



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

**RAQUEL MACEDO DANTAS COELHO**

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE KOMBUCHAS ANÁLOGAS DE ERVA**  
**CIDREIRA (*Melissa officinalis* L.) E ERVA DOCE (*Pimpinella anisum* L.):**  
**INFLUÊNCIA DE SUBSTRATOS, ADIÇÃO DE SUCO DE ACEROLA E**  
**APROVEITAMENTO DE PELÍCULAS CELULÓSICAS**

**FORTALEZA**

**2023**

RAQUEL MACEDO DANTAS COELHO

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE KOMBUCHAS ANÁLOGAS DE ERVA CIDREIRA  
(*Melissa Officinalis L.*) E ERVA DOCE (*Pimpinella Anisum L.*): INFLUÊNCIA DE  
SUBSTRATOS, ADIÇÃO DE SUCO DE ACEROLA E APROVEITAMENTO DE  
PELÍCULAS CELULÓSICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa

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)

---

C619e Coelho, Raquel Macedo Dantas.

Elaboração e avaliação de kombuchas análogas de erva cidreira (*Melissa officinalis* L.) e erva doce (*Pimpinella anisum* L.): influência de substratos, adição de suco de acerola e aproveitamento de películas celulósicas / Raquel Macedo Dantas Coelho. – 2023.

148 f. : il. color.

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

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

1. Bebida fermentada. 2. Infusões. 3. Compostos bioativos. 4. Análise sensorial. 5. Celulose. I. Título.  
CDD 664

---

RAQUEL MACEDO DANTAS COELHO

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE KOMBUCHAS ANÁLOGAS DE ERVA CIDREIRA  
(*Melissa officinalis* L.) E ERVA DOCE (*Pimpinella anisum* L.): INFLUÊNCIA DE  
SUBSTRATOS, ADIÇÃO DE SUCO DE ACEROLA E APROVEITAMENTO DE  
PELÍCULAS CELULÓSICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Aprovada em: 15/12/2023

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa (orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Tiago Lima de Albuquerque  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Jaqueline Rabelo de Lima  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Jonas Luiz Almada da Silva  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Ao meu avô que, certa vez, ainda na minha  
infância, disse que eu seria doutora.

*(in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Paulo Henrique Machado de Sousa, por depositar tanta confiança na minha capacidade durante a realização deste trabalho. Agradeço a disponibilidade, compreensão e paciência durante toda esta longa jornada acadêmica.

Aos professores doutores, Jonas Luiz Almada da Silva, Jaqueline Rabelo de Lima, Tiago Lima de Albuquerque e Larissa Morais Ribeiro da Silva, por participarem da banca de defesa desta tese e contribuírem com seus conhecimentos para engrandecê-lo.

Ao meu companheiro, Pedro Gurgel Moraes, por todo amor e por estar sempre ao meu lado, me dando suporte e ajudando a superar todos os desafios.

Às minhas filhas, Lis e Ester, que foram tão compreensivas e que tanto me encorajaram.

Aos meus pais, que sempre investiram e acreditaram no poder transformador da educação, me incentivando a buscar conhecimento e a estudar constantemente.

Aos meus alunos e orientandos que tanto colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que ajudaram com palavras carinhosas de apoio e incentivo e àqueles que colaboraram diretamente, me auxiliando na realização de análises.

Ao IFRN, pelo apoio e por toda a infraestrutura, que contribuiu para a realização deste trabalho. Agradeço também aos gestores do campus Currais Novos por toda a parceria e colaboração, que foram fundamentais durante essa caminhada.

Aos técnicos de laboratório do IFRN, campus Currais Novos, que não mediram esforços e que estavam sempre à disposição, dando todo suporte necessário para a execução da pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará e aos professores, por toda a minha formação acadêmica, que me possibilitaram ser a profissional e a pesquisadora que hoje sou.

“Ser capaz de recomeçar sempre, de fazer, de reconstruir, de não se entregar, e recusar burocratizar-se mentalmente, de entender e viver a vida como processo, como vir a ser.”

Paulo Freire

## RESUMO

A Kombucha é uma bebida resultante da fermentação de chá verde e/ou chá preto adoçados e adicionados de uma cultura contendo um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras. Em ascensão no mercado de alimentos, é conhecida por contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal, bem como pelas suas propriedades antimicrobianas e anticancerígenas. Diante disso, o presente trabalho destinou-se a elaborar kombuchas com diferentes substratos (chá verde, erva cidreira e erva doce) saborizadas com suco de acerola, acompanhar o processo de fermentação, avaliar a composição química, microbiológica e sensorial das bebidas, bem como elaborar um produto com as películas de celulose resultantes da fermentação. Foram elaboradas três formulações com as diferentes infusões: T1 (chá verde), T2 (erva cidreira) e T3 (erva doce) contendo 10 % (p/v) de açúcar que foram fermentados em estufa BOD, sob 30 °C. Durante dez dias, a cada 24 horas, foram realizadas determinações de pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, açúcares, ácidos orgânicos e etanol para o acompanhamento da fermentação. Após essa etapa, foi adicionado, em todas as formulações, o suco de acerola clarificado, pasteurizado e adoçado e as bebidas foram submetidas a uma nova fermentação, resultando nas kombuchas: K1 (chá verde), K2 (erva cidreira) e K3 (erva doce). Os parâmetros físico-químicos, bioativos, de cor, de estabilidade, microbiológicos e sensoriais foram avaliados. As películas celulósicas resultantes foram aproveitadas para a elaboração de canudos e em seguida os protótipos avaliados quanto a umidade, solubilidade, absorção de umidade, viabilidade e degradabilidade. As kombuchas à base erva doce apresentaram os maiores teores de acidez total titulável (T3 - 0,77 % e K3 - 0,64 %) e acidez volátil (T3 - 144,14 mEq/L e K3- 144,14 mEq/L). Com relação a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos, tanto a adição do suco de acerola quanto a segunda fermentação tiveram efeitos positivos na acumulação desses compostos bioativos, sendo mais relevantes nas amostras K2 e K3. A adição do suco reduziu os parâmetros L\* e aumentou os parâmetros a\* e b\* em todos os tratamentos, indicando que as bebidas incorporaram a coloração vermelha da acerola. A amostra T2 obteve melhor eficiência no consumo dos monossacarídeos, enquanto T3 apresentou maiores concentrações de produtos (ácido acético, ácido láctico e etanol). O rendimento do SCOBY após a primeira fermentação foi maior nos tratamentos T1 (121,29 %) e T3 (72,33 %). Com relação aos parâmetros microbiológicos, os valores de leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas variaram entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC/mL. As kombuchas (K1, K2 e K3) não apresentaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) quanto aos atributos avaliados para aceitabilidade, com exceção do atributo aroma, que

também foi o único que obteve índice de aceitação inferior a 70 % em K1 e K2. No CATA, os descritores mais mencionados para caracterizar as kombuchas foram: “aroma de fermentado”, “aroma de acerola” e “sabor refrescante”. No teste RATA, os atributos relacionados ao aroma foram os mais significativos, porém todos apresentaram baixa intensidade. Foi possível produzir canudos a partir do material celulósico resultante da fermentação das kombuchas que apresentaram dimensões e propriedades compatíveis ao uso, boa capacidade de absorção de água, baixa solubilidade e sofreram degradação total após 45 dias. Dessa forma, a utilização de novas infusões consiste em alternativas de substituição ao chá verde na obtenção de kombucha, e a adição de suco de frutas na segunda fermentação contribui para a melhor aceitação da bebida e no incremento de suas características bioativas. Além disso, destaca-se o caráter sustentável da bebida, uma vez que a produção de canudos biodegradáveis a partir das películas apresentou boa viabilidade.

**Palavras-chave:** bebida fermentada; infusões; compostos bioativos; análise sensorial; celulose.

## ABSTRACT

Kombucha is a drink resulting from the fermentation of green tea and/or sweetened black tea and the addition of a culture containing a symbiotic consortium of bacteria and yeast. Increasing in the food market, it is known for contributing to the balance of the intestinal microbiota, as well as for its antimicrobial and anticancer properties. Therefore, the present work aims to prepare kombuchas with different substrates (green tea, lemon balm and anise) flavored with acerola juice, monitor the fermentation process, evaluate the chemical, microbiological and sensorial composition of the drinks, as well as make a product with the cellulose films resulting from fermentation. Three formulations were prepared with different infusions: T1 (green tea), T2 (lemon balm) and T3 (anise) containing 10 % (w/v) sugar which were fermented in a BOD oven, at 30 °C. For ten days, every 24 hours, pH, total soluble solids, titratable acidity, sugars, organic acids and ethanol were determined to monitor fermentation. After this step, clarified, pasteurized and sweetened acerola juice was added to all formulations and the drinks were subjected to a new fermentation, resulting in the kombuchas: K1 (green tea), K2 (lemon balm) and K3 (anise). The physicochemical, bioactive, color, stability, microbiological and sensory parameters were evaluated. The resulting cellulosic films were used to make straws and then the prototypes were evaluated for humidity, solubility, moisture absorption, predictions, and degradability. Anise-based kombuchas had the highest levels of total titratable acidity (T3 - 0.77 % and K3 - 0.64 %) and volatile acidity (T3 -144.14 mEq/L and K3- 144.14 mEq/ L). Regarding antioxidant capacity and phenolic content, both the addition of acerola juice and the second interference had positive effects on the accumulation of these bioactive compounds, being more relevant in samples K2 and K3. The addition of juice impaired the L\* restrictions and increased the a\* and b\* restrictions in all treatments, reducing the ability of the drinks to incorporate the red color of the acerola. Sample T2 had better efficiency in the consumption of monosaccharides, while T3 presented higher concentrations of products (acetic acid, lactic acid and ethanol). The SCOBY yield after the first fermentation was higher in treatments T1 (121.29 %) and T3 (72.33 %). Regarding microbiological settings, the values of yeast, acetic bacteria and lactic acid bacteria varied between 10<sup>3</sup> and 10<sup>5</sup> CFU/mL. The kombuchas (K1, K2 and K3) did not make a significant difference (p ≥0.05) regarding the attributes evaluated for acceptability, except for the aroma attribute, which was also the only one that had an accessibility index of less than 70 % in K1 and K2. In CATA, the most suitable descriptors to characterize kombuchas were: “fermented aroma”, “acerola aroma” and “refreshing flavor”. In

the RATA test, the attributes related to aroma were the most significant, but all had low intensity. Straws were produced from the cellulosic material resulting from the fermentation of kombuchas, which presented dimensions and properties compatible with use, good water absorption capacity, low solubility, and total handling after 45 days. In this way, the use of new infusions consists of alternatives to replace green tea in obtaining kombucha, and the addition of fruit juice in the second fermentation contributes to better accessibility of the drink and the increase of its bioactive characteristics. Furthermore, the sustainable nature of the drink stands out, as the production of biodegradable straws based on films presented with good recommendations.

**Keywords:** fermented drink; infusions; bioactive compounds; sensory analysis; cellulose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo microbiano na fermentação da kombucha	35
Figura 2 - Fluxograma com o processo de produção da kombucha	49
Figura 3 - Etapas do processo de obtenção do suco clarificado	50
Figura 4 - Cabine de prova preparada para a análise sensorial	60
Figura 5 - Etapas do processamento dos SCOBYS para a produção dos canudos	62
Figura 6 - Recipientes contendo os canudos submersos no solo simulado para o teste de biodegradação	65
Figura 7 - Kombuchas após a fermentação com as infusões (a) e kombuchas após a saborização com suco de acerola (b)	76
Figura 8 - Aspecto visual das diferentes formulações de kombucha ao longo do tempo de fermentação	79
Figura 9 - Acompanhamento do pH ao longo da fermentação	81
Figura 10 - Acompanhamento da acidez titulável ao longo da fermentação	83
Figura 11 - Acompanhamento dos sólidos solúveis totais longo da fermentação	85
Figura 12 - Acompanhamento do conteúdo de açúcares ao longo da fermentação	86
Figura 13 - Acompanhamento do conteúdo de etanol e ácidos orgânicos ao longo da fermentação	89
Figura 14 - Variação no teor de acidez total em relação ao tempo de armazenamento	94
Figura 15 - Variação no teor de sólidos solúveis em relação ao tempo de armazenamento	97
Figura 16 - Variação do pH em relação ao tempo de armazenamento	98
Figura 17 - Imagens obtidas no microscópio das lâminas com alguns microrganismos presentes nas kombuchas	101
Figura 18 - Análise de Componentes Principais dos tratamentos pelo CATA	112
Figura 19 - Principais atributos e graus de intensidade para os tratamentos elaborados de acordo com o RATA	114
Figura 20 - Canudos obtidos a partir do SCOBYS da kombucha	119
Figura 21 - Canudos imersos em refrigerante tipo cola e suco de cajá nos diferentes tempos de observação	123
Figura 22 - Canudos após 20 minutos imersos nos líquidos	124
Figura 23 - Tempo de biodegradação dos canudos	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes químicos bioativos presentes nos chás de <i>Camellia sinensis</i>	21
Tabela 2 - Proporções de chá e de açúcar utilizadas no preparo da kombucha	25
Tabela 3 - Proporções de SCOBY e de kombucha para uma nova fermentação	25
Tabela 4 - Temperatura e Tempo de infusão dos chás	29
Tabela 5 - Composição química da kombucha	37
Tabela 6 - Painel sensorial referente aos 100 provadores participantes do teste de aceitabilidade	59
Tabela 7 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos do suco de acerola, das infusões, das kombuchas após primeira e após segunda fermentação	67
Tabela 8 - Acidez volátil das amostras de kombucha após primeira e após segunda fermentação	71
Tabela 9 - Teor de antioxidantes e fenólicos do suco de acerola, das infusões, das kombuchas após primeira e após segunda fermentação	73
Tabela 10 - Parâmetros de cor do suco de acerola e das kombuchas após primeira e após segunda fermentação	77
Tabela 11 - Rendimento do SCOBY das kombuchas produzidas após a fermentação	79
Tabela 12 - Análise de variância para acidez total titulável, sólidos solúveis e pH	93
Tabela 13 - Análise da soma dos quadrados para acidez total, sólidos solúveis e pH	94
Tabela 14 - Médias de acidez total, sólidos solúveis e pH para os tratamentos	95
Tabela 15 - Médias da acidez total e sólidos solúveis ao longo do tempo	95
Tabela 16 - Resultados das análises microbiológicas	100
Tabela 17 - Participantes que já consumiram kombucha divididos em suas respectivas regiões	104
Tabela 18 - <i>Countbest</i> e <i>Countworst</i>	106
Tabela 19 - Atributos da kombucha classificados como importantes	107
Tabela 20 - Atributos da kombucha classificados como determinantes	108
Tabela 21 - Lista de descritores das kombuchas analisadas pelos 14 participantes do grupo focal	109
Tabela 22 - Resultado do teste Q de Cochran para a lista dos atributos e frequência de escolha de cada atributo por tratamento	111

Tabela 23 - Média da intensidade dos atributos sensoriais do teste RATA pela ANOVA com respectivos p-valor para cada um dos tratamentos	114
Tabela 24 - Médias e índice de aceitação dos atributos sensoriais dos tratamentos avaliados	118
Tabela 25 - Características dos canudos produzidos a partir do SCOBY da kombucha	121

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
2.1	<i>Objetivo geral</i>	18
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
3.1	<i>Chá</i>	19
3.2	<i>Infusão de erva cidreira</i>	21
3.3	<i>Infusão de erva doce</i>	22
3.4	<i>Origem da kombucha</i>	24
3.5	<i>Processo de obtenção da kombucha</i>	24
3.6	<i>Substratos utilizados para a obtenção da kombucha</i>	28
3.7	<b>SCOPY</b>	30
3.8	<i>Composição microbiológica da kombucha</i>	31
3.8.1	<i>Bactérias</i>	32
3.8.2	<i>Leveduras</i>	33
3.9	<i>Metabolismo dos microrganismos durante a fermentação da kombucha</i>	34
3.10	<i>Composição química da kombucha</i>	36
3.11	<i>Propriedades benéficas da kombucha</i>	38
3.11.1	<i>Propriedades antimicrobianas</i>	39
3.11.2	<i>Propriedades antioxidantes</i>	39
3.11.3	<i>Propriedades anticancerígenas</i>	40
3.12	<i>Propriedades tóxicas</i>	41
3.13	<i>Legislação</i>	42
3.14	<i>Mercado econômico para a kombucha no Brasil</i>	44
3.15	<i>Inovações tecnológicas para a utilização da película de celulose</i>	45
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	47
4.1	<i>Preparo das infusões</i>	47
4.2	<i>Preparo da kombucha</i>	47
4.3	<i>Saborização e segunda fermentação</i>	48

<b>4.4</b>	<b><i>Preparo e clarificação do suco de acerola</i></b>	50
<b>4.5</b>	<b><i>Acompanhamento da fermentação</i></b>	51
4.5.1	<i>Rendimento do SCOBY</i>	51
<b>4.6</b>	<b><i>Análises físico-químicas</i></b>	51
4.6.1	<i>Determinação de pH</i>	51
4.6.2	<i>Determinação dos sólidos solúveis totais</i>	52
4.6.3	<i>Determinação de acidez titulável</i>	52
4.6.4	<i>Determinação de acidez volátil</i>	52
<b>4.7</b>	<b><i>Determinação de compostos fenólicos totais</i></b>	52
<b>4.8</b>	<b><i>Determinação da atividade antioxidante</i></b>	53
<b>4.9</b>	<b><i>Análise de Cor</i></b>	53
<b>4.10</b>	<b><i>Determinações em HPLC</i></b>	53
<b>4.11</b>	<b><i>Análise de estabilidade</i></b>	54
<b>4.12</b>	<b><i>Análises Microbiológicas</i></b>	54
4.12.1	<i>Determinação de coliformes</i>	55
4.12.2	<i>Contagem de leveduras</i>	55
4.12.3	<i>Contagem de bactérias acéticas</i>	56
4.12.4	<i>Contagem de bactérias lácticas</i>	56
<b>4.13</b>	<b><i>Identificação do perfil do consumidor de kombucha</i></b>	56
4.13.1	<i>Método Best-Worst Scaling (BWS)</i>	57
<b>4.14</b>	<b><i>Análise Sensorial</i></b>	57
4.14.1	<i>Grupo de Foco</i>	58
4.14.2	<i>Aceitabilidade e intenção de consumo das kombuchas produzidas</i>	58
4.14.3	<i>Check all that apply (CATA), rate all that apply (RATA)</i>	61
<b>4.15</b>	<b><i>Comitê de ética</i></b>	61
<b>4.16</b>	<b><i>Aproveitamento dos SCOBYS da kombucha para a produção de canudos</i></b>	61
4.16.1	<i>Obtenção dos canudos</i>	63
4.16.2	<i>Umidade dos canudos</i>	63
4.16.3	<i>Teste de solubilidade dos canudos</i>	63
4.16.4	<i>Teste de absorção de umidade dos canudos</i>	64
4.16.5	<i>Teste de viabilidade dos canudos</i>	64
4.16.6	<i>Teste de biodegradação dos canudos</i>	65

4.17	<i>Tratamento Estatístico</i>	66
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	67
5.1	<i>Análises físico-químicas</i>	67
5.2	<i>Compostos fenólicos e antioxidantes</i>	72
5.3	<i>Análise de Cor</i>	76
5.4	<i>Perfil do processo de fermentação das kombuchas</i>	78
5.4.1	<i>Acompanhamento do pH</i>	81
5.4.2	<i>Acompanhamento da acidez total titulável</i>	83
5.4.3	<i>Acompanhamento dos sólidos solúveis totais</i>	85
5.4.4	<i>Acompanhamento do conteúdo de açúcares</i>	86
5.4.5	<i>5.4.5 Acompanhamento do conteúdo de etanol e de ácidos orgânicos</i>	89
5.5	<i>Análise de estabilidade</i>	93
5.6	<i>Análises microbiológicas</i>	100
5.7	<i>Identificação do perfil do consumidor de kombucha</i>	103
5.7.1	<i>Caracterização socioeconômica</i>	103
5.7.2	<i>Características do Consumo</i>	105
5.7.3	<i>Relevância dos atributos para decisão de compra</i>	106
5.8	<i>Análise sensorial</i>	108
5.8.1	<i>Grupo de foco</i>	108
5.8.2	<i>Check all that apply (CATA)</i>	110
5.8.3	<i>Rate all that apply (RATA)</i>	114
5.8.4	<i>Aceitabilidade e intenção de compra das kombuchas produzidas</i>	117
5.9	<i>Caracterização dos canudos</i>	120
5.10	<i>Teste de viabilidade dos canudos</i>	123
5.11	<i>Teste de biodegradação dos canudos</i>	125
6	<b>CONCLUSÕES</b>	128
	<b>REFERÊNCIAS</b>	129
	<b>APÊNDICE A – FICHA DA ANÁLISE SENSORIAL DAS KOMBUCHAS PRODUZIDAS</b>	145

## 1 INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada não alcoólica de origem oriental, que vem ganhando popularidade no ocidente, devido aos seus efeitos terapêuticos, tais como antimicrobiano, antioxidante, anticarcinogênico, antidiabético, além de efeito potencial no tratamento de úlceras gástricas e colesterol alto, mostrando também ter impacto na resposta imune e desintoxicação do fígado (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

O processo tradicional para obtenção da bebida ocorre a partir da fermentação, originalmente, do chá preto ou verde (*Camelia sinensis*) adoçado, porém vários estudos apontam que outras infusões também podem ser utilizadas para a sua preparação, como infusões de equinácea (*Echinacea purpurea L.*), de segurelha-de-inverno (*Satureja montana L.*), de menta (*Mentha spicata L.*) de sálvia (*Salvia officinalis L.*), de hibisco (*Hibiscus sabdariffa L.*), de erva-mate (*Ilex paraguariensis St. Hil.*) e muitas outras (RODRIGUES *et al.*, 2018; PALUDO, 2017). A fermentação do chá é o produto da atividade de uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY), que ficam instaladas em uma película de celulose sintetizada por bactérias acéticas (DE FILIPPIS *et al.*, 2018; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; SANTOS, 2016). Enquanto as leveduras osmofílicas fermentam o açúcar do chá e produzem etanol, as bactérias oxidam o álcool e produzem ácido acético (TEOH *et al.*, 2004). Além do ácido acético, são formados outros ácidos orgânicos como: glucônico, láctico, málico, cítrico e tartárico que possuem atividade antibacteriana e previnem a contaminação da kombucha por bactérias patogênicas (NEFFE-SKOCIŃSKA *et al.*, 2017; LEAL *et al.*, 2018).

Os efeitos benéficos da kombucha são atribuídos à presença de microrganismos probióticos (bactérias acéticas e lácticas), antibióticos, aminoácidos, polifenóis provenientes do chá, açúcares, ácidos orgânicos, etanol, vitaminas hidrossolúveis e uma variedade de micronutrientes produzidos durante fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2008; FU *et al.*, 2014).

Em relação ao sabor, segundo Leal *et al.* (2018), a kombucha é levemente ácida e gaseificada, o que proporciona maior aceitação entre os consumidores. Podendo ser um substituto não alcoólico de espumantes ou de refrigerantes, devido ao seu alto grau de carbonatação, constituindo uma alternativa mais saudável (PALUDO, 2017).

Como já mencionado, o chá preto ou chá verde são os substratos tradicionais para a fermentação da kombucha, no entanto, substratos alternativos vêm sendo utilizados com sucesso na produção da bebida, tais como: extratos de tubérculos de alcachofra, vinho, leite,

sucos de frutas e infusões de plantas. (WATAWANA *et al.*, 2015b; RODRIGUES *et al.*, 2018; BISPHO *et al.*, 2022).

Diante de tantas possibilidades, a kombucha possui um grande potencial na indústria de alimentos, pois oferece versatilidade de produtos ao consumidor. Contudo, a fabricação desse produto no Brasil ainda se encontra em escala inicial e as pesquisas relacionadas ao tema são incipientes.

Nesse contexto, este trabalho destinou-se a elaborar kombuchas a partir de chá verde e infusões não usuais (erva cidreira e erva doce), acompanhar o andamento da fermentação durante a produção, saborizar as bebidas obtidas com suco de acerola e em seguida avaliar as formulações quanto as suas composições químicas, microbiológicas e propriedades sensoriais. Além disso, também foram elaborados canudos biodegradáveis visando o aproveitamento das películas de celulose formadas durante a fermentação das kombuchas elaboradas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Elaborar kombuchas a partir da fermentação de diferentes infusões de chá verde, erva cidreira e erva doce, saborizadas com suco de acerola e analisar viabilidade do aproveitamento das películas de celulose resultantes do processo de fermentação da bebida.

### 2.2 Objetivos específicos

- Monitorar o andamento da fermentação das bebidas por meio de análises de pH, sólidos solúveis, acidez total titulável e rendimento de celulose.
- Avaliar o consumo de substratos (açúcares) e a formação de produtos (ácidos orgânicos e etanol) durante a fermentação das kombuchas.
- Agregar valor funcional e melhorar a aceitação sensorial das kombuchas a partir da saborização com suco de acerola clarificado e pasteurizado.
- Determinar as características físico-químicas (pH, sólidos solúveis, acidez titulável, acidez volátil), a concentração de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante e a cor das bebidas.
- Realizar contagem de coliformes totais, leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas.
- Avaliar a estabilidade físico-química das kombuchas saborizadas sob armazenamento refrigerado (5°C) durante 90 dias.
- Identificar o perfil dos consumidores de kombucha utilizando o método *Best-Worst Scaling* (BWS).
- Avaliar o perfil sensorial das bebidas obtidas por meio de testes de aceitação, CATA e RATA.
- Propor uma alternativa para o aproveitamento dos SCOBYS obtidos a partir da elaboração de canudos biodegradáveis.
- Estudar as características e a viabilidade de utilização dos canudos obtidos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Chá

O chá teve origem na China durante o império de Shen Nung. Diz a lenda que, deitado à sombra de um arbusto, o imperador acabou adormecendo antes de beber uma tigela de água fervida. O vento fez algumas folhas de *Camellia sinensis* caírem na sua tigela, com a água ainda quente, resultando em chá. O Imperador ficou surpreso com o aroma e sabor agradáveis da bebida e logo após a ingestão sentiu-se revigorado. Dessa forma, o chá passou a ser sua bebida preferida e foi difundido por toda a China (DA SILVA e VILELA, 2019; SAIGG e SILVA, 2009). No entanto, existem muitas outras narrativas a respeito da origem dos chás, ressaltando a importância dessa bebida desde a antiguidade (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

Ao longo do tempo, a forma de preparo do chá foi sendo aperfeiçoada empiricamente na China, de modo a transformar as folhas amargas numa bebida agradável e revigorante e, aos poucos, essa bebida foi ganhando importância no restante do mundo. Os portugueses foram os primeiros a levarem o chá para o Ocidente, porém os holandeses trouxeram a cultura do consumo de chá para a Europa no início do século XVII (SANTOS, 2016).

No Brasil, a bebida foi trazida por imigrantes chineses há aproximadamente um século, que também repassaram técnicas de plantio, queima, manipulação e padronização do produto que foram difundidas nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (SAIGG e SILVA, 2009).

Atualmente, o chá é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Essa crescente popularidade se deve à presença de compostos químicos que possuem propriedades bioativas (FANG *et al.*, 2019).

Apesar de aproximadamente três mil produtos levarem esta denominação, só podem ser considerados chás aqueles que apresentam na composição a planta *Camellia sinensis* (SAIGG e SILVA, 2009). Infusões obtidas a partir de outras plantas, são erroneamente denominadas de chás. No entanto, quando se utiliza folhas, frutos, talos ou outras partes de outros vegetais para o preparo de infusões, através de imersão em água quente, estes são considerados sucedâneos de *C. sinensis*. Dessa forma, para infusões de outras plantas, deve-se seguir o nome da planta após a palavra chá, como por exemplo: chá de alecrim, chá de camomila, chá de boldo, entre outros (DA SILVA e VILELA, 2019).

A planta *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze é subdividida botanicamente em duas subespécies principais, de acordo com a origem, sendo a *Camellia sinensis* var. *sinensis* nativa da China e a segunda subespécie, a *Camellia sinensis* var. *assamica*, originária da região de Assam, na Índia (ZHANG, 2012).

Os tipos de chá que são obtidos a partir da planta *Camellia sinensis* são classificados de acordo com o processamento ao qual as folhas são submetidas, resultando em infusões que apresentam colorações diferentes, como verde, amarelo, branco, *oolong*, preto e escuro (FANG *et al.*, 2019).

Para a obtenção do chá preto, as folhas são esmagadas e deixadas expostas a alta umidade, causando uma oxidação dos polifenóis pela ação da enzima polifenoloxidase (VALENZUELA, 2004). Já para o chá escuro, as folhas sofrem oxidação e posteriormente são fermentadas por microrganismos exógenos (FANG *et al.*, 2019). Por outro lado, para a produção dos chás verde e amarelo, as folhas frescas são submetidas ao vapor, dessa forma, o calor inativa as enzimas impedindo a oxidação (GONZÁLEZ, 2003; FANG *et al.*, 2019). O chá *oolong* é produzido a partir da oxidação parcial (10 a 70%) das folhas frescas da *Camellia sinensis* (CHEN *et al.*, 2011) e para a produção do chá branco, as folhas frescas passam por um rápido processo de secagem evitando-se a oxidação (HILAL e ENGELHARDT, 2007). Cada tipo de chá tem suas propriedades sensoriais características, tais como: sabor, aroma e cor da infusão e sua composição química específica (FANG *et al.*, 2019).

De acordo com Belitz *et al.* (2009), em geral, esses chás apresentam em sua composição polifenóis, aminoácidos, cafeína, compostos voláteis e minerais. No entanto, os diferentes processos de obtenção, bem como as reações de oxidação que ocorrem em alguns processos fazem com que esses chás apresentem composição química diferente (LEE *et al.*, 2015).

A Tabela 1 apresenta os principais componentes químicos bioativos presentes nos chás verde, branco, *oolong* e preto.

Tabela 1 - Componentes químicos bioativos presentes nos chás de *Camellia sinensis*

Composto	Chá verde (mg/g)	Chá branco (mg/g)	Chá oolong (mg/g)	Chá preto (mg/g)	Referência
<b>Catequinas</b>	105,85 ±35,69	56,62 ±12,53	86,91± 23,54	10,18 ± 6,68	WANG <i>et al.</i> , 2011
<b>Epicatequina (EC)</b>	13,44 ± 10,58	1,87 ± 0,62	16,78 ± 5,09	0,31 ± 0,31	WANG <i>et al.</i> , 2011
<b>Epigalocatequina (EGC)</b>	50,29 ± 13,88	27,09 ± 6,14	38,36 ± 16,82	3,46 ± 1,86	WANG <i>et al.</i> , 2011
	27,70		10,00	5,71	ZUO <i>et al.</i> , 2002
<b>Epicatequina galato (ECG)</b>	5,78 ± 4,18	1,22 ± 0,34	4,12 ± 1,18	1,21 ± 1,29	WANG <i>et al.</i> , 2011
<b>Epigalocatequina galato (EGCG)</b>	18,10 – 35,46		7,36–12,24	5,52–9,18	LEE e ONG, 2000
<b>Teaflavinas</b>	5,37 ± 1,73	2,05 ± 0,90	1,01 ± 0,28	0,52 ± 0,77	LEE e ONG, 2000
<b>Cafeína</b>	34,86 ± 4,32	27,17 ± 5,37	19,67 ± 2,95	28,54 ± 3,68	YI <i>et al.</i> , 2015
	23,00		18,70	21,60	ZUO <i>et al.</i> , 2002

Fonte: Autora, 2023.

De forma geral, os benefícios atribuídos aos chás são principalmente associados à catequina, que é derivada dos polifenóis presentes nas folhas, podendo alcançar concentrações acima de 100 mg/g no chá verde (WANG *et al.*, 2011). Nas folhas frescas o conteúdo de catequina é muito alto. Esses compostos caracterizam-se pela sua estrutura monomérica, sendo os mais comumente encontrados: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina galato (EGCG). Já nas folhas oxidadas, a estrutura monomérica das catequinas é alterada, resultando em flavonóis diméricos e poliméricos, conhecidos como teaflavinas e tearubiginas (VALENZUELA, 2004). Por isso, o chá preto é mais aromático e mais escuro do que o chá verde, uma vez que, devido à oxidação enzimática, compostos aromáticos são liberados e compostos fenólicos são transformados em complexos maiores, de coloração escura (MCGEE, 2007).

### 3.2 Infusão de erva cidreira

A erva cidreira (*Melissa officinalis L.*) é uma erva da família *Lamiaceae*, nativa do Mediterrâneo e atualmente cultivada em toda a Europa, América do Norte e Ásia (BONEZA & NIEMEYER, 2018). A planta tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional para diversos fins por conta da sua história que remonta a mais de 2.000 anos atrás. No entanto, sua

aplicação também apresenta considerável importância para os setores de alimentos e cosméticos. Vale ressaltar que, tradicionalmente, são utilizadas apenas partes aéreas das plantas, enquanto suas raízes chamam menos atenção (DRAGINIC *et al.*, 2021).

A utilização para fins medicinais da *Melissa officinalis* foi registrada principalmente em países europeus, região mediterrânea e países do Oriente Médio. Ensaios clínicos demonstraram efeitos farmacológicos da planta, revelando propriedades ansiolíticas, antivirais e anti espasmódicas, bem como seus efeitos neurológicos relacionados ao humor, cognição e memória (SHAKERI *et al.*, 2016).

Na medicina tradicional, a erva-cidreira é comumente administrada como uma infusão de chá usada para tratar doenças gastrointestinais, dor de cabeça e febre. O óleo essencial de erva-cidreira possui propriedades antibacterianas e antifúngicas, enquanto os extratos aquosos possuem atividade antiviral. A planta contém altas concentrações de ácidos fenólicos, particularmente derivados do ácido cafeico, como o ácido rosmarínico que provavelmente contribuem para as propriedades medicinais da erva-cidreira, sendo ainda associados à sua alta capacidade antioxidante (BONEZA & NIEMEYER, 2018).

Os componentes responsáveis pelo aroma acentuado da erva cidreira são: B-cariofileno, citronelal, geranial, geraniol e neral. Destaca-se um aroma cítrico na erva devido à presença de isômeros citrais como neral e geranial, bem como pequenas concentrações de acetato de geranil e citronelal (SHAKERI *et al.*, 2016).

### 3.3 Infusão de erva doce

A erva doce (*Pimpinella anisum L.*), também conhecida como anis é originária de países da Ásia, Egito e Grécia, e cultivada na Turquia, Rússia, América Latina e Brasil. No Brasil, ela é cultivada especialmente no sul do país. Em diferentes regiões do mundo a erva doce é amplamente usada para temperar comida. Já os europeus, utilizam como flavorizante em biscoitos, pretzels, pães, saladas de frutas, sucos e chás. Além disso, seu óleo essencial também pode ser utilizado como flavorizante em pastas de dentes, enxaguatórios bucais, cremes perfumados e loções (CHARLES, 2012).

É uma planta anual, herbácea, ereta (0,30-0,70 m), aromática, que apresenta flores brancas e dispostas em umbelas. Já os frutos, são aquênios, secos e indeiscentes, contendo

habitualmente uma só semente, de sabor adocicado e cheiro forte (SANTOS, 2012; TAKAHASHI *et al.*, 2009). Além disso, segundo a legislação brasileira, RDC N° 267, somente os frutos *Pimpinella anisum L.*, devem ser utilizados no preparo da infusão de erva doce (BRASIL, 2005).

No entanto, a espécie *Pimpinella anisum L.* pode ser confundida com outras que são morfológicamente semelhantes, como a *Foeniculum vulgare*, também chamada de funcho, falsa-erva-doce e anis-doce (AZEVEDO *et al.*, 2012). Apesar de apresentarem aroma semelhante, o funcho pode medir mais de 1,0 m de altura, as flores são amarelas e as sementes maiores e mais alongadas. No comércio a *P. anisum L.* é conhecida como erva-doce importada enquanto a *Foeniculum vulgare* como erva-doce nacional (SANTOS, 2012).

Segundo Matos (2002), os frutos da verdadeira erva doce possuem maior teor de óleos essenciais, apresentando em sua composição de 2 a 6% de óleo essencial, contendo transanetol (90-95%), uma substância responsável pelo sabor e odor característicos da erva doce (SANTOS, 2012).

Além de óleo essencial, os frutos da erva doce também apresentam, proteínas, carboidratos, glicosídeos, ácidos málico, cafeico e clorogênio, cumarinas, flavonóides e esteróides, bem como uma considerável quantidade de acetilcolina e seu precursor, a colina (SANTOS, 2012).

A espécie *Pimpinella anisum L.* além de ser utilizada na alimentação também é usada para fins medicinais na fitoterapia, onde são aproveitados principalmente os frutos, raízes e, algumas vezes, folhas frescas. Os componentes desta planta atuam no aparelho digestivo e respiratório, estimulando, ainda outras funções biológicas. Também possui efeito dilatador, facilitando a circulação cutânea (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

De acordo com Santos (2012), o uso dessa infusão é internacionalmente reconhecido como medicação simples contra o resfriado, tosse e bronquite, febre, cólicas, inflamação na boca e na garganta, má digestão e perda de apetite. Além disso, a referida autora menciona estudos que apontam a ação broncodilatadora do óleo essencial, antioxidante e antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

### 3.4 Origem da kombucha

Acredita-se que o chá fermentado foi utilizado pela primeira vez no leste da Ásia por seus benefícios curativos, mas originou-se no nordeste da China (Manchúria), onde foi adotado durante a Dinastia *Tsin (Ling Chi)* em 221a.C, por suas propriedades desintoxicantes e energizantes (JAYABALAN *et al.*, 2016; SANTOS, 2016).

Em 414 d.C, um médico de nome Kombu teria levado o chá para o Japão, utilizando-a para curar os problemas digestivos do Imperador Inkyo, essa seria a origem do nome “Kombu cha” ou “chá do Kombu” (SANTOS, 2016).

Além de kombucha, o produto recebeu outros nomes, como *Tea Fungus*, *Kargasok Tea*, *Manchurian Mushroom*, e *Haipao* durante sua entrada em diversos países (GREENWALT *et al.*, 2000). Com a expansão das rotas comerciais, a kombucha foi introduzida primeiramente na Rússia, e depois no leste europeu, entrando na Alemanha por volta do século XX (SANTOS, 2016).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a bebida foi reintroduzida na Alemanha, e na década de 1950 chegou na França, e na África do Norte, onde seu consumo tornou-se bastante popular, o que resultou na escassez de folhas de chá e açúcar e a bebida deixou de ser consumida (JAYABALAN *et al.*, 2016).

Anos depois, pesquisadores suíços afirmaram que o consumo da kombucha era tão benéfico quanto o do iogurte, pela presença de ácidos que promoviam o crescimento de bactérias benéficas do intestino (FRANK, 1995). Desde então, a popularidade da bebida aumentou, e ela passou a ser introduzida no mercado com uma variedade de novos sabores. Além da bebida, também é possível adquirir a cultura com os microrganismos em vários sites de compras online (JAYABALAN *et al.*, 2016).

### 3.5 Processo de obtenção da kombucha

A kombucha é preparada tradicionalmente à base de chá preto ou de chá verde (JAYABALAN *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2018). As proporções de chá e de açúcar, bem como o tempo e a temperatura de fermentação utilizados no processo de obtenção da kombucha podem variar de acordo com cada região ou até mesmo com as preferências dos consumidores (JAYABALAN *et al.*, 2016).

