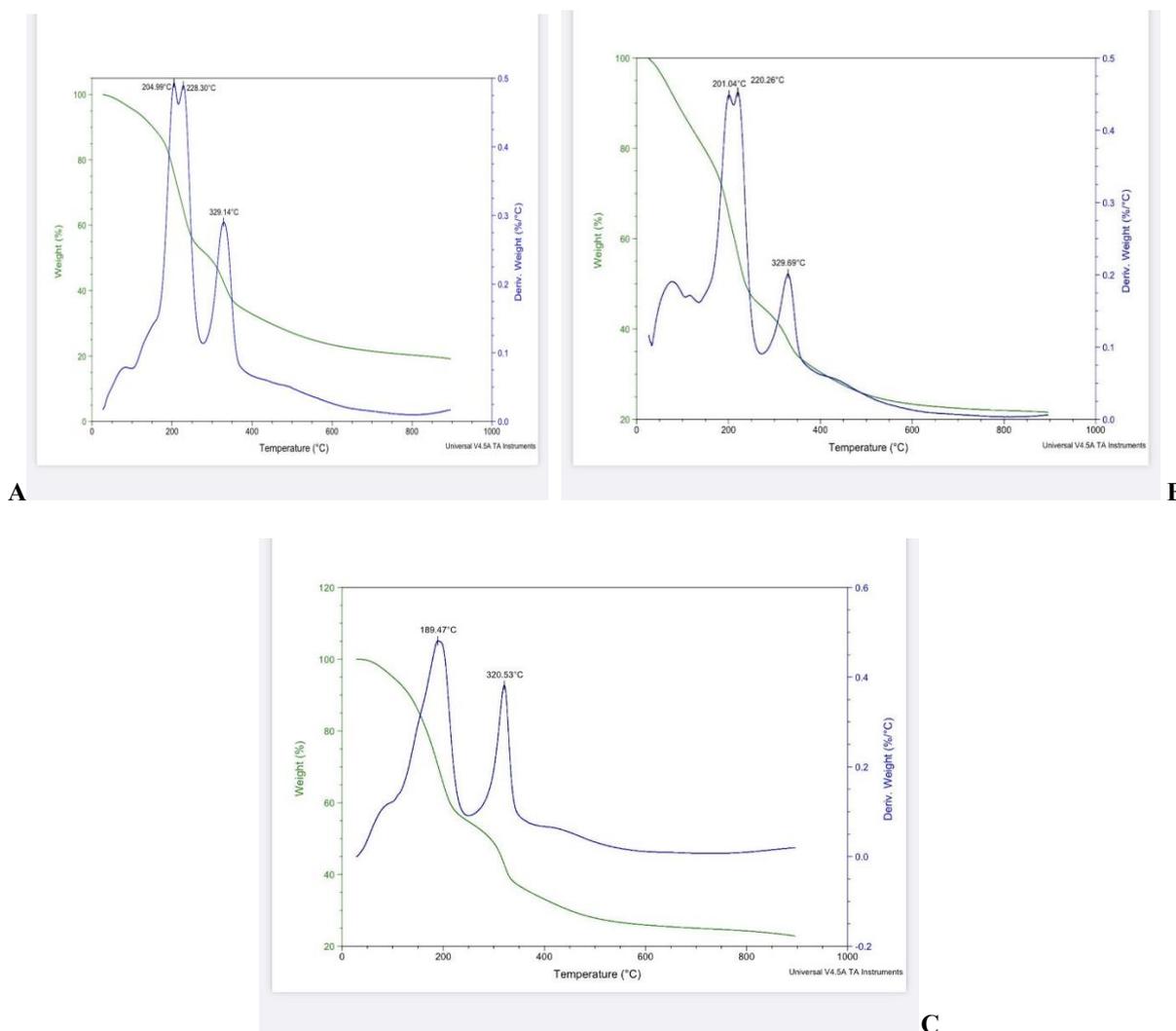
Essa técnica é frequentemente aplicada na caracterização de diversos materiais, incluindo materiais alimentícios como nos pós de SCOBY de kombucha.

Na análise termogravimétrica do pó de SCOBY de kombucha, a amostra é aquecida gradualmente em uma atmosfera controlada, enquanto a variação de massa é monitorada em

função da temperatura. Isso permite determinar a quantidade de massa perdida pela amostra em diferentes faixas de temperatura.

A análise de TGA fornecer informações sobre a estabilidade térmica da amostra, identificando as temperaturas de dissolução de componentes específicos da matriz e avalia a perda de compostos voláteis, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Análise termogravimétrica nos pó de SCOBY's de acerola, maracujá e chá verde.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023. Amostra **A** (pó de SCOBY de acerola). Amostra **B** (pó de SCOBY de maracujá). Amostra **C** (pó de SCOBY de chá verde). A linha azul no gráfico representa a variação da massa da amostra ao longo do tempo em função da temperatura representados nos eixos X e Y. A linha verde representa a variação das mudanças das reações químicas que ocorrem durante o experimento.

Com base nas informações fornecidas na Figura 7, é observado picos iniciais nas temperaturas de 204,99 e 228,30° C na amostra A, para a amostra B é observado picos iniciais nas temperaturas de 201,04 e 229,69° C, e para a amostra C, observa-se picos iniciais nas temperaturas de 189,47 e 320,53° C, esses picos mostram como a massa inicial de cada

amostra diminui a medida que a temperatura vai aumentando.

De acordo com Wang *et al.* (2014) a interação repulsiva entre os grupos de sulfato adicionados leva a uma conformação estendida e rígida. sugere a presença de componentes voláteis ou de baixa estabilidade térmica dos pós de SCOBY. Esses componentes podem incluir compostos orgânicos de baixo peso molecular, como água, solventes residuais, gases ou outros materiais voláteis.

A redução do pico em temperaturas mais elevadas indica a decomposição ou volatilização de componentes mais estáveis termicamente. Isso pode estar relacionado à decomposição de compostos orgânicos mais complexos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios ou outros constituintes de SCOBY.

Essas informações indicam que os pós de SCOBYs passam por diferentes etapas de decomposição térmica à medida que a temperatura aumenta.

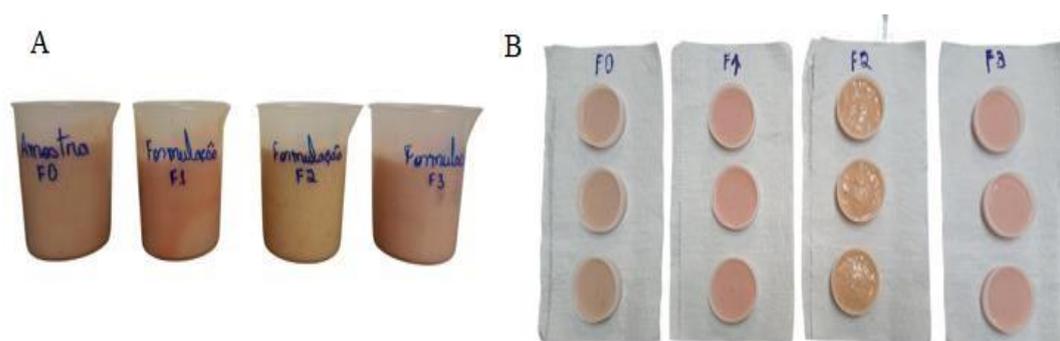
Ao analisar o perfil termogravimétrico dos pós de SCOBYs de acerola, maracujá e chá verde, é possível identificar diferentes estágios de perda de massa. As diferenças nas faixas de temperaturas dos picos iniciais sugerem que os SCOBYs de cada substrato podem conter diferentes compostos voláteis ou ter diferentes teores desses compostos.

Existem diferenças nas características térmicas entre os SCOBYs de acerola, maracujá e chá verde com base nos picos iniciais observados nas temperaturas de decomposição térmica.

9 PROCESSAMENTO DOS *SMOOTHIES*

A elaboração das formulações da bebida *smoothie* seguiu os requisitos básicos das Boas Práticas de Fabricação, obtendo-se, no final do processo, uma bebida sem adição de pó de SCOBY (F0) e com adição de SCOBY de kombucha de acerola (F1), maracujá (F2) e chá verde (F3), conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Processamento das bebidas com a aplicação dos pós desenvolvidos.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023. (A) Formulações homogeneizadas (F0, F1, F2 e F3); (B) Formulações homogeneizadas.