De forma geral, para a produção da kombucha, prepara-se uma base de chá e em seguida adiciona-se o açúcar, que servirá como substrato para bactérias e leveduras fermentadoras do chá (LEAL *et al.*, 2018). A Tabela 2 apresenta algumas proporções de chá e de açúcar reportadas pela literatura.

Tabela 2 - Proporções de chá e de açúcar utilizadas no preparo da kombucha

Chá (p/v)	Açúcar (p/v)	Referência
0,5%	5 %	JAYABALAN <i>et al.</i> , 2016; LEAL <i>et al.</i> , 2018
5%	10%	SANTOS <i>et al.</i> , 2017
0,8%	8%	GAGGÌA <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Autora, 2023.

Após o preparo, o chá deve ser resfriado a uma temperatura próxima a 20 °C (LEAL *et al.*, 2018), só então o SCOBY é adicionado juntamente com 10 a 20% (v/v) de kombucha já fermentada. As proporções de SCOBY e de kombucha utilizados para iniciar uma nova fermentação também podem ser variáveis, como mostrado na Tabela 3, que representa as proporções utilizadas para preparar 1L de kombucha.

Tabela 3 - Proporções de SCOBY e de kombucha para uma nova fermentação

SCOBY	Kombucha	Referência
24 g	200 mL	JAYABALAN <i>et al.</i> , 2014
7 cm	100 mL	SANTOS 2016
30 g	100 mL	GAGGÌA <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Autora, 2023.

É extremamente importante a higiene dos utensílios e do ambiente na elaboração da bebida, de modo a evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis. Ademais, outros métodos para garantir a segurança alimentar incluem a pasteurização do produto, que além de eliminar microrganismos patogênicos também evita a superprodução de álcool e dióxido de carbono, a adição de 0,1% de benzoato de sódio e 0,1% de sorbato de potássio como conservante, bem como a manutenção da kombucha sob refrigeração (WATAWANA *et al.*, 2015a).

Tanto a pasteurização como o armazenamento refrigerado podem reduzir a viabilidade dos microrganismos probióticos presentes na kombucha. No entanto, estudos recentes demonstram que a presença de microrganismos não viáveis ou até mesmo dos subprodutos do seu metabolismo podem contribuir com a saúde e bem-estar dos consumidores, assim como os probióticos. Dessa forma, os termos paraprobióticos e pós-bióticos vem sendo utilizados para indicar a presença de probióticos inativados e de seus metabólitos em alimentos que passaram por algum tipo de processamento (pasteurização, esterilização, alta-pressão) ou que apresentam características estressantes (pH, acidez, atividade de água) para a sobrevivência de microrganismos probióticos. Nesse sentido, estudos que comprovam a eficácia dos paraprobióticos e pós-bióticos são de grande relevância, uma vez que, indicam que a aplicação de tratamentos térmicos não compromete a funcionalidade dos produtos, garantindo assim a estabilidade e a segurança microbiológica dos alimentos (BARROS *et al.*, 2020). No caso da kombucha, a pasteurização é um processo importante para evitar que a produção de álcool e a acidificação da bebida continuem ocorrendo durante o armazenamento (NUMMER, 2013).

Da mesma forma, é importante controlar os níveis de pH durante a fermentação, uma vez que podem ser produzidos altos teores de ácido acético durante o processo, dessa forma, recomenda-se encerrar a fermentação quando o pH atingir um valor de 4,2 (KOVACEVIC *et al.*, 2014).

Devido a intensa formação de ácidos orgânicos durante a fermentação da kombucha, os recipientes mais adequados para a sua produção devem ser de vidro ou aço inox, a fim de evitar corrosões. Visto que já foram relatados casos de toxicidade devido a migração de compostos tóxicos de recipientes de chumbo e cerâmica para a kombucha durante a fermentação (BRUSCHI *et al.*, 2018).

De acordo com Santos (2016), o recipiente em que a kombucha é produzida deve ser coberto apenas com gaze e nunca fechado completamente, para permitir o contato com o ar, evitando a contaminação por moscas e esporos. Também é importante reservar um espaço de cabeça no recipiente para que haja bastante oxigênio disponível. Bruschi *et al.* (2018) também recomendam a utilização de recipientes com bocal largo para que haja maior contato com o ar, o que também facilita a remoção da película para posterior utilização.

Cvetkovic *et al.* (2008) avaliaram a influência da área superficial e do volume dos reatores para a fermentação de kombucha em escala industrial e constataram que reatores com a mesma área superficial, porém, com capacidade de volume diferente, podem fornecer transferência de massa semelhante. Já Cotton *et al.* (2017) trabalharam com reatores de 1000 L

e observaram que a população microbiana parecia não ser afetada pelo estresse microbiano em escala industrial, bem como, constataram também que além do volume, a geometria dos reatores é um importante parâmetro a ser considerado

Em relação a temperatura e o tempo de fermentação utilizados para a produção da kombucha, as condições reportadas pela literatura apresentam variações significativas. Jayabalan *et al.* (2016) indicam temperaturas entre 20 e 22 °C durante 7 a 10 dias, ou até mais, dependendo do estado do inóculo ou do resultado pretendido.

Neffe-Skocińska *et al.* (2017), ao estudarem sobre a influência dos ácidos orgânicos formados durante a produção da kombucha nas suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, pesquisaram as temperaturas de 20, 25 e 30°C e concluíram que as condições ideais para a fermentação da bebida foi a temperatura de 25°C por 10 dias, as quais permitiram a obtenção de um produto microbiologicamente estável e com boa qualidade sensorial.

Semelhante ao estudo anterior, De Filippis *et al.* (2018) avaliaram os efeitos das temperaturas de 20 e 30°C na seleção de bactérias acéticas e a produção de ácido orgânicos durante 21 dias de fermentação da kombucha. Segundo os autores a temperatura de 30°C contribuiu para uma maior diversidade microbiana incluindo diferentes espécies produtoras de ácidos orgânicos promotoras de *Gluconacetobacter*. Esses autores também observaram que a concentração de bactérias ácido acéticas aumentou no líquido fermentado após uma semana, em ambas as temperaturas, e seus níveis permaneceram estáveis até o final do processo.

Quanto maior o tempo de fermentação, maior a produção de ácidos orgânicos pela cultura da kombucha, o que pode representar riscos potenciais para os consumidores, dessa forma, o tempo de fermentação deve ser padronizado para a obtenção de sabor e aroma agradáveis (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Após alguns dias de fermentação, uma nova película de celulose (SCOBY) será formada na superfície do líquido, e, caso não seja utilizada para uma nova fermentação, recomenda-se que seja armazenada sob refrigeração juntamente com um pequeno volume da kombucha já fermentada (SANTOS, 2016).

A bebida resultante deve ser filtrada para remoção dos restos de celulose e massas de microrganismos em suspensão e armazenada sob refrigeração em recipientes fechados (SANTOS, 2016).

De acordo com Santos (2016), uma segunda fermentação ainda pode ser realizada a fim de carbonatar a kombucha, esse processo pode ser realizado adicionando-se uma fonte de açúcar ou suco de fruta à bebida já fermentada.

### 3.6 Substratos utilizados para a obtenção da kombucha

O chá preto e o chá verde são os substratos tradicionalmente utilizados para a preparação da kombucha (BATTIKH et al., 2012; JAYABALAN et al., 2014).

Como já citado anteriormente, ambos são provenientes das folhas da planta *Camellia sinensis*, a diferença entre eles consiste apenas no tipo de processamento ao qual as folhas são submetidas (AHMED e STEPP, 2013).

A presença do chá no meio de cultivo para kombucha fornece aos microrganismos o nitrogênio necessário para o seu metabolismo. Os principais componentes presentes no chá que atuam como fonte de nitrogênio são os derivados da purina (cafeína e teofilina) (VELIANSKI et al., 2013).

Dessa forma, alguns estudos apontam que a microbiota da kombucha também pode atuar em outros tipos de substratos diferentes dos chás obtidos a partir da planta *Camellia sinensis*, mas que também apresentam cafeína em sua composição, como a erva mate (*Ilex paraguariensis*), que pode ser consumida como chimarrão, tererê e chá-mate (SANTOS et al., 2009; PALUDO, 2017) e o próprio café (WATAWANA et al., 2015b).

No entanto, vários outros trabalhos demonstram que a cultura simbiótica da kombucha também se desenvolve adequadamente em substratos que não apresentam cafeína em sua composição, sugerindo que os microrganismos da kombucha são capazes de utilizar diferentes fontes de nitrogênio. Dessa forma, de acordo com Leal et al. (2018) é possível encontrar variações da kombucha obtidas a partir de infusões de hortelã, erva-cidreira ou jasmim.

Cvetković (2008) demonstrou que as infusões de equinácia (*Echinacea purpurea* L.) e de segurelha-de-inverno (*Satureja montana* L.) também podem ser utilizadas como fontes alternativas de nitrogênio na fermentação da kombucha, reduzindo o tempo de fermentação e obtendo características comparáveis à bebida tradicional. Já Rodrigues et al. (2018) produziram kombucha ( $25 \pm 2$  °C / 12 dias) à base chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*, L.) e avaliaram as características físico-químicas do produto obtido (pH  $3,18 \pm 0,01$ ; acidez total  $0,18 \pm 0,0$  %; açúcares totais  $4,42 \pm 0,09$ %; sólidos solúveis totais  $8,10 \pm 0,2$  ° Brix).

A composição das infusões de chá utilizadas como matéria prima depende da forma de preparo do chá, sendo a temperatura da água e o tempo de infusão, alguns dos principais fatores (SANTOS, 2016). Porém, não existe consenso na literatura para esse tempo de infusão, podendo variar de acordo com o tipo de chá e do produtor, no geral, os tempos podem variar entre 10 a 15 minutos em água fervente (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). A tabela 4 apresenta as condições de preparo de alguns chás, relacionando a temperatura e tempo de infusão utilizados nos trabalhos pesquisados.

Tabela 4 - Temperatura e tempo de infusão das ervas utilizados para preparo das kombuchas

<b>Substrato</b>	<b>Temperatura / Tempo de infusão</b>	<b>Referência</b>
<b>Chá preto</b>	água fervente /15 min água fervente /5 min 95°C / 5 min	BATTIKH <i>et al.</i> , 2012 JAYABALAN, <i>et al.</i> , 2008 GAGGÌA <i>et al.</i> , 2019
<b>Chá verde</b>	74°C / 3 min água fervente /5 min	GAGGÌA <i>et al.</i> , 2019 JAYABALAN, <i>et al.</i> , 2008
<b>Chá mate</b>	água fervente /15 min água fervente /10 min	SANTOS <i>et al.</i> , 2009 PALUDO, 2017
<b>Café</b>	água fervente /5 min	WATAWANA <i>et al.</i> , 2015b
<b>Chá de rooibos</b>	95°C / 10 min	GAGGÌA <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Autora, 2023.

Além dos chás, outras matérias primas também foram apontadas em diversos trabalhos como sendo substratos viáveis para a fermentação da cultura da kombucha. Como por exemplo, Watawana *et al.* (2016) fermentaram água de coco ( $24 \pm 3$  °C por 7 dias) e observaram mais propriedades antioxidantes na bebida, quando comparada a kombucha tradicional, uma vez que, o teor de fenólicos totais da bebida passou de 15 para 25 mg de ácido gálico equivalente/g já a partir do primeiro dia de fermentação.

Já Ayed *et al.* (2017) fermentaram suco de uva com a cultura da kombucha a uma temperatura de 30 °C e avaliaram suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana e sensoriais durante 12 dias de fermentação. A partir dos resultados, foi demonstrado que a bebida apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas e propriedades funcionais devido à presença de compostos antioxidantes que foram formados. Além disso, também foi observado que após o oitavo dia de fermentação a acidez da bebida aumentou de forma muito pronunciada, enquanto o pH ( $2,91 \pm 0,010$ ) se manteve

constante até o último dia de fermentação, sendo o período de 6 dias considerado o tempo ideal para interromper o processo. A bebida fermentada nesse período (pH  $3,18 \pm 0,02$ ; acidez total  $62,2 \pm 5,1$  meq/L; concentração de etanol  $0,52 \pm 0,03$  g/mL) foi melhor aceita entre os provadores nos quesitos cor, acidez, aroma, sabor e avaliação global quando comparada às dos dias 8, 10 e 12. Já a bebida com 12 dias de fermentação (pH  $2,91 \pm 0,01$ ; acidez total  $104,2 \pm 3,2$  meq/L; concentração de etanol  $0,29 \pm 0,10$  g/mL) apresentou aroma e sabor avaliados como inaceitáveis pelos provadores, e acidez extremamente pronunciada.

MALBAŠA *et al.* (2002) utilizaram extrato de tubérculo de alcachofra (*Helianthus tuberosus L.*) e verificaram que a bebida obtida poderia ser considerada um produto dietético por apresentar uma baixa concentração de açúcares após o processo de fermentação (28 °C / 21 dias) e pela presença de inulo-oligossacarídeos. Foi constatado também que a película formada na bebida à base do extrato de alcachofra era muito mais espessa do que na kombucha tradicional.

### 3.7 SCOBY

A cultura da kombucha ou SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*) é um biofilme obtido a partir da associação simbiótica entre leveduras e bactérias acéticas que também é chamado de “chá de fungo”, uma vez que parece um tapete fúngico quando cultivado em condições estáticas. Esse biofilme cresce no chá adoçado e resfriado formando uma camada de película celulósica (JAYABALAN *et al.*, 2016).

O SCOBY é o nome comum que se dá à película gelatinosa celulósica que se forma na superfície do chá e que tem como função realizar a fermentação para a obtenção da kombucha. Também conhecido como “mãe da kombucha”, o SCOBY recebe este nome pois origina a bebida e uma nova película, a “filha”. As películas formam-se por camadas, sendo a da superfície sempre a mais recente. Os microrganismos (bactérias e leveduras) se acomodam nessa matriz de celulose e são responsáveis pela fermentação da kombucha (SANTOS, 2016; JARRELL *et al.*, 2000).

De acordo com Illana (2007), o crescimento deste consórcio de bactérias e leveduras induz a adição de novas membranas mais grossas que tomam a forma do seu recipiente em que a bebida é preparada e aumenta o efeito simbiótico entre bactérias e leveduras. O SCOBY mantém as bactérias acéticas na superfície, permitindo oxigênio

suficiente para o seu desenvolvimento, bem como, protege as leveduras da ação do oxigênio, uma vez que elas ficam abrigadas na parte inferior da película, possibilitando a realização da fermentação anaeróbica (SUHARTATIK *et al.*, 2011).

Vários estudos mostraram que a composição microbiológica do SCOBY ou fungo do chá, pode variar entre fermentações (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COTON *et al.*, 2017; REVA *et al.*, 2015), dependendo de fatores como origem, clima, localização geográfica e meio utilizado para o processo de fermentação (WATAWANA *et al.*, 2015a).

Dentre as bactérias acéticas que fazem parte da composição da kombucha, a *Komagataeibacter xylinus* merece destaque, uma vez que sintetiza a celulose que compõe o SCOBY (MAY *et al.*, 2019). A atuação da *K. xylinus* no chá começa a partir da oxidação da glicose a ácido glucônico, em seguida, outro metabolismo específico leva à síntese de celulose microbiana formando o biofilme que permanece na superfície do líquido. O processo inclui a síntese de difosfo-glicose de uridina (UDPGlc), que é o precursor de celulose, então cada célula *Komagataeibacter* pode polimerizar até 200.000 resíduos de glicose por segundo em cadeias  $\beta$ -1,4-glucana. A vantagem desta forma de produção de celulose é que a bactéria cresce rapidamente sob condições controladas e pode produzir celulose a partir de uma variedade de fontes de carbono, incluindo glicose, etanol, sacarose e glicerol (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

De acordo com Costa *et al.* (2017), a celulose bacteriana apresenta propriedades únicas como: alta cristalinidade, alta resistência à tração, extrema insolubilidade na maioria dos solventes, moldabilidade, alto grau de polimerização, é 100 vezes mais fina que a das fibras de celulose obtidas de plantas, e sua capacidade de retenção de água é mais de 100 vezes maior. Dessa forma, a aplicação dessa película pode ser utilizada para diferentes fins, em várias áreas, como alimentos, embalagens ou na medicina (CAMPANO, *et al.*, 2016).

Alguns fatores podem ser considerados com objetivo de maximizar e otimizar o rendimento da celulose microbiana obtida a partir da kombucha, a saber: o volume dos meios inoculados, o tempo de incubação, a área e a altura da superfície (CACICEDO *et al.*, 2015).

### **3.8 Composição microbiológica da kombucha**

De acordo com De Filippis *et al.* (2018), os microrganismos que predominam durante a fermentação da kombucha são as bactérias ácido acéticas e as leveduras osmofílicas.

Assim como outras associações de microrganismos, como o kefir, derivado do leite, a composição microbiológica da kombucha não está bem definida, uma vez que pode variar de acordo com sua origem, substratos e condições de produção (JAYABALAN *et al.*, 2014).

### 3.8.1 Bactérias

As bactérias que predominam na cultura da kombucha são as produtoras de ácido acético e ácido glucônico, pertencentes aos gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. Sendo *Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *A. aceti*, *A. pausterianus*, *Bacterium gluconicum* e *Gluconobacter oxydans* as espécies encontradas com maior frequência nos estudos (JAYABALAN *et al.*, 2014; BISHOP *et al.*, 2022).

A *Acetobacter xylinum* foi reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus* e mais recentemente como *Komagataeibacter xylinus* (YAMADA *et al.*, 2012) e mostrou ser a principal bactéria do meio, pois além de produzir ácido acético e glucônico, também produz celulose, que é um composto de extrema importância para a película celulósica (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

As espécies de *Komagataeibacter* também têm a capacidade de acumular até 10–20% de ácido acético no meio, enquanto as espécies de *Acetobacter* só conseguem acumular no máximo 8% de ácido acético (GOMES *et al.*, 2018).

Apesar da *Komagataeibacter xylinus* apresentar maior evidência, estudos comprovam a diversidade ainda maior de *Komagataeibacter* spp. no kombucha, uma vez que foram encontradas recentemente as cepas: *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter intermedius* e *Komagataeibacter rhaeticus* (MAY *et al.*, 2019).

A *Gluconoacetobacter* sp. A4 também merece destaque por produzir o ácido D-sacarico-1,4-lactona (DSL) que é um componente derivado do ácido D-glucárico, responsável pelas propriedades desintoxicantes e antioxidantes da kombucha (JAYABALAN *et al.*, 2014; JAYABALAN *et al.*, 2016).

Jayabalan *et al.* (2014) citam que em amostras de kombucha provenientes do Canadá, Irlanda, Estados Unidos e Reino Unido as bactérias predominantes foram *Gluconoacetobacter* e *Lactobacillus*, sendo *Acetobacter* o grupo menos frequente.

Resultado semelhante foi obtido por Filippis *et al.* (2018), que demonstraram a predominância de *Gluconacetobacter* mesmo em temperaturas de fermentação diferentes (20 e 30°C), enquanto a concentração de *Acetobacter* apresentou níveis mais baixos após 24 horas de

fermentação (cerca de 80 e 10%, respectivamente). Após sete dias, o *Gluconacetobacter* foi responsável por mais de 90% da população bacteriana e sua abundância permaneceu inalterada até o final da fermentação, enquanto a concentração de *Acetobacter* diminuiu com o tempo, atingindo níveis em torno de 3-5% após 21 dias.

Além disso, algumas bactérias como *Leuconostoc*, *Allobaculum*, *Ruminococcaceae*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Thermus* também foram detectadas, porém estas não apresentaram tanta ocorrência quanto as outras (SANTOS, 2016).

De acordo com Jayabalan *et al.* (2014), foram isoladas células de *A. intermedius*, *A. nitrogenifigens*, que fixam nitrogênio, e *Gluconacetobacter kombucha*, que também é capaz de produzir celulose.

A presença de bactérias lácticas na kombucha é variável, normalmente elas não são encontradas ou quando presentes estão em baixas concentrações, sendo mais comuns os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Oenococcus* (BISHOP *et al.*, 2022; TRAN *et al.*, 2020).

### 3.8.2 Leveduras

Diversos estudos indicam grande variedade de espécies de leveduras isoladas na kombucha, incluindo os gêneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Kloeckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora* e *Zygosaccharomyces*. Com relação ao gênero *Brettanomyces* foram identificados *Brettanomyces intermedius*, *Brettanomyces bruxellensis* e *Brettanomyces claussenii*. Já as espécies relatadas do gênero *Candida* incluem *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida obtusa*, *Candida estrelada*, *Candida guilliermondii*, *Candida colliculosa*, *Candida kefir* e *Candida krusei*. Leveduras do gênero *Saccharomyces* também foram apontadas por vários pesquisadores, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Sacchromyces ludwigii* e *Sacchromyces pombe*. Do gênero *Schizosaccharomyces* foi encontrado apenas *Schizosaccharomyces pombe*, já para o gênero *Zygosaccharomyces* foram identificados *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, e *Zygosaccharomyces kombuchaensis* sp. (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COTON *et al.*, 2017; JAYABALAN *et al.*, 2014; MARSH *et al.*, 2014).

Leveduras como *Torula*, *Torulopsis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Pichia membranefaciens*, *Kloeckera apiculata* e *Kluyveromyces africanus* também foram relatadas por Jayabalan *et al.* (2014).

Watawana *et al.* (2016) relataram *Zygosaccharomyces* como a levedura predominante com 84,1% de porcentagem relativa de abundância no SCOBY e espécies *Dekkera* e *Pichia* com 6% e 5%, respectivamente.

Estudos indicam que as espécies de leveduras fermentativas osmotolerantes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Torulasporea delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe*) frequentemente iniciam a fermentação enquanto espécies acidotolerantes (*Brettanomyces spp.*, *Candida stellata*) aparecem subsequentemente (TEOH *et al.*, 2004).

Interações entre leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* mostram-se vantajosas no processamento de fermentação mista da kombucha, uma vez que minimizam o risco de crescimento de bactérias que podem interferir na fermentação, bem como, contribuem para a formação de aromas e sabores característicos (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

### **3.9 Metabolismo dos microrganismos durante a fermentação da kombucha**

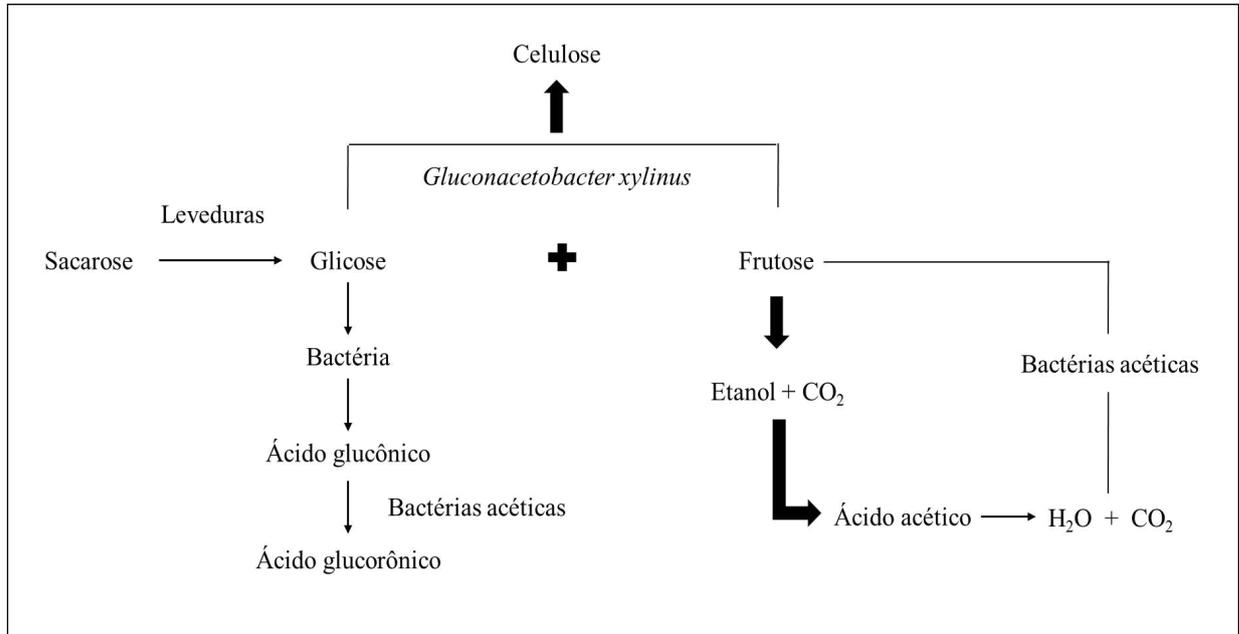
O metabolismo dos microrganismos durante a fermentação da kombucha é complexo e ainda não foi completamente elucidado devido ao grande número de microrganismos envolvidos nesse ecossistema e as interações, tanto de cooperação quanto de conflito, que ocorrem entre eles (MAY *et al.*, 2019).

Já se sabe que, no início do processo, as leveduras hidrolisam a sacarose em glicose e frutose pela invertase e produzem etanol via glicólise, sendo que algumas delas, como as do gênero *Saccharomyces* tem preferência por glicose, ao passo que determinadas leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* têm preferência por frutose como substrato (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Além disso, os outros microrganismos presentes no meio também se beneficiam dos monômeros obtidos a partir da quebra das moléculas de sacarose pela invertase das leveduras, consistindo na primeira relação de cooperação entre leveduras e bactérias que ocorre durante a fermentação do kombucha (MAY *et al.*, 2019).

As bactérias ácido acéticas fazem uso de glicose para produzir ácido glucônico e etanol para produzir ácido acético (JAYABALAN *et al.*, 2014). A presença desse ácido estimula as leveduras a produzirem etanol que depois é utilizado pelas bactérias acéticas para o seu crescimento e para a produção de mais ácido acético (MAY *et al.*, 2019), conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Metabolismo microbiano na fermentação da kombucha



Fonte: Adaptado Markov *et al.* (2003)

Por sua vez, as cepas do gênero *Acetobacter* produzem ácido acético a partir de etanol. Este processo é realizado pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, que entram no Ciclo de Krebs produzindo água e dióxido de carbono (TEYSSIER e HAMDOUCHE, 2016). Já o gênero *Gluconobacter* não é capaz de oxidar o acetato através do ciclo de Krebs, uma vez que não possui as enzimas necessárias para o processo de oxidação, levando ao acúmulo de produtos, como gluconato, no meio (LEAL *et al.*, 2018).

A bactéria *Komagataeibacter xylinus* é considerada a principal responsável pela produção de celulose bacteriana nas culturas de kombucha. No entanto, estudos recentes ilustraram uma diversidade ainda maior de *Komagataeibacter* spp. na kombucha do que se conhecia anteriormente (MAY *et al.*, 2019).

Inicialmente, a população de bactérias que sintetiza celulose no meio aumenta devido ao consumo do oxigênio dissolvido na interface ar/meio, possibilitando o desenvolvimento apenas das bactérias que estão na superfície da película. Com o avanço da

fermentação a película fica mais espessa, devido ao incremento de mais camadas na superfície, formando uma estrutura suspensa no líquido. A síntese de celulose se encerra quando a película fica densa o bastante até o ponto de afundar no líquido. Dessa forma, os microrganismos ficam aprisionadas no SCOBY e as bactérias acéticas permanecem inativas devido ao suprimento insuficiente de oxigênio (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Além disso, a presença do SCOBY também diminui o suprimento de oxigênio para as leveduras, já que elas ficam abaixo da parte inferior do biofilme, podendo, dessa forma, continuar a fermentação anaeróbica gerando como produtos etanol e compostos aromáticos frutados, pelas leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces*, que apresentam uma grande importância no desenvolvimento do aroma da kombucha. Já as leveduras apiculadas (como *Kloeckera* e *Hanseniaspora*) sintetizam ésteres voláteis e ácidos que conferem ao substrato um aroma semelhante a sidra (SANTOS, 2016).

Os ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação da kombucha causam uma diminuição do pH do chá, gerando um acúmulo de acidez. A capacidade da microbiota da kombucha de gerar e tolerar estas condições ácidas pode proporcionar um benefício geral em termos de proteção do sistema contra a invasão de microrganismos indesejáveis. Dessa forma, o crescimento de possíveis bactérias patogênicas é inibido, possibilitando o consumo seguro da bebida (WATAWANA *et al.*, 2015a; MAY *et al.*, 2019).

Após o envase da kombucha as bactérias acéticas, que são estritamente aeróbias, vão perdendo sua atividade e deixando de metabolizar o etanol que continua a ser produzido pelas leveduras caso ainda reste açúcar na bebida (CARVALHES e ANDRADE 2020).

### **3.10 Composição química da kombucha**

Como já foi mencionado anteriormente, a composição química da kombucha é variável tanto quantitativa quanto qualitativamente, porém, alguns componentes, como ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis e aminoácidos estão comprovadamente presentes na maioria (FU *et al.*, 2014).

Villarreal-Soto *et al.* (2018), listaram os principais componentes presentes na kombucha, de acordo com a quantidade inicial de açúcar utilizado e o tempo de fermentação, conforme apresentado da Tabela 5.

Tabela 5 - Composição química da kombucha

	<b>Composto</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Sacarose Inicial</b>	<b>Tempo de Fermentação</b>
<b>Ácidos Orgânicos</b>	Ácido acético	5,6 g/L	70 g/L	15 dias
	Ácido acético	8,36 g/L	100 g/L	18 dias
	Ácido acético	11 g/L	100 g/L	30 dias
	Ácido glucônico	39 g/L	100 g/L	60 dias
	Ácido glucorônico	0,0160 g/L	70 g/L	21 dias
	Ácido lático	0,18 g/L	100 g/L	18 dias
<b>Vitaminas</b>	Vitamina B <sub>1</sub>	0,74 mg/mL	70 g/L	15 dias
	Vitamina B <sub>2</sub>	0,08 mg/mL	70 g/L	10 dias
	Vitamina B <sub>6</sub>	0,52 mg/mL	70 g/L	15 dias
	Vitamina B <sub>12</sub>	0,84 mg/mL	70 g/L	15 dias
	Vitamina C	0,03 mg/mL	70 g/L	10 dias
<b>Outros compostos</b>	Etanol	5,5 g/L	100 g/L	20 dias
	Proteínas	3 g/L	100 g/L	12 dias
	Polifenóis	7,8 mM GAE*	100 g/L	15 dias
<b>Minerais</b>	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	0,1 a 0,4 µg/mL	70 g/L	15 dias
<b>Ânions</b>	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,04 a 3,20 mg/g	100 g/L	7 dias

Fonte: VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018

\*GAE (ácido gálico equivalente)

Entre os ácidos orgânicos presentes, os mais importantes produzidos durante a fermentação são: acético, glucorônico, glucônico, lático, málico, cítrico, tartárico, fólico, malônico, oxálico, pirúvico e úsnico (JAYABALAN *et al.*, 2014).

O ácido acético é o composto químico responsável pelo aroma e sabor de vinagre na kombucha. Sua concentração tende a aumentar lentamente na bebida, atingindo 11 g/L aos 30 dias de fermentação e diminuindo gradualmente até terminar em 8 g/L aos 60 dias de fermentação. Esta redução deve-se à utilização desse ácido como fonte de carbono pelas bactérias, quando as fontes de açúcar e de etanol já se encontram esgotadas (LEAL *et al.*, 2018).

O ácido lático se mostra mais presente em preparações à base de chá verde quando comparado a outros chás, como o chá preto. Já o ácido glucorônico é produzido pelos microrganismos a partir da oxidação da glicose durante a fermentação da kombucha. Esse é o composto de maior importância para a saúde contido na kombucha, uma vez que atua no fígado como desintoxicante, pois é capaz de se ligar aos compostos tóxicos, permitindo que essas substâncias sejam excretadas pelos rins de forma mais eficiente. Além de, também, ser precursor na biossíntese de vitamina C (NGUYEN *et al.*, 2015).

Com relação aos polifenóis, os mais comumente encontrados na kombucha são epicatequina (CE), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigallocatequina

galato (EGCG) (MANACH *et al.*, 2004; VALENZUELA, 2004). Esses são compostos ativos com mais de uma unidade estrutural de fenol por molécula, representando o maior grupo de fitoquímicos e os mais abundantes antioxidantes presentes na dieta (LEAL *et al.*, 2018). As propriedades antioxidantes advindas dos polifenóis são responsáveis por muitos dos efeitos benéficos atribuídos a kombucha, tais como: prevenção do câncer, aumento da imunidade, alívio de inflamações e artrite (JAYABALAN *et al.*, 2014; JAYABALAN *et al.*, 2008).

Leal *et al.* (2018), ao estudarem os benefícios à saúde dos compostos nutricionais e metabólitos da kombucha, relatam, ainda, a presença de etanol, dióxido de carbono, aminoácidos, aminas biogênicas, purinas, pigmentos, lipídios, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e C; antimicrobianos naturais, polifenóis provenientes do chá, alguns minerais (manganês, ferro, níquel, cobre, zinco, chumbo, cobalto, crômio e cádmio) e ânions (fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, fosfato e sulfato).

### **3.11 Propriedades benéficas da kombucha**

São atribuídos a kombucha vários benefícios à saúde humana. Entretanto, a maioria desses benefícios foram estudados apenas em modelos experimentais, havendo ausência de evidências científicas em modelos humanos (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Dentre os benefícios relatados por Dufresne e Farnworth (2000), podem-se citar: desintoxicação do sangue, redução do nível de colesterol, redução da aterosclerose pela regeneração da parede celular, redução da pressão arterial, redução de problemas inflamatórios, alívio os sintomas de artrite e reumatismo, auxílio da atividade intestinal, equilíbrio da microbiota intestinal, cura de hemorroidas, redução da obesidade e regulação do apetite, prevenção de infecção da bexiga e redução da calcificação renal, aumento da resistência do corpo ao câncer, efeito antibiótico contra bactérias, vírus e leveduras, melhoria do sistema imunológico, alívio de bronquite e asma, redução de distúrbios menstruais e ondas de calor na menopausa, redução de estresse, distúrbios nervosos e insônia, alívio das dores de cabeça, combate ao envelhecimento, dentre outros efeitos.

### **3.11.1 Propriedades antimicrobianas**

Segundo Battikh *et al.* (2012), já foram relatados vários estudos que apontam que a kombucha exerce atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

Pesquisas sobre o kombucha demonstraram sua eficácia antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas. Sendo a atividade antimicrobiana da kombucha atribuída, principalmente, à presença de ácidos orgânicos, particularmente ácido acético, proteínas grandes e catequinas. Uma vez que o ácido acético e as catequinas são conhecidos por inibir microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Por outro lado, Sreeramulu *et al.* (2000) sugerem que o poder antimicrobiano da kombucha não estaria associado, exclusivamente, à presença do ácido acético, uma vez que a bebida também apresentou ação inibitória, mesmo em pH neutro, para o crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni* e *Candida albicans*. Além disso, sugerem que as proteínas presentes no chá, também não estariam associadas a atividade microbiana, uma vez que, mesmo os chás que foram submetidos a um tratamento térmico (provocando desnaturação das proteínas) apresentaram atividade antimicrobiana. Finalmente os autores também apontam que as catequinas (compostos fenólicos presentes em abundância no chá) também não contribuem com esse efeito, já que amostras de chá não fermentado também foram testadas e não apresentaram ação inibitória para nenhum dos microrganismos, com exceção do *Campylobacter jejuni*. Dessa forma, apontam a existência de outros compostos com ação antimicrobiana na composição da bebida.

### **3.11.2 Propriedades antioxidantes**

Muitos dos efeitos benéficos atribuídos a kombucha como prevenção do câncer, aumento da imunidade, alívio de inflamações e artrite estão relacionados com a atividade antioxidante da bebida (JAYABALAN *et al.*, 2014).

A capacidade antioxidante da kombucha é atribuída, principalmente, à presença de polifenóis produzidos durante a fermentação, bem como ao efeito sinérgico dos diferentes compostos encontrados no chá (JAYABALAN *et al.*, 2008). Segundo Chu & Chen (2006), o teor total de polifenóis na kombucha aumenta linearmente durante o tempo de fermentação. Porém a fermentação prolongada do chá não é recomendada, uma vez que a concentração de ácidos orgânicos também aumenta ao longo do tempo, podendo atingir níveis prejudiciais para o consumo direto (JAYABALAN *et al.*, 2008).

De acordo com JAYABALAN *et al.* (2014), a kombucha tem atividade antioxidante superior ao chá não fermentado, fato que pode estar relacionado com a produção de componentes de baixo peso molecular e modificações estruturais dos polifenóis presentes no chá por enzimas produzidas por bactérias e leveduras durante fermentação.

Fu *et al.* (2014) utilizaram diferentes tipos de kombucha para comparar as capacidades de eliminação de radicais livres contra o 2,2-difenil-picrylhydrazyl (DPPH), radicais hidroxila e radicais superóxido. Diferentes tipos de chá foram usados para preparar a kombucha: chá verde de baixo custo, chá preto e chá em pó e os resultados mostraram que a kombucha obtida a partir da fermentação do chá verde apresentou maior capacidade de eliminação de radicais livres contra DPPH, radicais hidroxila e ânions superóxido.

### ***3.11.3 Propriedades anticancerígenas***

Como mencionado, as propriedades anticancerígenas da kombucha podem estar relacionadas à presença de polifenóis no chá e seus produtos de degradação formados durante a fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Os possíveis mecanismos anticancerígenos dos polifenóis do chá citados pela maioria dos pesquisadores consistem em: (1) inibição da mutação genética; (2) inibição da proliferação de células cancerígenas; (3) indução de apoptose de células cancerígenas; e (4) término de metástase (CONNEY *et al.*, 2002; IOANNIDES & YOXALL, 2003; BODE & DONG, 2003).

Jabalayan *et al.* (2011), estudaram as propriedades citotóxicas e anti-invasivas de frações de kombucha extraídas por diferentes solventes, contra três tipos de células cancerígenas humanas (carcinoma pulmonar, osteossarcoma e carcinoma renal), demonstrando que o malonato de dimetil 2- (2-hidroxi-2-metoxipropilideno) e a vitexina seriam os possíveis

compostos responsáveis pelas propriedades anticancerígenas da kombucha. Srihari *et al.* (2013) também demonstraram o efeito do extrato da Kombucha liofilizada sob células cancro da próstata, uma vez que foi observada a diminuição da expressão de moléculas que estimulam a angiogénese.

Também foi atribuída à kombucha propriedade hepatoprotetora contra vários agentes tóxicos e carcinogênicos do fígado, comprovada em experimentos com ratos e camundongos albinos. A capacidade de desintoxicação no fígado e a hepatoproteção devem-se, provavelmente, à atividade antioxidante da kombucha. Sendo o principal responsável por esses efeitos protetores o DSL (ácido D-sacárico-1, 4-lactona) que é produzido na bebida pela *Gluconacetobacter sp.* (JAYABALAN *et al.*, 2016).

### 3.12 Propriedades tóxicas

Jayabalan *et al.* (2014) mencionam alguns casos de distúrbios de saúde relatados por alguns indivíduos após a ingestão da bebida, como tontura e náusea, reações alérgicas, dor de cabeça, acidose láctica e hipertermia. No entanto, esses sintomas foram manifestados em casos isolados e geralmente estão associados ao consumo em excesso (mais que 4 oz por dia, equivalente a aproximadamente 120 mL/dia) à falta de higiene na preparação, à vulnerabilidade de saúde dos pacientes (HIV e insuficiência renal aguda), à lixiviação de metais pesados de recipientes utilizados para armazenar a bebida, e ao consumo de kombuchas muito ácidas resultantes de longos processos fermentativos (LEAL *et al.*, 2018; KAPP e SUMNER, 2018).

Além disso, alguns autores relataram a presença microrganismos patogênicos em kombuchas preparadas em casa, sem as condições de higiene adequadas, como bactérias do gênero *Bacillus anthrax* (SADJADI, 1998) e bolores *Penicillium* e *Aspergillus* que são conhecidos pelos seus efeitos carcinogênicos e intoxicogênicos (KOLE *et al.*, 2009). Bem como também foram identificados casos de intoxicação por chumbo e toxicidade gastrointestinal devido à migração de recipientes de cerâmica utilizados para armazenar a kombucha (PHAN *et al.*, 1998; SABOURAUD, 2009).

Já Kole *et al.* (2009) publicaram um estudo de caso de um paciente de 22 anos, HIV positivo, que apresentou insuficiência renal aguda com acidose láctica e hipertermia após 15 horas de ingestão de kombucha. Segundo Leal *et al.* (2018), foram relatados dois casos de acidose relacionados ao consumo excessivo da kombucha. Esses mesmos autores afirmam

ainda que, posteriormente, foi comprovado que os pacientes eram portadores de HIV e insuficiência renal aguda, condições que os torna vulneráveis ao desenvolvimento da doença.

Por outro lado, em relação às gestantes, o consumo da kombucha é contraindicado como um parâmetro de segurança, devido ao possível conteúdo de heparina (componente glicosaminoglicano) no chá, que inibe proteínas do sistema de coagulação do sangue, sendo prejudicial durante o terceiro trimestre da gravidez. Contudo, os autores afirmam que a presença de heparina não foi comprovada em amostras analisadas, porém, o consumo da bebida pode favorecer sua produção no organismo (RUBIO DELGADO, 2015).

No entanto, todos estes casos são isolados e envolveram um número restrito de indivíduos. Além disso, não há evidências substanciais que confirmem a toxicidade da kombucha ou a ocorrência de doenças em estudos anteriores (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2000).

### 3.13 Legislação

O Brasil definiu recentemente os padrões de identidade e qualidade da kombucha em todo o território nacional através da Instrução Normativa Nº 41, de 17 de setembro de 2019, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Essa legislação contempla aspectos como: definição, classificação, rotulagem, parâmetros analíticos, composição (ingredientes obrigatórios e opcionais) e proibições relacionados à produção e comercialização da kombucha (BRASIL 2019).

De acordo com a legislação brasileira, kombucha é a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (BRASIL 2019).

A bebida é considerada alcoólica quando contém entre 0,6% e 8,0 % de álcool, em volume, sendo obrigatória a informação do teor alcoólico da bebida no rótulo. Mesmo na kombucha não alcoólica (menos de 0,5% de álcool) a concentração de álcool deve ser indicada no rótulo quando ultrapassar o limite de 0,05% (BRASIL 2019).

Dentre os parâmetros físico-químicos, a Instrução Normativa estabelece que o pH da kombucha esteja entre 2,5 e 4,2 e que o teor de acidez volátil mínimo permitido seja 30

mEq/L e o máximo 130 mEq/L, podendo ser adicionada de suco, polpa de fruta, extrato vegetal, especiarias, mel e outros aditivos permitidos pela ANVISA (BRASIL, 2019a).

Nos Estados Unidos as bebidas fermentadas e os alimentos enlatados acidificados estão isentos de regulamentação pelo FDA, dessa forma, não existe uma legislação específica para a kombucha (NUMMER, 2013). No entanto ela é definida como uma bebida fermentada obtida por “processo especializado” e para sua obtenção é necessário que o produtor apresente um plano de Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle – HACCP (FDA, 2009).

Dessa forma, com objetivo de controlar o processo e garantir a segurança alimentar dos consumidores da bebida, o Departamento de Agricultura da Pensilvânia (EUA) publicou um documento contendo as diretrizes para a produção e o envase da kombucha. De acordo com essas diretrizes, o pH da kombucha deve ser monitorado durante todo o processo de fermentação e não deve ser superior a 4,2 e inferior a 2,5 a fim de evitar contaminações microbiológicas e acidose, respectivamente. Ademais, o documento orienta ainda que é vetado qualquer tipo de alegação de saúde no rótulo da bebida, bem como, que o consumidor deve ser alertado quanto: a contraindicação do produto para indivíduos imuno-comprometidos, quanto ao limite de consumo diário (que não deve exceder 4 oz. por dia, equivalente a aproximadamente 120 mL/dia) e quanto a possível presença de álcool, mesmo que em baixas concentrações. (DUTTA e PAUL, 2019)

Com relação ao teor alcoólico da bebida, o Departamento do Tesouro e Comércio do Tabaco e Departamento do Imposto do Tesouro dos EUA (2017) exige que a concentração seja inferior a 0,5% em volume, caso contrário, a bebida é classificada como bebida alcoólica e sujeita a uma regulamentação específica por esse departamento.

Nummer (2013) alerta que mesmo após o engarrafamento a bebida pode continuar fermentando, o que pode provocar um aumento do teor alcoólico para até 3%. Isso ocorre porque os microrganismos continuam fermentando os açúcares e produzindo álcool e dióxido de carbono dentro do recipiente e o acúmulo de dióxido de carbono impede a conversão do álcool em ácido acético. Para evitar esse tipo de problema, o autor recomenda a utilização de técnicas de pasteurização e/ou adição de conservantes (0,1% m/v de benzoato de sódio e 0,1% m/v de sorbato de potássio) em combinação com refrigeração com intuito de interromper o processo fermentativo, porém, vale salientar que o uso dessas técnicas pode comprometer a característica probiótica que é atribuída a bebida, uma vez que os microrganismos benéficos seriam eliminados. No entanto, estudos comprovando a viabilidade dos paraprobióticos e pós-bióticos podem solucionar esse impasse, uma vez que alguns autores defendem a teoria de que

mesmo após o tratamento térmico, os alimentos probióticos podem continuar com sua funcionalidade, já que a presença de microrganismos não viáveis ou até mesmo dos subprodutos do seu metabolismo podem contribuir com a saúde e bem-estar dos consumidores (BARROS *et al.*, 2020).

### **3.14 Mercado econômico para a kombucha no Brasil**

Os alimentos funcionais estão se tornando cada vez mais populares no mercado, refletindo uma mudança no estilo de vida da população, que passa a buscar uma dieta mais saudável. Dentre os alimentos funcionais, aqueles que contribuem para a saúde digestiva estão entre os mais procurados, dessa forma o mercado de bebidas probióticas, como a kombucha, vem crescendo de forma significativa nos últimos anos (BRUSCHI *et al.*, 2018; KIM & ADHIKARI 2020).

O Brasil é o quinto maior mercado de alimentos e bebidas saudáveis do mundo, o volume de vendas atingiu aproximadamente US\$27,5 bilhões em 2015, segundo levantamento da EUROMONITOR. Esse mercado cresceu 98% no Brasil entre 2009 e 2014. E a agência prevê um crescimento expansivo do setor até 2020. Segundo dados da EUROMONITOR, 28% dos brasileiros consideram o valor nutricional o mais importante na hora de consumir um produto, enquanto 22% dão preferência a alimentos naturais e sem conservantes (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019).

Dessa forma, com o aumento do consumo de alimentos e bebidas naturais, a produção da kombucha no Brasil começou a avançar. Inicialmente essa produção era apenas artesanal, desenvolvida por pessoas que tinham interesse em produzir a bebida em casa. Porém, nos últimos três anos, algumas indústrias de pequeno porte começaram a produzir a bebida, para venda em mercados regionais (Associação Nacional dos exportadores de suco cítrico - CITRUS, 2018).

Contudo, o produto ainda não é muito conhecido, segundo a Associação Brasileira de Kombucha (ABkom) existem 40 empresas produtoras de Kombucha espalhadas pelo país. Essas empresas têm uma produção média de entre 2 mil e 5 mil garrafas por mês, ou 25 mil litros por mês, e a venda é feita de forma regional. Em 2018 a comercialização da kombucha movimentou cerca de 20 milhões de reais (Associação Nacional dos exportadores de suco cítrico - CITRUS, 2018).

É importante pontuar que o aumento do consumo da kombucha não é exclusivo apenas no Brasil, no período de 2014-2018, o mercado americano cresceu a uma taxa de 23% ao ano. E as previsões estimam que esse crescimento continue aumentando até 2025, atingindo entre US\$3,5 a 5 bilhões. Na medida em que a indústria da kombucha foi ganhando espaço, em 2014, uma organização sem fins lucrativos chamada *Kombucha Brewers International* (KBI) foi criada para compartilhar informações sobre a produção, ajudar com regulamentações e legislações relacionadas à bebida. Em novembro de 2019, havia 235 empresas em todo o mundo inscritas como membros desta organização, sendo 134 sediadas nos EUA. Este número não inclui o número total de empresas de kombucha em atividade nos EUA, no entanto, fornece uma estimativa da dimensão desse mercado no país (KIM & ADHIKARI 2020).

### **3.15 Inovações tecnológicas para a utilização da película de celulose**

Um dos primeiros produtos comercialmente disponíveis elaborados a partir da celulose bacteriana foi a “nata de coco”, que teve origem nas Filipinas na década de 1990 e ao longo dos anos tornou-se popular em outros países como Japão, Coreia e EUA (GAMA *et al.*, 2013; JAGANNATH *et al.*, 2008). A “nata de coco” é a película de celulose sintetizada pela *Komagataeibacter xylinus* (antes *Acetobacter xylinum*) a partir da fermentação de água de coco. O termo “nata” é de origem latina (natare significando flotar), e se refere à película de celulose formada na superfície da água de coco ou de outros meios de cultura como suco de abacaxi (nata de pinha) e soro de leite (nata de soro) (DANESI & WOSIACKI, 1998). A nata de coco é produzida na forma de camadas grossas de celulose que são cortadas em pequenos cubos uniformes, lavadas e fervidas em água antes de serem cozidas em xarope de açúcar para aplicações alimentares. A nata de coco é usada em produtos alimentícios, como sobremesas de baixa caloria, saladas, coquetéis de frutas e geleias de frutas (GAMA *et al.*, 2013; JAGANNATH *et al.*, 2008).

A película da kombucha vem sendo amplamente utilizada para a fermentação de outros substratos, além dos chás, resultando na obtenção de produtos com características diferentes da kombucha. Como por exemplo, Malbaša *et al.* (2009) produziram bebidas similares a iogurte a partir da fermentação de leite meio gordo e kombucha de várias origens (de chá preto, verde e de extrato de tупinambo). Já Tu *et al.* (2019) utilizaram a película da kombucha para fermentar soro de soja e obter uma nova bebida funcional. Enquanto Ayed e

Hamdi (2015) utilizaram suco de palma forrageira como substrato para desenvolver uma nova bebida com propriedades nutricionais aprimoradas a partir da colônia de microrganismos da kombucha.

Além disso, outras aplicações da película de celulose formada a partir da fermentação de bactérias acéticas na kombucha, também são reportadas pela literatura. Uma vez que esse material se destaca pela sua estabilidade química, estrutura molecular e força (CZAJA *et al.*, 2007).

Essa película de celulose vem sendo utilizada por pesquisadores como bioissorvente para remoção de poluentes metálicos como arsênico, cromo e cobre a partir de águas residuais (MURUGESAN *et al.*, 2006; MAMISAHEBEI *et al.*, 2007; ŠĆIBAN *et al.*, 2012).

Murugesan *et al.* (2005) relataram que a utilização da biomassa da kombucha como suplemento proteico na ração de frangos de corte em uma concentração de 15 % (p/p) de película na ração, resultou em um aumento do peso e do fator de produção das aves.

Santos (2016) produziu “nata de kombucha”, com objetivo de obter um produto semelhante a “nata de coco” a fim de fornecer uma alternativa para o aproveitamento das películas de celulose resultantes da produção da kombucha, a mesma autora formulou também “géis de kombucha” a partir na adição de hidrocoloides (ágar, goma de alfarroba e carragenina) para serem utilizados em sobremesas e na produção de gomas comestíveis.

De acordo com Costa *et al.* (2017) a celulose sintetizada pelas bactérias apresenta estrutura molecular idêntica à da celulose vegetal, no entanto, a celulose bacteriana possui maiores graus de pureza, polimerização, cristalinidade, resistência à tração, absorção de água, capacidade de retenção de água e adaptabilidade biológica, oferecendo biocompatibilidade, biodegradabilidade.

Essas propriedades exclusivas resultam em uma ampla variedade de aplicações. Podendo ser utilizada na área da biomedicina no tratamento de queimaduras e outras lesões de pele (CZAJA *et al.*, 2007) ou até mesmo na reparação de cartilagem e osso (PUPPI *et al.*, 2010); ou ainda como um vaso sanguíneo artificial em procedimentos microcirúrgicos (KLEMM *et al.*, 2001).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Preparo das infusões

Para a produção da kombucha, foram utilizados três tipos de infusões diferentes como substrato: chá verde (*Camellia sinensis*), cidreira (*Melissa officinalis*) e erva doce (*Pimpinella anisum*), separadamente. Todas as ervas foram adquiridas no mercado local da cidade de Currais Novos-RN, da marca Maratá®, cada caixa contendo 10 sachês de 10g.

Os sachês de cada um dos chás foram colocados em panelas de aço inoxidável contendo 10% de açúcar branco cristal (m/v) e água fervente, conforme a proporção estabelecida pelo fabricante no rótulo do produto (1 sachê para 130 mL de água) e mantidos sob infusão durante 10 minutos. A concentração de açúcar utilizada e o tempo de infusão das ervas foi estabelecida conforme descrito por Santos (2016).

Em seguida, os sachês foram retirados e as infusões adoçadas foram transferidas para recipientes de vidro previamente lavados e sanitizados, com capacidade de 3 litros e 9,5 centímetros de diâmetro de abertura.

Todas as etapas que envolveram a produção das kombuchas foram realizadas no laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Rio Grande do Norte, *campus* Currais Novos.

### 4.2 Preparo da kombucha

Após o arrefecimento das infusões (temperatura em torno de 25°C) foi realizada a inoculação, em que foi adicionado um volume de 20% (v/v) de kombucha já fermentada proveniente de cada uma das infusões de origem, juntamente com um SCOBY (película), também previamente fermentado em infusão específica para cada erva, medindo em torno de 14 centímetros de diâmetro.

Os bocais dos recipientes foram protegidos com papel toalha presos por elásticos, evitando-se contato com insetos e sujidades físicas, mas permitindo a entrada de oxigênio. A incubação foi realizada em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) sob 30°C durante 10 dias.

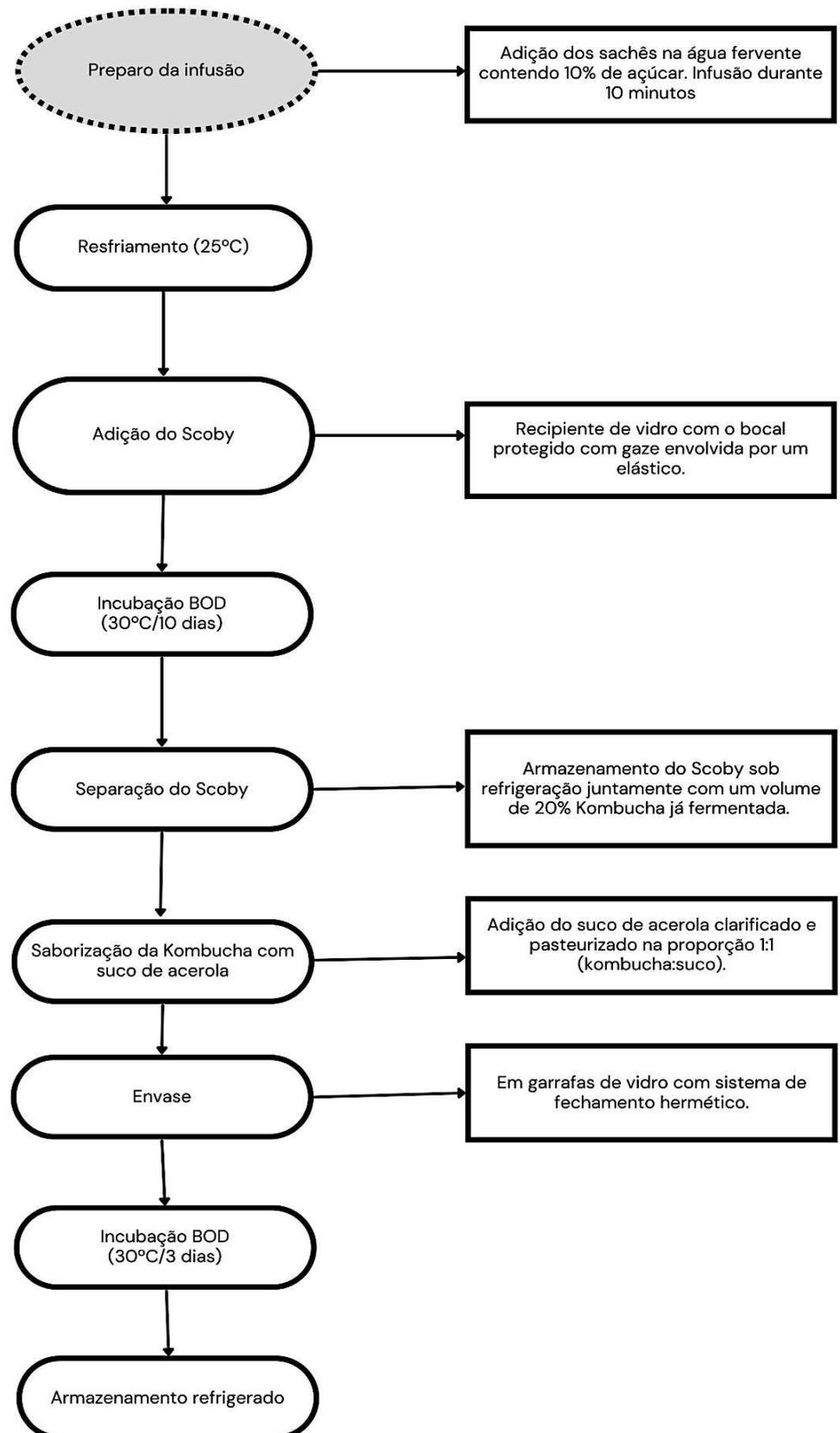
Os tratamentos foram nomeados T1, T2 e T3, correspondendo às kombuchas obtidas a partir das infusões de chá verde, cidreira e erva doce, respectivamente.

### 4.3 Saborização e segunda fermentação

Após 10 dias de fermentação o líquido foi separado dos SCOBY e as bebidas obtidas foram saborizadas com suco de acerola clarificado adoçado na proporção 1:1. Após a homogeneização dos ingredientes, o líquido foi distribuído em garrafas de vidro com tampa hermética. Em seguida, essas garrafas foram fechadas e armazenadas em estufa BOD sob 30°C, durante 3 dias para que ocorresse uma nova fermentação. Essa etapa teve como objetivo, além do incremento do sabor característico do suco, a produção de gás, devido à adição de açúcar, que possibilitou a continuação da fermentação pelos microrganismos da kombuchas.

Após a segunda fermentação as amostras foram nomeadas: K1 – primeira fermentação no chá verde e segunda fermentação com 50% de suco de acerola clarificado, K2 – primeira fermentação na infusão de cidreira e segunda fermentação com 50% de suco de acerola clarificado e K3 primeira fermentação na infusão de erva doce e segunda fermentação com 50% de suco de acerola clarificado. O fluxograma referente ao processo de obtenção da kombucha está apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma com o processo de produção da kombucha



Fonte: Autora, 2023.

#### 4.4 Preparo e clarificação do suco de acerola

Para a produção do suco de acerola, foram utilizadas polpas de fruta da marca *Sterbom*, produzidas e comercializadas na cidade de Currais Novos-RN. O suco foi preparado conforme diluição recomendada pelo fabricante (200 mL de água para cada 100g de polpa), juntamente com 10% de açúcar branco cristal (m/v). Em seguida, foi filtrado para remoção do excesso de resíduos sólidos (Figura 3, a) e aquecido a 40°C para a realização do tratamento enzimático de clarificação. Para esse tratamento foi utilizada a enzima pectinase da marca Yanglonghui® na concentração 0,02% (m/v). A enzima foi adicionada ao suco e incubada a 40°C na BOD durante 90 minutos. Após esse tempo, o suco foi colocado em provetas de 1L e mantido sob refrigeração durante 24 horas, para a decantação do restante dos sólidos em suspensão (Figura 3, b) e posterior separação do suco clarificado. Passado esse tempo, o suco foi pasteurizado a 70°C por 15 minutos e resfriado em banho de gelo até a temperatura de aproximadamente 25°C. Após o resfriamento, o suco foi utilizado para a savorização e segunda fermentação das kombuchas.

Figura 3 - Etapas do processo de obtenção do suco clarificado



Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** (a) resíduos do suco retidos após a filtração, (b) resíduos depositados no fundo da proveta após o armazenamento refrigerado do suco tratado com a enzima.

## 4.5 Acompanhamento da fermentação

Para a avaliação do comportamento da fermentação das kombuchas, diariamente, foram retiradas alíquotas de 50 mL da bebida até o décimo dia de fermentação para determinação do pH, sólidos solúveis e acidez total. Além desses parâmetros, também eram retiradas amostras diariamente e mantidas em microtubos (tipo Eppendorf) sob congelamento para as determinações das concentrações de sacarose, glicose, frutose, ácido acético, ácido láctico e etanol em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os dados obtidos foram representados em gráficos construídos através do *software Origin 8*.

Ao final da fermentação, calculou-se o rendimento de SCOBY formado em cada um dos tratamentos.

### 4.5.1 Rendimento do SCOBY

O rendimento da película de celulose formada durante o processo de fermentação foi calculado conforme Wang *et al.* (2023). A massa da película inicial foi medida antes da fermentação e as películas resultantes após a fermentação, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $m_i$  é a massa do SCOBY adicionado no início da fermentação e  $m_f$  é a massa total de SCOBY resultante após a fermentação.

## 4.6 Análises físico-químicas

### 4.6.1 Determinação de pH

O pH foi determinado através de leitura direta utilizando um potenciômetro digital da marca ALFAKIT modelo AT-355. O equipamento foi calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

#### **4.6.2 Determinação dos sólidos solúveis totais**

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado utilizando um refratômetro portátil da marca INSTRUTHERM, modelo RTD-95, e os resultados expressos em °Brix (LUTZ, 2008).

#### **4.6.3 Determinação de acidez titulável**

Para a determinação da acidez titulável, inicialmente, utilizou-se 5 mL da amostra juntamente com 50 mL de água destilada e adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína (1%). Em seguida, titulou-se com uma solução de NaOH 0,1 M até mudança de cor para róseo claro. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido acético, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

#### **4.6.4 Determinação de acidez volátil**

Para determinação da acidez volátil, 10 mL da amostra foram destiladas em destilador de nitrogênio (Marconi, MA 036 plus) e os ácidos voláteis presentes na bebida foram coletados após a condensação dos vapores em *Erlenmeyer* contendo 20 mL de água destilada. Em seguida, foi realizada a titulação com solução de NaOH 0,1M, até a coloração rosa persistente e os resultados foram expressos em meq/L (LUTZ, 2008).

#### **4.7 Determinação de compostos fenólicos totais**

O teor dos compostos fenólicos foi determinado através do método colorimétrico *Folin-Ciocalteu* (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997). Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de ácido gálico (EAG) para a obtenção da curva padrão. De acordo com o tipo da amostra, diluições de diferentes concentrações foram obtidas. Para a reação colorimétrica, foi adicionado 1 mL da amostra diluída, 1 mL da solução de *Folin-Ciocalteu* (1:3), 2 mL de água destilada e 2 mL de carbonato de sódio 20%, homogeneizadas e colocados sob abrigo da luz para reagir durante 30 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220) a 700 nm sob temperatura ambiente. Os teores de

fenólicos totais foram expressos em mg de ácido gálico equivalentes (GAE) por 100 mL da amostra.

#### 4.8 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com o método descrito por RE *et al.*, 1999; RUFINO *et al.*, 2007, através do potencial de inibição do radical ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)). O radical ABTS<sup>+</sup> foi produzido pela reação de 5 mmol/L solução estoque de ABTS 7mM com 88 µL de persulfato de potássio 140mM em um ambiente escuro à temperatura ambiente 16 horas antes do uso. O radical produzido foi diluído em etanol até a absorvância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm. Para a curva padrão, utilizou-se solução de trolox previamente preparada com diferentes concentrações (100 – 2000 µM). Em seguida, 30 µL das amostras em três concentrações diferentes foram misturados com 3,0 mL da solução de ABTS<sup>+</sup> e após incubação em temperatura ambiente por seis minutos, a absorvância foi lida em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220) a 734 nm. A atividade antioxidante foi expressa em µM Trolox/L.

#### 4.9 Análise de Cor

A análise de cor foi realizada no Laboratório de Frutos e Hortaliças do Departamento de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para essa análise foi utilizado o equipamento colorímetro ColorQuest XE (HunterLab, Virgínia, EUA) acoplado ao software EasyMatch QC 4.81, operando em modo Transmissão Total com iluminante D65 e os resultados foram expressos a partir da escala de cores CIELAB (L\*, a\* e b\*). Onde, L\* corresponde a luminosidade (0 a 100); a\* corresponde ao espectro de cores verde (-a\*) e vermelho (+a\*) e b\* corresponde ao espectro de cores azul (-b\*) e amarelo (+b\*).

#### 4.10 Determinações em HPLC

As amostras foram mantidas sob congelamento até o momento das análises que foram realizadas na Central Analítica do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos do Departamento de Engenharia Química da UFC.

Os teores de açúcar (sacarose, glicose e frutose), de ácidos orgânicos (acético, láctico) e etanol formados durante os 10 dias de produção das kombuchas foram quantificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) utilizando um sistema *Thermo Finnigan Surveyor* (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com um detector de índice de refração e com uma coluna Supelco 610 H. A solução de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a 0,1% v/v preparada com Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizada como fase móvel com vazão de 0,5 mL/min e a análise conduzida a 30 °C. O volume de injeção das amostras foi padronizado em 20 µL e os picos foram comparados com o tempo de retenção dos padrões previamente definidos dos constituintes de interesse identificados.

#### **4.11 Análise de estabilidade**

As kombuchas saborizadas (K1, K2 e K3) foram armazenadas durante 90 dias para a avaliação da estabilidade ao longo do armazenamento refrigerado (5 °C). Durante esse período, mensalmente, eram abertas garrafas de cada uma das amostras para a avaliação do pH, sólidos solúveis totais e acidez.

#### **4.12 Análises Microbiológicas**

A Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da kombucha em todo o território nacional, não define os parâmetros microbiológicos para a bebida. No entanto, estabelece que os microrganismos do SCOBY podem estar presentes na bebida, proíbe a adição dos mesmos após o processo de fermentação e a presença de contaminantes microbiológicos em concentração superior ao limite estabelecido pela Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2019a). Porém, em 2019, a RDC nº 12 foi revogada pela RDC nº 331, publicada em 23 de dezembro de 2019, em que estabelece os novos padrões microbiológicos para alimentos com os limites dispostos na Instrução Normativa nº 60, de 26 de dezembro de 2019. Apesar dessa atualização na resolução, a kombucha não se enquadra em nenhuma categoria específica, podendo ser incluída, por aproximação, em função da similaridade com “Refrigerantes e outras bebidas carbonatadas” que estão dentro da categoria “Bebidas não alcoólicas”, dentre tantos outros grupos de alimentos especificados na legislação. Para esse tipo de produto, apenas a quantidade de bolores e leveduras é estabelecido como parâmetro microbiológico, porém, exclui-se as bebidas

fermentadas (BRASIL, 2019b). Uma vez que a kombucha é uma bebida obtida a partir de um processo fermentativo e que pode ser naturalmente ou artificialmente carbonatada, situa-se num limbo legislativo e, até este momento ainda carece de definição dos critérios microbiológicos que garantam a qualidade e a segurança da bebida.

Foram realizadas as análises de coliformes a 35°C e a 45°C; contagem de bolores e leveduras, contagem de bactérias acéticas e contagem de bactérias lácticas. Para a realização dessas análises, inicialmente, as amostras foram diluídas em solução salina (0,85% - p/v) nas concentrações  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .

#### **4.12.1 Determinação de coliformes**

A determinação de coliformes foi realizada a partir da técnica do número mais provável (NMP), conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2017). Para a quantificação dos coliformes a 35°C, inoculou-se 1 mL de cada diluição em uma série de 3 (três) tubos contendo 9 mL de caldo Lactose (digerido pancreático de gelatina 5 g/L; lactose monohidratada 5 g/L e extrato de carne 3 g/L) com tubos de *Durham* invertidos. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas. Uma vez que, após a incubação, não foi observado crescimento positivo em nenhuma das diluições das amostras analisadas, não foi necessário seguir para as próximas etapas para a determinação de coliformes.

#### **4.12.2 Contagem de leveduras**

Para a determinação de bolores e leveduras foi realizado o plaqueamento em superfície utilizando o meio Ágar Batata Dextrose (PDA), (dextrose 2 g/L; infusão de batata 200 g/L; ágar bacteriológico 15 g/L) acidificado com ácido tartárico a 10% (m/v), com o pH 5,0, no qual inoculou-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata e realizou-se o espalhamento com alça de *Drigalsky* em toda a superfície da placa. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 5 dias para realização das contagens, os resultados foram expressos em UFC/mL (SILVA *et al.*, 2017).

#### **4.12.3 Contagem de bactérias acéticas**

Para a contagem de bactérias acéticas também foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície, onde inoculou-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata, no meio de cultura composto GYCA (glicose 30 g/L; extrato de levedura 5g/L; peptona 3 g/L; carbonato de cálcio 10 g/L; ágar 20 g/L e 3% de álcool etílico absoluto após autoclavagem). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas para posterior realização das contagens, os resultados foram expressos em UFC/mL (WATAWANA *et al.*, 2016).

#### **4.12.4 Contagem de bactérias lácticas**

As bactérias lácticas foram determinadas utilizando o Ágar MRS (peptona de caseína 10 g/L; extrato de carne 10 g/L; extrato de levedura 4,2 g/L; glucose 20 g/L; fosfato dipotássico 2 g/L; Tween \*80 1 g/L; citrato de amônio 2 g/L; acetato de sódio 5 g/L; sulfato de magnésio 0,2 g/L; sulfato de manganês 0,04 g/L e ágar 14 g/L) a partir da técnica de plaqueamento em profundidade, utilizando 1 mL de inóculo para cada diluição, em duplicata. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas, sob anaerobiose e os resultados foram expressos em UFC/mL (ETGETON e ZANETTE 2020).

### **4.13 Identificação do perfil do consumidor de kombucha**

Participaram desse levantamento 385 indivíduos residentes da cidade de Fortaleza e região metropolitana do Ceará. Os dados foram coletados a partir de um questionário utilizando a plataforma *Google Forms* que foi aplicada em meio *online*.

O questionário foi dividido em doze seções, a primeira seção continha o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e os participantes deveriam confirmar ou não a sua participação na pesquisa. As seções dois, três e quatro foram compostas por questões sociodemográficas, tais como: localidade (Fortaleza ou Região Metropolitana), bairro, faixa etária, renda, escolaridade, gênero e situação civil. Na seção cinco, os participantes deveriam marcar se conheciam ou não kombucha. Em caso de resposta negativa, o questionário era finalizado. A seção seis continha duas questões de sim ou não, uma sobre o conhecimento dos benefícios da kombucha e a outra se já haviam consumido a bebida. Os participantes que responderam nunca ter consumido eram encaminhados para a sétima seção, na qual foi

solicitado que justificassem sua resposta. Enquanto, os participantes que responderam já ter consumido, marcaram a frequência de consumo na seção oito. Nas seções nove e dez foram levantadas questões sobre preferências de consumo, como origem que mais agradava (artesanal, industrial), tipo de erva base preferida (como alternativa à *Camellia sinensis*), embalagem preferida, bem como o seu tipo e cor e, por fim, quais informações os participantes gostariam de encontrar na embalagem da kombucha. A décima primeira seção foi destinada para a avaliação dos elementos relacionados à decisão de compra do consumidor utilizando o método *Best-Worst Scaling* (BWS).

#### **4.13.1 Método *Best-Worst Scaling* (BWS)**

O método BWS se destaca como ferramenta que possibilita a delimitação de atributos relevantes ao comprador através de indicação de qual elemento é melhor ou mais importante e qual é pior ou menos importante por parte dos entrevistados, possui como objetivo identificar o grau de importância, de maneira hierárquica, de elementos chaves do produto estudado pela perspectiva do consumidor (FINN; LOUVIERE, 1992; DINIZ *et al*, 2017). Dessa forma, para a construção do método BWS foram selecionados 10 atributos para realizar as combinações, sendo eles: elevado teor de antioxidantes, sabor, probiótico, benefício à saúde, marca, boa opção para substituir o refrigerante, preço, não conter aditivos químicos, produto artesanal e aumentar a imunidade. Os atributos foram distribuídos em conjuntos de cinco, de forma que o participante deveria selecionar apenas um atributo para o termo “mais importante” e outro atributo para o termo “menos importante” dentro de cada grupo. Para garantir que todos os atributos aparecessem na mesma quantidade de vezes foi utilizado o software XLSTAT. Os atributos foram distribuídos no *Google Forms* como “linhas”, enquanto os termos “menos importante” e “mais importante” foram distribuídos em colunas. Dessa forma, foi possível restringir a resposta do participante a apenas uma resposta por coluna, garantindo, assim, que não houvesse uma dupla seleção de elementos na mesma coluna.

#### **4.14 Análise Sensorial**

Os testes sensoriais para avaliação das kombuchas produzidas foram realizados em dois momentos separadamente, no primeiro momento foram levantados os termos descritores

da bebida durante duas sessões de grupo de foco, no segundo momento foram realizados os testes de aceitação, intenção de compra, o CATA (*check-all-that-apply*) e o RATA (*rate-all-that-apply*) simultaneamente.

#### **4.14.1 Grupo de Foco**

Foram realizadas duas sessões de grupo de foco a fim de fazer o levantamento dos termos descritores que melhor caracterizam as kombuchas elaboradas (K1, K2 e K3). Os encontros foram realizados no laboratório de análise sensorial do Instituto de Cultura e Arte (ICA) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Ao todo, esse momento contou com a participação de 14 voluntários, dentre eles, discentes da graduação ou da pós-graduação em gastronomia da UFC, sendo o primeiro encontro realizado com 8 (oito) participantes e o segundo com 6 (seis). As sessões foram mediadas por dois pesquisadores envolvidos no projeto no primeiro momento, foram apresentados os objetivos do trabalho e logo em seguida foi solicitado aos participantes o consentimento para a gravação da reunião, que durou cerca de 60 minutos cada sessão. Os participantes descreveram suas impressões sobre a aparência, o aroma e o sabor de cada uma das amostras separadamente.

#### **4.14.2 Aceitabilidade e intenção de consumo das kombuchas produzidas**

O teste foi realizado no Laboratório de análise sensorial do Instituto Federal do Rio Grande do Norte, campus Currais Novos, onde participaram 100 provadores não treinados. Destes, a maioria apresentava menos de 25 anos (68%) e nunca havia consumido kombucha (85%), como mostra a Tabela 6, com o perfil dos participantes. Antes de começar, eles foram orientados a preencher o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e declarar a sua anuência para a participação na pesquisa.

Em seguida, cada provador recebeu três amostras diferentes de kombucha, de cada uma das formulações (K1, K2 e K3) em taças de vidro, codificadas com números de três dígitos aleatórios (Figura 4), contendo aproximadamente 30 mL de cada amostra do produto refrigerado (MACFIE *et al.*, 1989). Entre cada amostra, os provadores foram orientados a comer um pedaço de biscoito de água e sal e beber água para limpar e enxaguar o paladar. Também foram dadas orientações sobre o preenchimento da ficha de avaliação e de cada amostra deveria ser avaliada por vez, da esquerda para a direita (Apêndice A).

Tabela 6 - Painel sensorial referente aos 100 provadores participantes do teste de aceitabilidade

<b>Itens</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>	
<b>Idade</b>	>18 anos	19
	18-25 anos	49
	26-35 anos	9
	36-50 anos	20
	51-65 anos	3
	< 65 anos	0
<b>Gosta de suco de Acerola</b>	Sim	94
	Não	6
<b>Conhece Kombucha</b>	Sim	64
	Não	36
<b>Já consumiu Kombucha</b>	Sim	15
	Não	85
<b>Frequência de consumo (Kombucha)</b>	Diariamente	2
	2 a 3 vezes/semana	0
	1 vez/semana	3
	Quinzenalmente	0
	Mensalmente	1
	Semestralmente	9
<b>Frequência de consumo (Suco de Acerola)</b>	Diariamente	6
	2 a 3 vezes/semana	21
	1 vez/semana	15
	Quinzenalmente	20
	Mensalmente	1
	Semestralmente	9

Fonte: Autora, 2023.

Figura 4 - Cabine de prova preparada para a análise sensorial



Fonte: Autora, 2023.

O teste de aceitação foi realizado utilizando uma escala hedônica estruturada mista de 9 pontos, com as extremidades ancoradas nos termos “gostei muitíssimo” = 9, e “desgostei muitíssimo” = 1, e “não gostei nem desgostei” = 5 no meio da escala. Foram avaliados os atributos: aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. A intenção de compra também foi avaliada através de uma escala de 5 pontos (1 = certamente não compraria, 5 = certamente compraria) (MEILGAARD *et al.*, 2004).

O índice de aceitação (IA%) para cada atributo foi calculado conforme Teixeira *et al.* (1987), de acordo com a Equação 2:

$$IA\% = \frac{\text{Pontuação média do atributo} \times 100}{\text{pontuação máxima da escala}} \quad (\text{Equação 2})$$

A rejeição foi assumida se  $IA\% < 70\%$  (Teixeira *et al.*, 1987).

#### **4.14.3 Check all that apply (CATA), rate all that apply (RATA)**

Os mesmos provadores do item 4.14.2 também selecionaram os termos que melhor caracterizaram cada amostra para a aplicação do teste CATA (MEYNERs e CASTURA, 2014) e simultaneamente avaliaram a intensidade dos termos aplicáveis usando uma escala estruturada de 5 pontos (1-pouquíssimo, 3-médio e 5-muitíssimo), para a aplicação do teste RATA (MEYNERs, *et al.*, 2016).

Os termos descritores para as bebidas foram identificados e listados previamente através de sessões de discussões entre provadores não treinados, mediada pelos pesquisadores envolvidos no projeto, conforme descrito no item 4.14.1. Vale salientar que os provadores que participaram das discussões para identificação dos termos descritores da amostra não participaram do teste propriamente dito.

Para análise dos resultados, a frequência de uso de cada atributo sensorial foi determinada pela contagem do número de consumidores que usaram o termo para descrever cada amostra. Foi aplicado o teste de Q de Cochran para identificação dos atributos significativos e o procedimento das comparações múltiplas pareadas de McNemar (Bonferroni) para avaliar se existia diferença significativa entre os tratamentos em cada um dos atributos listados no teste CATA.