10 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, CENTESIMAL, VITAMINA C E MICROBIOLÓGICAS DAS FORMULAÇÕES DOS *SMOOTHIES*.

Na Tabela 11 apresentam-se os resultados das análises físico-químicas, centesimal e Vitamina C das formulações dos *smoothies*.

Tabela 11 - Análises físico-químicas, centesimal e Vitamina C das bebidas tipo *smoothie* com e sem adição de pó de SCOPY.

Físico-químicas	Formulações das bebidas tipo <i>smoothies</i> (100 mL)			
	F0	F1	F2	F3
pH	4,5 ± 0,60 ^a	4,2 ± 0,12 ^a	4,2 ± 0,250 ^a	4,3 ± 0,27 ^a
Acidez titulável (g/100 g)	2,98 ± 0,02 ^a	3,9 ± 0,10 ^a	4,5 ± 0,040 ^{ab}	5,10 ± 1,010 ^{bc}
Sólidos Solúveis (°Brix)	26,7 ± 0,12 ^a	17,00 ± 0,23 ^b	18,00 ± 0,03 ^b	16,00 ± 0,19 ^b
Atividade de Água (Aw)	0,98 ± 0,001 ^a	0,98 ± 0,00 ^a	0,98 ± 0,001 ^a	0,98 ± 0,002 ^a
Vitamina C (mg/100 g)	51,16 ± 0,23 ^a	275,07 ± 0,11 ^b	145,63 ± 0,04 ^c	74,00 ± 0,01 ^{ad}
Composição	Formulações das bebidas tipo <i>smoothies</i> (100 mL)			
Centesimal	F0	F1	F2	F3
Umidade (%)	11,11 ± 0,24 ^a	6,41 ± 0,16 ^b	7,35 ± 0,02 ^{bc}	7,89 ± 0,32 ^{bc}
Proteínas	2,31 ± 0,43 ^a	4,90 ± 0,35 ^b	3,57 ± 0,13 ^c	2,64 ± 0,33 ^{cd}
Cinzas (%)	0,72 ± 0,55 ^a	3,01 ± 0,23 ^b	1,78 ± 0,02 ^c	2,61 ± 0,65 ^{cd}
Lipídeos	0,25 ± 0,28 ^a	0,58 ± 0,06 ^a	0,44 ± 0,22 ^a	0,35 ± 0,14 ^a

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. As Formulações (F0, F1, F2 e F3) seguem a descrição conforme mencionadas na Tabela 3. Médias seguidas por letra maiúscula na coluna e por letra minúscula na linha não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Valores de pH referem-se um parâmetro de segurança aplicável a produtos alimentícios. Nas pesquisas de Nunes (2016), avaliando a qualidade de 16 *smoothies* comerciais, o autor encontrou em sua pesquisa valores de pH entre 3,8 e 3,7, abaixo dos achados nessa pesquisa. Em estudos realizados por Silva (2017), foram encontrados valores de pH que se assemelham aos da pesquisa, entre 4,99 e 3,77 para *smoothies* com diferentes

concentrações de polpas de maracujá e goiaba. A combinação de fermentação, composição do SCOBY, tempo e ingredientes adicionais pode contribuir para as diferenças observadas nos valores de pH dos dois grupos de *smoothies*, o adicionado com pó de SCOBY de kombucha e o *smoothie* sem adição de pós, esses valores pode ter alterado devido a matriz dos *smoothies* conter ainda leite (pH variando de 6,7-6,9), podendo ter colaborado com o pH alcançado nas amostras.

Os diferentes teores de acidez nas formulações da bebida tipo *smoothie*, pode ter ocorrido devido à degradação das enzimas presentes na mesma, levando ao aumento no seu teor, em alguns casos, favorável, como na inibição da ação de certos microrganismos patogênicos, como também se deve a presença das bactérias ácido-láticas e leveduras presentes que convertem os açúcares presentes na bebida em ácido lático e outros ácidos orgânicos, a adição de pó de SCOBY de kombucha nos *smoothies* pode intensificar e aumentar os teores de acidez. Gallina *et al.* (2019), analisando 36 amostras de *smoothies* elaborados com diferentes polpas de frutas, encontrou valores de acidez que variaram de 0,494 a 1,60g de ácido lático por 100 g de amostra, valores esses inferiores aos encontrados na pesquisa.

Uma diferença também foi observada no teor de sólidos solúveis da bebida desenvolvida sem adição de pó de SCOBY que foi de 26,7 (°Brix), enquanto que para as formulações adicionadas de pó de SCOBY de kombucha apresentaram valores de 16 a 18 (°Brix), provavelmente devido à própria composição, uma vez que a bebida adicionada de pó de SCOBY de kombucha. As bebidas desenvolvidas sem adição de pó de SCOBY de kombucha tem formulações diferentes que podem afetar o teor de sólidos, dependendo dos ingredientes utilizados, como por exemplo a adição de mais frutas e açúcares, isso pode aumentar o teor de sólidos na bebida final.

Na pesquisa realizada por Gallina *et al.* (2019), os valores de sólidos solúveis encontrados nas amostras de *smoothies* de acerola, maracujá, morango e manga variaram de 12,1 a 18,7 (°Brix), valores esses semelhantes aos encontrados neste trabalho.

De acordo com a Tabela 11, pôde-se observar que os valores de A_w para todas as formulações foram de 0,98 não diferindo estatisticamente entre si. Silva *et al.* (2011), descreveram em suas pesquisas valores de A_w 0,60 nos *smoothies* estudados. Os valores de A_w semelhantes entre as formulações confirmam a padronização das mesmas quanto ao teor de líquidos utilizados.

A Vitamina C apresentou maior teor nas formulações F1 e F2, diferindo significativamente a nível de ($p < 0,05$) entre as demais formulações. Essa diferença entre os teores de vitamina C inclui os ingredientes com maior teor de vitamina C, como por exemplo o

pó de SCOBY de kombucha de acerola que apresentou teor de 1998,04 mg/100 g e o pó de SCOBY de maracujá que apresentou teor de 163,29 mg/100 g, portanto, a diferença do teor de vitamina C nas formulações analisadas pode ser explicada por uma combinação de fatores, incluindo a composição dos ingredientes, as concentrações, os processos de produção e as interações entre os ingredientes, como também o tratamento térmico aplicado nas formulações e, sendo um processo natural, já que estudos atuais mostram que fatores, como luz, calor, tipo de embalagem, tratamento térmico aplicado, dentre outros, afetam diretamente o teor de vitamina C e que esse composto se degrada com facilidade, mesmo a bebida tipo *smoothie* sendo mantida na mesma temperatura de refrigeração (CUNHA *et al.*, 2014).

Quando observados os valores para Umidade, apenas a formulação F0 apresentou um valor maior para esse parâmetro que foi de 11,11%, quando comparado com as demais formulações. O *smoothies* da formulação F0 tem maior proporção de ingredientes com alto teor de água e menor teor de ingredientes sólidos, o que pode resultar em um maior teor de umidade em sua composição. Além disso, o pó de SCOBY de kombucha adicionado aos *smoothies* tem efeito absorvente ou desidratante devido à sua capacidade de retenção de água, isso pode reduzir o teor de umidade nas formulações de *smoothies* adicionados de pó de SCOBY de kombucha de acerola, maracujá e chá verde.

Quanto ao teor de Proteínas dos *smoothies*, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o *smoothie* sem adição de pó de SCOBY ($2,31 \pm 0,43$) e os demais. O *smoothie* adicionado de pó de SCOBY de acerola apresentou valor de proteína de $4,90 \pm 0,35$, destacando-se das demais formulações elaboradas, seguido do *smoothie* adicionado de pó de SCOBY de maracujá e do *smoothie* adicionado de pó de SCOBY de chá verde (Tabela 8).

Silva (2017), avaliou o teor de proteínas em quatro formulações de *smoothies* elaborados a base de leite delactosado, polpa de goiaba e maracujá e encontrou valores entre 1,94 a 2,72, próximos aos encontrados para os *smoothies* sem adição de pó de SCOBY e o *smoothie* adicionado de pó de SCOBY de chá verde, já para os *smoothies* adicionado de pó de SCOBY de acerola e maracujá, os valores encontram-se inferiores ao da presente pesquisa. O pó de SCOBY de kombucha é composto principalmente por uma matriz de celulose produzida pelas bactérias e leveduras presentes no SCOBY, essa matriz contém proteínas que contribuem para o aumento dos teores nas formulações dos *smoothies*, conforme observa-se nas Tabelas 8 e 11.

Quanto ao teor de Cinzas das bebidas tipo *smoothie*, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o *smoothie* sem adição de pó de SCOBY e os demais *smoothies* adicionados de pó de SCOBY. O pó de SCOBY de acerola pode conter uma quantidade maior de minerais e compostos inorgânicos em comparação com os pós de SCOBY de kombucha de maracujá e chá

verde, assim, ao adicionar o pó de SCOBY de acerola ao smoothie, é possível aumentar o teor de cinzas (que é indicativo do conteúdo de minerais) na bebida final.

O teor Lipídico nas formulações da bebida tipo smoothie não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações (Tabela 11). Isso revela que a adição de pó de SCOBY não afetou esse componente, embora a maior parte do SCOBY seja composta por celulose e outros carboidratos, também é possível encontrar lipídeos em menor quantidade. Os lipídeos desempenham papéis importantes na estrutura celular e na função metabólica dos microrganismos presentes no SCOBY. No entanto, a quantidade de lipídeos nos pós de SCOBYs de kombucha de acerola, maracujá e chá verde geralmente são mínimos e os resultados obtidos nesta pesquisa se assemelham aos encontrados na pesquisa de Torres Rojas (2016). Portanto essa característica observada nos smoothies é relevante e pode ser utilizada como apelo nutricional, sendo ainda mais atrativo para pessoas com interesse de consumo de alimentos mais saudáveis, com baixo conteúdo lipídico e calórico.

11 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A elaboração das formulações das bebidas tipo *smoothie* sem e com adição de pó de SCOBY seguiu os requisitos básicos das Boas Práticas de Fabricação.

Tabela 12 - Análises microbiológicas das bebidas tipo *smoothie* sem e com adição de pó de SCOBY.

Formulações	Análise microbiológica		
	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	Mesófilos (UFC/g)
F0	< 3	< 3	$2,2 \times 10^2$
F1	< 3	< 3	$3,1 \times 10^2$
F2	< 3	< 3	$3,1 \times 10^2$
F3	< 3	< 3	$2,0 \times 10^2$

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. NMP: número mais provável; F0, F1, F2 e F3 são observadas conforme a Tabela 3.

De acordo com a Tabela 12, observou-se que o processamento dos smoothies seguiu as boas práticas de manipulação obtendo formulações microbiologicamente seguras, e portanto, não sendo veículo de microrganismos envolvidos em Doença Transmitida por Alimento (DTA). Yassin (2019), realizando análise microbiológica em smoothies fermentados com kombucha encontrou resultados similares ao desta pesquisa para coliformes totais,

termotolerantes e bolores e leveduras.

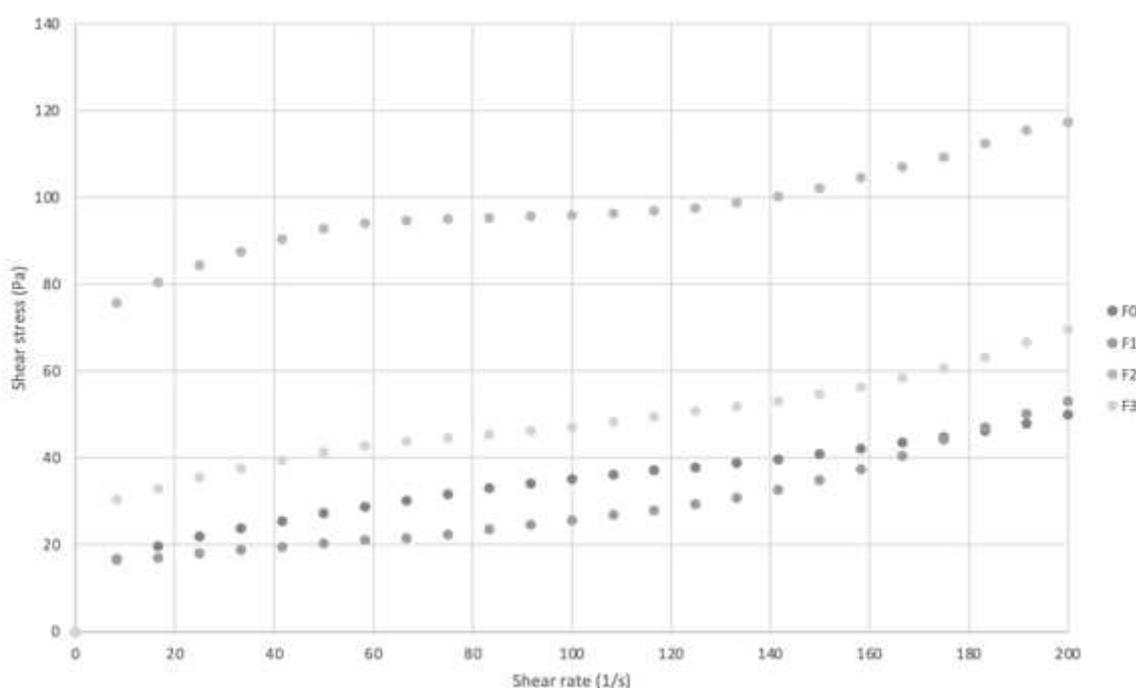
As características de pH e atividade de água desfavoráveis ao desenvolvimento de microrganismos nas formulações de smoothie, além da qualidade da matéria-prima, cuidados higiênicos no preparo e aplicação do tratamento térmico das mesmas pode estar relacionado com a qualidade microbiológica obtida.

12 ANÁLISE REOLÓGICA

Os modelos reológicos obtidos a partir das medições experimentais são úteis na concepção de projetos de engenharia, juntamente com o impulso, energia e os balanços de massas, indispensáveis no processo produtivo de alimentos. Efeitos do tratamento sobre as propriedades reológicas devem ser conhecidos para o melhor controle de processos (SAHIN; SUMNU, 2005). Uma compreensão do comportamento de escoamento é necessária para determinar a viscosidade de um alimento.

Os resultados das análises reológicas estão expressos na Figura 9. Ao conduzir a análise reológica, pode-se realizar testes de cisalhamento controlado para medir a viscosidade do smoothie em diferentes taxas de cisalhamento. Normalmente, o reômetro aplica uma força de cisalhamento ao smoothie e mede a resposta do fluido, como a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento resultante.

Figura 9 - Reogramas do *smoothie* das formulações F0 (controle), F1 (SCOBY de acerola), F2 (SCOBY de maracujá) e F3 (SCOBY de chá verde). Viscosidade em função da taxa de cisalhamento.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

O *smoothie* com adição de pó de SCOBY de acerola (Figura 9) foi o que apresentou comportamento reológico mais semelhante ao controle (F0), seguido do *smoothie* adicionado de SCOBY de chá verde. O *smoothie* adicionado de SCOBY de maracujá (F2) apresentou comportamento reológico muito discrepante das demais formulações, sugerindo que essa amostra possui maior viscosidade quando comparada as demais. Destaca-se que o resíduo de acerola pode conter substâncias, como a pectina, que possam ter influenciado no resultado obtido.