As pontuações RATA foram calculadas somando as pontuações fornecidas pelos provadores que selecionaram o termo como aplicável para descrever a amostra (ARES *et al.*, 2014).

#### **4.15 Comitê de ética**

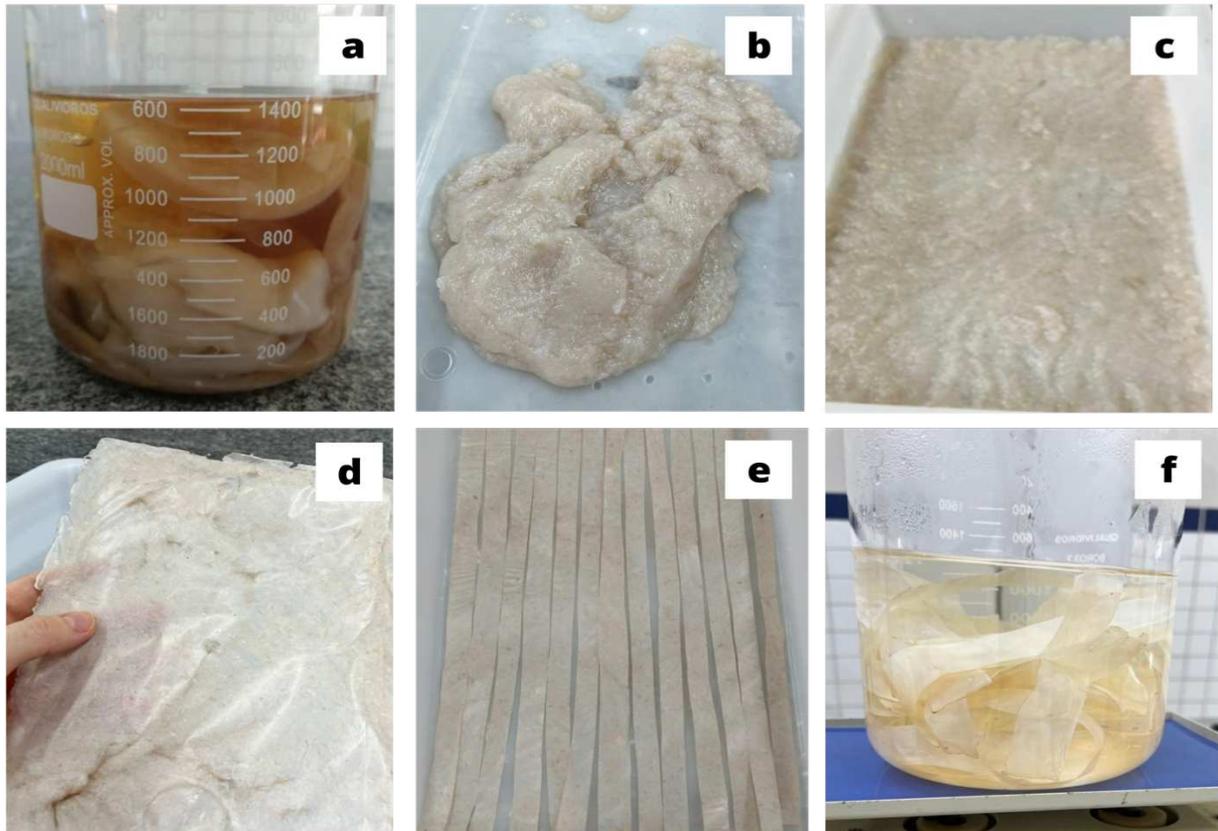
As análises que envolveram a participação de seres humanos, tais como: identificação do perfil do consumidor de kombucha e análise sensorial, só foram iniciadas após aprovação pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFC, em cumprimento à Resolução nº 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, sob o parecer nº 41822420.2.0000.5054.

#### **4.16 Aproveitamento dos SCOBYS da kombucha para a produção de canudos**

As películas de celulose resultantes da fermentação da kombucha formadas durante a execução desse trabalho foram submetidas a um tratamento de purificação, conforme

metodologia descrita por Silva (2018), adaptada, o qual consistiu, inicialmente em lavar as películas em água corrente e fervê-las duas vezes em água a 100°C, por 30 minutos cada cocção (primeiro branqueamento). Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens sucessivas (1h cada lavagem) com solução alcalina de NaOH 2% (m.v<sup>-1</sup>) na proporção de 300 g de SCOBYS para 2 L de solução (Figura 5, a) a 80°C para completa remoção do remanescente de células da fermentação (purificação). Em sequência, as membranas foram lavadas com água até atingir pH 7, trituradas em liquidificador (Figura 5, b) colocadas em bandejas de plástico de maneira uniforme (Figura 5, c) e secas em uma estufa de circulação de ar (SOLAB SL-102/1152I) a 50°C até a completa remoção de água. Após a secagem o material adquiriu o aspecto semelhante a uma folha de papel (Figura 5, d), posteriormente foi cortado em tiras de aproximadamente dois centímetros (Figura 5, e) e por fim, as tiras foram imersas em água aquecida (60°C) e agitadas em um oscilador de bancada por 30 minutos, para o segundo branqueamento (Figura 5, f).

Figura 5 - Etapas do processamento dos SCOBYS para a produção dos canudos



Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** (a) última purificação em solução alcalina de NaOH 2% (m.v<sup>-1</sup>), (b) películas trituradas, (c) películas dispostas na bandeja plástica antes da secagem, (d) material após a secagem, (e) corte das tiras, (f) segundo branqueamento (tiras).

#### 4.16.1 Obtenção dos canudos

Após as etapas descritas acima, as tiras obtidas foram moldadas na forma de canudo, utilizando três camadas, com o auxílio de uma pipeta 1mL e postas para secar sobre uma bandeja de plástico em estufa de circulação de ar a 50°C, por 24 horas.

Com o objetivo de diminuir a solubilidade em água, após a secagem, os canudos foram imersos em óleo de soja, agitados constantemente por 3 horas, lavados em água corrente para remover o excesso de óleo e secos sobre uma bandeja plástica à 50°C, por 24 horas, em estufa de circulação de ar (ALMEIDA *et al.*, 2017).

A espessura dos canudos e o diâmetro interno foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess, 100174BL).

Com o objetivo de verificar a possibilidade de utilização dos canudos produzidos, alguns testes foram realizados, tais como: teste de umidade, solubilidade, absorção de umidade, viabilidade e biodegradação.

#### 4.16.2 Umidade dos canudos

O teor de umidade dos canudos foi calculado de acordo com a metodologia proposta por LUTZ (2008), onde, inicialmente, tomou-se a massa inicial dos canudos e sua massa final após a secagem em estufa a 105 °C até o peso constante. Para a obtenção da umidade utilizou-se a Equação 3.

$$Umidade (\%) = \left( \frac{mi - mf}{mi} \right) \times 100 \quad (Equação 3)$$

Onde: *mi* é a massa inicial e *mf* é a massa final dos canudos após secagem em estufa.

#### 4.16.3 Teste de solubilidade dos canudos

Os testes de solubilidade foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Almeida *et al.* (2020) com modificações, os canudos foram secos em estufa a 105 °C, tiveram suas massas aferidas e foram imersos em dois recipientes diferentes, um contendo 50 mL de água destilada e outro contendo 50 mL de ácido cítrico a 1% (m/v), a fim de obter a solubilidade em água e em ácido respectivamente. O sistema foi mantido sob agitação a 100

rpm em mesa agitadora orbital, por 40 minutos. Após essa etapa, as amostras foram removidas da água e do ácido e secas em estufa a 105 °C por 24 horas para a determinação da massa seca final do material que não foi solubilizado. Os resultados foram expressos através da porcentagem de material seco solubilizado e calculados de acordo com a Equação 4.

$$SOL = \left( \frac{mi-mf}{mi} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo: *SOL* a massa solubilizada em função da massa seca inicial em porcentagem; *mi* a massa inicial do material seco e *mf* a massa final do material seco não solubilizado.

#### **4.16.4 Teste de absorção de umidade dos canudos**

O teste de absorção de umidade foi realizado segundo metodologia proposta por LUTZ (2008), modificada. A massa das amostras secas a 105 °C foi anotada e as películas foram submetidas ao teste de solubilidade em água. Tomou-se a massa das amostras úmidas e aplicou-se na Equação 5.

$$\text{Umidade absorvida (\%)} = 100 \times \frac{N}{P} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: *N* é a massa da umidade absorvida em gramas e *P* é a massa da amostra seca em gramas.

#### **4.16.5 Teste de viabilidade dos canudos**

A viabilidade para a utilização dos canudos foi avaliada conforme disposto em Silva *et al.* (2021) com adaptações. Para isso, foram utilizados refrigerante de cola e suco de cajá, por essas bebidas serem usualmente consumidas com esses dispositivos e apresentaram pH mais ácido. O pH e temperatura do refrigerante estavam em torno de  $2,40 \pm 0,01$  e 22 °C, respectivamente; já para o suco de cajá, os valores foram equivalentes a  $2,70 \pm 0,01$  e 14 °C, respectivamente. Para realização do teste, os canudos foram imersos nas bebidas e em 0, 5, 10 e 15 minutos, avaliou-se a integridade visual, a viabilidade à sucção e a possibilidade de interferência no sabor dos produtos.

#### 4.16.6 Teste de biodegradação dos canudos

O teste de biodegradação foi realizado a partir de adaptações das metodologias descritas por Marinho *et al.*, 2018 e Prakash Marana *et al.*, 2014. Os canudos foram cortados em pedaços de 3 cm e secos em estufa de circulação de ar (105 °C/24h), para verificar a perda de massa ao longo dos dias submersos em solo simulado. Para isso, utilizou-se 50 g de uma mistura de areia grossa, adubo (1:1) e 10 mL de água em recipientes plásticos de 150 mL (medindo 6,5 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro), nos quais os canudos ficaram subterrados durante 45 dias. Os recipientes foram mantidos sob temperatura ambiente ( $28 \pm 5$  °C), umidade relativa  $69 \pm 5$  %, e próximos a uma janela para maior contato com a luminosidade, a fim de simular condições naturais de decomposição (Figura 6).

Figura 6 - Recipientes contendo os canudos submersos no solo simulado para o teste de biodegradação



Fonte: Autora, 2023.

O solo simulado apresentou pH 9,40 e era umedecido sempre que necessário. Nos tempos 5, 15, 25, 35 e 45 dias foram retiradas três amostras do solo, cuidadosamente lavadas com água destilada e secas em estufa de circulação de ar (105°C/24 h) para avaliação da perda

de massa. A média da perda de massa de cada um dos tempos foi calculada conforme Equação 6.

$$\text{Perda de massa (\%)} = 100 \frac{(\text{Peso seco inicial}) - (\text{Peso seco final})}{\text{Peso seco inicial}} \quad (\text{Equação 6})$$

#### 4.17 Tratamento Estatístico

Os resultados das análises físico-químicas, dos compostos bioativos e das análises microbiológicas foram apresentados como médias + desvio padrão dos experimentos independentes feitos em triplicata (n=3). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As médias dos valores hedônicos obtidos na análise sensorial também foram avaliadas pela ANOVA e em seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o CATA, foi aplicado o Teste Q de Cochran com o objetivo de identificar diferenças significativas em cada atributo e o teste das Comparações múltiplas pareadas McNemar (Bonferroni) para avaliar diferenças significativas entre os tratamentos. A análise de componentes principais (ACP) também foi utilizada a fim de observar como os tratamentos se distribuíram conforme os descritores selecionados.

As pontuações RATA foram calculadas somando as pontuações fornecidas pelos consumidores que selecionaram o termo como aplicável para descrever os tratamentos. As médias de intensidade foram avaliadas através da ANOVA e as diferenças significativas entre os tratamentos através do teste das Comparações múltiplas pareadas McNemar (Bonferroni).

A análises estatísticas foram obtidas através do software XLSTAT versão 2021.1.11090.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análises físico-químicas

Análises físico-químicas são parâmetros importantes tanto para avaliação da qualidade das matérias primas, como para o acompanhamento do processo fermentativo da kombucha e caracterização do produto final. Dessa forma, o pH, o teor de sólidos solúveis e a porcentagem de acidez total foram determinados nas matérias primas (suco de acerola e infusões) e nas kombuchas após a primeira fermentação e após a segunda fermentação, quando ocorreu a adição do suco de acerola - saborização (Tabela 7).

Tabela 7- Valores médios dos parâmetros físico-químicos do suco de acerola, das infusões, das kombuchas após primeira e após segunda fermentação

	Amostra	pH	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Acidez total titulável
Infusões	Suco	3,41±0,00	11,13±0,21	0,33±0,01*
	Chá verde	5,90 <sup>c</sup> ±0,03	12,10 <sup>d</sup> ±0,17	0,04 <sup>a</sup> ±0,00**
	Erva cidreira	5,99 <sup>cd</sup> ±0,08	11,07 <sup>c</sup> ±0,12	0,03 <sup>a</sup> ±0,01**
	Erva doce	6,07 <sup>d</sup> ±0,03	11,23 <sup>c</sup> ±0,15	0,03 <sup>a</sup> ±0,01**
Após primeira fermentação	T1	3,03 <sup>b</sup> ±0,03	9,63 <sup>ab</sup> ±0,21	0,63 <sup>bc</sup> ±0,01**
	T2	2,90 <sup>a</sup> ±0,02	10,13 <sup>ab</sup> ±0,06	0,58 <sup>bc</sup> ±0,07**
	T3	3,02 <sup>ab</sup> ±0,04	9,60 <sup>ab</sup> ±0,26	0,77 <sup>d</sup> ±0,05**
Após segunda fermentação (saborização)	K1	3,06 <sup>b</sup> ±0,00	9,57 <sup>a</sup> ±0,47	0,54 <sup>b</sup> ±0,01**
	K2	2,99 <sup>ab</sup> ±0,02	10,13 <sup>ab</sup> ±0,06	0,63 <sup>bc</sup> ±0,03**
	K3	3,05 <sup>b</sup> ±0,01	10,23 <sup>b</sup> ±0,06	0,64 <sup>c</sup> ±0,01**

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** T1 – kombucha chá verde, T2 – kombucha erva cidreira, T3 – kombucha erva doce, K1 – kombucha chá verde saborizada, K2 – kombucha erva cidreira saborizada, K3 – kombucha erva doce saborizada. \*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ). \* % ácido cítrico. \*\* % ácido acético.

Com relação ao suco de acerola, os parâmetros de pH e acidez titulável obtidos foram semelhantes aos valores encontrados na literatura. Para Dala-Paula *et al.* (2019) os extratos de polpa de acerola apresentaram pH entre 3,47 e 3,48, semelhante ao encontrado também por Caetano *et al.* (2012), onde os valores de pH da polpa e do suco foram: 3,44 e 3,47

respectivamente. A acidez titulável do suco foi expressa em ácido cítrico e coincidiu com os valores obtidos por Dala-Paula *et al.* (2019) que variaram entre 0,32 e 0,34 g de ácido cítrico/100 mL de polpa de acerola. Já quanto ao teor de sólidos totais, vale salientar que o suco em questão foi previamente adoçado com 10 % (m/v) de açúcar para posterior utilização na segunda fermentação das kombuchas. Diante disso, Lima *et al.* (2015) relataram teor de sólidos solúveis inferiores para diferentes genótipos de acerola (em média 8 °Brix). Vale salientar que os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) estabelecidos para suco de acerola pela legislação brasileira indicam que o suco deve apresentar no mínimo: 5,5 °Brix; pH 2,8 e acidez 0,8 g de ácido cítrico /100 g de suco (BRASIL, 2018), dessa forma, o suco avaliado apresentou teor de acidez abaixo do especificado, podendo indicar que houve adição de água na polpa utilizada para a obtenção do suco.

No que diz respeito à caracterização físico-química das infusões, é possível perceber que elas apresentaram características semelhantes (Tabela 7). Quanto ao pH, os valores variaram entre 5,90 (Chá verde) e 6,07 (Erva doce), sendo que o pH da erva cidreira não diferiu significativamente ( $p>0,05$ ) do pH do chá verde e da erva doce, no entanto, esses últimos diferenciaram-se entre si. O teor de sólidos solúveis variou entre 11,07 °Brix (Erva cidreira) e 12,10 °Brix (Chá verde) e, para a erva cidreira e erva doce, esses valores não diferiram ( $p>0,05$ ). Vale salientar que as infusões também foram previamente adoçadas com 10 % (m/m) de açúcar antes das análises e que os valores de acidez total titulável não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ) entre as infusões. Dessa forma, quanto a esses parâmetros, as amostras de kombucha partiram de condições semelhantes.

Com relação ao pH, não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as kombuchas obtidas a partir das mesmas infusões após a primeira fermentação e após a segunda fermentação. Esse comportamento pode ter ocorrido por conta da adição do suco, que contribuiu para um sutil aumento do pH das kombuchas, seguido de diminuição durante a segunda fermentação, o que fez com que não fosse observado diferença entre os valores. Já que se espera que o pH decresça com o decorrer da fermentação devido à formação de ácidos orgânicos durante o processo (SHARIFUDIN *et al.*, 2021), uma segunda fermentação teria um efeito semelhante.

Moura (2019) também observou uma estabilidade no pH entre kombucha elaborada a partir de chá mate e após a sua saborização e segunda fermentação com suco de maçã, gengibre e limão, em que o pH ficou em torno de 3,13 para ambas as bebidas.

Após a primeira fermentação, os resultados de pH variaram entre 2,90 (kombucha de erva cidreira) e 3,03 (kombucha de chá verde), sendo que os tratamentos T1 - T3 e T2 - T3

não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Para as kombuchas saborizadas, foi observado variação entre 2,99 (kombucha de erva cidreira) e 3,06 (kombucha de chá verde) e, da mesma forma, os tratamentos K1 - K3 e K2 - K3 não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ).

Veliyansk *et al.* (2013) observaram que o valor de pH da infusão de erva cidreira adoçada foi de 7,00 para 2,85 após cinco dias de fermentação a 28 °C com a cultura da kombucha. Enquanto para Kaewkod *et al.* (2019), o pH da kombucha à base de chá verde, após 15 dias de fermentação sob temperatura ambiente, foi em torno de 2,94.

Ainda em relação ao pH, todas as amostras de kombucha avaliadas (após a primeira e após a segunda fermentação) estavam dentro do que preconiza a legislação para esse parâmetro, uma vez que o pH estabelecido deve variar entre 2,5 e 4,2. Além disso, alguns autores afirmam que o controle do pH pode ser utilizado como parâmetro para o monitoramento da fermentação da kombucha e pode definir o final do processo, sendo 2,5 o valor de pH que delimita esse final (MALBAŠA *et al.*, 2008; JAYABALAN *et al.*, 2014; ULUSOY & TAMER, 2019).

Não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os valores de sólidos solúveis totais entre os diferentes tratamentos após a primeira fermentação. Na Tabela 7 é possível perceber que os teores variaram de 9,60 (T3) a 10,13 °Brix (T2).

Para Kaewkod *et al.* (2019), o teor de sólidos solúveis final, em todas as três formulações de kombuchas estudadas (chá verde, *oolong* e preto), ficou em torno de 6 °Brix após 15 dias de fermentação. Valor inferior aos obtidos nesse estudo, que pode ser explicado devido ao maior tempo de fermentação empregado e por conta da diferença de composição dos microrganismos presentes no SCOBY.

Assim como para o pH, não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos da primeira e da segunda fermentação elaborados com os mesmos tipos de infusão. O que também tem relação com a adição do suco de acerola adoçado, que contribuiu para o incremento no teor de sólidos solúveis nas kombuchas.

Moura (2019) observou aumento no teor de sólidos solúveis após a segunda fermentação, em que a kombucha a base de erva mate possuía em torno de 5 °Brix e a kombucha de erva mate saborizada, 7,29 °Brix. E também justificou esse comportamento devido ao acréscimo de suco e açúcar na bebida. Revelando que a segunda fermentação não contribui para o consumo dos açúcares presentes no meio. Diferente do que foi obtido nesse estudo, já que mesmo com a adição do suco que já apresentava 11,13 °Brix, ao soma-se ao teor de sólidos solúveis presentes nas kombuchas após a primeira fermentação é possível perceber uma redução

dessa concentração de açúcares, mostrando que os microrganismos ainda estavam ativos e aptos para uma nova fermentação. Já que a sacarose e os outros tipos de açúcares presentes no meio são consumidos pelas bactérias e leveduras da kombucha, resultando na diminuição do teor de sólidos solúveis ao longo da fermentação (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019).

O teor de acidez total titulável (expresso em ácido acético) para ambos os tratamentos variou de 0,54 a 0,77 %, sendo as kombuchas elaboradas a partir da infusão de erva doce, as que apresentaram os maiores valores, tanto após a primeira quanto após a segunda fermentação, enquanto o tratamento K1 foi o que apresentou o menor valor de acidez. Os tratamentos com erva doce também foram os únicos que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as kombuchas após a primeira e após a segunda fermentação, onde o teor de acidez reduziu de 0,77 para 0,64 %.

Já para Moura (2019), a acidez total titulável aumentou após a saborização da kombucha a base de erva mate, passando de 3,39 % (kombucha de erva mate após a primeira fermentação) para 7,29 % (kombucha saborizada após a segunda fermentação).

Percebe-se que em todos os tratamentos, a acidez aumentou de forma expressiva, quando comparada aos valores de acidez do suco de acerola e das infusões. Ressaltando a atuação dos microrganismos do SCOBY da kombucha, que durante a fermentação produzem ácidos orgânicos e contribuem para o aumento da acidez na bebida (JAKUBCZYK *et al.*, 2020).

No entanto, a quantidade de ácidos orgânicos produzidos na bebida deve ser controlada, uma vez que podem danificar a mucosa gástrica e acarretar danos à saúde humana (CHANDRAKALA *et al.*, 2019).

Para Veliyansk *et al.* (2013), o teor de acidez ideal de consumo deve estar em torno de 0,4 %, e dentre as infusões de ervas testadas pelos autores na elaboração de kombucha (erva cidreira, tomilho, hortelã pimenta e sálvia), a maior produção de ácidos ocorreu no caldo de fermentação com infusão de erva-cidreira, onde os 0,4 % de acidez foi obtido em menos de três dias de fermentação a 28 °C.

Cardoso *et al.* (2020) também observaram valores de acidez inferiores aos obtidos neste estudo para kombuchas à base de chá preto e chá verde, consistindo em 0,32 e 0,36 % (ácido acético), respectivamente. Enquanto para Kaewkod *et al.* (2019), a acidez total da kombucha preparada a partir de chá preto foi significativamente maior (1,68 %) do que a da kombucha preparada a partir de *oolong* (1,22 %) e do chá verde (1,17%).

Segundo o Código de Prática da Kombucha (KOMBUCHA BREWERS INTERNATIONAL, 2021), a concentração final da acidez deve estar entre 2,7 e 20,3 g de ácido

acético /L. Porém, a Instrução Normativa nº41, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade das kombuchas no Brasil, não menciona a acidez total titulável como um parâmetro de qualidade para a bebida, mas, define limites para acidez volátil, estabelecendo valores entre 30 e 130 mEq/L (BRASIL, 2019a).

De maneira geral, o consumo de sólidos solúveis foi considerado sutil em todos os tratamentos, uma vez que se observou uma pequena redução de valores quando comparados aos teores de sólidos iniciais presentes nas matérias primas. Mesmo assim, é possível constatar a ação dos microrganismos do inóculo, uma vez que a acidez total das kombuchas foi bastante pronunciada quando comparada a porcentagem de acidez contida nas infusões e no suco de acerola, coincidindo com a redução do pH nos tratamentos, podendo indicar que as infusões estão fornecendo outros tipos de compostos, diferente dos açúcares, como fonte de carbono para a produção de ácidos orgânicos.

### 5.1.2 Acidez volátil

Como citado anteriormente, a acidez mencionada pela legislação como parâmetro de qualidade de produção das kombuchas é a acidez volátil (Tabela 8).

Tabela 8 - Acidez volátil das amostras de kombucha após primeira e após segunda fermentação

	Amostra	Acidez volátil (mEq/L)
<b>Após primeira fermentação</b>	T1	123,10 <sup>c</sup> ±3,90
	T2	85,70 <sup>d</sup> ±0,99
	T3	144,14 <sup>f</sup> ±1,50
<b>Após segunda fermentação (saborização)</b>	K1	51,55 <sup>b</sup> ±1,50
	K2	40,06 <sup>a</sup> ±1,14
	K3	78,15 <sup>c</sup> ±2,48

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** T1 – kombucha chá verde, T2 – kombucha erva cidreira, T3 – kombucha erva doce, K1 – kombucha chá verde saborizada, K2 – kombucha erva cidreira saborizada, K3 – kombucha erva doce saborizada. \*Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 41, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade das kombuchas no Brasil, os valores de acidez volátil devem estar entre 30 e 130 mEq/L (BRASIL, 2019a).

Por tanto, segundo a Tabela 8, todos os tratamentos estavam de acordo com o que estabelece a legislação para esse critério, com exceção do T3. Vale salientar que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as kombuchas obtidas a partir das diferentes infusões e entre os tratamentos após a primeira e após a segunda fermentação. Também se observou que os valores de acidez volátil reduziram após a segunda fermentação. Após a primeira fermentação, a acidez volátil variou entre 85,70 mEq/L (T2) e 144,14 mEq/L (T3) e após a segunda variou entre 40,06 mEq/L (K2) e 78,15 mEq/L (K3). Dessa forma, a adição do suco de acerola contribuiu para a redução da acidez volátil em todos os tratamentos, já que a água presente no suco provocou a redução da concentração dos ácidos. Sendo as kombuchas à base de erva doce as que apresentaram os maiores valores de acidez volátil.

Venturim (2022) avaliou a influência de diferentes inóculos de kombucha brasileiros no processo fermentativo e na qualidade físico-química de diferentes formulações de kombucha e obteve valores de acidez volátil que variaram entre 0,89 e 32,2 mEq/L no decorrer dos 10 dias de fermentação. Valores inferiores aos obtidos por Pereira *et al.* (2021) para kombucha a base de chá verde, que após 10 dias de fermentação sob temperatura ambiente relatou um teor de acidez volátil de 47,10 mEq/L.

O teor de acidez volátil corresponde à quantidade de ácido acético presente na kombucha. E de acordo com Wang *et al.* (2023), este é considerado o ácido orgânico mais relevante na bebida. No entanto, apesar da legislação brasileira estabelecer esse parâmetro como critério de qualidade para as kombuchas, o que se observa é que a maioria dos trabalhos faz uso da acidez total titulável, tanto para o monitoramento como para encerramento do processo de fermentação, bem como para avaliação da qualidade, talvez pela facilidade e praticidade desta análise.

## 5.2 Compostos fenólicos e antioxidantes

Foram determinados os teores de antioxidantes e compostos fenólicos do suco de acerola, dos chás e das kombuchas após a primeira e após a segunda fermentação (Tabela 9).

Vale destacar a quantidade significativa de antioxidantes e de polifenóis contidos no suco de acerola, mostrando que, mesmo após o processamento, que envolveu etapas de clarificação e pasteurização, esses compostos ainda estavam presentes em altas concentrações, caracterizando o suco de acerola como uma importante fonte de compostos bioativos.

Os compostos fenólicos constituem uma importante classe dos fitoquímicos e são amplamente encontrados em frutas. Os principais compostos fenólicos encontrados na acerola são: rutina, quercetina, ácido cafeico, kaempferol e isoramnetina (MAGALHÃES *et al.*, 2021).

Não houve diferença significativa entre os teores de antioxidantes e de polifenóis nas infusões de erva cidreira e de erva doce ( $p < 0,05$ ). Dentre as infusões, o chá verde foi o que apresentou o maior teor de antioxidantes (7796,00 uM Trolox/L) e de compostos fenólicos (54,77 mg GAE/100mL).

Tabela 9 - Teor de antioxidantes e fenólicos do suco de acerola, das infusões, das kombuchas após primeira e após segunda fermentação

	Amostra	Antioxidantes (uM Trolox/L)	Fenólicos (mg GAE/100mL)
Infusões	Suco	34921,74±582,57	629,88±33,79
	Chá verde	7796,00 <sup>c</sup> ±269,01	54,77 <sup>bc</sup> ±1,04
	Erva cidreira	383,41 <sup>a</sup> ±62,70	5,78 <sup>a</sup> ±0,15
	Erva doce	237,92 <sup>a</sup> ±32,15	7,22 <sup>a</sup> ±0,41
Após primeira fermentação	T1	7450,83 <sup>c</sup> ±217,47	9,63 <sup>c</sup> ±2,59
	T2	1281,75 <sup>b</sup> ±14,38	26,75 <sup>ab</sup> ±2,79
	T3	751,60 <sup>ab</sup> ±43,42	28,91 <sup>ab</sup> ±0,83
Após segunda fermentação (saborização)	K1	14773,81 <sup>e</sup> ±348,24	326,44 <sup>e</sup> ±2,25
	K2	10622,46 <sup>d</sup> ±94,19	286,06 <sup>d</sup> ±15,62
	K3	10835,56 <sup>d</sup> ±100,97	315,20 <sup>de</sup> ±4,27

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** T1 – kombucha chá verde, T2 – kombucha erva cidreira, T3 – kombucha erva doce, K1 – kombucha chá verde saborizada, K2 – kombucha erva cidreira saborizada, K3 – kombucha erva doce saborizada. \*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Os benefícios relacionados ao consumo de chá verde são atribuídos à presença de antioxidantes, como os polifenóis que incluem vários compostos: flavonóis, flavandióis e ácidos fenólicos, constituindo até 30% da massa seca. Esses compostos presentes no chá estimulam processos imunológicos e de desintoxicação do organismo e as pesquisas associam a ingestão da bebida com a redução do risco de doenças do aparelho circulatório e cânceros (JAKUBCZYK *et al.*, 2020).

O tratamento T1 apresentou a maior concentração de antioxidantes (7450,83 uM Trolox/L), já para os tratamentos T2 e T3 essas concentrações não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ). Também não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os teores de antioxidantes

do chá verde e da sua respectiva kombucha após a primeira fermentação, mesmo havendo uma pequena redução após a primeira fermentação. Enquanto nos tratamentos T2 e T3, os teores de antioxidantes aumentaram consideravelmente quando comparados aos valores presentes nos seus respectivos chás. No entanto, pela análise de variância ( $p < 0,05$ ), o teor de antioxidantes presente na infusão de erva doce (237,92 uM Trolox/L) não diferiu da sua kombucha após a primeira fermentação (751,60 uM Trolox/L).

Cardoso *et al.* (2020) observaram capacidade antioxidante na kombucha a base de chá verde (8220 uM Trolox/L) semelhante ao valor obtido neste estudo, os autores também relataram que o chá verde e sua kombucha apresentaram semelhança no perfil antioxidante. Comportamento semelhante ao observado por Zou *et al.* (2021) ao avaliarem o perfil antioxidante de kombucha à base de chá *Zijuan*, infusão obtida a partir da folha da *Camellia sinensis* tradicional da China, que obtiveram atividade antioxidante inicial de 12000 uM Trolox/mL, mantendo-se inalterada após 14 dias de fermentação. Já Velicanski *et al.* (2014) relataram que a atividade antioxidante durante sete dias de fermentação de kombucha à base de erva cidreira foi significativamente ( $p < 0,05$ ) superior à do seu respectivo chá.

Após a segunda fermentação, o teor de antioxidantes foi consideravelmente superior, quando comparado aos das infusões e das suas respectivas kombuchas após a primeira fermentação, em todos os tratamentos. Os valores variaram entre 10622,46 uM Trolox/mL (K2) e 14773,81 uM Trolox/mL (K1), sendo que nos tratamentos K2 e K3 os valores não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ). Esse comportamento revela que a adição do suco de acerola contribuiu de forma positiva para o aumento da capacidade antioxidante nas bebidas.

A atividade antioxidante da kombucha está diretamente relacionada aos compostos fenólicos presentes na bebida (SHI *et al.*, 2023). Esses compostos podem ser provenientes tanto do substrato, como também da atividade metabólica dos microrganismos envolvidos na fermentação da bebida. Dessa forma, é esperado que a concentração de compostos bioativos aumente no final da fermentação. No entanto, também pode haver degradação e utilização de alguns polifenóis pelos microrganismos durante o processo de fermentação, resultando em uma diminuição da concentração final desses compostos bioativos na kombucha (LEONARSKI, *et al.*, 2022).

As concentrações de compostos fenólicos presente nas infusões e nas kombuchas depois da primeira e depois da segunda fermentação se comportaram de maneira semelhante ao teor de antioxidantes, comprovando que são parâmetros associados, uma vez que o aumento da concentração de compostos fenólicos contribui para o aumento da capacidade antioxidante.

O chá verde apresentou o maior teor de polifenóis (54,77 mg GAE/100mL) dentre as infusões e após a fermentação (T1) esse valor reduziu para 9,63 mg GAE/100mL. Porém, de acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores.

Vários autores observaram esse mesmo comportamento de redução de compostos fenólicos ao longo da fermentação de kombuchas à base de chá verde. Foram encontradas reduções: de 56 para 25mg GAE/100 mL (SHAHBAZI *et al.* 2018); de 16,04 para 11,68 mg GAE/100mL (KAYISOGLU & COSKUN, 2021); de 1300 mg para 925 mg GAE/100mL (ULUSOY & TAMER, 2019), dessa forma, as condições de fermentação podem contribuir para a degradação destes compostos.

Como já mencionada, essa redução no teor de fenólicos pode estar associada a ação dos microrganismos presentes no SCOBY que liberam enzimas no meio causando a degradação de alguns polifenóis durante a fermentação ou à utilização desses compostos pelo consórcio de bactérias e leveduras (AMARASINGHE *et al.*, 2018).

As infusões de cidreira e erva doce não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a concentração de polifenóis. Esses valores aumentaram nas suas respectivas kombuchas após a fermentação, no entanto esse aumento não foi significativo ( $p < 0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado por Velićanski *et al.* (2014), em que o teor de fenólicos na infusão de erva cidreira foi de 66,10 mg GAE/100mL para 85,03 mg GAE/100mL após 7 dias de fermentação a 28°C.

Ainda de acordo com Velićanski *et al.* (2014), o principal composto fenólico da kombucha de erva cidreira é o ácido rosmarínico, já a catequina e o ácido gálico são os principais compostos fenólicos da kombucha de chá verde.

O teor de fenólicos aumentou significativamente nos tratamentos após a segunda fermentação, mostrando que a adição do suco de acerola também influenciou de maneira positiva nesse parâmetro. Os maiores aumentos foram observados nos tratamentos K1 (326,44 mg GAE/100mL) e K2 (315,20 mg GAE/100mL).

Bortolomedi *et al.* (2022) defendem que vários fatores impactam no teor de compostos bioativos final da kombucha, tais como: o tipo de substrato, o tipo e a concentração de açúcar, o tempo e a temperatura de fermentação e o tipo de fermentador utilizado no processo.

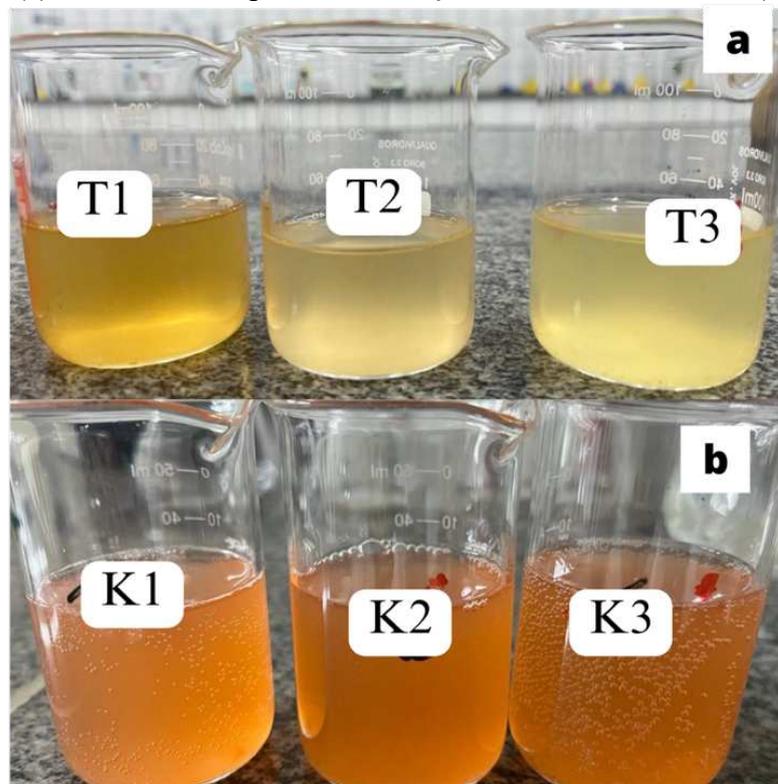
As propriedades benéficas atribuídas a kombucha estão relacionadas à presença desses compostos bioativos em sua composição, principalmente aos compostos fenólicos, que são conhecidos pela sua ação antioxidante. Esses compostos são capazes de sequestrar radicais

livres relacionados a várias doenças degenerativas, tais como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; AYED, *et al.*, 2017).

### 5.3 Análise de Cor

A coloração das kombuchas é apresentada na Figura 8. Foi possível verificar mudanças nos parâmetros de coloração entre os tratamentos após a primeira e após a segunda fermentação, já que, partiu-se de infusões com colorações diferentes e foi adicionado suco de acerola para a segunda fermentação. De forma que, as observações visuais (Figura 7) foram confirmadas pelos resultados cromáticos (Tabela 10).

Figura 7 - Kombuchas após a fermentação com as infusões (a) e kombuchas após a saborização com suco de acerola (b)



Fonte: Autora, 2023.

Com base na análise de variância, os efeitos do tipo de chá utilizado e da adição de suco de acerola para a segunda fermentação foram significativos ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (Tabela 10). Os valores de  $L^*$  após a primeira fermentação variaram entre 94,70 (T1) e 98,21 (T3). A adição de suco de acerola na segunda fermentação contribuiu para a redução dos valores de luminosidade em todos os tratamentos. Sendo o tratamento K3 o que

apresentou maior redução no valor de L\*. Isso mostra que não apenas a adição do suco contribuiu para esse comportamento, mas os produtos formados durante a segunda fermentação no chá de erva doce também contribuíram para uma redução da luminosidade.

Tabela 10 - Parâmetros de cor do suco de acerola e das kombuchas após primeira e após segunda fermentação

	Amostra	L*	a*	b*
	Suco	74,08±0,54	17,15±0,27	46,96±0,57
<b>Após primeira fermentação</b>	T1	94,70 <sup>d</sup> ±0,02	0,05 <sup>b</sup> ±0,02	17,53 <sup>c</sup> ±0,05
	T2	95,87 <sup>e</sup> ±0,01	0,37 <sup>c</sup> ±0,02	12,86 <sup>b</sup> ±0,02
	T3	98,21 <sup>f</sup> ±0,04	-0,87 <sup>a</sup> ±0,02	9,63 <sup>a</sup> ±0,21
<b>Após segunda fermentação (saborização)</b>	K1	85,75 <sup>b</sup> ±0,10	13,35 <sup>f</sup> ±0,05	28,81 <sup>c</sup> ±0,02
	K2	91,41 <sup>c</sup> ±0,19	8,37 <sup>d</sup> ±0,00	19,90 <sup>d</sup> ±0,01
	K3	85,26 <sup>a</sup> ±0,22	12,95 <sup>e</sup> ±0,06	30,86 <sup>f</sup> ±0,10

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** T1 – kombucha chá verde, T2 – kombucha erva cidreira, T3 – kombucha erva doce, K1 – kombucha chá verde saborizada, K2 – kombucha erva cidreira saborizada, K3 – kombucha erva doce saborizada. \*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Kayisoglu e Coskun (2021) perceberam uma redução de luminosidade em kombuchas a base de chá verde após 14 dias de fermentação, em que o valor de L\* reduziu de 80,57 para 80,22. Já para Zou *et al.* (2021) não foram observadas alterações visíveis de cor antes e depois de 14 dias de fermentação do chá verde e os valores de L\* foram semelhantes à amostra T1.

Ulusoy e Tamer (2019) também observaram redução na luminosidade da kombucha de chá verde (91,11) após a adição dos sucos de louro-cereja (66,48), framboesa vermelha (62,30), abrunho (71,76) e cenoura preta (33,22).

Após a primeira fermentação, todas as amostras apresentaram valores muito baixos de a\*, sendo a amostra T3 a única que obteve valor negativo (-0,87), sugerindo proximidade com a coloração verde. No entanto, o valor de a\* aumentou em todos os tratamentos após a segunda fermentação, indicando que as amostras incorporaram a coloração vermelha do suco de acerola e alcançaram valores de a\* próximos ao do suco (17,15). Já o tratamento à base de chá verde (T1) foi o que atingiu o maior valor de a\* (13,35) após a segunda fermentação.

Os valores de b\* variaram entre 9,63 (T3) e 17,53 (T1) após a primeira fermentação. Após a segunda fermentação, esses valores aumentaram em todos os tratamentos, indicando a

proximidade com a coloração amarela. Sendo a amostra a base de erva doce (T3) a que apresentou um aumento mais significativo em relação ao valor de  $b^*$ .

Zou *et al.* (2021) obtiveram valores negativos de  $a^*$ , próximo a -0,25, e valores de  $b^*$  em torno de 17,5, durante 14 dias de fermentação de kombucha à base de chá verde. Já Ulusoy e Tamer (2019) apresentaram valor inicial de  $a^*$  1,65 e após dois dias de fermentação 0,37, enquanto o valor de  $b^*$  variou de 40,40 para 17,03, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo para o chá verde após a primeira fermentação.

Dessa forma, a após a adição do suco de acerola para a segunda fermentação, as kombuchas apresentaram-se mais claras, com o menor valor de luminosidade, tanto por conta da incorporação do suco como por conta da formação de produtos da fermentação, afetando também os parâmetros de coloração  $a^*$  e  $b^*$ .

Em geral, a cor das bebidas costuma ser a primeira propriedade sensorial percebida pelos consumidores (Zou *et al.*, 2021). No caso da kombucha, a coloração é proveniente da ação de polifenóis contidos nos chás que podem sofrer alterações, em decorrência das mudanças de pH durante a fermentação, ou serem consumidos por microrganismos presentes na bebida, resultando na diminuição dos parâmetros de cor (BISHOP *et al.*, 2022; ULUSOY; TAMER, 2019).

#### **5.4 Perfil do processo de fermentação das kombuchas**

As três formulações de kombucha elaboradas a partir da fermentação do chá verde (T1); da erva cidreira (T2) e da erva doce (T3) foram monitoradas durante 10 dias. Durante esse tempo, diariamente avaliaram-se os parâmetros pH, sólidos solúveis totais (°Brix) e acidez total titulável. Além disso, diariamente, amostras das formulações eram coletadas em microtubos do tipo *Eppendorf* e congeladas para posterior realização das análises em HPLC. Ao final da fermentação, calculou-se o rendimento do SCOBY obtido após o processo (Figura 8).

A Tabela 11 apresenta o rendimento dos SCOBY's formados após a fermentação. A partir do segundo dia de fermentação, foi possível observar a formação de uma fina película no topo dos recipientes, que foi identificada como a celulose produzida pelas bactérias do ácido acético.

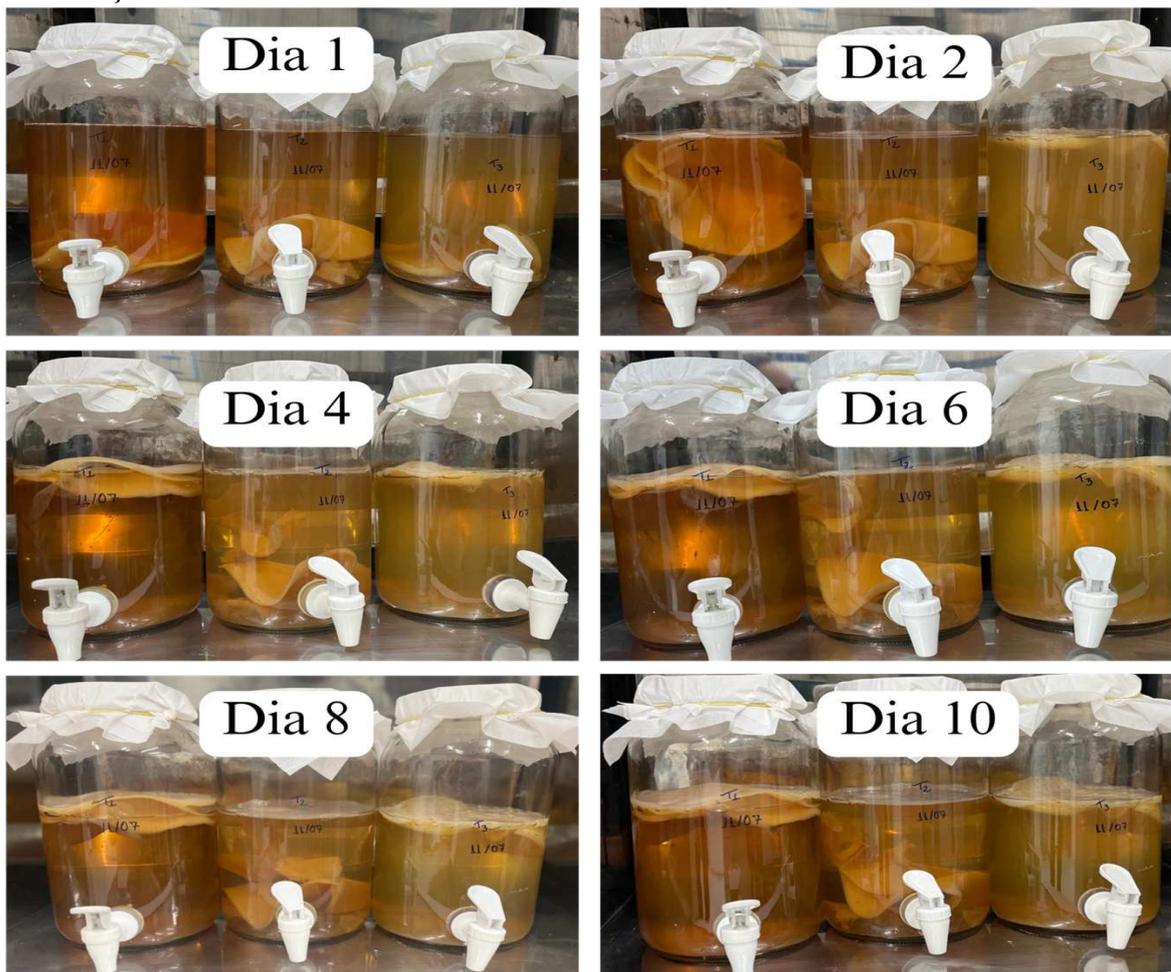
Tabela 11 - Rendimento do SCOBY das kombuchas produzidas após a fermentação

Amostras	Rendimento (%)
T1	121,29 <sup>c</sup> ± 0,40
T2	35,69 <sup>a</sup> ± 0,70
T3	72,33 <sup>b</sup> ± 0,80

Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** T1 – kombucha chá verde, T2 – kombucha erva cidreira, T3 – kombucha erva doce \*Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Figura 8 - Aspecto visual das diferentes formulações de kombucha ao longo do tempo de fermentação



Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** Da esquerda para a direita, as imagens representam as amostras T1, T2 e T3, respectivamente

Essa película, é resultante da ação da *Acetobacter xylinum*, bactéria acética que sintetiza a celulose no chá. A celulose obtida pela ação bacteriana é um polissacarídeo extracelular constituído por moléculas de glicose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, e sua

produção depende da disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio, etanol, ácidos orgânicos e condições de cultivo (AUNG & EUN, 2021).

O tratamento T1 foi o que mais se destacou em relação ao rendimento em celulose, possivelmente porque os microrganismos, se desenvolvem melhor no chá verde, meio ou por conta de uma maior concentração inicial de sacarose no chá. Aqui cabe ressaltar que mesmo partindo da mesma concentração de açúcar (10 % m/v) para o preparo de todas as infusões, o chá verde apresentou a maior concentração inicial de açúcar, que pode ter sido ocasionado por problemas de calibração da balança utilizada.

Apesar do tratamento T2 apresentar o menor rendimento em relação aos outros, todos os valores de rendimento apresentados neste estudo foram superiores ao de Wang *et al.* (2023), que obtiveram um valor próximo a 28 % ao fermentar chá preto.

A formação de um novo SCOBY na superfície do recipiente indica que o processo de fermentação foi bem-sucedido (AUNG & EUN, 2021), dessa forma, todas as ervas possibilitaram a formação desse material, indicando que os substratos utilizados são capazes de fornecer glicose suficiente para a síntese de celulose, sendo o chá verde e a erva doce os que possibilitam os maiores rendimentos.

A celulose bacteriana tem sido amplamente utilizada como um nano material ecologicamente amigável e viável nas indústrias cosmética e alimentícia devido à sua alta resistência mecânica, alta elasticidade, alta capacidade de retenção de água e estabilidade química e capacidade de biodegradação. Portanto, é importante determinar e otimizar o rendimento da película celulósica formada a partir da fermentação da kombucha (WANG *et al.*, 2023).

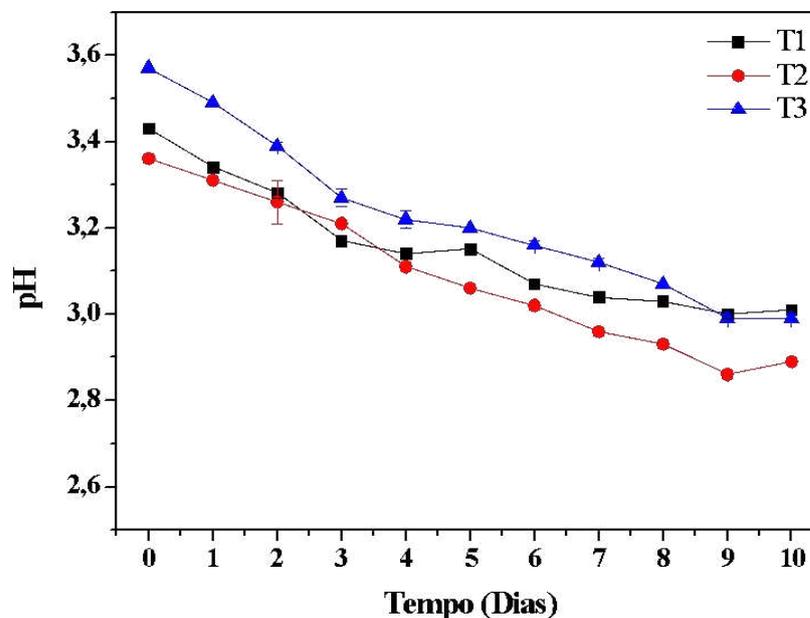
#### **5.4.1 Acompanhamento do pH**

A Figura 9 apresenta o acompanhamento do pH ao longo dos 10 dias de fermentação para cada uma das infusões estudadas. A partir da análise dos dados é possível perceber que todos os chás iniciaram o processo fermentativo com uma faixa de pH semelhante, entre 3,4 e 3,6. Ao longo dos dias esse parâmetro foi decrescendo até atingir uma certa estabilidade, nos dias nove e dez, apresentando pH final entre 2,9 e 3,0. Assim como observado por Wang *et al.* (2023), que avaliaram o comportamento da kombucha à base de chá preto e também observaram um decréscimo mais acentuado do pH nos três primeiros dias de fermentação.

Velićanski *et al.* (2014) observaram decréscimo do pH de kombucha de chá preto e de erva cidreira durante 7 dias de fermentação à 28 °C, com pH inicial de 7,05 e 6,94 e final de 4,70 e 4,60 para o chá preto e erva cidreira respectivamente, valores superiores aos reportados neste estudo. Já para Wang *et al.* (2023), o pH do chá preto diminuiu de  $3,94 \pm 0,04$  para  $3,16 \pm 0,01$ , durante a fermentação por 14 dias a 22 °C.

Tomar (2023) ao avaliar algumas propriedades de qualidade de kombuchas produzidas com diferentes frutas vermelhas, observou redução de pH de 3,30 para 2,75 em kombucha de chá preto; 3,49 para 2,53 em kombucha de uvas pretas; 3,95 para 2,76 em kombucha de amora preta e 3,33 para 2,58 em kombucha a base de rosa mosqueta. Todas foram fermentadas a 24 °C durante 21 dias.

Figura 9 - Acompanhamento do pH ao longo da fermentação



Fonte: Autora, 2023.

Suffys *et al.* (2023), assim como na presente pesquisa, também utilizaram uma temperatura de 30 °C como base para a fermentação e produziram kombucha a partir de uma mistura de infusão de chá preto e chá verde (1:1) adoçada com açúcar de beterraba branca, em que relataram pH inicial de 4,0 e pH final de 3,0, após 14 dias de fermentação. Os mesmos autores também ressaltam que a diminuição do pH foi mais rápida durante os 10 primeiros dias de fermentação, já entre os dias 10 e 14, essa diminuição foi mais lenta.

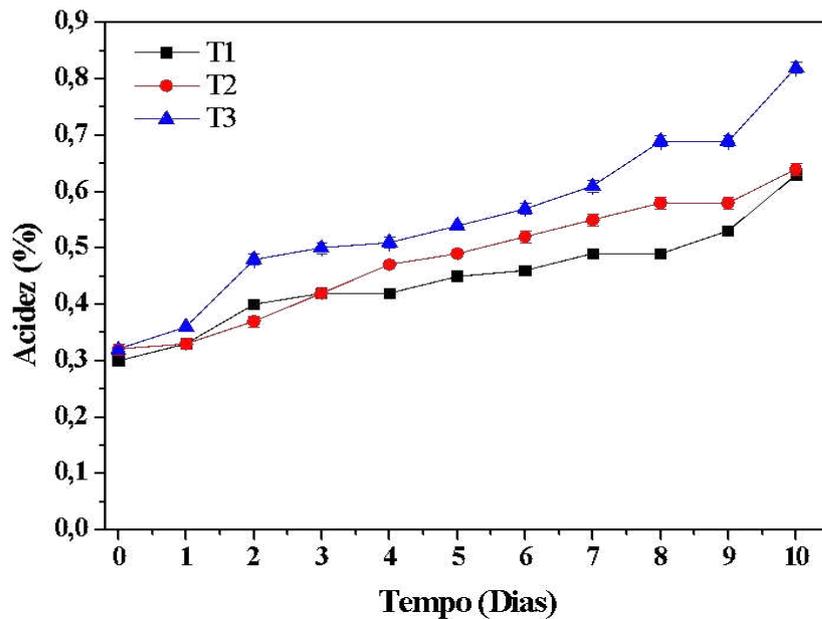
Importante destacar que o pH final das bebidas desenvolvidas neste estudo encontra-se dentro do valor estabelecido pela legislação, que define um limite entre 2,5 e 4,2 (BRASIL, 2019a). O baixo pH para este tipo de produto é um parâmetro considerado desejável, pois pode inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (KALLEL *et al.* 2012). No entanto, um pH muito baixo pode interferir na qualidade sensorial da bebida em decorrência da formação de ácidos orgânicos, principalmente do ácido acético, tornando o produto sensorialmente inaceitável (SHARIFUDIN *et al.*, 2021; LEAL *et al.*, 2018).

De acordo com Jayabalan *et al.* (2014), é possível controlar o andamento da fermentação a partir de medições de pH, uma vez que esse parâmetro pode ser utilizado para determinar o fim do processo, que é recomendado que encerre-se quando o pH atinge 2,5.

#### **5.4.2 Acompanhamento da acidez total titulável**

A Figura 10 representa os valores de acidez titulável das amostras ao longo do processo de fermentação. A partir dos resultados obtidos pode-se observar que o aumento do teor de acidez se deu de forma constante em todas as amostras durante os dez dias de fermentação. Estando os valores iniciais de acidez entre 0,30 e 0,32 % e os valores finais entre 0,63 e 0,82%, sendo o chá de erva doce o que apresentou os maiores valores. Essa diferença, deve-se, provavelmente, ao predomínio de diferentes espécies de bactérias acéticas e lácticas entre os diferentes tipos de infusão, e conseqüentemente uma variação na produção de ácidos orgânicos (CARDOSO *et al.*, 2020).

Figura 10 - Acompanhamento da acidez titulável ao longo da fermentação



Fonte: Autora, 2023.

Neffe-Skocińska *et al.* (2017) também observaram o aumento da concentração de ácido acético na kombucha fermentada a 30°C após dez dias de fermentação, onde os valores evoluíram de uma quantidade não detectável até 1,42%.

Para Wang *et al.* (2023), a acidez aumentou de forma constante ao longo da fermentação do chá preto, passando de 0,02% para 0,14% ao final de 14 dias de fermentação sob 22 °C. Já Cardoso *et al.* (2020), reportam valores de acidez superiores, sendo 0,36% para o chá verde e 0,32% para o chá preto, ao final de 10 dias de fermentação à 25 °C.

O aumento significativo da acidez titulável é um comportamento esperado, devido à produção de ácidos característicos do processo fermentativo e, principalmente, do metabolismo das bactérias acéticas (JAYABALAN *et al.*, 2014; SANTOS, 2016).

Um teor de acidez titulável entre 0,4 e 0,45 % tem sido relatado como indicativo do término do processo fermentativo (CVETKOVIC, 2008; VELICANSKI *et al.*, 2013), dessa forma, segundo essa orientação, a fermentação poderia ter sido encerrada no segundo dia para T1 e T3 e no terceiro dia para T2. Porém, como o objetivo dessa etapa foi avaliar o comportamento da fermentação, o processo durou mais tempo, resultando em uma bebida mais ácida.

A presença de ácidos orgânicos determina as características sensoriais e funcionais da kombucha, que dependem da quantidade e dos tipos de ácidos presentes em sua composição

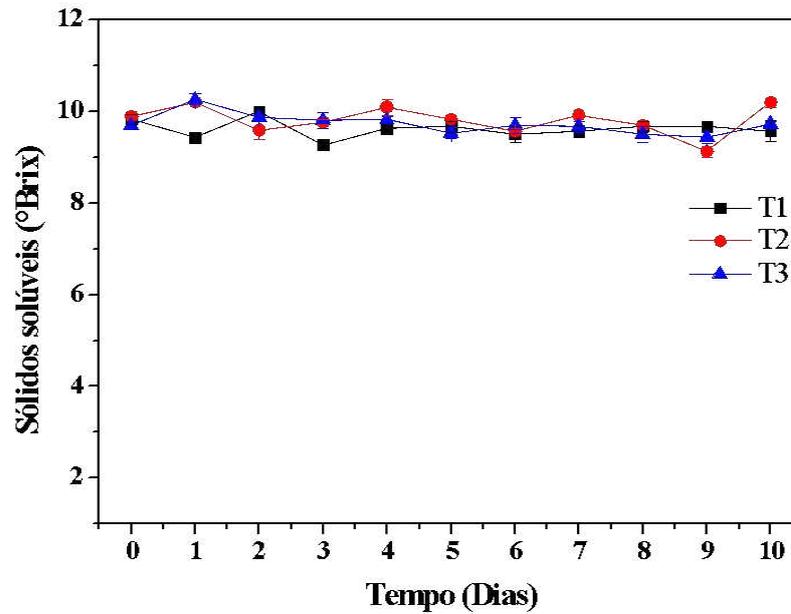
(CHANDRAKALA *et al.*, 2019). Os ácidos orgânicos formados durante o processo de fermentação diminuem o pH da bebida, sendo o ácido acético, um dos ácidos orgânicos mais importantes e que contribui para o aroma ácido e o sabor semelhante ao vinagre (ARIFF *et al.*, 2023). Além do ácido acético, a kombucha contém outros ácidos orgânicos como ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucônico, ácido glucurônico e ácido succínico (SKNEPNEK *et al.*, 2021).

#### **5.4.3 Acompanhamento dos sólidos solúveis totais**

A Figura 11 mostra os valores de sólidos solúveis (SS) no decorrer da fermentação dos diferentes tipos de infusão. Para ambos os tratamentos, o valor dos sólidos solúveis apresentou uma estabilidade ao longo dos dias de fermentação. Diferente do que aponta a literatura, uma vez que é esperado um decaimento lento dos sólidos solúveis, já que a sacarose e os outros tipos de açúcares presentes no meio são consumidos pelas bactérias e leveduras (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016). No entanto, esse comportamento pode ser explicado devido a formação de ácidos orgânicos e outros metabólitos dissolvidos no meio durante o processo de fermentação, que além dos açúcares, também são referidos como sólidos solúveis totais (SHARIFUDIN *et al.* 2021).

Wang *et al.* (2023) observaram diminuição constante dos sólidos solúveis (SS) de 4,87 para 3,13 °Brix ao longo da fermentação por 14 dias (22°C). Já Aung e Eun (2021), assim como neste estudo, obtiveram uma diminuição menos significativa dos SS para kombuchas de chá verde, de 6,30 para 6,20 °Brix. Enquanto para kombuchas de chá preto essa redução foi mais acentuada, de 5,37 para 4,17 °Brix ao final de 14 dias de fermentação a 20 °C. Os últimos autores destacam que níveis mais baixos de sólidos solúveis totais são condizentes com o nível mais alto de acidez nas amostras de kombucha avaliadas.

Figura 11 - Acompanhamento dos sólidos solúveis totais longo da fermentação



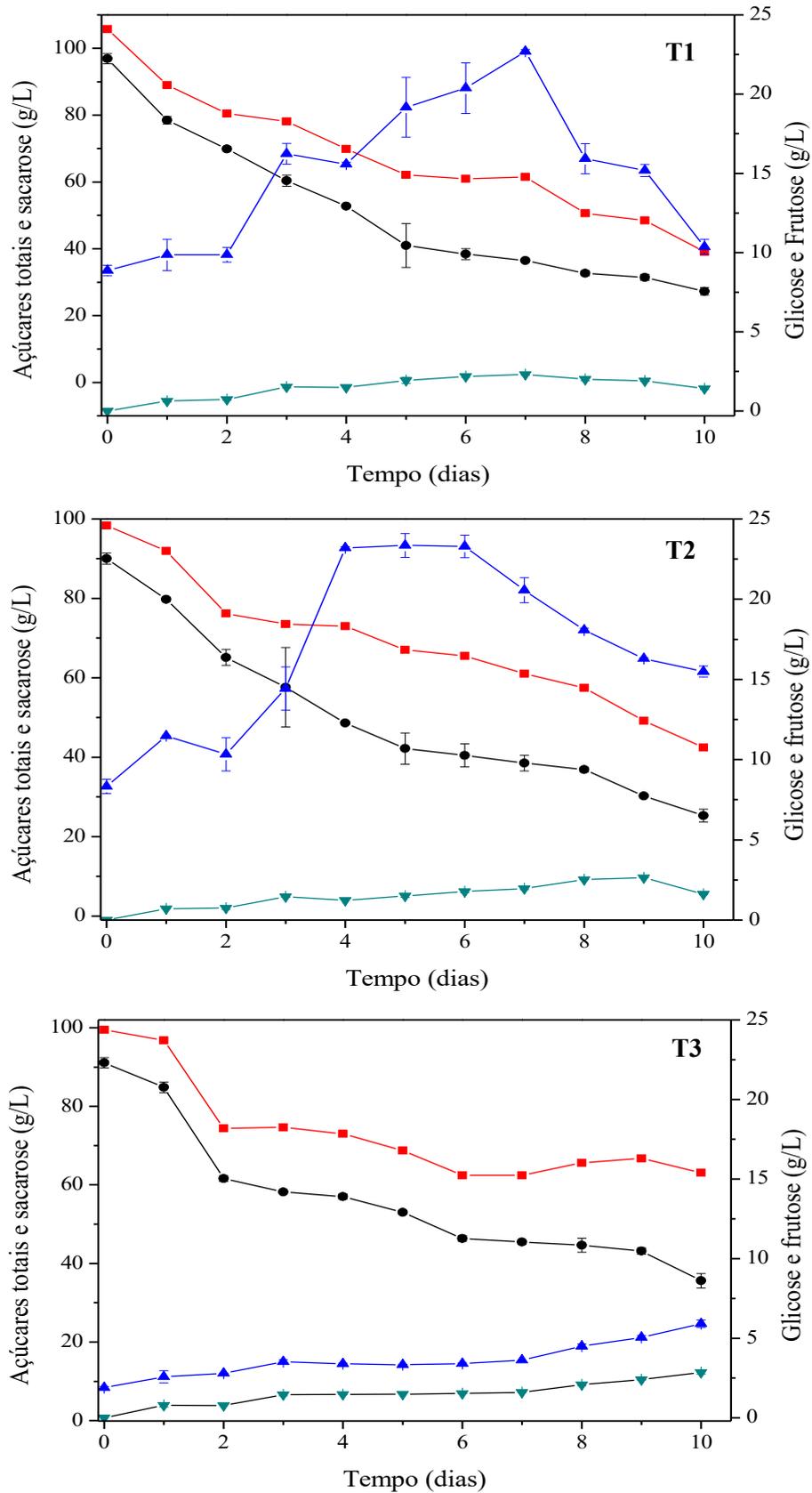
Fonte: Autora, 2023.

Para kombuchas preparadas a partir de chá verde, *oolong* e preto, Kaewkod *et al.*, (2019), observaram que os sólidos solúveis totais diminuiriam significativamente de 10 °Brix para 6 °Brix aos 15 dias de fermentação sob temperatura ambiente.

#### 5.4.4 Acompanhamento do conteúdo de açúcares

A Figura 12 representa o consumo de sacarose e as concentrações de glicose e frutose formadas durante o processo de fermentação da kombucha nas três amostras avaliadas (T1, T2 e T3).

Figura 12 - Acompanhamento do conteúdo de açúcares ao longo da fermentação



Fonte: Autora, 2023.

Legenda: (■) Açúcares totais, (●) sacarose, (▲) glicose e (▼) frutose

As amostras começaram a fermentação com uma concentração de sacarose entre 90 e 97 g/L, sendo T1 a amostra que apresentou a maior concentração. O perfil de consumo da sacarose é semelhante em todas as amostras, sendo a velocidade de consumo maior nos seis primeiros dias de fermentação.

De acordo com ARIFF *et al.* (2023), a sacarose é comumente usada como fonte tradicional de carbono na fermentação da kombucha, e no início da fermentação, é hidrolisada em glicose e frutose pela ação das invertases provenientes das leveduras. Dessa forma, à medida que a fermentação avança, a concentração de sacarose diminui. Esse comportamento foi observado em todas as amostras neste trabalho, e as concentrações finais de sacarose variaram entre 35,6 e 25,32 g/L; sendo a amostra T2 a que apresentou menor concentração.

A concentração de açúcares totais foi superior a concentração de sacarose em todos os tratamentos, demonstrando que além da sacarose proveniente do açúcar adicionado, outros açúcares também estavam presentes no meio, provavelmente, remanescentes da kombucha já fermentada que foi adicionada no início do processo, com o objetivo de diminuir o pH do meio e facilitar a ação dos microrganismos.

As concentrações de glicose e frutose variaram conforme os tratamentos. No T1, as concentrações de glicose e frutose seguiram o mesmo padrão, aumentaram até o sétimo dia e em seguida foram diminuindo até o final da fermentação. Já no tratamento T2, observou-se um aumento da concentração de glicose até o quinto dia, seguido de diminuição, enquanto para a frutose, esse aumento foi até o nono dia e diminuição apenas no último dia de fermentação. Para o tratamento T3, as concentrações de glicose e frutose seguiram o mesmo padrão, ambas aumentaram até o final da fermentação. Em todos os tratamentos os valores de glicose foram superiores quando comparados aos de frutose, porém, nos tratamentos T1 e T2, as concentrações de glicose foram consideravelmente superiores.

Os valores iniciais de glicose variaram entre 8,33 e 8,87 g/L para os tratamentos, enquanto os valores finais foram de 10,37 a 24,64 g/L. Já a concentração de frutose foi zero no início de todos os tratamentos e variou entre 1,42 e 2,85 g/L no último dia de fermentação.

Neffe-Skocińska *et al.* (2017), também observaram que em todas as temperaturas de fermentação estudadas (20 °C, 25 °C e 30 °C), as concentrações de glicose foram superiores às de frutose, o que sugere uma preferência pela frutose como fonte de carbono pelas células de levedura. Os autores observaram um consumo mais rápido de sacarose e uma maior concentração de glicose e frutose a 25 °C. Já na fermentação a 30 °C, foi observado um consumo de sacarose menos intenso.

Tran *et al.* (2022), avaliaram diferentes tipos de culturas em chás preto e verde para a produção de kombucha, sob temperatura ambiente, após 7 e 12 dias de fermentação e a concentração inicial média de sacarose entre os tratamentos foi de  $58,3 \pm 0,9$  g/L. Já a concentração final não variou significativamente entre 7 e 12 dias de fermentação, variando entre 39,1 e 56,1 g/L nos diferentes tratamentos. Os autores destacam que a sacarose não foi totalmente hidrolisada e que as concentrações de monossacarídeos não excederam 5 g/L, sugerindo um consumo progressivo de monossacarídeos obtidos a partir da hidrólise da sacarose.

Suffys *et al.* (2023) observaram que a concentração de sacarose diminuiu de forma muito significativa ao longo do tempo de 57,4 g/L para 25,2 g/L, após 14 dias de fermentação. Enquanto a concentração de glicose foi de 0,40 g/L para 14,0 g/L e a da frutose de 0,93 g/L para 2,03 g/L, aumentando de forma muito significativa no decorrer do processo.

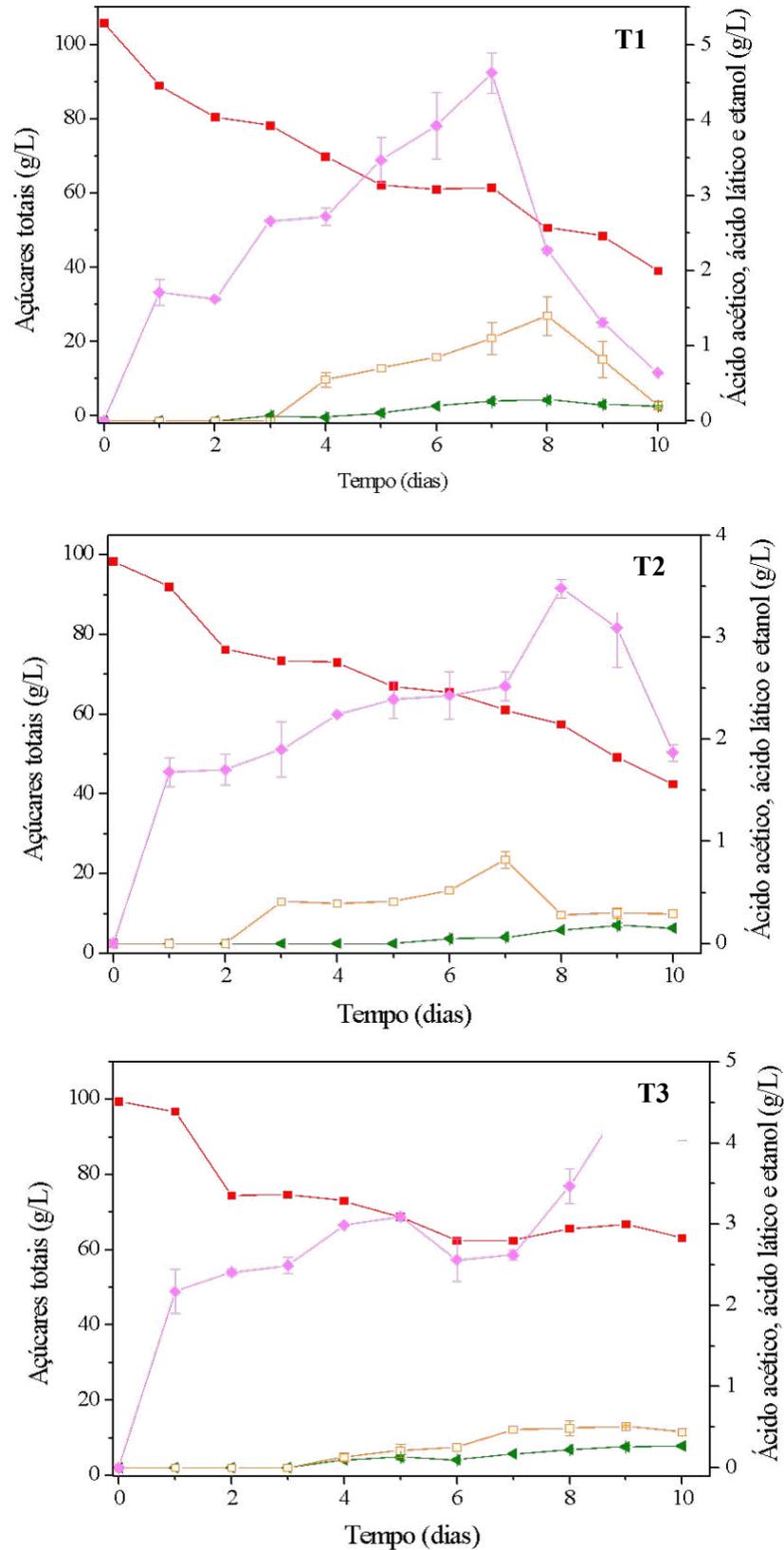
A hidrólise da sacarose, explica as alterações nas concentrações iniciais e finais dos teores de açúcares nos diferentes tratamentos, uma vez que as leveduras convertem frutose e glicose simultaneamente em etanol e CO<sub>2</sub>, porém, com uma utilização rápida da frutose em comparação a glicose. No entanto, as bactérias ácido acéticas utilizam a glicose como fonte preferencial de carbono, resultando na síntese de celulose e de ácidos orgânicos (NEFFE-SKOCIŃSKA *et al.*, 2017; DURÃES *et al.*, 2021; SUFFYS *et al.*, 2023).

Dessa forma, a kombucha produzida a partir da infusão de erva cidreira demonstrou ser um meio mais adequado para o crescimento dos microrganismos envolvidos no processo fermentativo, uma vez que o processo de hidrólise da sacarose foi mais eficiente, bem como, apresentou uma maior produção de açúcares redutores (glicose e frutose), seguido de posterior consumo. Já o processo fermentativo da infusão de erva doce demonstrou menos eficiência em relação aos outros, ao analisar o comportamento de consumo e produção de açúcares.

#### **5.4.5 Acompanhamento do conteúdo de etanol e de ácidos orgânicos**

A Figura 13 representa o consumo de açúcares totais e as concentrações de ácido acético, ácido lático e etanol formados durante o processo de fermentação da kombucha nas três amostras avaliadas (T1, T2 e T3).

Figura 13 - Acompanhamento do conteúdo de etanol e ácidos orgânicos ao longo da fermentação



Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** (■) Açúcares totais, (◆) ácido acético, (▲) ácido láctico e (□) etanol

A produção de etanol foi mais significativa nas amostras T1 e T2, atingindo as maiores concentrações no sexto (1,4 g/L) e sétimo (0,82 g/L) dias de fermentação, nas kombuchas a base de chá verde e cidreira respectivamente. Após esse tempo, as concentrações de etanol foram diminuindo e chegaram a 0,21 g/L em T1 e 0,30 g/L em T2. Já em T3, o teor de etanol foi aumentando até o nono dia, 0,51 g/L, e encerrou com concentração final de 0,44 g/L. Dessa forma, apesar de as kombuchas a base de chá verde e de cidreira terem apresentado valores superiores em etanol no decorrer do processo fermentativo, a kombucha a base de erva doce foi a que apresentou o maior teor alcoólico ao final do processo, demonstrando a alternância de atividade dos microrganismos ao longo do tempo e de acordo com o substrato.

No entanto, segundo a legislação brasileira, todas as kombuchas produzidas neste trabalho podem ser consideradas como não alcoólicas, uma vez que a bebida é classificada como alcoólica quando contém entre 0,6 % e 8,0 % de álcool, e não alcoólica quando contém menos de 0,5 % de álcool (BRASIL, 2019a).

O aumento da concentração de etanol nas primeiras fases de fermentação seguido de uma posterior redução é esperado durante a produção de kombucha. Isso porque, o início do processo coincide com o aumento populacional da concentração de leveduras no meio, que quebram a sacarose e produzem etanol e com a progressão da fermentação, as bactérias acéticas consomem esse etanol e produzem ácido acético (MAY *et al.*, 2019).

Para Chakravorty *et al.* (2016), a concentração de etanol aumentou inicialmente com o tempo e atingiu o valor máximo no sétimo dia de fermentação (0,28 g/L) seguido por uma diminuição para cerca de 0,073 g/L, após 21 dias de fermentação. Já para Suffys *et al.* (2023), o teor de etanol aumentou de forma altamente significativa durante o processo de fermentação, partindo de 1,3 g/L na fase inicial até 7,4 g/L na fase final (14 dias).

Dentre os ácidos quantificados, o ácido acético mostrou-se o principal em todas as amostras. A partir do primeiro dia de fermentação, já foi possível observar um aumento constante na produção desse ácido nos tratamentos. Em T1, a concentração máxima de ácido acético foi atingida no sétimo dia (4,63 g/L), já em T2 e T3, nos dias 8 (3,48 g/L) e 9 (4,55 g/L) da fermentação, respectivamente. As concentrações finais de ácido acético variaram entre 0,64 e 4,18 g/L, sendo a kombucha a base de infusão de erva doce a que apresentou o teor de ácido acético mais elevado.

Em contrapartida, diversos estudos relatam o aumento lento, porém, constante da concentração de ácido acético durante a fermentação da kombucha, em virtude do aumento da concentração de bactérias acéticas no meio (NEFFE-SKOCIŃSKA *et al.*, 2017). Para Suffys *et*

*al.* (2023), a concentração de ácido acético partiu de 0,63 g/L no estágio inicial para atingir 8,42 g/L após 14 dias de fermentação. Já para Chakravorty *et al.* (2016) a concentração de ácido acético aumentou de 0,65 g/L para 16,57 g/L após 21 dias de fermentação.

Segundo Kallel *et al.* (2012), o ácido acético é o principal ácido orgânico presente na kombucha, e sua concentração pode variar entre 5 e 10 g/L na bebida, dependendo dos substratos e da atividade das bactérias acéticas presentes no meio.

Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar que a partir de determinado ponto da fermentação, microrganismos que são capazes de degradar o ácido acético foram beneficiados, uma vez que a concentração deste ácido foi diminuindo após atingir um valor máximo. No entanto, como essa diminuição não foi correspondente com a diminuição do teor de acidez total, outros tipos de ácidos foram sintetizados pelos microrganismos.