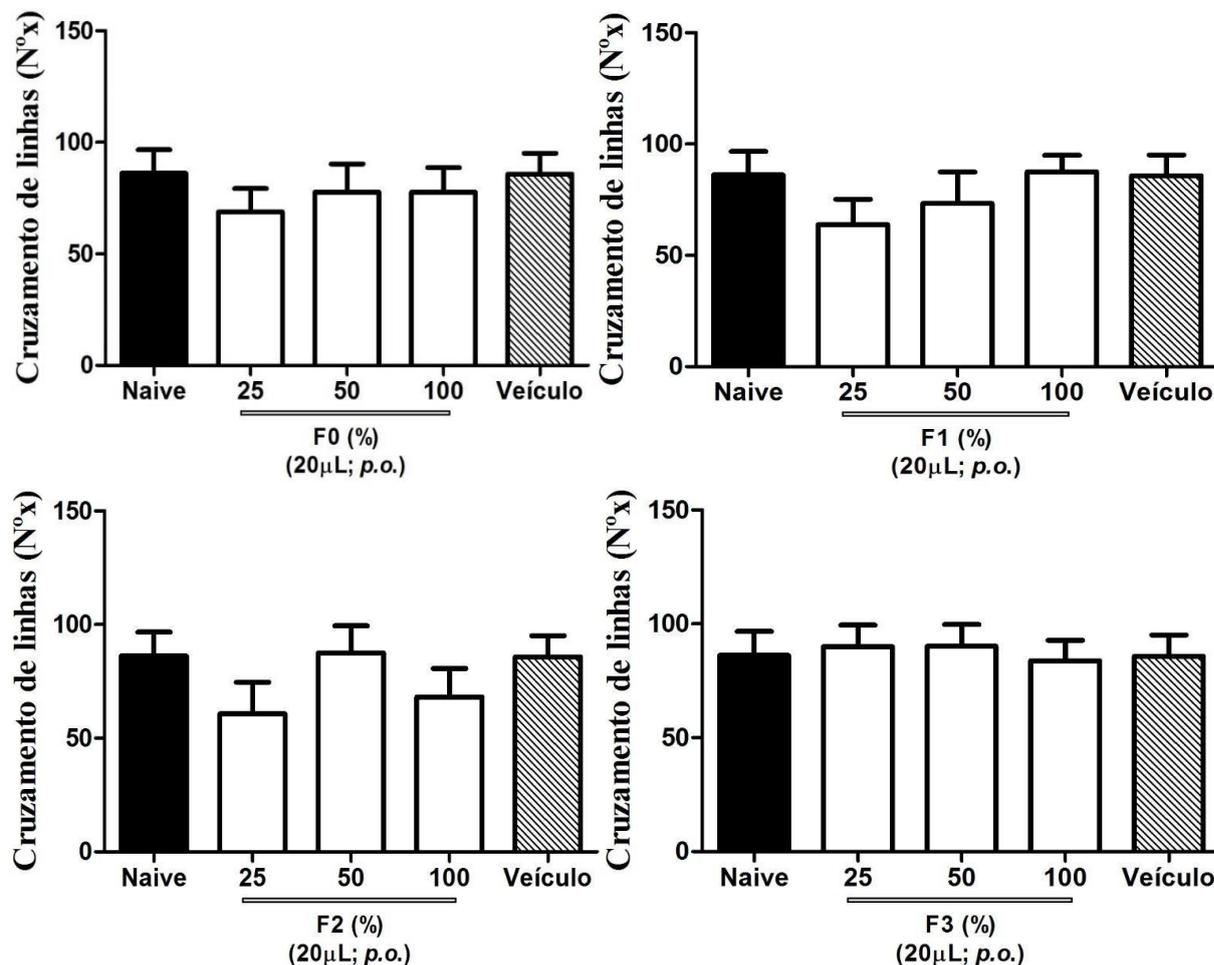
Existem diferentes tipos de comportamento não newtoniano, como pseudoplástico, dilatante, tixotrópico, entre outros. A curva de fluxo para um fluido não newtoniano pode ter uma forma linear descendente (pseudoplástico), uma forma linear ascendente (dilatante) ou uma curva com uma forma cônica, por exemplo. Os *smoothies* desenvolvidos nessa pesquisa apresentaram comportamento pseudoplástico.

13 ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DE CAMPO ABERTO)

Nativo do sudoeste da Ásia, o peixe da espécie *D. rerio*, conhecido popularmente por zebrafish, possui alta similaridade fisiológica com os seres humanos, apresenta respostas comportamentais robustas e tem seu genoma inteiramente sequenciado e caracterizado (CACHAT *et al.*, 2013).

As alterações no comportamento desses animais iniciam com o aumento ou redução da natação e são parâmetros que indicam o estado geral interno do animal (LITTLE; FAIRCHILD; DELONAY, 1993; SANTOS *et al.*, 2016). Na Figura 10 é possível observar os resultados para o teste de campo aberto dos *smoothies* codificados como F0, F1, F2 e F3.

Figura 10 - Efeito das Formulações (F0;F1; F2 e F3) dos *smoothies* sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto.



Fonte: dados obtidos da pesquisa, 2023. Legenda - (Figura 10) - cruzamento de linhas referente à amostra de *smoothie* sem adição de pó de SCOPY (F0); amostra de *smoothie* com adição de pó de SCOPY de acerola (F1); amostra de *smoothie* com adição de pó de SCOPY de maracujá (F2); amostra de *smoothie* com adição de pó de SCOPY de chá verde (F3) nas concentrações de 100, 50 e 25%. Naive - animais não tratados. v.o. – administração via oral. Veículo – água destilada estéril (20 µL; v.o.). Os valores representam a média ± desvio padrão da média para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey.

Na figura 10 é observado ausência de comportamento tóxico em resposta à exposição aos *smoothies* formulados o que torna um resultado altamente positivo. Isso sugere que as formulações não causaram efeitos adversos imediatos ou óbvios nos peixes durante o teste de campo aberto.

O fato de os gráficos apresentarem desvio padrão aceitável é relevante porque indica a consistência dos resultados obtidos nos diferentes grupos de peixes submetidos às formulações F0, F1, F2 e F3. A baixa variação nos dados sugere que os efeitos observados foram uniformes e previsíveis entre os grupos. Esses achados são encorajadores para a produção e consumo desses *smoothies* na alimentação humana, ressaltando sua segurança e

qualidade.

Por mais que já se tenha diversos estudos que avaliaram o possível efeito sedativo de diversos alimentos frente ao zebrafish, há a necessidade de mais estudos que investiguem o efeito sedativo e as vias de atuação dos *smoothies* frente ao zebrafish, sendo esse estudo um dos pioneiros na área.

14 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA POR 96 H DOS SMOOTHIES

Na Tabela 13 é possível perceber que para todas as amostras do estudo não foi registrado nenhuma mortalidade após 96 horas, com valores $CL_{50} > 0,25$ mg / mL, para todas as amostras testadas. Diante disso, as formulações mostram-se seguras para o consumo humano, não apresentando toxicidade capaz de comprometer a saúde humana.

Tabela 13 - Mortalidade por dose analisada para o teste de toxicidade aguda das formulações de *smoothies*.

Mortalidades do <i>Zebrafish</i> Adulto					
Amostra	CN	C1	C2	C3	CL50 (mg/mL) / IV
F0	0	0	0	0	> 0,25
F1	0	0	0	0	> 0,25
F2	0	0	0	0	> 0,25
F3	0	0	0	2	> 0,25

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. CN: Grupo controle negativo - água destilada estéril; Amostra F0: *Smoothie* sem adição de pó de kombuchá; Amostra F1: *Smoothie* adicionado de pó de SCOBY de acerola; Amostra F2: *Smoothie* adicionado de pó de SCOBY de maracujá; Amostra F3: *Smoothie* adicionado de pó de SCOBY de chá verde. C1: concentração 1 (100, 50 e 25% de *Smoothie*; 20 μ L; v.o.); C2: concentração 2 (75% de kombucha; 20 μ L; v.o.); C3 – concentração 3 (25% de kombucha; 20 μ L; v.o.); CL_{50} : concentração letal para matar 50% dos *Zebrafish* adulto; IV – intervalo de confiança.

Não foi encontrado na literatura nenhum tipo de estudo que utilizou essa metodologia para avaliar a toxicidade em amostras de *smoothies* adicionados de pó de SCOBY de acerola, maracujá e chá verde, tornando-se pioneiro para este tipo de bebida.