A concentração de ácido láctico foi aumentando de maneira inexpressiva em todos os tratamentos ao longo do tempo. Nas amostras T1 e T2, os valores aumentaram até os dias 8 (0,28 g/L) e 9 (0,18 g/L) da fermentação, respectivamente, seguidos de uma ligeira queda até o final do processo. As concentrações finais de ácido láctico variaram entre 0,15 e 0,27 g/L. A amostra T3 foi a que apresentou a maior concentração, e os teores de ácido láctico aumentaram de forma linear a partir do sexto dia de fermentação.

Quanto à presença de bactérias lácticas na kombucha, normalmente, esses microrganismos não são encontrados ou estão presentes em quantidades muito baixas. No entanto, as bactérias lácticas tendem a ser detectadas em quantidades maiores na fermentação comercial da kombucha (BISHOP *et al.*, 2022).

Cardoso *et al.* (2020) retrata que o ácido láctico foi o ácido encontrado em menor concentração, com teor de 0,015 e 0,02 g/L para kombucha de chá verde e chá preto, respectivamente. Enquanto Suffys *et al.* (2023), obtiveram valores ligeiramente superiores, variando de 0,05 a 0,06 g/L para as etapas inicial e final da fermentação, respectivamente. Já Neffe-skocińska *et al.* (2017) não detectaram a presença de ácido láctico em suas amostras de kombucha ao longo da fermentação. Fato que pode ser explicado pela diversidade de microrganismos envolvidos no processo, pelas condições da fermentação e pelas diferenças de substratos empregados.

No geral, as infusões à base de chá verde, erva cidreira e erva doce consistiram em substratos viáveis para a fermentação e obtenção das kombuchas, já que foi possível observar o consumo dos açúcares do meio pelos microrganismos e formação de produtos (ácidos orgânicos, celulose, etanol). No entanto, na kombucha à base de erva cidreira, o processo de

quebra da sacarose e formação dos monossacarídeos, bem como posterior consumo desses substratos foi mais eficiente, porém, na kombucha à base de erva doce, a concentração dos produtos formados (ácido acético, ácido lático e etanol) no final do processo foi superior aos outros tratamentos.

### 5.5 Análise de estabilidade

As kombuchas saborizadas com suco de acerola foram avaliadas quanto a estabilidade ao armazenamento refrigerado por 90 dias. Para isso, no tempo inicial e de 30 em 30 dias durante a estocagem refrigerada, eram retiradas amostras de cada um dos tratamentos e determinados os valores de pH, sólidos solúveis totais e acidez total titulável.

De acordo com a análise de variância, o modelo foi significativo para as variáveis acidez total titulável, sólidos solúveis e pH (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise de variância para acidez total titulável, sólidos solúveis e pH

Fonte	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	Pr > F
<b>Acidez total</b>					
Modelo	5,000	0,994	0,199	357,922	<0,0001*
Erro	30,000	0,017	0,001		
Total corrigido	35,000	1,011			
<b>Sólidos solúveis</b>					
Modelo	5,000	107,098	21,420	67,008	<0,0001*
Erro	30,000	9,590	0,320		
Total corrigido	35,000	116,687			
<b>pH</b>					
Modelo	5,000	0,100	0,020	40,086	<0,0001*
Erro	30,000	0,015	0,000		
Total corrigido	35,000	0,115			

Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** \* Indica significância ( $p \leq 0,05$ ).

A Tabela 13 indica que as variáveis tempo, tratamento e interação entre elas foram significativas e explicaram 98% ( $R^2$ ) das variações nos teores da acidez total titulável e 92% ( $R^2$ ) das variações dos valores de sólidos solúveis. Já para o pH, apenas as variáveis tempo e tratamento foram significativas e explicaram 82% ( $R^2$ ) das variações. No entanto, a variável tratamento foi a que apresentou a maior influência, em todos os parâmetros analisados, revelando que as kombuchas não sofreram grandes alterações de acidez, sólidos solúveis e pH ao longo do tempo de armazenamento refrigerado.

Tabela 13 - Análise da soma dos quadrados para acidez total, sólidos solúveis e pH

Fonte	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	Pr > F
<b>Acidez total</b>					
Tempo	1,000	0,003	0,003	5,624	0,024 *
Tratamento	2,000	0,980	0,490	881,679	<0,0001*
Tempo*Tratamento	2,000	0,011	0,006	10,315	0,000 *
<b>Sólidos solúveis</b>					
Tempo	1,000	5,843	5,843	18,278	0,001*
Tratamento	2,000	17,234	8,617	26,956	<0,0001*
Tempo*Tratamento	2,000	4,760	2,380	7,445	0,002*
<b>pH</b>					
Tempo	1,000	0,015	0,015	31,091	<0,0001*
Tratamento	2,000	0,083	0,041	83,032	<0,0001*
Tempo*Tratamento	2,000	0,002	0,001	1,637	0,212

Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** \* indica significância ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores das médias dos tratamentos para acidez total titulável, sólidos solúveis e pH. encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Médias de acidez total, sólidos solúveis e pH para os tratamentos

Tratamento	Acidez total titulável (% ácido acético)	Sólidos Solúveis (°Brix)	pH
<b>K1</b>	1,47 <sup>c</sup> ± 0,02	10,77 <sup>b</sup> ± 0,05	3,05 <sup>a</sup> ± 0,07
<b>K2</b>	1,09 <sup>a</sup> ± 0,01	10,42 <sup>b</sup> ± 0,03	3,08 <sup>b</sup> ± 0,04
<b>K3</b>	1,17 <sup>b</sup> ± 0,05	7,13 <sup>a</sup> ± 0,03	3,16 <sup>c</sup> ± 0,05

Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** **K1** – kombucha chá verde saborizada. **K2** – kombucha erva cidreira saborizada, **K3** – kombucha erva doce saborizada. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Ambos os tratamentos diferiram ( $p \leq 0,05$ ) em relação às médias do teor de acidez e do pH. Enquanto os tratamentos K1 e K2 não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) nas médias do teor de sólidos solúveis. Como mostra a Tabela 15, a amostra K3, utilizada para a análise de estabilidade, partiu de um teor de sólidos solúveis totais menor, quando comparada as outras amostras, o que pode explicar essa diferença significativa.

Quanto à interação entre tempo e tratamento, que foi significativa apenas para teor de acidez e sólidos solúveis (Tabela 15), houve diferença entre os tratamentos em todos os dias avaliados, tanto no valor de acidez quanto no teor de sólidos solúveis.

Tabela 15 - Médias da acidez total e sólidos solúveis ao longo do tempo

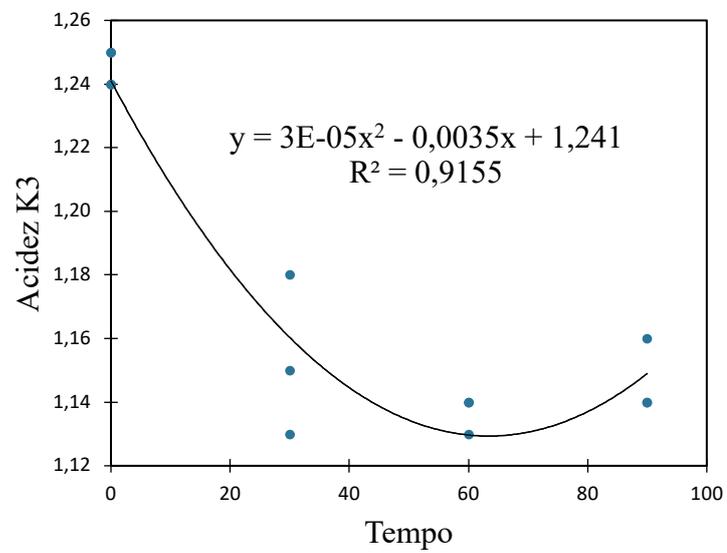
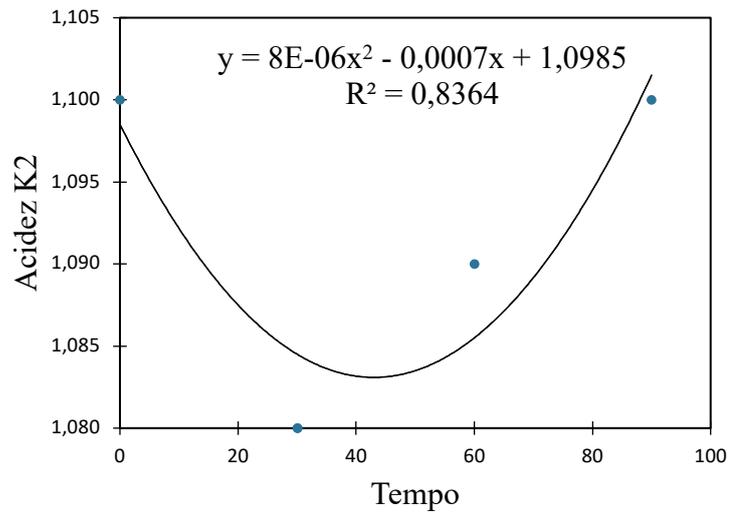
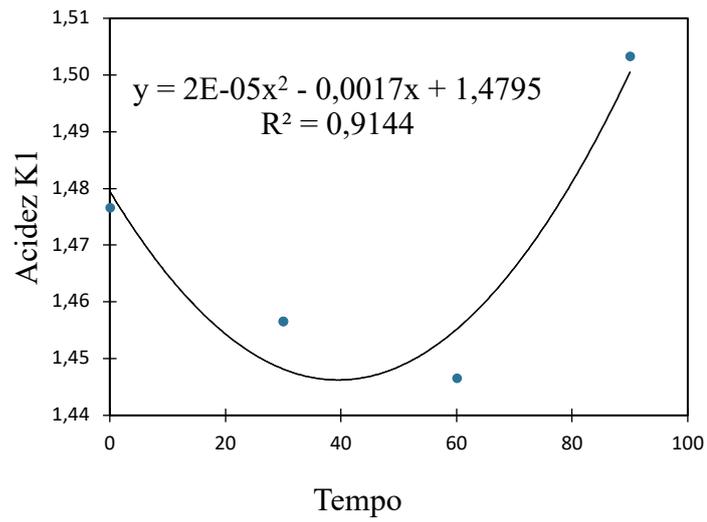
Parâmetro	Tratamento	Tempo			
		0 dias	30 dias	60 dias	90 dias
<b>Acidez total titulável (% ácido acético)</b>	K1	1,48 <sup>c</sup> ± 0,01	1,47 <sup>c</sup> ± 0,03	1,45 <sup>c</sup> ± 0,01	1,50 <sup>c</sup> ± 0,60
	K2	1,10 <sup>a</sup> ± 0,00	1,08 <sup>a</sup> ± 0,04	1,09 <sup>a</sup> ± 0,12	1,10 <sup>a</sup> ± 0,15
	K3	1,24 <sup>b</sup> ± 0,00	1,15 <sup>b</sup> ± 0,01	1,14 <sup>b</sup> ± 0,10	1,15 <sup>b</sup> ± 0,10
<b>Sólidos solúveis (°Brix)</b>	K1	10,80 <sup>b</sup> ± 0,01	10,80 <sup>c</sup> ± 0,01	10,80 <sup>c</sup> ± 0,04	10,67 <sup>b</sup> ± 0,50
	K2	11,40 <sup>c</sup> ± 0,05	9,90 <sup>b</sup> ± 0,03	9,67 <sup>b</sup> ± 0,10	10,70 <sup>b</sup> ± 0,00
	K3	8,90 <sup>a</sup> ± 0,00	6,50 <sup>a</sup> ± 0,00	7,13 <sup>a</sup> ± 0,10	6,00 <sup>a</sup> ± 0,10

Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** **K1** – kombucha chá verde saborizada. **K2** – kombucha erva cidreira saborizada, **K3** – kombucha erva doce saborizada. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 14 contém os gráficos com os modelos de regressão não linear para as variações de acidez dos tratamentos ao longo do tempo de armazenamento.

Figura 14 - Variação no teor de acidez total em relação ao tempo de armazenamento



Fonte: Autora, 2023.

Nos tratamentos K1 e K2 a acidez diminuiu no 30º dia e foi aumentando até os 90 dias de armazenamento. Já no tratamento K3, houve redução da acidez no 30º dia, seguida de estabilidade. No entanto, a variação entre os valores de acidez, em todos os tratamentos, ao longo dos dias, foi muito pequena, levando-se a concluir que o armazenamento refrigerado conferiu estabilidade às kombuchas.

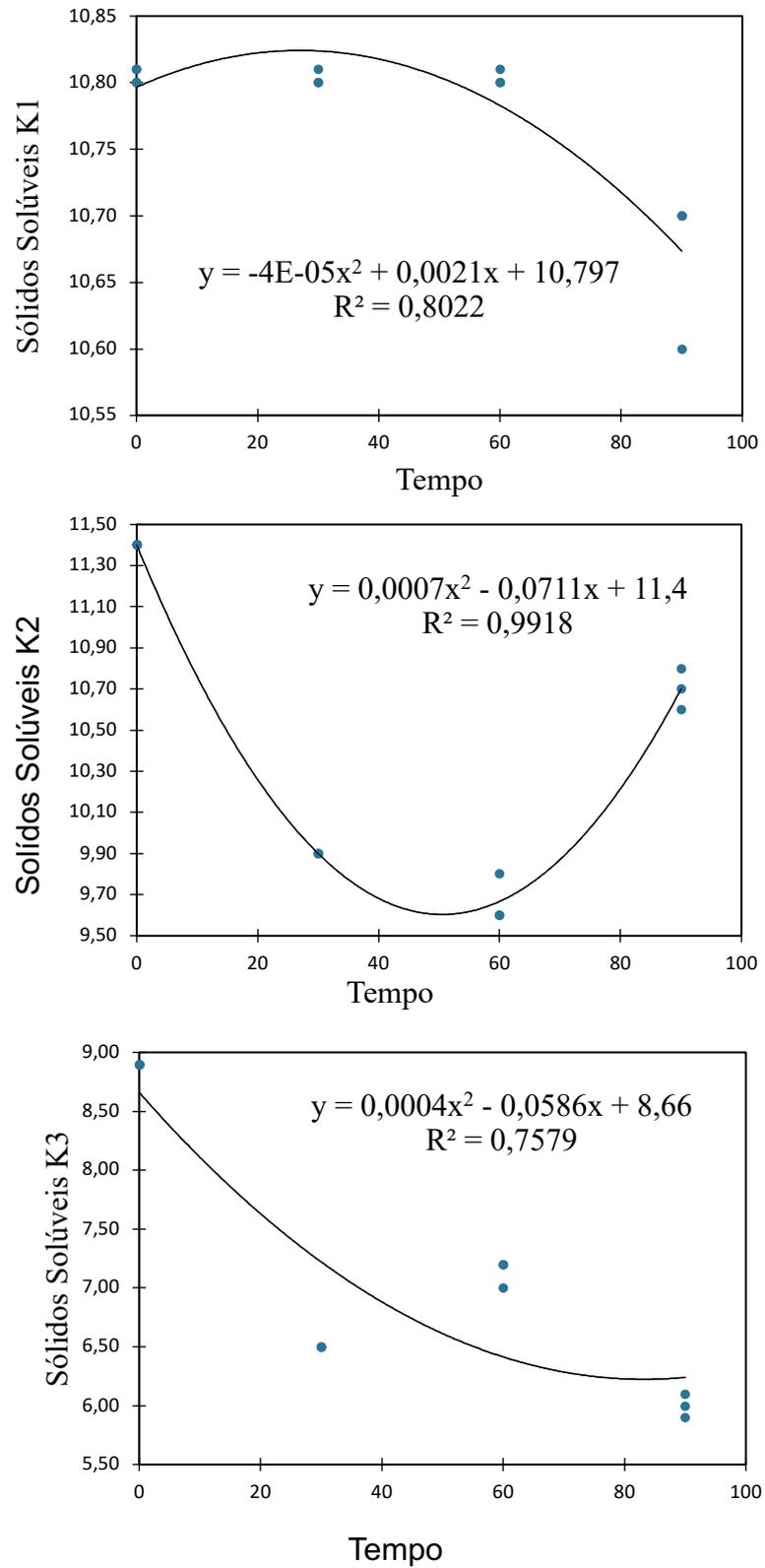
Yıkmiş e Tuğgüm (2019) avaliaram as propriedades físico-químicas de kombuchas de manjerição roxo ao longo de 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C) e observaram um pequeno aumento nos teores de acidez total das amostras no decorrer do tempo de armazenamento.

Segundo Malbaša *et al.* (2008), durante a vida de prateleira da kombucha, as bactérias acéticas e lácticas utilizam açúcares residuais e etanol como substrato e continuam produzindo ácidos orgânicos.

Quanto às variações no teor de sólidos solúveis totais ao longo do tempo (Figura 15), na amostra K1 os valores permaneceram estáveis até o 60º dia de armazenamento (10,80 °Brix) e ao final dos 90 dias ocorreu uma redução (10,67 °Brix). Já em K2, o teor de sólidos solúveis diminuiu até o 60º dia, seguido de um ligeiro aumento até o tempo final de estocagem refrigerada. Enquanto em K3, os valores diminuíram de 8,90 °Brix, no primeiro dia, para 6,00 °Brix, no tempo final.

Yıkmiş e Tuğgüm (2019) também observaram uma redução no teor de sólidos solúveis em todos os tratamentos avaliados durante 30 dias de armazenamento e atribuíram esse comportamento à continuação do efeito simbiótico das bactérias e leveduras na kombucha, ainda que refrigerada.

Figura 15 - Variação no teor de sólidos solúveis em relação ao tempo de armazenamento



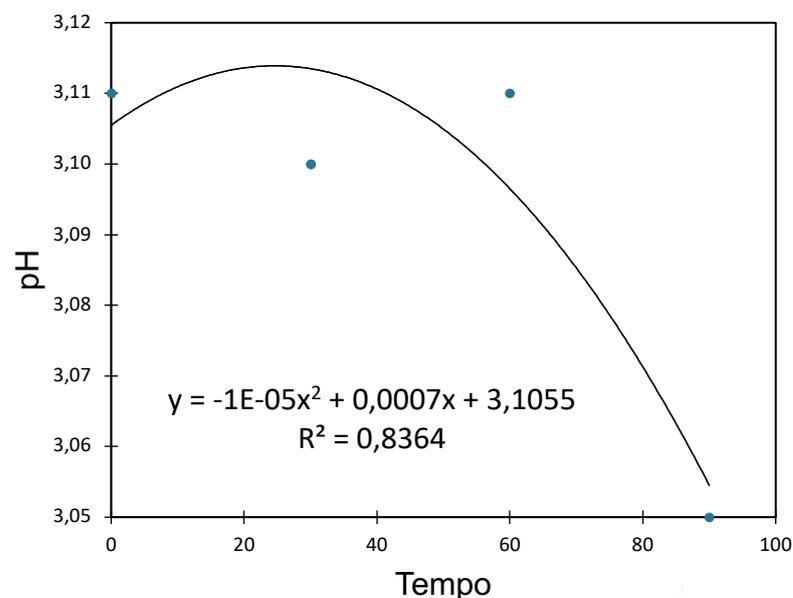
Fonte: Autora, 2023.

A Figura 16 contém o modelo de regressão não linear para a média do pH dos tratamentos em relação ao tempo de estocagem. Como a interação entre tempo e tratamento não foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) para explicar as variações de pH, as variações entre tempo e pH de todos os tratamentos foram explicadas em um único gráfico. Dessa forma, foi possível verificar que houve uma diminuição nos valores de pH ao longo dos dias de armazenamento, variando de 3,11 no primeiro dia para 3,05 no final dos 90 dias. Refletindo também em uma diminuição pouco significativa, assim como no comportamento da variação da acidez ao longo dos dias.

Chakravorty *et al.* (2016) também observaram que o valor do pH diminuiu com o tempo de armazenamento e afirmaram que essa diminuição foi causada pelos ácidos orgânicos formados como resultado da fermentação das kombuchas.

O armazenamento refrigerado, bem como, a redução de oxigênio na embalagem, diminuem a atividade metabólica dos microrganismos presentes na kombucha, resultando na estabilização das transformações bioquímicas na bebida durante a estocagem sob baixa temperatura. Ademais, os efeitos tamponantes causados pelos ácidos orgânicos e o esgotamento dos substratos podem inibir o crescimento dos microrganismos (NORONHA, 2021). Dessa forma, a kombucha consiste em uma bebida estável ao armazenamento refrigerado, preservando suas características sensoriais e segurança microbiológica.

Figura 16 - Variação do pH em relação ao tempo de armazenamento



Fonte: Autora, 2023.

## 5.6 Análises microbiológicas

A Tabela 16 contém a composição microbiológica das kombuchas elaboradas.

Tabela 16 - Resultados das análises microbiológicas

Microrganismos	Tratamentos		
	K1	K2	K3
<b>Coliformes à 35 °C (NMP/mL)</b>	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Leveduras (UFC/mL)</b>	2,75 x 10 <sup>4</sup> b	4,50 x 10 <sup>3</sup> a	1,89 x 10 <sup>4</sup> b
<b>Bactérias acéticas (UFC/mL)</b>	1,76 x 10 <sup>5</sup> b	7,55 x 10 <sup>3</sup> a	7,60 x 10 <sup>4</sup> a
<b>Bactérias lácticas (UFC/mL)</b>	2,54 x 10 <sup>4</sup> c	4,05 x 10 <sup>3</sup> a	1,62 x 10 <sup>4</sup> b

Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** **K1** – kombucha chá verde saborizada. **K2** – kombucha erva cidreira saborizada, **K3** – kombucha erva doce saborizada. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve crescimento de coliformes (30°C e 45°C) em nenhum dos tratamentos estudados, indicando que as bebidas são seguras do ponto de vista microbiológico.

Além disso, as próprias características da kombucha, como o pH abaixo de 4,5 e as altas contagens de bactérias acéticas e leveduras, são fatores de proteção que impedem o crescimento de microrganismos patogênicos na bebida (SANTOS *et al.*, 2017).

Os tratamentos K1 e K3 não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) para a contagem de leveduras. O tratamento K2 foi o que apresentou a menor contagem, 4,50 x 10<sup>3</sup> UFC/mL, revelando que, possivelmente, as infusões à base de chá verde e de erva doce consistiram em meios mais favoráveis para o desenvolvimento das leveduras da kombucha.

Kaewkod *et al.* (2019) produziram kombuchas (sob temperatura ambiente por 15 dias) a partir de diferentes infusões e obtiveram os seguintes resultados para a contagem de leveduras: chá verde (4,37 x 10<sup>7</sup> UFC/mL), chá *oolong* (5,50 x 10<sup>7</sup> UFC/mL) e chá preto (6,02 x 10<sup>7</sup> UFC/mL). Já Zhao *et al.*, (2018), também após 15 dias de fermentação (28 °C), obtiveram uma contagem de leveduras de 6,01 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Resultados superiores aos obtidos no presente estudo.

Na fermentação da kombucha, as leveduras são responsáveis pela quebra da sacarose e pela produção de etanol e atuam em cooperação com as bactérias acéticas. Após a

conclusão da fermentação a contagem de leveduras pode superar a contagem de bactérias dentro da bebida (BISPHO *et al.*, 2022).

A kombucha a base de chá verde apresentou a maior contagem de bactérias acéticas ( $1,76 \times 10^5$  UFC/mL). Já as amostras K2 e K3 apresentaram valores inferiores e não diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ). Demonstrando que no chá verde esses microrganismos encontraram melhores condições para o crescimento, o que é esperado, já que esse é o meio tradicional para fermentação da kombucha.

Kaewkod *et al.* (2019) observaram um aumento na contagem de bactérias acéticas na kombucha de chá verde, em que variou de  $5,25 \times 10^5$  UFC/mL no tempo inicial, a  $6,31 \times 10^7$  UFC/mL após 15 dias de fermentação. Enquanto para Cardoso *et al.* (2020) a contagem de bactérias acéticas para as kombuchas de chá verde e chá preto não apresentaram diferença ( $p \leq 0,05$ ) e variaram entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL

As bactérias do ácido acético são as bactérias que mais se sobressaem na fermentação da kombucha. Existem mais de dezessete gêneros de bactérias ácido acéticas encontrados na bebida, dentre eles têm-se: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. Sendo a espécie *Komagataeibacter*, especificamente a cepa *Komagataeibacter xylinus*, a mais significativa, devido à sua capacidade de produzir celulose. Além disso, essa cepa tem capacidade de acumular até 10 a 20% de ácido acético no meio, enquanto as espécies de *Acetobacter* só conseguem acumular no máximo 8% (MAY *et al.*, 2019).

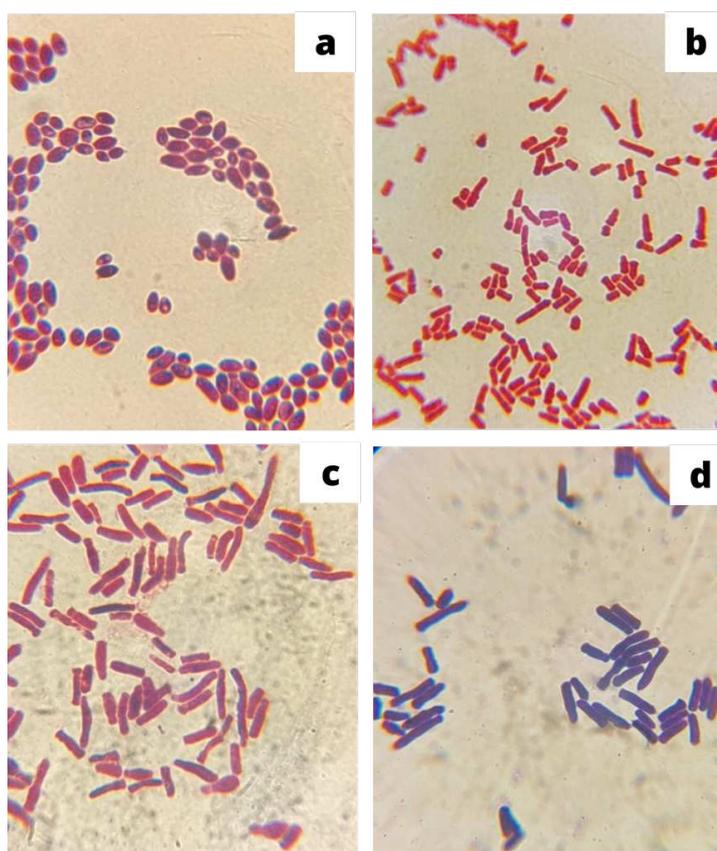
A contagem de bactérias lácticas foi significativamente diferente entre as amostras, ( $p \leq 0,05$ ), variando entre  $4,05 \times 10^3$  (K2) e  $2,54 \times 10^4$  (K1) UFC/mL. Mais uma vez o chá verde apresentou o melhor desempenho como meio para o crescimento da microbiota da kombucha.

Cardoso *et al.* (2020) encontraram contagens de bactérias lácticas superiores aos obtidos neste estudo, variando de  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL nas kombuchas de chá preto e chá verde respectivamente. No entanto, apesar das altas contagens, o teor de ácido láctico presente nas kombuchas foi insignificante, provavelmente pela predominância de bactérias ácido-lácticas heterofermentativa que resultaria em uma menor produção de ácido láctico. O que pode ter ocorrido também neste trabalho, uma vez que as concentrações de ácido láctico nas kombuchas obtidas foram baixas.

A composição microbiológica da kombucha pode variar de cultura para cultura, localização geográfica, clima, espécies locais de leveduras e bactérias e condições de fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2014).

A Figura 17 apresenta algumas imagens de lâminas obtidas no microscópio após o crescimento dos microrganismos presentes nas kombuchas nos meios de cultura específicos, seguido de coloração de Gram. Vale salientar que as colônias obtidas em cada um dos meios apresentavam as mesmas características morfológicas para os diferentes tratamentos. Levando a uma conclusão de que a microbiota que se desenvolveu nos três tipos de infusões era a mesma, variando apenas as concentrações de leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas em cada bebida ao final do processo.

Figura 17 - Imagens obtidas no microscópio das lâminas com alguns microrganismos presentes nas kombuchas



Fonte: Autora, 2023.

**Legenda:** a) Leveduras (crescimento no meio PDA); b) Bactérias acéticas (crescimento no meio GYCA); c e d) Bactérias lácticas (crescimento no meio MRS)

Todas as colônias de leveduras que cresceram no meio PDA apresentaram aspecto circular, brilhante e liso, com coloração branca, bordas regulares, tamanho pequeno e uniforme. Com relação à morfologia, as células apresentaram o formato ovalado (Figura 17, a). Dentre as colônias que cresceram no meio GYCA, para seleção de bactérias acéticas, as mais

predominantes eram extremamente pequenas, com coloração creme, formato circular e halo de inibição. Essas bactérias se apresentaram como bacilos Gram-negativos (Figura 17, b). Já no meio MRS, houve crescimento de colônias tanto na superfície quanto no interior do meio de cultura, ambas as células eram Gram-positivas de formato bacilar, características comuns às bactérias lácticas (Figura 17, c e d). No entanto, seria necessário a aplicação de técnicas de sequenciamento de DNA para possibilitar a identificação dos microrganismos obtidos neste estudo.

## **5.7 Identificação do perfil do consumidor de kombucha**

### ***5.7.1 Caracterização socioeconômica***

Dos 385 participantes da pesquisa, 72,29 % afirmaram saber o que é kombucha. Destes, 67,15 % declararam já ter consumido a bebida (233 indivíduos), dessa forma, as respostas dadas por esses indivíduos foram utilizadas para traçar o perfil dos consumidores de kombucha.

De acordo com os dados coletados, o público consumidor de kombucha foi predominantemente feminino (60,09 %), com ensino superior completo (71,67 %) e solteiro (57,51 %). A maioria pertencente às faixas etárias de 20 a 29 anos e 30 a 39 anos, representando 37,3 % e 36,5 %, respectivamente. Quanto à renda, 25,32 % possuem de um a quatro salários-mínimos (até 4.179 reais), seguidos por 17,17 % com menos de um salário-mínimo (até 1.045 reais) e 14,59 % acima de 10 salários-mínimos (até 10.450 reais). Esses resultados corroboram com os encontrados por Walker (2021), que estudou o perfil dos consumidores de kombucha entre a população americana e observou que a frequência de consumo aumentava entre pessoas mais jovens e de maior escolaridade.

A Tabela 17, mostra que 21,0 % dos participantes da pesquisa são moradores da regional III, correspondendo, segundo a Prefeitura de Fortaleza (2019), aos bairros Aldeota, Meireles, Papicu, Varjota, De Lourdes, Vicente Pinzon, Cais do Porto, Mucuripe, São João do Tauape, Dionísio Torres e Joaquim Távora. Sendo Aldeota e Meireles os bairros com maior número de indivíduos que consumiam kombucha.

Tabela 17 - Participantes que já consumiram kombucha divididos em suas respectivas regiões

<b>Região (n=233)</b>	<b>Número (porcentagem do total de respostas)</b>
REGIÃO METROPOLITANA	13 (5,6%)
SER I	12 (5,2%)
SER II	10 (4,3%)
SER III	49 (21,0%)
SER IV	29 (12,4%)
SÉRIE IX	3 (1,3%)
SER V	40 (17,2%)
SER VI	14 (6,0%)
SER VII	13 (5,6%)
SER VIII	30 (12,9)
SER X	2 (0,9%)
SER XI	13 (5,6%)
SER XII	5 (2,1%)

Fonte: Autora, 2023.

Segundo o Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE), os bairros Meireles e Aldeota ocuparam o primeiro e quinto lugar, respectivamente, entre os bairros mais ricos de Fortaleza em 2010. Esses bairros apresentam índice de desenvolvimento humano (IDH) próximo a 1 (Meireles 0,953 e Aldeota 0,867), valor que representa a nota máxima de IDH, uma vez que a escala vai de 0 a 1.

O preço elevado da bebida pode justificar o fato da maioria dos consumidores pertencerem aos bairros Aldeota e Meireles, já que 300 mL de kombucha pode chegar a custar até R\$ 20,00 (MESQUITA, 2023).

No entanto, a kombucha também pode ser obtida de forma caseira, e os ingredientes (água mineral, açúcar, chá verde ou preto e a colônia inicial) são considerados baratos e acessíveis à população (SANTOS, 2016; YAMAZAKI, 2015). Isso torna a produção artesanal acessível e possivelmente justifica o consumo da população com renda abaixo de um e entre um e quatro salários-mínimos. Walker (2021) concluiu que a renda não é um fator que determina o consumo de kombucha.

### 5.7.2 Características do Consumo

Dentre o grupo de entrevistados que afirmou já ter consumido kombucha, 76,82 % consumiam ocasionalmente, enquanto apenas 7,73 % dos participantes consumiam diariamente.

Do total de 347 participantes que sabem o que é kombucha, 32,85 % afirmam nunca ter consumido a bebida. Dentre os motivos que justificaram o não consumo, os mais frequentes, respectivamente, foram: dificuldade de acesso à bebida pronta, por não saber prepará-la, por não obter informações suficientes para motivar o consumo, porque não tenho acesso a colônia inicializadora, porque acho difícil fazer a bebida em casa, porque acho difícil manter a colônia viva, preço e não gostar da erva tradicionalmente usada.

Com esse levantamento, podemos perceber que a maioria das respostas está ligada às poucas informações divulgadas sobre o que é kombucha, como produzi-la e como conservá-la. Segundo Batista *et al.* (2022), a falta de informação sobre o produto, sua qualidade e segurança podem condicionar a compra e o consumo. Assim, é necessário a difusão de mais conhecimento nessa área, bem como a definição de padrões que garantam a qualidade, eficácia e padrões de segurança da kombucha.

Quanto à erva tradicionalmente utilizada e à possibilidade de substituição desse ingrediente, as ervas mais citadas foram: capim santo (44,09 %), hortelã (43,23 %), camomila (27,09 %), erva-doce (22,48 %), erva-cidreira (20,75 %), erva-mate (20,17 %) e boldo (4,32 %). Enquanto 16,14 % revelaram que não fariam nenhuma alteração.

Em relação à origem da bebida, 76,08 % dos entrevistados afirmaram preferir a kombucha caseira em detrimento da kombucha industrial.

Sobre a embalagem, os participantes preferiram o acondicionamento em garrafas de vidro transparente (80,40 %). O vidro, portanto, é considerado, dentre os materiais utilizados para embalagens de alimentos, o material mais inerte, possibilitando a preservação integral de suas características, além disso, é totalmente reciclável (CABRAL, 1984). Sendo esse tipo de embalagem o mais recomendado para a kombucha, uma vez que impede as interações dos ácidos orgânicos que são formados durante a fermentação com a embalagem (WATAWANA, 2015).

Ainda sobre as embalagens, as informações mais desejáveis nos rótulos da kombucha foram: a lista de ingredientes, prazo de validade, método de armazenamento, data de fabricação, origem do produto, teor de açúcar, benefícios à saúde, teor alcoólico e nome da

marca. Já para Walker (2021), as informações do rótulo mais decisivas para a compra de kombucha foram: “produto orgânico certificado pelo USDA”, “não possui transgênicos”, “sem glúten”, “tradicionalmente fermentado”, “não pasteurizado” e “pasteurizado”.

### 5.7.3 Relevância dos atributos para decisão de compra

A Tabela 18 apresenta o número de vezes que cada atributo foi citado como mais importante (*Countbest*) e menos importante (*Countworst*) pelos entrevistados. Com base nesses dados, foi calculado o nível de relevância, que corresponde ao número de vezes que cada atributo foi citado como o mais importante (*Countbest*), subtraindo o número de vezes que esse mesmo atributo foi citado como menos importante (*Countworst*). Em seguida, foi calculado a pontuação padrão, que corresponde ao nível de relevância dividido pelo número de vezes que cada atributo aparece na combinação (5 vezes), multiplicado pelo número de questionários respondidos (347 respostas). Os dados foram obtidos conforme metodologia descrita por Diniz *et al.* (2017).

Tabela 18 - *Countbest* e *Countworst*

<b>Atributos</b>	<b><i>Countbest</i></b>	<b><i>Countworst</i></b>
Alto teor de antioxidantes	206	100
Sabor	439	76
Probiótico	534	38
Benefícios para a saúde	698	35
Marca	24	1180
Boa opção para substituir o refrigerante	52	1169
Preço	163	204
Não conter aditivo químico	440	100
Produto artesanal	143	150
Aumentar imunidade	420	58

Fonte: Autora, 2023.

Para avaliar o grau de relevância dos atributos em relação à influência na decisão de compra do kombucha, foi utilizada a classificação de Espartel (1999). Assim, os atributos foram divididos em importantes (atributos que não são determinantes para a compra do produto, mas são levados em consideração no momento da escolha) e determinantes (atributos que influenciam na decisão de compra do produto). Por meio da escala *Best-Worst*, verificou-se que 4 (quatro) dos 10 (dez) atributos avaliados apresentaram nível de relevância negativo (Tabela 19). Portanto, a kombucha ser artesanal, o preço, a possibilidade de substituição do refrigerante e a marca não foram considerados atributos decisivos para a compra e foram classificados como atributos importantes. Diniz *et al.* (2017) também indicaram preço e marca apenas como atributos importantes e não decisivos para a compra de vinhos da escala *Best-Worst*.

Tabela 19 - Atributos da kombucha classificados como importantes

Atributos	Nível de Relevância	Pontuação Padrão
Produto artesanal	-7	-0,0040
Preço	-41	-0,0236
Boa opção para substituir o refrigerante	-1117	-0,6438
Marca	-1156	-0,6663

Fonte: Autora, 2023.

Os atributos: benefícios à saúde, probiótico, sabor, aumentar a imunidade, não conter aditivos químicos e alto teor de antioxidantes foram considerados determinantes para a compra da kombucha, pois apresentaram nível de relevância positiva, conforme a Tabela 20. Portanto, a decisão de compra da kombucha está associada, principalmente, aos possíveis benefícios à saúde que o consumo da bebida pode trazer. Walker (2021) também observou que “benefícios à saúde” é o principal fator que motiva o consumo de kombucha para os americanos, seguido de “sabor” e “conteúdo probiótico”, com porcentagens de 30,2%; 15,7% e 13,8%, respectivamente, das respostas entre os indivíduos pesquisados.

Tabela 20 - Atributos da kombucha classificados como determinantes

Atributos	Nível de Relevância	Pontuação Padrão
Benefícios à saúde	663	0,3821
Probiótico	496	0,2859
Sabor	363	0,2092
Aumentar imunidade	362	0,2086
Não conter aditivos químicos	340	0,1960
Elevado teor de antioxidantes	106	0,0611

Fonte: Autora, 2023.

Segundo Bruschi *et al.* (2018), a população vem buscando uma alimentação mais saudável e uma mudança no estilo de vida, refletindo no aumento da procura por alimentos funcionais, que estão se tornando cada vez mais populares no mercado. Dentre os alimentos funcionais, os probióticos, que são aqueles que contribuem para a saúde digestiva, estão entre os mais procurados.

Entretanto, embora a kombucha seja considerada um produto natural e saudável, muitas alegações nutricionais ainda não foram comprovadas cientificamente, sendo a maioria estudada apenas em modelos experimentais, havendo ausência de comprovação científica em modelos humanos. Assim, estudos mais robustos são necessários para comprovar os potenciais benefícios para a saúde da ingestão de kombucha (BATISTA, *et al.*, 2022; JAYABALAN *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, proíbe qualquer tipo de alegação de saúde no rótulo da bebida (BRASIL, 2019a).