15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pós de SCOBYs produzidos com subprodutos de acerola, maracujá e chá verde apresentam características físico-químicas adequadas, teores significativos de vitamina C, composição proximal relevante e são microbiologicamente seguros, se destacando o pó de SCOBY de acerola. Esses resultados abrem possibilidades interessantes para a indústria de

alimentos, fornecendo opções nutricionais e sustentáveis para os consumidores, bem como a sua aplicação no desenvolvimento dos *smoothies*.

Os *smoothies* avaliados apresentaram condições microbiológicas satisfatórias e suas características físico-químicas foram muito diferentes entre si comparando o *smoothie* sem adição de pó de SCOBY de kombucha como os *smoothies* adicionados de pó de SCOBY de acerola, maracujá e chá verde, agregando assim valores nutricionais aos *smoothies* adicionados de pó de SCOBY.

A análise de FTIR e TG em *smoothies* sem adição de pó de SCOBY de kombucha e adicionados de pó de SCOBY de kombucha de acerola, maracujá e chá verde, forneceu informações valiosas sobre as mudanças químicas causadas pela adição desse ingrediente, permitindo uma melhor compreensão da composição e qualidade dos *smoothies*.

O teste de atividade locomotora em zebrafish adulto realizado nas formulações não diminuíram sua atividade locomotora (mobilidade) do zebrafish (*D. rerio*) adulto em campo aberto. visto que as formulações testadas foram comparadas entre si. Além disso, todas as formulações demonstraram ser seguras para o consumo humano, não apresentando toxicidade capaz de comprometer a saúde humana sendo consumidas puras ou diluídas até 25%.

16 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Sugere-se que as bebidas sejam submetidas à análise sensorial, por meio de testes afetivos, a fim de verificar a sua aceitação pelos consumidores. Além disso, estudos envolvendo a determinação de compostos bioativos podem ser conduzidos com o intuito de verificar se as bebidas possuem atividade biológica. Monitorar a vida útil das amostras de *smoothies* ao longo do tempo, considerando critérios microbiológicos, físico-químicos e sensoriais pré-estabelecidos, realizando uma análise estatística para estimar a duração da vida útil das amostras e o impacto desses ingredientes na qualidade do produto final.

É importante ressaltar que uma interpretação completa dos resultados das análises FTIR e termogravimétrica requer conhecimento detalhado da composição química e estrutura dos SCOBYs de acerola, maracujá e chá verde, bem como a realização de análises complementares, como espectroscopia ou análise de produtos de degradação, para confirmar as suposições feitas com base nos dados das análises realizadas TGA.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, S. S. Bacterial Cellulose of Kombucha Mushroom Tea. **New York Science Journal**, [s. l.], v. 5(4), p. 81–87, 2012.
- ADIAMO, O. Q.; GHAFOOR, K.; AL-JUHAIMI, F.; BABIKER, E. E.; AHMED, I. A. M. Thermosonication process for optimal functional properties in carrot juice containing orange peel and pulp extracts. **Food Chemistry**, v. 245, p. 79–88, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.090>
- ADRIANI, L.; MAYASARI, N.; ANGGA; KARTASUDJANA, R. The effect of feeding fermented kombucha tea on HLD, LDL and total cholesterol levels in the duck bloods. **Biotechnology in Animal Husbandry**, Zemun, v. 27, n.4, p. 1749-1755, 2011. <https://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=1450-91561104749A>
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behav Processes**, [S.l.], v. 92, p.88-98, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014>
- ALOULO, A.; HAMDEN, K.; ELLOUMI, D. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 63, p. 1–9. Mai, 2012.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 17. ed. Washington: APHA, 2015.
- ANDRADE, B. A.; PERIUS, D. B.; DE MATTOS, N. V.; DE MELLO LUVIELMO, M.; MELLADO, M. S. Produção de farinha de banana verde (*Musa* spp.) para aplicação em pão de trigo integral. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 1-10, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.5516>.
- ANDRÉS, V.; VILLANUEVA, M. J.; TENORIO, M. D. The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in *smoothies* during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 328-35, 2016.
- ARELLANO-AGUIAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCÍA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences**, [S.l.], v.9, p.52-62, 2015.
- AYED, L.; ABID, S. B.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111-121, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S.; GARRUTI, D. S. Alterações químicas em alimentos durante a estocagem. In: AZEREDO (Ed.) **Fundamentos da estabilidade de alimentos**. Brasília: Embrapa. p. 15-38, 2012.
- AZEVEDO, L. N. **Fermentação secundária do Kombucha com polpa de frutos do palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius): efeito do tempo e da concentração na qualidade**

do produto. 2020. 44f. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Univerisdade Vila Velha. Vila Velha. 2020.

BAIANO, A.; MASTROMATTEO, M.; DEL NOBILE, M. A. Effects of cultivar and process variables on dynamic-mechanical and sensorial behavior of value-added grape-based *smoothies*. **Molecules**, v. 17, p. 11421-11434, 2012.

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

BATISTA, E. M. **Aproveitamento dos resíduos industriais de frutas na elaboração de barras de cereais.** 2013. 68p. Monografia (Especialização em Segurança Alimentar). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Limoeiro do Norte-CE, 2013.

BATISTA, E. M.; MOISES, R. M. M.; SOUZA, P.A.; REGIS, A. A.; REGES, B. M.; REGES, S. C. N.; ALMEIDA, J. I. O.; OLIVEIRA, A. M.; NUNES, M. V.; CRUZ, R. S. **Aproveitamento dos resíduos industriais de frutas na elaboração de barras de cereais.** Ed 2.Ponta Grossa (PR). Brasil: Atena Editora, v. 2, p. 18-33, 2021.

BATISTA, M. E. **Influência dos tipos e substratos na cinética mássica de produtos da película celulósica do kombucha.** 2019. 37p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. BAZZO, G. C.; SEGATTO SILVA, G. C. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 315-322, 2012.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondriadependent apoptosis. **Pathophysiology**, v. 18, n. 3, p. 221–234. Jun 2011.

BICHARA, D.; CALCATERRA, N. B.; ARRANZ, S.; ARMAS, P. SIMONETTA, S. H. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. **Journal of Applied Toxicology**, 2014. <https://doi.org/10.1002/jat.2856>

BINDA, S.; HILL, C.; JOHANSEN, E.; OBIS, D.; POT, B.; SANDERS, M. E.; TREMBLAY, A.; OUWEHAND, A. C. Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1662, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>

BRAIBANTE, M. E. F.; SILVA, D.; BRAIBANTE, H. T. S.; PAZINATO, M. S. A química dos chás. **Química e Sociedade**, v.00, n.0,p xxx, 2014. Disponível em: <http://qnesc.s bq.org.br/online/prelo/QS-47-13.pdf>. Acesso em 20 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Dispõe sobre o Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de

identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**, nº 8.918 de 14 de julho de 1994. Brasília-DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece o padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, nº 181, p.13, 2019. Acesso em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>. Acesso em: 25 nov, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 103, de 20 de setembro de 2018., Consulta pública sobre Projeto de Instrução Normativa para estabelecer Padrão de Identidade e Qualidade de Kombucha. **Diário Oficial da União**. ed. 188, seção 1, p. 18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 724 de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**. nº 126, de 6 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, Seção 1, p. 45-53, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução ANVS/MS nº 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico de procedimentos para o registro de alimentos e ou novos ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D.; STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, ISSN18098797, v.6.2, p.127-139, 2011.

BRUNINI, M. A.; MACEDO, N.B.; COELHO, C. V.; SIQUEIRA, G. F. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 486-489, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000300027>

BRUSCHI, J. S.; SOUSA, R. C. S.; MODESTO, K. R. O ressurgimento do chá de kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão - REIcEn**, v. 1, n. Esp., p. 162– 168. Jul, 2018.

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

CACHAT, J.; KYZAR, E. J.; COLLINS, C.; GAIKWAD, S.; GREEN, J.; ROTH, A.; EL-OUNSI, M.; DAVIS, A.; PHAM, M. LANDSMAN, S.; STWART, A. M.; KALUEFF, A. V. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: the developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p.

258-269, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.041>

CÂMARA, G. B.; PRADO, G. M do.; SOUSA, P. H. M de.; LIMA, A. R. N.; OLIVEIRA, L. SOUZA de.; FURTADO, J. A.; SILVA, L. M. R da. Potencial de aplicabilidade de coproduto de frutas no desenvolvimento bebidas fermentadas do tipo kombucha: um estudo de revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, e33811525846, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.25846>.

CASA VOGUE. “**Kombucha saiba tudo sobre a bebida milenar que emagrece**”. Jun. 2018. Disponível em: <https://casavogue.globo.com/LazerCultura/noticia/2018/06/dossie-kombucha-saiba-tudo-sobre-bebida-milenar-que-emagrece.html> Acesso em: 26 Out. 2022.

CAVALCANTI, M. A.; SELVAM, M. M.; VIEIRA, R. R. M.; COLOMBO, C. R.; QUEIROZ, V. T. M. **Pesquisa e desenvolvimento de produtos usando resíduos de frutas regionais: Inovação e integração no mercado competitivo. Maturidade e desafios da Engenharia de Produção: competitividade das empresas, condições de trabalho, meio ambiente.** São Carlos, SP, Brasil, 12 a 15 de outubro de 2010.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, [S.l.], v. 78, p. 1-5; 2013.

CONEGERO, J.; RIBEIRO, L. C.; COSTA, J. M. C.; MONTEIRO, A. R. G. Stability of ‘mangaba’ pulp powder obtained by freeze drying. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 9, p. 645-650, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n9p645-650>

COSTA, P. Z. R. C.; BIZ, P. **Cultivando materiais: o uso da celulose bacteriana no design de produtos.** 3º simpósio de pós-graduação em design da ESDI. Rio de Janeiro, 22 e 23, nov, 2017.

CUNHA, K. D.; SILVA, P. R. da.; COSTA, A. L. F. e S. da F.; TEODORO, A. J. Estabilidade de ácido ascórbico em sucos de frutas frescas sob diferentes formas de armazenamento. **Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 139-145, 2014.

CHAKRABORTY, S.; KAUSHIK, N.; RAO, S.; MISHRA, H. N. High pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 578-596, 2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12071>

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Fermentative Production of Microbial Cellulose. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, p. 2009.

CHENG, T. O. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 301-308, 2006.

DAMIANI, C.; ALMEIDA, A. C. S.; FERREIRA, J.; ASQUIERI, E. R.; VILAS BOAS, E. V. B.; SILVA, F. A. Doces de corte formulados com casca de manga. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 360-369, 2011.

DAN, I. International Journal of Gastronomy and Food Science. **International Journal of**

Gastronomy and Food Science, v. 13, n. May, p. 38–46, 2018.

DOMENEGHETTI, P. A.; SOARES, M. G.; SCHMIDT, V. C. R. Caracterização de SCOBY do Kombucha para a produção de biofilmes. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Uberlândia, MG 21-24 jul, 2019.

DONINI, I. A. N.; SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARU, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana, **Eclética química**, v. 35, n.4, 2010.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha and health: a review. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 409-421, jul. 2000.

DUTTA, H.; PAUL, S.K.R. **Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects**. Production and Management of Beverages, [s.l.], p.259-288, 2019.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/acerola>> acessado em: 03 de out, 2022.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Estudos socioeconômicos e ambientais. Produção vegetal: debate impactos da covid-19 na fruticultura tropical. **Revista Da fruta**, 2020. Disponível em: <https://www.revistadafruta.com.br/eventos/embrapa-debate-impactos-da-covid-19-na-fruticultura-tropical>, 361259.jhtml Acesso em 23 set, 2020.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición**. 1997, 335 p. Universidad de Chile - Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos - Santiago, Chile.

FIESP (Federação das Indústrias do Estado de São Paulo); ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos). As tendências da alimentação. *In: Brasil Food Trends*. 2020. Cap. 2, p. 23-38. São Paulo, 2010.

FONTES, V.; PEREIRA, D. C.; PUPIN, B.; SAKANE, K. K. Aplicação de espectroscopia no infravermelho: como ferramenta para análise quantitativa de orégano. **Revista Univap**. São José dos Campos-SP-Brasil, v. 26, n. 51, 2020. ISSN 2237-1753.

Food and Nutrition Board. (FNB). Dietary Fats: Total Fat and Fatty Acids. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). 2005.

GALLINA, D. A.; BARBOSA, P. P. M.; ORMENESE, R. C. S.; GARCIA, A. O. Development and characterization of probiotic fermented smoothie Beverage. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, n. 3, p. 378-386, jul-set, 2019. ISSN 1806-6690

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologias de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GLOBAL Industry Analysts. **Global smoothies' market to reach \$11.0 billion by 2018, according to new report by Global Industry Analysts, Inc**. 2019. Disponível em:

http://www.prweb.com/releases/smoothies_market/frozen_mix_smoothie/prweb3808804.htm. Acesso em: 18 set, 2019.

GOH, W. N.; ROSMA, A.; KAUR, B.; FAZILAH, A.; KARIM A. A.; BHAT, R. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 109-117, 2012b.

GOH, W. N.; ROSMA, A.; KAUR, B.; FAZILAH, A.; KARIM, A. A.; BHAT, J. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (kombucha). II. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 153–158, 2012a.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, K. M. S. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HUANG, Y.; ZHANG, J.; HAN, X.; HUANG, T. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v.11, n. 4 p.3650-3660, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph110403650>

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Edição, 1ª Edição Digital, 2008.

IASSIN, L. S. **Desenvolvimento de Smoothie fermentado por microorganismos da kombucha com base no perfil de consumo, composição química, compostos bioativos e descrição sensorial**. 2019, 112 f. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Mycologist**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 166-170, nov. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80034-8)

JASA (Juice and Smoothie Association). **Smoothie history**. Disponível em: <http://www.smoothiecentral.com/Flashsite/index.html>. Acesso em: 18 set 2020.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R.V.; LONCAR, E.S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A Review on Kombucha Tea –Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Changes in free radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>

KAUFMANN, K. *Kombucha Rediscovered! Revised Edition The Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea*. **Book Publishing Company**, 2013.

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, 99, 98–100, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.060>

KHANDPUR, P.; GOGATE, P. R. Understanding the effect of novel approaches based on ultrasound on sensory profile of orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p.87-95,2015.

KIM, D. H.; JEONG, D.; KANG, I. B.; LIM, H. W.; CHO, Y. J.; SEO, K. H. Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 3903-3911, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15639>

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAVABALAN, R.; OROS, J. H.; ESCALANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

LEONARSKI, E.; CESCO, K.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B. U.; OLIVEIRA, D.; POLETTO, P. Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material, **LWT**, v. 135, p. 110075, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110075>

LITTLE, E. E.; FAIRCHILD, J. F.; DELONAY, A. J. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. [s. l.]: **American Fisheries Society**, 1993.

LIU, C.; WANG, O.; LIANG, K.; LIU, J.; ZHOU, B.; ZHANG, X.; LIU, H. L.; GIESY, J. P. YU, H. Effects of tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate and triphenyl phosphate on receptor-associated mRNA expression in zebrafish embryos/larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 128, p. 147-157, 2013.

MACAGNAN, F. T. **Potencial tecnológico e nutricional de subprodutos do processamento de frutas**. 2013. 161 f. Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. A. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A. O.; LIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. S.; CAMPOS, A. R. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin induced nociception. **Zebrafish**, [S.l.], v. 4, p.422-429, 2017. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1436>

MAIA, Y. L. M.; CORREIA, L. S.; NETO, J. V. S.; CASTRO, B. N. Kombucha: características e aspectos biológicos. **Revista: RRS-FRESGO**, vol.03, n.1, pp. 114-123. Jan-jul, 2020.

MALBASA, R., LONCAR, M., DJURIC, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p.1039-1045, 1 fev.2008. DOI: 10.1016/j. foodchem, 2007.