## 5.8 Análise sensorial

### 5.8.1 Grupo de foco

Dos 14 voluntários que participaram das discussões, apenas um deles relatou que nunca havia experimentado a bebida, porém, todos sabiam o que era kombucha.

Os participantes descreveram suas impressões sobre a aparência, o aroma e o sabor de cada uma das amostras separadamente. Após as discussões, foram levantados os descritores

para cada um dos critérios analisados que melhor se aplicaram às bebidas, totalizando 35 termos, conforme representado na Tabela 21.

Ademais, os participantes também responderam questões sobre suas preferências em relação a forma de consumo, o tipo de embalagem, o preço e a motivação de consumo. Muitos deles mencionaram que as kombuchas avaliadas poderiam substituir bebidas como sucos de fruta e refrigerantes, acompanhar refeições e serem utilizadas como ingredientes na preparação de drinks alcoólicos ou não alcoólicos. Alguns, citaram ainda, que as kombuchas de acerola também poderiam ser uma opção de bebida para as pessoas que não consomem bebidas alcoólicas.

Tabela 21 - Lista de descritores das kombuchas analisadas pelos 14 participantes do grupo focal

<b>Aparência</b>	<b>Aroma</b>	<b>Sabor</b>
Presença de bolhas	Aroma de fermentado	Gosto doce
Presença de espuma	Aroma de acerola	Gosto salgado
Cor pêssego	Aroma frutado	Gosto ácido
Cor alaranjada	Aroma doce	Gosto amargo
Cor rosada	Aroma cítrico	Sabor frutado
Brilhante	Aroma de vinagre	Sabor de acerola
Translúcida (límpida)	Aroma de erva	Sabor de chá
Turva (material em suspensão)	Aroma de chá	Sabor de chá verde
Homogênea	Aroma de chá verde	Sabor de erva cidreira
	Aroma de erva cidreira	Sabor de erva doce
	Aroma de erva doce	Sabor de vinagre
	Aroma apodrecido	Sabor refrescante
		Sabor adstringente
		Sabor desagradável

Fonte: Autora, 2023.

Quanto ao tipo de embalagem, todos eles preferiram embalagens de vidro transparente, pois possibilitaria a visualização da coloração do produto, que eles julgaram atraente. Os dois grupos avaliaram que as embalagens de vidros poderiam comportar entre 300

e 750 mL de kombucha e com o preço variando entre R\$ 17 e R\$ 32. Por fim, os participantes mencionaram que consumiriam a bebida pelo seu sabor atrativo, por ser diferenciada e divertida, mas não desconsideraram os possíveis benefícios à saúde que são associados ao consumo.

De acordo com Kim e Adhikari (2020), que analisaram 201 produtos de 16 empresas norte americanas de kombucha, a maioria das kombuchas avaliadas eram armazenadas em garrafas de vidro, os tamanhos mais comuns das embalagens variaram entre 200 e 480 mL e o preço referente a 100 mL da bebida variou entre US\$ 0,22 a US\$ 2,07. Os autores também destacam uma tendência das empresas de substituição das embalagens de vidro pelas latas de alumínio, uma vez que apresentam vantagens como: facilidade no transporte, possibilidade de reciclagem e diminuição dos custos. Em todas as empresas avaliadas, o custo da bebida na embalagem de vidro era superior ao das latas

### ***5.8.2 Check all that apply (CATA)***

Dos 35 atributos avaliados, cinco foram mais significativos para caracterizar os tratamentos ao nível de 5%, sendo eles: presença de bolhas, presença de espuma, aroma de fermentado, aroma de acerola e aroma apodrecido. Sendo os termos aroma de fermentado e aroma de acerola mencionados em uma proporção acima de 80%, enquanto, presença de bolhas abaixo de 60% e presença de espuma e aroma apodrecido inferior a 40% (Tabela 22).

Apenas para o atributo “aroma de fermentado” não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Os tratamentos K2 e K3 diferiram entre si, tanto em relação à presença de bolhas quanto à presença de espuma, sendo o tratamento K3 o que apresentou o maior número de menções relacionadas a esses termos, 60 e 42%, respectivamente. Verificou-se, assim, que os provadores atribuíram uma maior carbonatação para kombucha elaborada a partir da infusão de erva doce, em detrimento às kombuchas de chá verde e cidreira. Quanto ao aroma de acerola, os tratamentos K1 e K2 diferiram significativamente, sendo esse aroma mais percebido no tratamento K1, uma vez que foi mencionado mais de 90% das vezes. O aroma apodrecido foi percebido de forma diferente nos tratamentos K1 e K3, sendo K3 o que apresentou a menor quantidade de menções para esse termo (35%).

Tabela 22 - Resultado do teste Q de Cochran para a lista dos atributos e frequência de escolha de cada atributo por tratamento

Atributos	p-valores	Tratamentos**		
		K1	K2	K3
<i>Presença de bolhas*</i>	0,005	0,570 <sup>ab</sup>	0,420 <sup>a</sup>	0,600 <sup>b</sup>
<i>Presença de espuma*</i>	0,000	0,310 <sup>ab</sup>	0,200 <sup>a</sup>	0,420 <sup>b</sup>
Cor pêssego	0,895	0,950 <sup>a</sup>	0,950 <sup>a</sup>	0,940 <sup>a</sup>
Cor alaranjada	0,529	0,950 <sup>a</sup>	0,940 <sup>a</sup>	0,970 <sup>a</sup>
Cor rosada	0,155	0,400 <sup>a</sup>	0,490 <sup>a</sup>	0,420 <sup>a</sup>
Brilhante	0,779	0,900 <sup>a</sup>	0,920 <sup>a</sup>	0,920 <sup>a</sup>
Translúcida (límpida)	0,568	0,840 <sup>a</sup>	0,870 <sup>a</sup>	0,880 <sup>a</sup>
Turva (presença de material em suspensão)	0,846	0,430 <sup>a</sup>	0,420 <sup>a</sup>	0,450 <sup>a</sup>
<i>Aroma de fermentado*</i>	0,021	0,930 <sup>a</sup>	0,840 <sup>a</sup>	0,840 <sup>a</sup>
<i>Aroma de acerola*</i>	0,002	0,930 <sup>b</sup>	0,800 <sup>a</sup>	0,870 <sup>ab</sup>
Aroma frutado	0,196	0,920 <sup>a</sup>	0,860 <sup>a</sup>	0,910 <sup>a</sup>
Aroma doce	0,428	0,810 <sup>a</sup>	0,770 <sup>a</sup>	0,830 <sup>a</sup>
Aroma cítrico	0,834	0,890 <sup>a</sup>	0,890 <sup>a</sup>	0,910 <sup>a</sup>
Aroma de vinagre	0,085	0,710 <sup>a</sup>	0,690 <sup>a</sup>	0,610 <sup>a</sup>
Aroma de erva	0,717	0,460 <sup>a</sup>	0,480 <sup>a</sup>	0,440 <sup>a</sup>
Aroma de chá	0,975	0,500 <sup>a</sup>	0,500 <sup>a</sup>	0,490 <sup>a</sup>
Aroma de chá verde	0,616	0,390 <sup>a</sup>	0,430 <sup>a</sup>	0,430 <sup>a</sup>
Aroma de erva cidreira	0,491	0,390 <sup>a</sup>	0,420 <sup>a</sup>	0,450 <sup>a</sup>
Aroma de erva doce	0,282	0,370 <sup>a</sup>	0,380 <sup>a</sup>	0,440 <sup>a</sup>
Aroma fermentado de pão	0,130	0,470 <sup>a</sup>	0,540 <sup>a</sup>	0,470 <sup>a</sup>
<i>Aroma apodrecido*</i>	0,024	0,490 <sup>b</sup>	0,450 <sup>ab</sup>	0,350 <sup>a</sup>
Gosto doce	0,229	0,880 <sup>a</sup>	0,920 <sup>a</sup>	0,860 <sup>a</sup>
Gosto salgado	0,717	0,390 <sup>a</sup>	0,360 <sup>a</sup>	0,390 <sup>a</sup>
Gosto ácido	0,895	0,940 <sup>a</sup>	0,950 <sup>a</sup>	0,950 <sup>a</sup>
Gosto amargo	0,272	0,560 <sup>a</sup>	0,570 <sup>a</sup>	0,630 <sup>a</sup>
Sabor frutado	0,161	0,930 <sup>a</sup>	0,880 <sup>a</sup>	0,870 <sup>a</sup>
Sabor de acerola	0,494	0,900 <sup>a</sup>	0,860 <sup>a</sup>	0,880 <sup>a</sup>
Sabor de chá	0,446	0,570 <sup>a</sup>	0,530 <sup>a</sup>	0,580 <sup>a</sup>
Sabor de chá verde	0,304	0,380 <sup>a</sup>	0,430 <sup>a</sup>	0,440 <sup>a</sup>
Sabor de erva cidreira	0,099	0,380 <sup>a</sup>	0,450 <sup>a</sup>	0,470 <sup>a</sup>
Sabor de erva doce	0,084	0,370 <sup>a</sup>	0,390 <sup>a</sup>	0,460 <sup>a</sup>
Sabor de vinagre	0,478	0,530 <sup>a</sup>	0,520 <sup>a</sup>	0,580 <sup>a</sup>
Sabor refrescante	0,091	0,890 <sup>a</sup>	0,890 <sup>a</sup>	0,830 <sup>a</sup>
Sabor adstringente	0,256	0,680 <sup>a</sup>	0,710 <sup>a</sup>	0,630 <sup>a</sup>
Sabor desagradável	0,066	0,410 <sup>a</sup>	0,540 <sup>a</sup>	0,500 <sup>a</sup>

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** **K1** – chá verde, **K2** – erva cidreira, **K3** – erva doce. \*p-valor menor que 0,05 indica significância para o atributo (teste Q de Cochran). \*\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de significância, pelo teste de McNemar (Bonferroni).

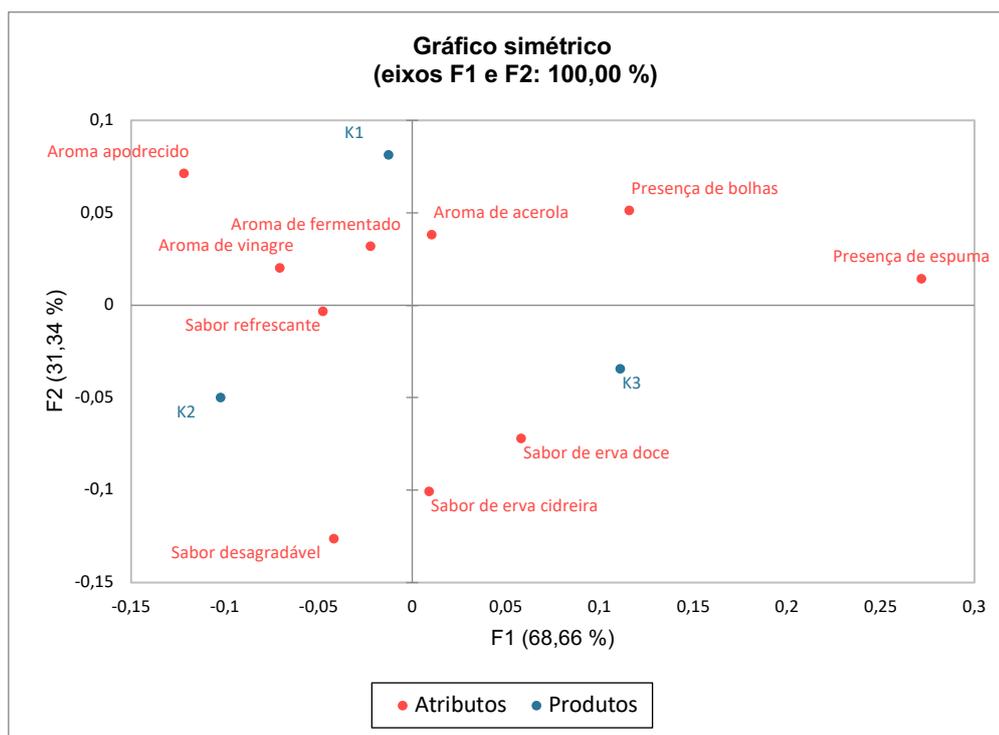
Os termos presença de bolhas, presença de espuma, aroma de fermentado, aroma de acerola, aroma de vinagre, aroma apodrecido, sabor de erva cidreira, sabor de erva doce, sabor refrescante e sabor desagradável foram considerados relevantes para a caracterização sensorial das bebidas, uma vez que apresentaram diferença significativa ao nível de 10% para teste Q de Cochran ( $p$ -valor  $< 0,1$ ), de acordo com a Tabela 23. De forma geral, os atributos: aroma de fermentado, aroma de acerola e sabor refrescante foram os que melhor descreveram as diferentes formulações de kombucha avaliadas, já os atributos que menos caracterizaram as bebidas foram: aroma de vinagre, aroma apodrecido e sabor desagradável.

Neffe-Skocińska *et al.* (2017) avaliaram as propriedades sensoriais de kombuchas obtidas a partir de um blend de chá verde e preto (30°C, 25°C, 20°C/ 10 dias de fermentação) e obtiveram: aroma ácido/azedo, aroma de limão, aroma de chá, sabor cítrico, sabor ácido e sabor de chá, enquanto Alderson *et al.* (2021) relataram: aspecto alaranjado, aroma azedo/ácido, aroma de tomate, aroma de fermentado e sabor e gosto menos doce para kombuchas de chá preto fermentadas durante 7 dias. Para kombuchas elaboradas a partir de chá verde e saborizadas com polpa de maracujá foram encontrados os seguintes descritores: cor amarela, sabor de maracujá, sabor ácido, formação de gás e gosto de álcool (SILVA, 2021). Já para kombuchas produzidas com suco clarificado de caju, os termos mais significativos foram: aroma de cajuína, aroma de caju, aroma doce, sedimentado, gosto doce, cor âmbar e translúcido (FREITAS, 2022).

Observou-se que a Análise dos Componentes Principais (ACP) para o teste CATA explicou adequadamente a variação dos dados para os diferentes tratamentos, visto que o somatório de ACP1 (68,66%) e ACP2 (31,34%) foi de 100%. A Figura 18 representa a análise dos componentes principais para as diferentes formulações de kombucha (produtos) e os termos que as caracterizam (atributos).

De acordo com a Figura 18, observa-se que as três amostras se encontram dispersas no gráfico, evidenciando a variedade das suas características. A amostra K1, elaborada a partir de chá verde, foi caracterizada pelos termos: aroma de fermentado e aroma de acerola. Esse comportamento demonstra que o perfil aromático do chá verde, utilizado como matéria prima, não contribuiu de forma significativa para o perfil aromático da kombucha, sendo mais relevante o aroma oriundo dos compostos voláteis orgânicos produzidos pelas leveduras durante a fermentação (BISHOP *et al.*, 2022), bem como o aroma do suco de acerola utilizado na segunda fermentação.

Figura 18 - Análise de Componentes Principais dos tratamentos pelo CATA



Fonte: Autora, 2023

A amostra K2, elaborada a partir da infusão de erva cidreira foi caracterizada pelo termo “sabor refrescante”, demonstrando que a utilização desse substrato mantém uma característica marcante da kombucha tradicional que é a sensação refrescante, termo utilizado na definição da bebida por diversos autores. Segundo Vitas *et al.* (2019), as características químicas e sensoriais classificam a kombucha no grupo das bebidas não alcoólicas refrescantes.

Já a amostra K3, elaborada com a infusão de erva doce foi caracterizada pelo termo “aroma de acerola”, assim, a utilização de erva doce como substrato na fermentação da kombucha, possibilitou uma maior prevalência do aroma do suco de acerola utilizado na segunda fermentação. Dessa forma, a fermentação da erva doce pode ter resultado na formação de uma menor quantidade de compostos voláteis típicos que caracterizam o aroma da kombucha. De acordo com Bishop *et al.* (2022), assim como em outras bebidas fermentadas, as matérias-primas (diferentes tipos de chá) e os microrganismos (leveduras e bactérias) têm um impacto significativo no perfil geral do aroma.

### 5.8.3 Rate all that apply (RATA)

A partir do teste RATA foi possível avaliar a intensidade dos termos listados (Tabela 23) no CATA.

Tabela 23 - Média da intensidade dos atributos sensoriais do teste RATA pela ANOVA com respectivos p-valor para cada um dos tratamentos

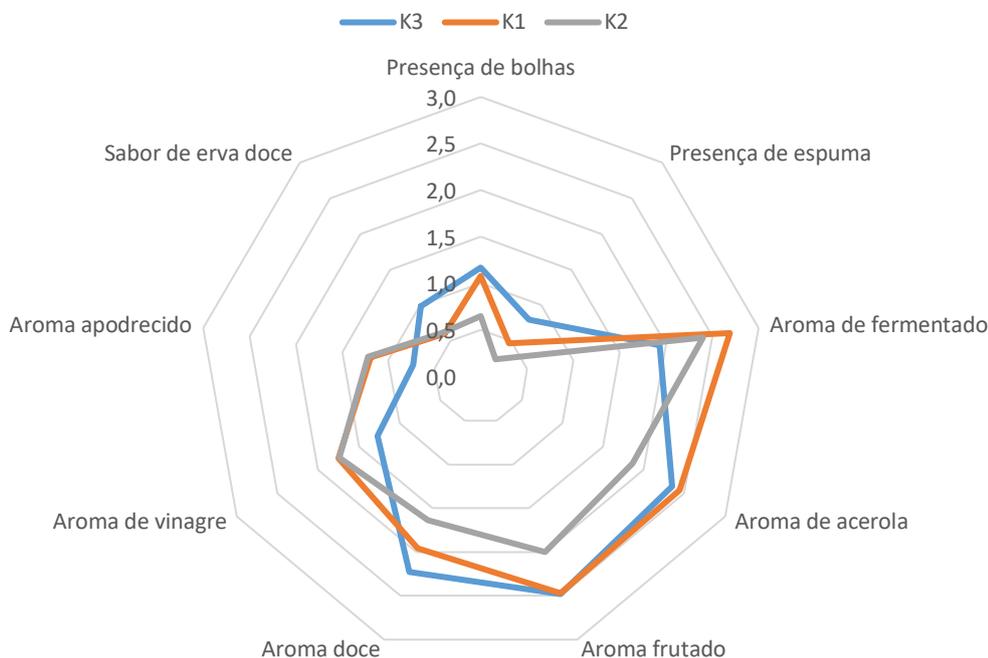
Atributos	Tratamentos**			Pr > Fc1
	K1	K2	K3	
<i>Presença de bolhas*</i>	1,1 <sup>a</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,2 <sup>a</sup>	0,004
<i>Presença de espuma*</i>	0,5 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>	0,8 <sup>a</sup>	<0,0001
Cor pêssego	3,0 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	3,1 <sup>a</sup>	0,714
Cor alaranjada	2,9 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	0,806
Cor rosada	0,7 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,278
Brilhante	2,5 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	0,577
Translúcida (límpida)	2,1 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	0,518
Turva (presença de material em suspensão)	1,1 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	0,602
<i>Aroma de fermentado*</i>	2,7 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	1,9 <sup>b</sup>	0,001
<i>Aroma de acerola*</i>	2,4 <sup>a</sup>	1,9 <sup>b</sup>	2,4 <sup>a</sup>	0,006
<i>Aroma frutado*</i>	2,5 <sup>a</sup>	2,0 <sup>b</sup>	2,5 <sup>a</sup>	0,012
<i>Aroma doce*</i>	2,0 <sup>ab</sup>	1,6 <sup>b</sup>	2,2 <sup>a</sup>	0,010
Aroma cítrico	2,6 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	0,129
<i>Aroma de vinagre*</i>	1,8 <sup>a</sup>	1,7 <sup>a</sup>	1,3 <sup>b</sup>	0,030
Aroma de erva	0,8 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	0,871
Aroma de chá	0,9 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0,701
Aroma de chá verde	0,6 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,330
Aroma de erva cidreira	0,6 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,328
Aroma de erva doce	0,6 <sup>b</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0,052
Aroma fermentado de pão	1,0 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	0,291
<i>Aroma apodrecido*</i>	1,2 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	0,7 <sup>b</sup>	0,039
Gosto doce	2,0 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>	0,381
Gosto salgado	0,6 <sup>a</sup>	0,6 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,836
Gosto ácido	3,1 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	0,465
Gosto amargo	1,7 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>	0,675
Sabor frutado	2,7 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	0,174
Sabor de acerola	2,5 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	0,208
Sabor de chá	1,1 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>	0,325
Sabor de chá verde	0,6 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	0,163
Sabor de erva cidreira	0,6 <sup>a</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	0,152
<i>Sabor de erva doce*</i>	0,6 <sup>b</sup>	0,6 <sup>b</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0,014
Sabor de vinagre	1,0 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>	0,301
Sabor refrescante	2,6 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	0,509
Sabor adstringente	1,7 <sup>a</sup>	1,6 <sup>a</sup>	1,7 <sup>a</sup>	0,714
Sabor desagradável	0,8 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0,250

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** K1 – chá verde, K2 – erva cidreira, K3 – erva doce. \*Atributos que apresentaram diferença na intensidade ( $p < 0,05$ ). \*\*Médias nas linhas seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de significância, pelo teste de McNemar (Bonferroni).

Houve diferença ( $p < 0,05$ ) na intensidade de nove atributos (Figura 19), com 2 relacionados a aparência, 6 referentes ao aroma e 1 correspondendo ao sabor.

Figura 19 - Principais atributos e graus de intensidade para os tratamentos elaborados de acordo com o RATA



Fonte: Autora, 2023.

Em relação a presença de bolhas, ambas as amostras apresentaram pouquíssima intensidade, sendo o tratamento K2 o que apresentou a menor intensidade (0,7), e o que diferiu significativamente dos demais ( $p < 0,05$ ). Quanto à espuma, os provadores praticamente não perceberam a sua formação nas amostras K2 (0,2) e K1 (0,5) e não houve diferença significativa entre elas ( $p < 0,05$ ). Já a amostra K3 diferiu das demais, sendo classificada como “pouquíssimo” quanto à presença de bolhas. Dessa forma, é possível constatar que, segundo os provadores, todas as formulações elaboradas apresentaram baixa carbonatação, resultando em pouquíssima ou quase nenhuma formação de bolhas e espuma. De acordo com Bishop *et al.* (2022), a sensação oral associada a bebidas carbonatadas é o formigamento, e a carbonatação depende da temperatura. À medida que a temperatura da bebida diminui, ocorre o aumento da sensação de formigamento na boca. Um fator que pode ter contribuído para a falta de percepção dessa sensação foi a falta de climatização da sala em que a análise sensorial foi realizada.

A intensidade em relação ao “aroma de fermentado” variou entre pouca e média, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos K1 (2,7) e K2 (2,4) que apresentaram intensidade superior ao tratamento K3 (1,9). Esse termo também foi inserido na lista de descritores CATA com menções superiores a 80%, sendo considerado relevante para perfil sensorial das kombuchas elaboradas.

Os tratamentos K1 (2,4) e K3 (2,4) apresentaram a mesma intensidade em relação ao “aroma de acerola”, superior ao tratamento K2 (1,9), que diferiu significativamente dos demais ( $p>0,05$ ), porém, ambos se apresentaram na faixa de pouca intensidade. Para o atributo “aroma frutado”, conforme o esperado, observou-se comportamento semelhante: os tratamentos K1 (2,5) e K3 (2,5) não diferiram entre si e foram superiores em relação à intensidade do aroma frutado no tratamento K2 (2,0).

Todas as amostras também apresentaram pouca intensidade em relação ao “aroma doce”, sendo o tratamento K3 (2,2) o que apresentou maior intensidade. Houve diferença significativa entre os tratamentos K3 e K2 (1,6) e o tratamento K1 (2,0) não diferiu dos demais ( $p>0,05$ ).

Quanto ao “aroma de vinagre”, e ao “aroma apodrecido” o comportamento dos tratamentos foi semelhante, variando de pouca ou pouquíssima a intensidade para o aroma de vinagre e pouquíssima para o aroma apodrecido. Sendo a amostra K3 a que apresentou menor intensidade para o aroma de vinagre (1,3) e para o aroma apodrecido (0,7), diferindo das amostras K1 e K2 que apresentaram intensidade superiores e não diferiram entre si ( $p>0,05$ ).

Dessa forma, o tratamento K2, elaborado a partir da infusão de erva cidreira apresentou menor intensidade em relação aos aromas de acerola, frutado e doce, enquanto a amostra K3, obtida a partir da fermentação da infusão de erva doce, possuiu maior intensidade em relação ao aroma doce e menor intensidade quanto aos aromas de fermentado, de vinagre e apodrecido.

Os compostos aromáticos das kombuchas podem estar associados aos constituintes do chá ou de outras matérias primas utilizadas, bem como à fonte de açúcar utilizada e aos compostos orgânicos voláteis (COV) produzidos pelos microrganismos durante a fermentação (TRAN *et al.*, 2020). No entanto, o perfil aromático típico do chá não parece desempenhar um papel significativo no perfil aromático característico da kombucha. Em vez disso, o perfil do aroma é dominado principalmente por ácido acético e COV produzidos pelas leveduras (BISHOP *et al.*, 2022)

A composição e concentração dos COV variam de acordo com os estágios de fermentação da kombucha, e com a temperatura de fermentação. Além disso, a produção de metabólitos como ácidos orgânicos, durante a fermentação, também contribui para a experiência sensorial geral. Os principais COV relatados na literatura são classificados em: ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e benzenoides (ZHANG *et al.*, 2021).

A variação das concentrações dos compostos voláteis resulta em diferentes perfis aromáticos da kombucha de acordo com a evolução da fermentação: notas cítricas, florais, doces e de laranja na fase inicial (dominação de geraniol e linalol), na fase intermediária, entre o segundo e o quarto dia de fermentação, intenso cítrico, herbal, lavanda e bergamota (síntese de  $\alpha$ -farneseno). Já a partir do sétimo dia, predominam notas doces, florais, de pão e de mel (síntese de 2-feniletanol) (SUFFYS *et al.*, 2023).

Diferentemente do CATA, que não apresentou nenhum atributo significativo em relação a percepção de sabor, na análise do RATA, os provadores conseguiram perceber, ainda que sendo considerado “pouquíssimo”, a intensidade do sabor de erva doce. Apesar dos valores não diferirem significativamente ( $p > 0,05$ ) entre as amostras, o tratamento K3 (0,7), elaborado a partir da infusão de erva doce, apresentou uma intensidade ligeiramente superior aos tratamentos K1(0,6) e K2 (0,6). Por tanto, a concentração de erva doce utilizada foi suficiente para que os provadores percebessem a sua presença na formulação da K3.

Neffe-Skocińska *et al.* (2017) obtiveram alta intensidade para os aromas de chá e cítrico e baixa intensidade para os aromas de ácido acético e de levedura. Com relação ao sabor, observaram alta intensidade para os sabores de chá, cítrico e ácido e baixa intensidade para os sabores amargo, de levedura e de ácido acético. Vale ressaltar que os tratamentos das diferentes temperaturas se comportaram de forma semelhante.

#### **5.8.4 Aceitabilidade e intenção de compra das kombuchas produzidas**

A Tabela 24 apresenta as médias de cada atributo para cada tratamento calculadas por ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ) juntamente com o índice de aceitação. De acordo com os dados, é possível verificar que dentre todos os atributos avaliados, só houve diferença significativa entre as amostras com relação ao aroma. Esses resultados demonstram que o uso dos diferentes substratos (chá verde, erva doce e cidreira) na fermentação da kombucha dos diferentes tratamentos não influenciaram na aceitabilidade sensorial das bebidas, com exceção do aroma.

Tabela 24 - Médias e índice de aceitação dos atributos sensoriais dos tratamentos avaliados

Atributos	Tratamentos			Índice de Aceitação (%)		
	K1	K2	K3	K1	K2	K3
Aparência	7,0 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>	77,78 <sup>a</sup>	75,56 <sup>a</sup>	76,67 <sup>a</sup>
Aroma	5,4 <sup>b</sup>	5,3 <sup>b</sup>	6,5 <sup>a</sup>	60,00 <sup>b</sup>	58,89 <sup>b</sup>	72,22 <sup>a</sup>
Sabor	6,7 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	74,44 <sup>a</sup>	71,11 <sup>a</sup>	70,00 <sup>a</sup>
Aceitação global	6,6 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	73,33 <sup>a</sup>	71,11 <sup>a</sup>	70,00 <sup>a</sup>
Intenção de compra	3,4 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	-	-	-

Fonte: Autora, 2023

**Legenda:** K1 – chá verde, K2 – erva cidreira, K3 – erva doce. \*valores seguidos de letras diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Quanto à aparência, os tratamentos foram todos bem aceitos, obtendo pontos relacionados ao “Gostei”, na escala hedônica de nove pontos. Já em relação ao aroma, o tratamento K3 diferiu-se dos tratamentos K1 e K2, que não diferiam entre si ( $p \leq 0,05$ ). Para esse atributo, a pontuação variou entre “Nem gostei nem desgostei” para as amostras K1 e K2 e “Gostei pouco” para a amostra K3, revelando que a infusão de erva doce como substrato da fermentação da kombucha contribui para um maior valor médio de aceitação do aroma da bebida. Os atributos sabor e a aceitação global se comportaram de forma semelhante, apesar das amostras não diferirem entre si. O tratamento K1 apresentou pontuação mais próxima ao “Gostei” em ambos os atributos, enquanto os tratamentos K2 e K3, ficaram mais próximos ao “Gostei pouco”, também para os dois atributos na escala hedônica. Esse comportamento mostra que aceitação global refleti de maneira geral a percepção do provador, comprovando que o sabor e a aparência influenciaram diretamente para a aceitação positiva das kombuchas avaliadas.

Já em relação a intenção de compra, os provadores declararam que “Talvez compraria/talvez não compraria” para todos os tratamentos avaliados. Dessa forma, apesar dos atributos: aparência, sabor e aceitação global apresentarem uma aceitabilidade positiva, o aroma parece ter influenciado de maneira negativa sob a intenção de compra, uma vez que esse atributo foi o que obteve a menor aceitação, contribuindo para a dúvida em relação a compra das kombuchas em questão.

Vale salientar que a maioria dos provadores (85%) informou que nunca havia consumido kombucha, mas, ainda assim, os índices de aceitação obtidos neste trabalho foram

condizentes aos encontrados em trabalhos semelhantes, mostrando que a saborização da bebida com suco de acerola pode contribuir para uma maior aceitação e inserção do produto no mercado.

Paludo (2017), também observou menores índices de aceitação para o atributo “odor” em kombuchas obtidas a partir de chá verde e extrato de erva-mate, tanto no produto artesanal (57,78 %) quanto no produto obtido em escala laboratorial (51,43 %). Também foram avaliados os atributos: aparência, cor, sabor, sabor residual e aceitação global, no entanto, para os dois tratamentos avaliados (artesanal - laboratorial), só houve diferença significativa para o “odor”. Sendo os atributos aparência (75,24 - 76,51%) e cor (76,19 - 77,14%) os que apresentaram os maiores índices de aceitação.

Já Durães *et al.* (2021) avaliaram duas formulações de kombucha, uma tradicional e outra em que o açúcar foi substituído por batata yacon, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa quanto à aceitação dos atributos: cor, aroma, sabor e aceitação global. Apesar disso, constatou-se que a kombucha a base de yacon foi menos classificada em todos os atributos, porém foi bem aceita dentro do limite do índice de aceitação. O aroma e o sabor foram os atributos que obtiveram as menores pontuações para kombucha a base de yacon, 70,71 e 70% respectivamente. Portanto, para trabalhos futuros, os autores sugeriram aumentar a concentração de extrato de yacon na formulação para corresponder ao teor de sólidos da kombucha tradicional, adicionar adoçantes não calóricos e realizar teste de aceitação com diferentes tempos de fermentação.

Yikmiş e Tuğgüm (2019), avaliaram as propriedades microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de formulações de kombucha contendo diferentes proporções de chá preto e de manjerição roxo e concluíram que a formulação com 100% de chá de manjerição apresentou melhor aceitação global.

Para que um produto seja bem aceito comercialmente o seu índice de aceitação deve ser igual ou superior a 70% (TEIXEIRA *et al.*, 1987), dessa forma, pode-se considerar que todas as formulações desenvolvidas neste trabalho seriam comercializadas de forma satisfatória. Demonstrando que a utilização das infusões de erva cidreira e erva doce também podem ser utilizadas para a elaboração de kombucha, já que obtiveram atributos sensoriais semelhantes aos obtidos pela kombucha tradicional, fermentada a partir de chá verde. Além disso, observa-se também que a saborização das bebidas a partir da adição de suco de acerola em uma segunda fermentação, também contribuiu para uma boa aceitação dos produtos.

## 5.9 Caracterização dos canudos

Após os tratamentos aplicados às películas de celulose resultantes da fermentação da kombucha, foi possível obter um material bastante maleável e resistente ao rasgo, que proporcionou uma fácil modelagem para a obtenção dos canudos. Os canudos apresentaram um aspecto opaco e fosco, estrutura coesa, não sendo necessário a adição de agentes ligantes ou coesivos para a sua manutenção, sendo isso uma grande vantagem em relação aos canudos de papel. A Figura 20 apresenta os canudos obtidos após todas as etapas.

Figura 20 - Canudos obtidos a partir do SCOBY da kombucha



Fonte: Autora, 2023.

A tabela 25 contém os resultados das análises realizadas para a caracterização dos canudos. Os protótipos apresentaram em média 1,08 g; 180 mm de comprimento; 0,16 mm de espessura; e diâmetro interno de 7,12mm. Por outro lado, Guo *et al.* (2023), ao avaliar impactos ambientais de três tipos de canudos diferentes (polipropileno, papel e ácido polilático) comumente usados na China, obtiveram dimensões superiores às encontradas neste estudo. Para

esses autores a massa variou entre 1,66 e 3,45 g; o comprimento 212 a 240 mm; e o diâmetro entre 11 e 12 mm, sendo o canudo de polipropileno o que apresentou a menor massa e o maior comprimento. Para Guo *et al.* (2023) as variações entre as principais características dos diferentes tipos de canudos se devem às diferenças nas matérias-primas e nas técnicas de processamento.

Tabela 25 – Características dos canudos produzidos a partir do SCOBY da kombucha

Análises	Resultados
Massa (g)	1,08 ± 0,15
Comprimento (mm)	180 ± 0,00
Espessura (mm)	0,16 ± 0,05
Diâmetro interno (mm)	7,12 ± 0,20
Umidade (%)	5,12 ± 0,32
Umidade absorvida (%)	67,45 ± 1,16
Solubilidade em água (%)	0,97 ± 0,07
Solubilidade em ácido (%)	0,84 ± 0,22

Fonte: Autora, 2023.

No entanto, os canudos à base de celulose da kombucha produzidos neste estudo apresentaram dimensões semelhantes a alguns canudos comercializados no Brasil. A partir de buscas na internet foram encontrados canudos de papel medindo 195 mm de comprimento e 6mm de diâmetro (DICARTA, 2023) e canudos plásticos medindo 200 mm de comprimento e 8 mm de diâmetro (BRESTER, 2023). Não foram encontradas normas e especificações que estabelecem as dimensões que os canudos devem apresentar para serem comercializados no Brasil. Porém, a ISO 18188:2016 – especifica as características gerais, requisitos e métodos para testes em canudos de polipropileno. Essa norma é aplicável a canudos com diâmetro interno de 3 mm a 12 mm e exige ensaios de medição de diâmetro, comprimento, espessura, dentre outros (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2016).

Os resultados indicaram que os protótipos obtidos neste estudo apresentaram uma baixa umidade (5,12%), o que seria outra grande vantagem. Já que, segundo Jones *et al.* (2016), o teor de umidade pode alterar o módulo de elasticidade do bioplástico resultante, e dessa forma,

interferir nas propriedades de resistência mecânica dos canudos. Silva (2018) obteve resultados de umidade superiores para todos os filmes produzidos com diferentes proporções de celulose bacteriana e goma de cajueiro, onde os valores variaram entre 9,23 e 10,71%, sendo a formulação que possuía 100% de goma de cajueiro a que apresentou o maior teor de umidade. Segundo a autora, o caráter hidrofílico que a goma apresenta facilita a absorção de água nos filmes.

Os canudos à base de celulose da kombucha absorveram aproximadamente 67% de água após exposição ao líquido por 40 minutos. Porém, esse alto índice de absorção de umidade já é esperado, uma vez que Jerez *et al.* (2007) determinaram que a absorção de água de vários bioplásticos variava entre 40% e 320%. Entretanto, a taxa de absorção de água deve ser controlada, já que essa característica altera as propriedades do bioplástico, reduzindo a sua resistência à tração, o que pode comprometer a integridade estrutural do canudo durante o uso (WANG *et al.*, 2020; JONES *et al.*, 2016). A etapa de aplicação do óleo de soja durante a produção do canudo contribuiu para diminuição do índice de absorção de água.

Por outro lado, a capacidade de absorção de água tem relação direta com a rápida biodegradação dos materiais, tanto por intemperismos físicos, quanto biológicos (ALMEIDA *et al.*, 2020). Assim, analisando sob essa perspectiva, os resultados encontrados neste estudo são relevantes, uma vez que os canudos têm estimativa de vida útil de 4 minutos, mas demoram, em média, 400 anos para se decompor (SILVA *et al.*, 2021). Dessa forma, para esse tipo de material, é aceitável que ele perca resistência mecânica e sofra deformações a partir de um certo tempo, uma vez que rapidamente será descartado.

Os resultados de solubilidade em água e em ácido demonstraram que os protótipos depositaram poucos resíduos nos líquidos utilizados no teste, indicando que os canudos não irão desprender grandes quantidades de resíduos nas bebidas que serão consumidas. Além disso, os valores obtidos neste estudo foram inferiores aos de Costa *et al.* (2017) para filmes de amido de feijão macáçar, os quais já consideravam 14%, um baixo grau de solubilidade em água. Almeida *et al.* (2020) produziram filmes de amido, quitosana, gelatina e glicerol e consideraram os resultados promissores, mesmo com valores de solubilidade superiores aos aqui relatados.

### 5.10 Teste de viabilidade dos canudos

A fim de avaliar a integridade dos canudos utilizou-se bebidas que são comumente consumidas com esses dispositivos, como refrigerante e suco de fruta.