- MARSH, A.; OSULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R.P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178. Ago, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- MAYSER, P.; FROMME, S.; LEITZMANN, G.; GRUNDER, K. The yeast spectrum of the tea fungus Kombucha. **Mycoses**, [s. l.], v. 38, n.7-8, p. 289-295, jul-ago. 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x>
- MEDEIROS, S. C. G.; CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Kombucha: Efeitos in Vitro e inVivo. **Infarma: Ciências Farmacêuticas**, v. 31, n. 2, p. 73–79. Out 2019.
- MENDONÇA, J. K. A.; FONTANA, T. C. Variação da concentração de vitamina C em sucos de laranja armazenados com diferentes condições de luminosidade e temperatura. **Revista Thema**, v. 19, n. 1, p. 95-106, 2021. <https://doi.org/10.15536/thema.V19.2021.95-106.1459>
- MENESES, V. P.; SILVA, J. R. A.; NETO, J. F.; ROLIM, H. O.; ARAÚJO, A. L. M.; LIMA, P. S. E. Subprodutos de frutas tropicais desidratados por secagem conectiva. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 4, p. 472-482, 2018. <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v13i4.5810>
- MENG, J.; ZHANG, Q. X.; LU, R. R. Surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM inhibit intestinal pathogen-induced apoptosis in HT-29 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 96, p. 766–774, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.085>
- MINTEL, G. **Fruit juice, juice drinks and smoothies**. 2016. Disponível em: <http://store.mintel.com/fruit-juice-juice-drinks-and-smoothies-uk-november-2016>. Acesso em: 18 set, 2020.
- MIRANDA, J. F.; RUIZ, L. F.; SILVA, C. B.; UEKANE, T. M.; SILVA, K. A.; GONZALES, A. G. M.; FERNANDES, F. F.; LIMA, A. R. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 503–527, 2022. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- MORAES, L. S.; BENDER, S.; KOTTWITZ, L. B. M. Determinação composicional de amostras de kombuchas acrescidas de polpas de frutas. **FAG JOURNAL OF HEALTH (FJH)**, v. 2, n. 2, p. 252-258, 2020. <https://doi.org/10.35984/fjh.v2i2.213>
- MOURA, A. B. **Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá mate**. 2019. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2019.
- NEPA; UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO**, 4ª edição revisada. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.
- NUNES, M. A.; COSTA, A. S. G.; BARREIRA, J. C. N.; VINHA, A. F.; ALVES, R. C.; ROCHA, A., & OLIVEIRA, M. B. P. P. (2016). How functional foods endure throughout the shelf storage? Effects of packing materials and formulation on the quality parameters and bioactivity of smoothies. **LWT - Food Science and Technology**, 65, 70-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.061>.

OECD. Guideline for testing of chemicals. **Fish, acute toxicity test**. 1992. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em: 02dez, 2020.

OLIVEIRA, L.; LORDELO, F.; TAVARES, J.; CAZETTA, M. Elaboração de Bebida Fermentada Utilizando Calda Residual da Desidratação Osmótica de Abacaxi (*Ananas comusus* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. V.06, n.01: p. 702-712. UTFPR. Paraná, 2012.

ORGANIZACION MUNDIAL DE EL LA SALUD – OMS. **Necessidades de energia y proteínas**. Genebra, OMS, 2000. 220p.

PAIVA, Y. F.; XAVIER, L. E.; SOUZA, D. G.; CAVALCANTI, M. T.; GARCIA, E. F. Qualidade de bebida tipo *smoothie* de frutas tropicais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 29, n.242/243, p. 931-935, 2015.

PALUDO, N. **Desenvolvimento e caracterização de Kombucha obtida a partir dechá verde e extrato de erva mate: processo artesanal e escala laboratorial**. 2017. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

PORTES, L. **Identificando as frutas para o desenvolvimento de smoothie para público infante-juvenil**. p. 27, 12. ed. São Paulo: IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas, 2009.

REISS, J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 198, n. 3, p. 258-261, 1994.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. Vol. 1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2015.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2007.

RIBEIRO, O. A. S.; FONSECA, C. M.; FIGUEREDO, S. P.; BOARI, C. A.; NEUMANN, D.; ABREU, L. R. Bebida láctea fermentada formulada com *Camellia sinensis*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** 2014;32(2).

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

RODRÍGUEZ-VERÁSTEGUI, L. L.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B. CASTILLEJO, N.; GÓMEZ, P. A.; ARTÉS, F.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetable *smoothies* during storage. **Food Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 137- 146, 2016.

SAHIN, S.; SUMNU S. G. Size, Shape, Volume, and Related Physical Attributes in **Physical Properties of Foods**. Middle East Technical University Ankara: Turkey, 2005.

SANCHO, S. de O.; SILVA, A. R. A.; DANTAS, A. N. S.; MAGALHÃES, T. A.; LOPES, G.

S.; RODRIGUES, S.; COSTA, J. M. C.; FERNANDES, F. A. N.; SILVA, M. G. V. Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. **Journal of Chemistry**, Article ID 264284, p. 1-9, 2015.

SANTOS, C. C. S.; MASSULO, M. CERULLI, A.; MARI, A.; ESTEVAM, C.S.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, v.140, p.45-51, 2017.

SANTOS, I. V. F.; DUARTE, J. L.; FERNANDES, C. P.; KEITA, H.; AMADO, J. R. R.; VELÁZQUEZ-MOYADO, J. A.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C. T. Use of zebrafish (*Danio rerio*) in experimental models for biological assay with natural products. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 10,n. 42, p. 883-891, 2016.
<https://doi.org/10.5897/AJPP2016.4662>

SANTOS, L. M. L. **Produção de pó de acerola verde via atomizações Spray Drying para elaboração de sorvete enriquecido com vitamina C**. 2014. 86f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *campus* Limoeiro do Norte, Limoeiro do Norte, 2014.

SANTOS, M. L. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para o uso em restaurante**. 2016. 117f. Instituto Superior de Agronomia. Dissertação. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

SCHROEDER, J. **Kombucha fermentada a partir de resíduos de acerola**. 2019. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019.

SILVA, B. C.; SILVA, F.; MICHELIN, D. C. Avaliação da qualidade de amostras de *Camellia sinensis* (L.) *Kuntze* (Theaceae) comercializadas no município de Araras– SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, 2013.

SILVA, C. F. G; SANTOS, F. L.; SANTANA, L. R. R de.; SILVA, M. V. L.; CONCEIÇÃO, T de. A. 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.
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.10617>.

SILVA, E. F. **Bebida tipo Smoothie a base de leite delactosado**. 2017, 63f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *campus* Limoeiro do Norte. Limoeiro do Norte, 2017.

SILVA, F. A. S. **ASSISTAT: Versão 7.7 beta**. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Tecnologia e Recursos Naturais. Departamento de Engenharia Agrícola, 2016.

SILVA, I. F. B.; SOUSA, B. A. A.; BESERRA, A.; SILVA, W. A.; MEDEIROS, G. C. A. Elaboração de biscoitos tipo cookies com farinha de resíduos do processamento de polpa de acerola. **ENECT - Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia**, UEPB, 2011.

SILVA, M. B. de; RAMOS, A. M. Composição química, textura e aceitação sensorial de doces em massa elaborados com polpa de banana e banana integral. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56,

n. 5, p. 551-554, 2009.

SILVEIRA, M. L. R.; SANTOS, C. O.; PENNA, N. G.; SAUTTER, C. K.; ROSA, C. S.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Aproveitamento tecnológico das sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.) como farinha na elaboração de biscoitos. **Boletim CEPPA**, [s.l.] v. 34, n. 1, p. 1-20, 2016.

SMITH, V.; GREEN-PETERSEN, D.; MOGELVANG-HANSEN, P.; CHRISTENSEN, R. H. B.; OVISTGAARD, F.; HYLDING G. What's (in) a real *smoothie*: a division of linguistic labour in consumers' acceptance of name-product combinations? **Appetite**, v. 63, p. 129-140, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.10.020>

SOUZA, L. F. S.; DOMINGOS, L. F.; FARIAS, V. L.; LUZIA, D. M. M. Avaliação físico-química e estabilidade do ácido ascórbico em sucos de frutas comercializados no município de Frutal, Minas Gerais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.12, Nº 4, p. 791-797, 2017.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589–2594. Jun 2000. <https://doi.org/10.1021/jf991333m>

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

TAYLOR, J. C.; DEWBERRY, L. S.; TOTSCH, S. K.; YESSICK, L. R.; DEBERRY, J. J.; WATTS, S. A.; SORGE, R. E. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 174, p. 83-88, 2017.

TEIXEIRA, M.; MONTEIRO, M. **Degradação de vitamina C em suco de fruta**. Alimentação e Nutrição, Araraquara. v. 17, n. 2, p. 219-227, 2006.

TORRES ROJAS, M. F. **Propiedades antagónicas de disoluciones de kombucha contra *Sclerotium cepivorum* Berk.** 2016. 87f. Trabalho de Conclusão de Curso. Bachiller en Ingeniería Agrícola. Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca-Perú, 2016.

VALENÇA, R. S. F.; SANTANA, M. F. S. ; FREITAS, M. M. Aproveitamento da casca de bacuri para elaboração de biscoitos. *In*: VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, **Anais**. 2008.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588. Mar 2018.

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

VITAS, J. S.; MALBAŠA, R. V.; GRAHOVAC, J. A.; LONČAR, E. S. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.129-

139, 2013.

WALKLING-RIBEIRO, M.; NOCI, F.; CRONIN, D. A.; LYNG, J. G.; MORGAN, D. J. Shelf life and sensory attributes of a fruit *smoothie* type beverage processed with moderate heat and pulsed electric fields. **LWT – FoodScience and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1067–1073, 2010.

WANG, Y.; JI, B.; WU, W.; WANG, R.; YANG, Z.; ZHANG, D.; TIAN, W. Hepatoprotective effects of kombucha tea: Identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, n. 2, p. 265–272. Jan 2014.

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

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, n. 1, p. 1–11. Dez 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>

WATSON E. **Fermentation on fire**: US retail sales of kombucha and other fermented beverages surged 37.4% in 2017. 2018.

YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v. 51, n. 25, p. 7396-7401, Dec. 2003. <https://doi.org/10.1021/jf030127i>

YASSIN, L. S. **Desenvolvimento de smoothie fermentado por microrganismos da kombucha com base no perfil de consumo, composição química, compostos bioativos e descrição sensorial**. 2019. 112f. Tese de Doutorado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

ANEXO A – CADASTRO NO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Grupos experimentais:

- Grupo 1: Animais tratados previamente com nanoemulsão com o óleo de *Annona squamosa* (0,025 mg/mL)
Grupo 2: Animais tratados previamente com nanoemulsão com o óleo de *Annona squamosa* (0,075 mg/mL)
Grupo 3: Animais tratados previamente com nanoemulsão com o óleo de *Annona squamosa* (0,25 mg/mL)
Grupo 4: Animais tratados previamente com nanoemulsão com o óleo de *Copaifera langsdorffii* (0,025 mg/mL)
Grupo 5: Animais tratados previamente com nanoemulsão com o óleo de *Copaifera langsdorffii* (0,075 mg/mL)
Grupo 6: Animais tratados previamente com nanoemulsão com o óleo de *Copaifera langsdorffii* (0,25 mg/mL)
Grupo 7: Animais tratados previamente com nanoemulsão com *Curcuma longa* (0,025 mg/mL)
Grupo 8: Animais tratados previamente com nanoemulsão com *Curcuma longa* (0,075 mg/mL)
Grupo 9: Animais tratados previamente com nanoemulsão com *Curcuma longa* (0,25 mg/mL)
Grupo 10: Animais tratados previamente com nanoemulsão com nanocápsulas magnéticas de xiloglicana contendo quercetina sulfatada e magnetita funcionalizada com poliacrilato de sódio (0,025 mg/mL)
Grupo 11: Animais tratados previamente com nanocápsulas magnéticas de xiloglicana contendo quercetina sulfatada e magnetita funcionalizada com poliacrilato de sódio (0,075 mg/mL)
Grupo 12: Animais tratados previamente com nanocápsulas magnéticas de xiloglicana contendo quercetina sulfatada e magnetita funcionalizada com poliacrilato de sódio (0,25 mg/mL)
Grupo 13: Animais tratados previamente com Nanocápsula de Alginato e Goma Guar com Hesperidina (0,025 mg/mL)
Grupo 14: Animais tratados previamente com Nanocápsula de Alginato e Goma Guar com Hesperidina (0,075 mg/mL)
Grupo 15: Animais tratados previamente com Nanocápsula de Alginato e Goma Guar com Hesperidina (0,25 mg/mL)
Grupo 16: Animais tratados previamente com Nanocápsula de Alginato reticulado e Goma Guar com Hesperidina (0,025 mg/mL)
Grupo 17: Animais tratados previamente com Nanocápsula de Alginato reticulado e Goma Guar com Hesperidina (0,075 mg/mL)
Grupo 18: Animais tratados previamente com Nanocápsula de Alginato reticulado e Goma Guar com Hesperidina (0,25 mg/mL)
Grupo 19: Animais tratados previamente com Nanocápsula com goma guar-folato e alginato com Hesperidina (0,025 mg/mL)
Grupo 20: Animais tratados previamente com Nanocápsula com goma guar-folato e alginato com Hesperidina (0,075 mg/mL)
Grupo 21: Animais tratados previamente com Nanocápsula com goma guar-folato e alginato com Hesperidina (0,25 mg/mL)
Grupo 22: Animais tratados previamente com solução de pó de celulose bacteriana (0,025 mg/mL)
Grupo 23: Animais tratados previamente com solução de pó de celulose bacteriana (0,075 mg/mL)
Grupo 24: Animais tratados previamente com solução de pó de celulose bacteriana (0,25 mg/mL)
Grupo 25: Animais tratados previamente com Bebida Kefir elaborada com extrato de castanha (0,025 mg/mL)
Grupo 26: Animais tratados previamente com Bebida Kefir elaborada com extrato de castanha (0,075 mg/mL)
Grupo 27: Animais tratados previamente com Bebida Kefir elaborada com extrato de castanha (0,25 mg/mL)
Grupo 28: Animais tratados previamente com Bebida Kefir elaborada com leite (0,025 mg/mL)
Grupo 29: Animais tratados previamente com Bebida Kefir elaborada com leite (0,075 mg/mL)
Grupo 30: Animais tratados previamente com Bebida Kefir elaborada com leite (0,25 mg/mL)
Grupo 31: Animais tratados previamente com Bebida kombucha (0,025 mg/mL)
Grupo 32: Animais tratados previamente com Bebida kombucha (0,075 mg/mL)
Grupo 33: Animais tratados previamente com Bebida kombucha (0,25 mg/mL)
Grupo 34: Animais tratados previamente com bebida kefir + kombucha (0,025 mg/mL)
Grupo 35: Animais tratados previamente com bebida kefir + kombucha (0,075 mg/mL)
Grupo 36: Animais tratados previamente com bebida kefir + kombucha (0,25 mg/mL)

ANEXO B – CERTIFICADO DO CEUAP-UFC



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Uso exclusivo da CEUAP-UFC Protocolo N ^o : 1806202101 Data de entrada: 18/06/2021 Data de aprovação: 02/07/2021

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP-UFC

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Toxicidade de produtos alimentícios e farmacêuticos de origem natural utilizando Zebrafish (Danio rerio)**", protocolada sob o CEUA n^o **1806202101**, sob a responsabilidade de **LARISSA MORAIS RIBEIRO DA SILVA e equipe**; que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de **02/07/2021**.

We certify that the proposal "**Toxicity of food and pharmaceutical products of natural origin using zebrafish (Danio rerio)**", protocol number CEUA **1806202101**, under the responsibility of **LARISSA MORAIS RIBEIRO DA SILVA and team**; which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of **02/07/2021**.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de AGOSTO/2021 a DEZEMBRO/2021 Área: Departamento de Engenharia de Alimentos

Origem: Agroquímica Comércio de Produtos Veterinários (CNPJ 73.899.502/0001-70)

Espécie: Danio rerio sexo: machos e fêmeas idade: 60 a 90 dias N: 360

Linhagem: Zebrafish Peso: 3 a 5g

Fortaleza, 02 de Julho de 2021.

Prof. Dr. Pedro Henrique Watanabe
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Elzânia Sales Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
Universidade Federal do Ceará