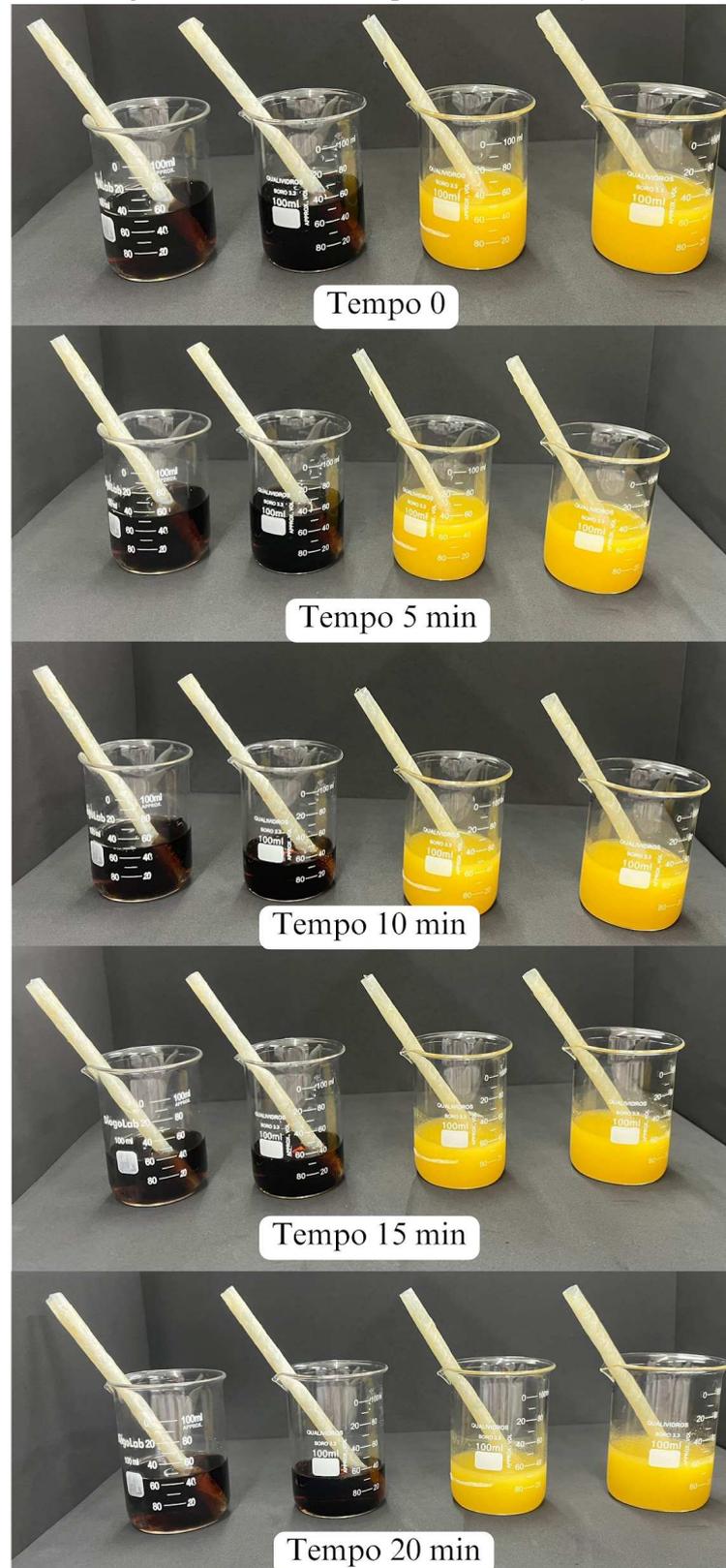
Os ensaios de integridade permitem avaliar a viabilidade, atestando que nenhum fragmento de seu revestimento ou matriz se rompa ou se desintegre, prejudicando sua funcionalidade (SILVA *et al.*, 2021).

Dessa forma, os protótipos foram imersos em refrigerante de cola e suco de cajá e tiveram a sua viabilidade avaliada durante 20 minutos (Figura 21). De 5 em 5 minutos, um voluntário fazia a sucção dos líquidos utilizando os canudos, que ficavam imersos nas bebidas, e avaliava: integridade, viabilidade de sucção e transferência de sabor do canudo para a bebida. Os testes foram realizados em duplicata.

Os protótipos apresentaram-se íntegros e com ótima capacidade para sucção em ambos os líquidos até o tempo de 20 minutos. Após 15 minutos, percebeu-se uma sutil transferência de sabor do canudo para o líquido, um pouco mais evidente no refrigerante. No entanto, essa interferência de sabor não foi acentuada no tempo de 20 minutos. De maneira geral, os canudos apresentaram uma boa viabilidade, uma vez que se mantiveram coesos, consistentes e íntegros, características que possibilitaram a sucção dos líquidos até o tempo máximo do teste (20 minutos). Após os testes, os canudos foram removidos dos líquidos e ainda assim permaneceram intactos, como mostra a Figura 22.

Silva *et al.* (2021), também obtiveram resultados promissores para canudos à base de amido e gel de Aloe vera, uma vez que os protótipos apresentaram uma boa viabilidade durante 15 minutos imersos em diferentes bebidas (achocolatado, água de coco, Coca-Cola e suco de laranja).

Figura 21 - Canudos imersos em refrigerante tipo cola e suco de caça nos diferentes tempos de observa o



Fonte: Autora, 2023.

Figura 22 - Canudos após 20 minutos imersos nos líquidos



Fonte: Autora, 2023.

### 5.11 Teste de biodegradação dos canudos

O teste de biodegradação foi realizado visando observar a degradação dos canudos produzidos em solo simulado. A partir do quinto dia de análise já foi possível observar uma perda de massa de 1,6 % dos canudos (Figura 23), porém essa perda foi mais significativa a partir do 35º dia (39,1%) e ao final dos 45 dias do teste, os canudos se desintegram totalmente. Esses resultados demonstraram que os canudos à base do SCOBY da kombucha apresentam uma alta biodegradabilidade.

De acordo com Campos *et al.* (2011), o processo de biodegradação ocorre, pois, as macromoléculas presentes no material, como proteínas, polissacarídeos e celulose, são degradáveis em sistemas biológicos por hidrólise seguida de oxidação.

Durante a biodegradação, ocorre inicialmente a modificação das propriedades mecânicas, químicas e físicas do material devido ao crescimento de microrganismos no seu interior ou na sua superfície. Em seguida, inicia-se a biofragmentação pela ação de microrganismos. E por fim, ocorre a assimilação, onde os microrganismos convertem a matéria orgânica degradada em CO<sub>2</sub>, água e biomassa (LUCAS *et al.*, 2008).

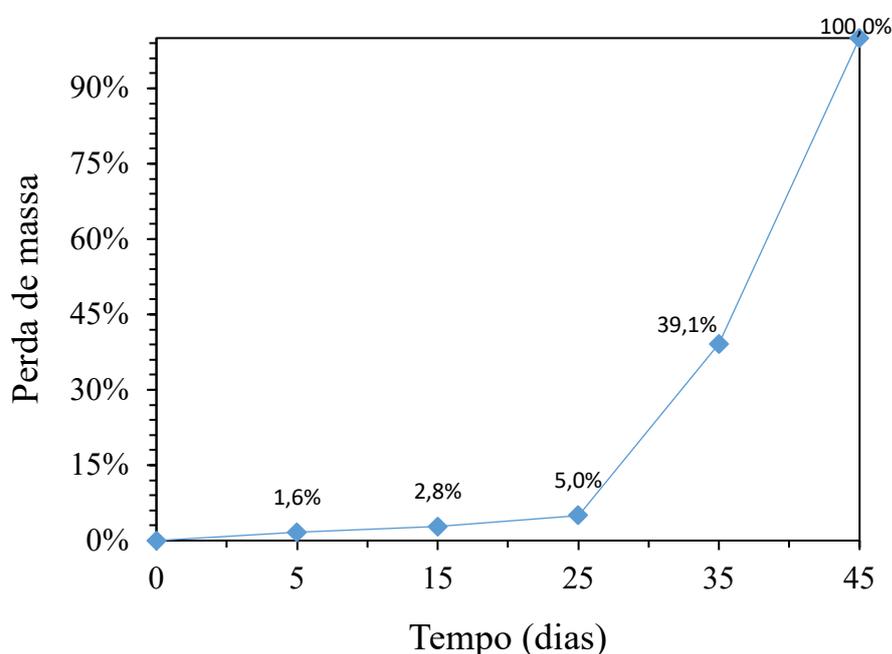
Diante do problema ambiental que envolve a utilização de canudos plásticos convencionais para bebidas, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de substituir o plástico por matérias primas mais sustentáveis. Isso porque a degradação completa dos

plásticos leva muitos séculos devido a sua durabilidade. Já que os microrganismos na natureza não evoluíram para degradar eficientemente os polímeros derivados de petróleo (GADE *et al.*, 2013; HARDING *et al.*, 2007).

Nesse sentido, Liu *et al.* (2022) avaliaram a biodegradabilidade de canudos de papel superhidrofóbicos enterrando-os no subsolo por 6 a 70 dias e concluíram que os canudos podem ser completamente degradados pelos microrganismos em 200 dias, com base nas taxas de perda de peso observadas.

Já Yang *et al.* (2021), obtiveram resultados semelhantes a este estudo ao avaliarem a biodegradabilidade de canudos à base de celulose bacteriana. Os autores observaram que após 15 dias, os canudos se partiram em grandes fragmentos, aos 45 dias esses fragmentos já estavam minúsculos e após 60 dias, os canudos já estavam totalmente integrados ao solo, indicando uma degradação quase total.

Figura 23 - Tempo de biodegradação dos canudos



Fonte: Autora, 2023.

Nesse viés, os canudos produzidos a partir das películas de celulose obtidas através do processo de fermentação da kombucha, consistem em uma alternativa viável para a substituição de canudos derivados de petróleo, já que os resultados demonstraram que os

protótipos apresentaram dimensões e propriedades compatíveis para o uso, boa capacidade de absorção de água, baixa solubilidade e alta capacidade de biodegradação.

A metodologia de obtenção dos canudos, bem como o produto resultante gerou um pedido de depósito de patente, sob o número de processo: BR 10 2023 006329 2 (COELHO *et al.*, 2023).

## 6 CONCLUSÕES

As infusões não usuais de erva cidreira e erva doce consistiram em substratos viáveis para a fermentação da kombucha, apresentando características semelhantes à bebida tradicional. Porém, a kombucha à base de erva cidreira obteve melhor eficiência na quebra da sacarose e consumo dos monossacarídeos, enquanto a bebida a base de erva doce apresentou maiores concentrações de produtos (ácido acético, ácido lático e etanol), demonstrando a alternância dos microrganismos envolvidos nesse processo. Em relação à segunda fermentação, a adição do suco de acerola contribuiu para modificações dos parâmetros de cor e no incremento de compostos bioativos em todas as formulações. Quanto aos parâmetros microbiológicos, as contagens de leveduras e bactérias acéticas foram mais elevadas na kombucha saborizada de erva doce do que na de erva cidreira. Além disso, as kombuchas contendo suco de acerola apresentaram-se estáveis aos três meses de armazenamento refrigerado.

“Possíveis benefícios à saúde atribuídos ao consumo da kombucha” foi considerado o fator determinante na decisão de compra, sendo o fator de maior relevância de acordo com a escala *Best-Worst*.

A kombucha saborizada à base de erva doce foi a mais bem avaliada no teste de aceitação. Os descritores “aroma de fermentado”, “aroma de acerola” e “sabor refrescante” foram os mais mencionados no teste CATA para caracterizar as kombuchas. Já os atributos relacionados ao aroma foram os mais significativos no teste RATA.

A partir do material celulósico resultante da fermentação das kombuchas, foi possível produzir canudos que apresentaram dimensões e propriedades compatíveis para o uso, boa capacidade de absorção de água, baixa solubilidade e alta capacidade de biodegradação, consistindo em uma alternativa mais sustentável para a substituição dos canudos derivados de petróleo.

Para trabalhos futuros seria interessante estudar os parâmetros de fermentação da kombucha para otimizar a produção de celulose visando a produção dos canudos em larga escala, bem como, realizar testes de porosidade, resistência à tração, citotoxicidade nos protótipos, com intuito de estudar melhor esses dispositivos.

## REFERÊNCIAS

- ALDERSON, H.; LIU, C.; MEHTA, A.; GALA, H. S.; MAZIVE, N. R.; CHEN, Y.; SERVENTI, L. Sensory profile of kombucha brewed with new zealand ingredients by focus group and word clouds. **Fermentation**, v. 7, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation7030100>
- ALMEIDA, J. L. S.; CARNEIRO, L. C.; SOUZA, P. A.; LIMA, M. M. Elaboração de canudos biodegradáveis por blend de amido, quitosana, gelatina e glicerol. **Nutrição: tecnologia a serviço da saúde**, v. 2. p. 397-417. 2020.
- ALMEIDA, V. M.; AZEVEDO, A. R.; SANTOS, S. A. S. Síntese e caracterizações preliminares de bioplásticos feitos a partir de polímeros naturais. ANAIS: V **Simpósio de Engenharia de Produção**. Joinville (SC). UDESC/UNIVILLE, 2017.
- AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Science & Nutrition**, v.6, n. 3, p. 659–665, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.605>
- AHARIZAD, S., RAHIMI, M. H., MOGHADAM, M., MOHEBALIPOUR, N. Study of genetic diversity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) populations based on morphological traits and essential oils content. **Annals of Biological Research**. v. 3, n. 12, p. 5748-5753, 2012.
- AHMED, S.; STEPP, J. R. Chapter 2 – **Green Tea: Plants, Processing, Manufacturing and Production**. V. Preedy (ed.), *Tea in Health and Disease Prevention*, p. 19-31. Academic Press, 2013.
- ARES, G.; ANTÚNEZ, L.; GIMENEZ, A.; ROIGARD, C. M.; PINEAU, B.; HUNTER, D. C.; JAEGER, S. R. Further investigations into the reproducibility of check-all-that-apply (CATA) questions for sensory product characterization elicited by consumers. **Food Quality and Preference**, v. 36, p. 111–121, 2014.
- ARIFF, R. M.; CHAI, X. Y.; CHANG, S. L.; FAZRY, S.; OTHMAN, B. A.; BABJI, A. S.; LIM, S. LJ Recent trends in Kombucha: Conventional and alternative fermentation in development of novel beverage, **Food Bioscience**, v. 53, 2023.
- AUNG, T.; EUN, J. -B. Production and characterization of a novel beverage from laver (*Porphyra dentata*) through fermentation with kombucha consortium, **Food Chemistry**, v. 350, 2021.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **Produção de Kombucha se multiplica no Brasil**. São Paulo: CITRUS, 23 out. 2018. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312621>. Acesso em: 3 dez. 2019

- AYED, L.; BEN ABID, S.; 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-016>.
- AYED, L. & HAMDI, M. Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. **Ann Microbiol**, v. 65, n. 4, p. 2293-2299, 2015.
- AZEVEDO, C. F., QUIRINO, Z. G. M., REGO, E. R., BRUNO, R. L. A., SILVA, G. Z., Aspectos anatômicos de plântulas *Foeniculum vulgare* Mill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, 2012.
- BARROS, C. P.; GUIMARÃES, J. T., ESMERINO, E. A., DUARTE, M. C. K. H., SILVA, M. C., SILVA, R., FERREIRA, B. M., SANT’ANA, A. S., FREITAS, M. Q., CRUZ, A. G. **Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products**. Current Opinion in Food Science. v. 32, p. 1-8, 2020.
- BATISTA, P.; PENAS, M.R.; PINTADO, M.; OLIVEIRA-SILVA, P. Kombucha: Perceptions and Future Prospects. **Foods**, v. 11, p. 1977. 2022.
- BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 71–77, 2012.
- BELITZ, H.-D.; GROSCHE W.; SCHIEBERLE P. **Food Chemistry**, 4ª edição, p. 951-8. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Alemanha. 2009.
- BISHOP, P.; ERIC, R. P.; BUDNER, D.; THOMPSON-WITRICK, K. A. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile, **Food Chemistry Advances**, v. 1, 2022.
- BODE, A. M.; DONG, Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. **BMB Reports**, v. 36, n. 1, p. 66-77, 2003.
- BONEZA, M. M.; NIEMEYER, E. D. Cultivar affects the phenolic composition and antioxidant properties of commercially available lemon balm (*Melissa officinalis* L.) varieties. **Industrial Crops & Products**, v. 112, p. 783–789, 2018.
- BORTOLOMEDI, B. M.; PAGLARINI, C. S.; BROD, F. C. A. Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions, **Food Chemistry**, v. 385, 2022.
- BRAIBANTE, M. E. F.; SILVA, D. D.; BRAIBANTE, H. T. S.; PAZINATO, M. S. A química dos chás. **Química Nova na escola**, v. 36, n. 3, p. 168-175, 2014.
- BRASIL. Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 49, 26 de setembro de 2018. Estabelece os parâmetros analíticos de suco e de polpa de frutas e a listagem das frutas e demais quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade já fixados pelo Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 181, p. 13, 2019 a.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 331. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**, v. 249, 2019 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº267, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. *Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos*. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1996.

BRESTER. Canudos. Disponível em: [https://www.brester.com.br/MLB-3784950604-canudo-de-plastico-biodegradavel-sach-8-mm-1200-unidades-\\_JM?gclid=Cj0KCQjwsp6pBhCfARIsAD3GZuZcEQkg6fZJIBGLpYbS8vFR9fhSaQHGMwWl4QjGmmciVcgZ63jIIwoaAsNbEALw\\_wcB](https://www.brester.com.br/MLB-3784950604-canudo-de-plastico-biodegradavel-sach-8-mm-1200-unidades-_JM?gclid=Cj0KCQjwsp6pBhCfARIsAD3GZuZcEQkg6fZJIBGLpYbS8vFR9fhSaQHGMwWl4QjGmmciVcgZ63jIIwoaAsNbEALw_wcB). Acesso em: 10 out. 2023.

BRUSCHI, J.; SOUSA, R.; MODESTO, K. O Ressurgimento Do Chá De Kombucha. **Revista de Iniciação à Pesquisa e Extensão**, 2018.

CABRAL, A. C. D.; MADI, L.; SOLER, R. **Apostila de embalagem para alimentos**. Campinas: ITAL, 1984.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T L C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; DE ALENCAR, S. M. Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana e Antioxidante da Própolis Vermelha Brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>

CAETANO, P. K.; DAIUTO, É. R.; VIEITES, R. L. Physicochemical and sensory characteristics of jam produced with acerola pulp and juice. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 191-197, 2012.

CAMPANO, C.; BALEA, A.; BLANCO, A.; NEGRO, C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 57–91, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>

CAMPOS, A.; MARCONATO, J. C.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Biodegradation of blend films PVA/PVC, PVA/PCL in soil and soil with landfill leachate. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 1367-1378, 2011.

CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D.; CAMERON, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; BARROS, F. A. R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic

profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities, **Food Research International**, v. 128, 2020.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

CHAKRAVORTY, Somnath *et al.* **Kombucha: A promising functional beverage prepared from tea**. Elsevier Inc., 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00010-4>

CHANDRAKALA, S. K.; LOBO, R.O.; DIAS, F. O. Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life? **Nutrients in Beverages**, v. 12, p. 591-616, 2019.

CHARLES, D. J. **Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources**. Springer Science & Business Media, p.159-64, 2012.

CHEN, Y. L.; DUAN, J.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; PENG, L.; XUE, S.; KAKUDA, Y. Production, quality, and biological effects of oolong tea (*Camellia sinensis*). **Food Reviews International**, v. 27, p. 1–15, 2011.

CHU, S.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 98, p. 502-507, 2006.

COELHO, R. M. D.; RAMOS, A. S. S.; SILVA JÚNIOR, J. M.; SOUSA, P. H. M. **Processo de obtenção de canudos ecológicos produzidos a partir da celulose formada durante a fermentação da kombucha e seu produto**. Depositantes: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte e Universidade Federal do Ceará. BR 10 2023 006329 2. Depósito: 04 abr. 2023.

CONNAY, A. H.; LU, Y. P.; LOU, Y. R.; HUANG, M. T. Inhibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat. **European Journal of Cancer Prevention**, p. S28-S36, 2002.

COSTA, A. F. S.; ALMEIDA, F. C. G.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2027, 2017.

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

COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE, L.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **Fems Microbiology Ecology**, n. 93, v. 5, p. 1– 16, 2017.

CVETKOVIĆ, D. **Kombucha made from medical herbs - biological activity and fermentation**, PhD Thesis, University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, 2008.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. JR. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1–12, 2007.

DALA-PAULA, B. M.; SANTOS, T. P.; ARAÚJO, L. S.; BASTOS, R. R. A.; MORAES, J. O.; CARBONERA, N. Domestic processing and storage on the physical-chemical characteristics of acerola juice (*Malpighia glabra* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.43, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943021519>

DANESI, E. D. G.; WOSIACKI, G. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18, n. 1, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000100027>

DA SILVA, L. R.; VILELA, D. M. Tecnologia de Chá e Seus Processos: Uma Revisão. **Rev. UNINGÁ Review**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 39-50, abr./jun. 2019.

DEPARTAMENTO DO TESOUREIRO E COMÉRCIO DO TABACO E DEPARTAMENTO DO IMPOSTO DO TESOUREIRO DOS EUA (2017). **Kombucha information and resources**. <https://ttb.gov/kombucha/index.shtml>. Acesso em: 10 dez. 2020.

DE FILIPPIS, F.; TROISE, A. D.; VITAGLIONE, P.; ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation, **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018.

DICARTA. Canudo Papel 195mm x 6mm. Disponível em: <https://dicarta.com.br/canudo-papel-195mm-x-6mm/>. Acesso em: 10 out. 2023.

DINIZ, N.; ALMEIDA, S.; SALAZAR, V.; SOUZA, A. G.; Consumo de vinhos na cidade do Recife (Brasil): uma pesquisa da relevância dos atributos da bebida no momento da compra. **Revista Brasileira de Pesquisa em Turismo**, v. 11, n. 1, p. 89-108, 2017.

DRAGINIC, N.; JAKOVLJEVIC, V.; ANDJIC, M.; JEREMIC, J.; SREJOVIC, I., RANKOVIC, M.; MILOSAVLJEVIC, I. Melissa officinalis L. as a Nutritional Strategy for Cardioprotection. **Frontiers in Physiology**, v.12, p.661778, 2021.

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

DURÃES, G. C. S.; PIRES, B. A. M.; LINS, T. C. L. Kombucha based synbiotic beverage using Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a fermentation substrate: development and sensorial analysis. **Food Research**, v. 5, n. 4, p. 66 – 71, 2021.

DUTTA, H.; PAUL, S. K. Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. **In: Production and management of beverages**. Woodhead Publishing, p. 259-288, 2019.

ESPARTEL, L. B. Atributos de produto e motivações de compra no mercado jornalístico do Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado em Administração**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1999.

ETGETON, S. A. P.; ZANETTE, C. M. Desenvolvimento de kombucha: caracterização microbiológica, físico-química e aspectos de mercado. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 11, n. 4, p. 1-14, 2020.

EUROMONITOR INTERNATIONAL, Naturally Healthy Packaged Food in Brazil Mar 2019. Disponível em: <https://www.euromonitor.com/naturally-healthy-packaged-food-in-brazil/report> . Acesso em: 10 de dez. 2019.

FANG, Z.-T.; SONG, C.-J.; XU, H.-R.; Ye, J.-H. Dynamic changes in flavonol glycosides during production of green, yellow, white, oolong and black teas from *Camellia sinensis L.* (cv. *Fudingdabaicha*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 490–498, 2019.

FDA Food and Drug Administration. (2009). Food code. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM2019396.htm>. Acesso em: 09 de dez. 2019.

FINN, A.; LOUVIERE, J. J. Determining the Appropriate Response to Evidence of Public Concern: The Case of Food Safety. **Journal of Public Policy & Marketing**, v. 11 n. 2, p. 12–25, 1992. Disponível em: doi:10.1177/074391569201100202

FRANK, G. W. **Kombucha - healthy beverage and natural remedy from the Far East**. Wilhelm Ennsthaler, Austria, 1995.

FREITAS, A. K. N. Efeito da adição de suco clarificado de caju nas características tecnológicas e nas propriedades sensoriais da kombucha. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2022.

FORTALEZA. Índice de desenvolvimento humano - **Anuário do Ceará**, 2010. Disponível em: <https://www.anuariooceara.com.br/indice-bairros-fortaleza/>. Acesso em: 23 fev. 2020.

FORTALEZA (Município), 2019. Lei Complementar nº 0278, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a organização e a estrutura administrativa do Poder Executivo Municipal e dá outras providências. **Fortaleza**, CE, 27 dez. 2019. pág. 11-14.

FU, C.; YAN, F.; CAO, Z.; XIE, F.; LIN, J. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Sciences Technology-Brazil**, v. 34, p. 123–126, 2014.

GADE, R.; TULASI, M. S.; BHAI, V. A.; 2013. Seaweeds: A novel biomaterial. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 40-44, 2013.

GAGGIÀ, F.; BAFFONI, L.; GALIANO, M.; NIELSEN, D. S.; JAKOBSEN, R. R.; CASTRO-MEJÍA, J. L.; BOSI, S.; TRUZZI, F.; MUSUMECI, F.; DINELLI, G.; DI GIOIA, D. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 2019.

GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM, D. **Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material**. CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, 2013.

GOMES, R. J.; DE FATIMA BORGES, M.; DE FREITAS ROSA, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; SPINOSA, W. A. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 139, 2018.

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

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 976–981, 2000.

GUO, X.; ZHAO, Y.; ZHAO, H.; LV, Y.; HUO, L. Multidimensional evaluation for environment impacts of plastic straws and alternatives based on life cycle assessment, **Journal of Cleaner Production**, v. 404, 2023.

HARDING, K. G.; DENNIS, J. S.; VON BLOTTNITZ, H.; HARRISON, S. T. L. Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis, **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 1, 2007.

HILAL, Y.; ENGELHARDT, U. Characterization of white tea—comparison to green and black tea. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 2, p. 414–421, 2007.

ILLANA, C. El hongo kombucha. **Boletín De La Sociedad Micológica De Madrid**, v. 31, p. 269–272. 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL, Kombucha Brewers. **Kombucha Code of Practice**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://kombuchabrewers.org/kombucha-code-of-practice/>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 18188: specification of polypropylene drinking straws. Geneva, 2016. 7 p.

IOANNIDES, C.; YOXALL, V. Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols, **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 6, p. 649–656, 2003.

JAGANNATH, A.; KALAISELVAN, A.; MANJUNATHA, S. S.; RAJU, P. S.; BAWA, A. S. The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 24, p. 2593–2599, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9781-8>

JAKUBCZYK, K.; KOCHMAN, J.; KWIATKOWSKA, A.; KAŁDUŃSKA, J.; DEC, K.; KAWCZUGA, D.; JANDA, K. Antioxidant Properties and Nutritional Composition of Matcha Green Tea. **Foods**, v. 9, n. 483, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9040483>

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The kombucha consortia of yeast and bacteria. **Mycologist**, v.14, n.4, 2000.

JAYABALAN, R.; MALBA`SA, R.; LONCAR, E.; VITAS, J.; 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, p. 538-550, 2014.

JAYABALAN, R., RADOMIR V., MALBA, ŠA., SATHISHKUMAR, M. Kombucha. **Reference Module in Food Science**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03032-8>

JAYABALAN, R., SUBATHRADEVI, P., MARIMUTHU, S., SATHISHKUMAR, M., & SWAMINATHAN, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, p. 227–234, 2008.

JEREZ, A.; PARTAL, P.; MARTÍNEZ, I.; GALLEGOS, C.; GUERRERO, A. Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing. **Rheologica Acta**, v. 46, p. 711–720, 2007.

JONES, A.; ZELLER, M. A.; SHARMA, S. Thermal, mechanical, and moisture absorption properties of egg white protein bioplastics with natural rubber and glycerol. **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 12, 2013.

KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.

KALLEL, L.; DESSEAUX, V.; HAMDI, M.; STOCKER, P.; AJANDOUZ, E. H. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. KOMBUCHA: A Systematic Review of the Empirical Evidence of Human Health Benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66-70, 2019.

KAYISOGLU, S.; COSKUN, F. Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. **Food Science and Technology**, v.41 p. 393-397, 2021.

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. **Beverages**, v. 6, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>

- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Prog. Polym. Sci.** v. 26, p.1561-1603, 2001.
- KOLE, A. S.; JONES, H. D.; CHRISTENSEN, R.; GLADSTEIN, J. A case of Kombucha tea toxicity. **J Intensive Care Med.** v. 24, n. 3, p. 205-207, 2009.
- KOVACEVIC, Z.; DAVIDOVIC, G.; VUCKOVIC-FILIPOVIC, J.; JANICIJEVIC-PETROVIC, M.; JANICIJEVIC, K.; POPOVIC, A. A toxic hepatitis caused the kombucha tea – Case report. Macedonian **Journal of Medical Sciences**, v. 7, p. 128–131, 2014.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 1390–1393, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf960282f>
- LEAL, M. J.; SUÁREZ, V. L.; JAVABALAN, R.; OROS, H. R.; ESCARLANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA - Journal of Food**, v.16:1, p. 390-399, 2018.
- LEE, B. L.; ONG, C. N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n.1, p. 439–447, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00215-6)
- LEE, J-E.; LEE, B-J.; CHUNG, J-O.; KIM, H-N.; KIM, E-H.; JUNG, S.; LEE, H.; LEE, S-J.; HONG, Y-S. Metabolomic unveiling of a diverse range of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites dependent on geography. **Food Chemistry**, v. 174, p. 452–459, 2015.
- LEONARSKI, E.; GUIMARÃES, A. C.; CESCO, K.; POLETTO, P. Production process and characteristics of kombucha fermented from alternative raw materials, **Food Bioscience**, v. 49, 2022,
- LIMA, L. F.; REIS, R. C.; ELISETH DE SOUZA VIANA, E. S.; OLIVEIRA, N. A. Caracterização físico-química e compostos bioativos de novos genótipos de acerola. **Anais 9ª Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, 2015.
- LIU, J.; WANG, C.; EWULONU, C. M.; CHEN, X.; WU, M.; HUANG, Y. Fabrication of superhydrophobic and degradable cellulose paper materials for straw application. **Cellulose**, v.29, p. 527–540, 2022.
- LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVA; SAUCEDO, J-E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques—a review. **Chemosphere**, v. 73, n.4, p. 429-442, 2008.
- MACFIE, H. J. H. N.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L. V. Designs to balance the effect of order of presentation and firstorder carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, v. 4, p. 129–148, 1989.
- MAGALHÃES, M.; GANDRA, K.; CUNHA, L.; LIMA, E. Obtenção da farinha do resíduo

do processamento de acerola e avaliação de compostos bioativos e nutritivos. **Research, Society and Development**. v.10, 2021.

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1039–1045, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>

MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; KOLAROV, L. J. A. Sucrose and Inulin Balance During Tea Fungus Fermentation. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 7, n.1, p. 573-576, 2002.

MALBAŠA, R.V.; MILANOVIĆ, S.D.; LONČAR, E.S.; DJURIĆ, M.S.; CARIĆ, M.Đ.; ILIČIĆ, M.D.; KOLAROV, L. Milk-based beverages obtained by Kombucha application. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 178-84, 2009.

MAMISAHEBEI, S.; KHANIKI, G. R. J.; TORABIAN, A.; NASSERI, S.; NADDAFI, K. Removal of Arsenic from an Aqueous Solution by Pretreated Waste Tea Fungal Biomass. **Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 85-92. 2007.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MARINHO, V. A. D.; ALMEIDA, T. G.; CARVALHO, L. H.; CANEDO E. L. Aditivacão e Biodegradação de Compósitos PHB/Babaçu. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 1, p. 37-41, 2018.

MARKOV, S.; JERINIC, V.; CVETKOVIC, D.; LONCAR, E.; MALBASA, R. Kombucha – functional beverage: Composition, characteristics and process of biotransformation. **Hem Ind**, v. 57, n. 10, p. 456-462, 2003.

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171– 178, 2014.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Imprensa Universitária/Edições UFC, p.344, Fortaleza, 2002.

MAY, A.; NARAYANAN, S.; ALCOCK, J.; VARSANI, A.; MALEY, C.; AKTIPIS, A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>

MCGEE, H. 2004. On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen, págs. 435-41. **Scribner**, Nova Iorque, EUA, 2007.

MEILGAARD, M. C.; CARR, T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**, 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004.

MESQUITA, Renata. O kombucha está em todo lugar. Estadão, 2017. Retirado de: <https://paladar.estadao.com.br/noticias/bebida,o-kombucha-agora-esta-em-todo-lugar,70001830341>. Acesso em: 22 março 2023.

MEYNERS, M.; CASTURA, J. C. Check-All-That- Apply Questions. In; P. Varela & G. Ares (Eds.). *Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling*. **Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group**, p. 272-305, 2014.

MEYNERS, M.; JAEGER, S. R.; ARES, G. On the analysis of Rate-All-That-Apply (RATA) data. **Food Quality and Preference**, v. 49, p. 1–10, 2016.

MOURA, A. B. D. E. Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá mate. **Trabalho de conclusão de curso-Universidade Federal de Pernambuco**, Vitória de Santo Antão, 2019.

MURUGESAN, G. S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass. **Bioresource Technology**, v. 97, n.3, p. 483-7, 2006.

MURUGESAN, G. S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. **Biores Technol**, v. 96, p. 1743–8, 2005.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K.; IWONA ŚCIBISZ, B. S.; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties, **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601-607, 2017.

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

NORONHA, M. C. **Kombucha de chá preto: Alteração físico-químicas, microbiológicas e no perfil de fenólicos durante a fermentação, atividade antimalárica e avaliação da vida de prateleira**. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa - Minas Gerais, 2021.

NUMMER, A. B. Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. **Journal of Environmental Health**, v. 76, n. 4, p. 8-11, 2013.

PALUDO, N. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre, 2017.

PEREIRA, D. M.; SILVA, S. X. S.; LIMA, L. C.; ARAÚJO, L. F. S.; BRITO, I. L. Identificação dos parâmetros físico-químicos e colorimétricos de kombucha de chá verde durante dez dias de fermentação. **Agron Food Academy**, 2021.

PRAKASH MARANA, J.; SIVAKUMAR A, Ā, K.; THIRUGNANASAMBANDHAMA, V.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 20-28, 2014.

PUPPI, D.; CHIELLINI, F.; PIRAS, A. M.; CHIELLINI, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Prog. Polym. Sci**, v. 35, p. 403–440, 2010.

PHAN, T. G.; ESTELL, J.; DUGGIN, G.; BEER, I.; SMITH, D.; FERSON, M. J. Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. **Medical Journal of Australia**, v. 169, n. 11-12, p. 644-646, 1998.

RE, R.; N., PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REVA, O. N.; ZAETS, I. E.; OVCHARENKO, L. P.; KUKHARENKO, O. E.; SHPYLOVA, S. P.; PODOLICH, O. V.; KOZYROVSKA, N. O. Metabarcoding of the Kombucha microbial community grown in different microenvironments. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 124, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0124-5>

RODRIGUES, R. da S.; MACHADO, M. R. G.; BARBOZA, G. G. R.; SOARES, L. S.; HEBERLE, T.; LEIVAS, Y. M. Características físicas e químicas de kombucha à base de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*, L.). **6º Simpósio de Segurança Alimentar**, Rio Grande do Sul, 2018.

RUBIO DELGADO, A. **Té de Kombucha y sus beneficios para el sistema digestivo**. Dissertação, Universidad Particular Equinoccial, 2015.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 127, p. 1-4, 2007.

SABOURAUD, S.; COPPER, E. B.; ROUSSEAU, C.; TESTUD, F.; PULCE, C.; THOLLY, F.; BLANC, M.; CULOMA, F.; FACCHIN, A.; NINET, J.; CHAMBON, P.; MEDINA, B.; DESCOTES, J. Environmental lead poisoning from lead-glazed earthenware used for storing drinks. **Rev Med Interne**, v. 30, p. 1038–43, 2009.

SADJADI, J. Cutaneous anthrax associated with the Kombucha 'mushroom' in Iran. **Jama**, v. 280, n. 18, p. 1567-1568, 1998.

SAIGG, N. I.; SILVA, M. C. Efeitos da Utilização do Chá Verde na Saúde Humana. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 69-89, 2009.

SANTOS, J. M. **Pesquisa de matérias estranhas em espécie vegetal, *Pimpinella anisum* L., para o preparo de “chá”**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, M. J. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Gastronômicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

SANTOS, R. C.; BARBOSA, C. D.; LACERDA, IAC. Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto. *Anais da 69ª Reunião anual da SBPC, [s.l.] 2017.*

SANTOS, R. J. JR.; BATISTA, R. A.; RODRIGUES, S. A.; FILHO, L. X.; LIMA, A. S. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. **J Microb Biochem Technol**, v. 1, n. 1, p. 72-8, 2009.

ŠĆIBAN, M. B.; PRODANOVIĆ, J. M.; RAZMOVSKI, R. N. Biosorption of Copper (II) and Chromium (VI) by Modified Tea Fungus. **Acta Periodica Technologica**, v. 43, p. 335-42, 2012.

SHAHBAZI, H.; GAHRUIE, H. H.; GOLMAKANI, M-T.; ESKANDARI, M. H.; MOVAHEDI, M. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 8, p. 2568–2577, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.873>

SHAKERI, A.; SAHEBKAR, A.; JAVADI, B. Melissa officinalis L. –A review of its traditional uses: phytochemistry and pharmacology. **J. Ethnopharm.** v. 188, p. 204–228, 2016.

SHARIFUDIN, S. A.; HO, W. Y.; YEAP, S. K.; ABDULLAH, R. W.; KOH, S. P. Fermentation and characterization of potential kombucha cultures on papaya-based substrates. **Lwt**, v. 151, n. June, p. 112060, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112060>

SHI, S.; WEI, Y.; LIN, X.; LIANG, H.; ZHANG, S.; CHEN, Y.; DONG, L.; JI, C. Microbial metabolic transformation and antioxidant activity evaluation of polyphenols in kombucha, *Food Bioscience*, v. 51, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102287>.

SILVA, L. A.; SOUZA, T. D.; LIMA, C. M. G.; BENEDITO, L. Z.; SANTANA, R. F.; PINTO JÚNIOR, W. R. Protótipo de canudo biodegradável à base de amido e gel de Aloe vera: caracterização e análise da integridade. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Editora científica, 2021, v. 4, cap 26, p. 403-416.

SILVA, N.; VALÉRIA JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**: 5. ed. São Paulo: Varela, 2017. v. único.

SILVA, S. M. F. Filmes compósitos de celulose bacteriana e goma de cajueiro para aplicação em alimentos. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. 2018.

SILVA, T. R. Desenvolvimento de kombucha obtida a partir de chá verde saborizado com polpa de maracujá: processo artesanal e avaliação sensorial. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Campus Salgueiro, 2021.

SKNEPNEK, A.; MILETIĆ, S. T. D.; LEVIĆ, S.; ČOLIĆ, M.; NEDOVIĆ, V.; NIKŠIĆ, M. Fermentation characteristics of novel *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes* kombucha

beverages and immunomodulatory potential of their polysaccharide extracts. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128344, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128344>

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2586-94, 2000.

SRIHARI, T.; ARUNKUMAR, R.; ARUNAKARAN, J.; SATYANARAYANA, U. Downregulation of signaling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 53-8, 2013.

SUFFYS, S.; RICHARD, G.; BURGEON, C.; WERRIE, P.-Y.; HAUBRUGE, E.; FAUCONNIER, M.-L.; GOFFIN, D. Characterization of Aroma Active Compound Production during Kombucha Fermentation: Towards the Control of Sensory Profiles. **Foods**, v. 12, p. 1657 – 1678, 2023. Disponível em <https://doi.org/10.3390/foods12081657>

TAKAHASHI, L. S. A. T.; SOUZA, J. R. P.; YOSHIDA, A. E.; ROCHA, J. N. Condições de armazenamento e tempo de embebição na germinação de sementes de erva doce (*Pimpinella anisum L.*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.1, p.1-6, 2009.  
TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBITTA, P. A. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis: Editora UFSC, 1987. 180p.

TEYSSIER, C.; HAMDOUCHE, Y. Acetic acid bacteria: Prospectives applications in food biotechnology. **Northwestern, FL**: CRC Press, 2016.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **Int J Food Microbiol**, v. 95, p. 119–26, 2004.

TOMAR, O. Determination of some quality properties and antimicrobial activities of kombucha tea prepared with different berries. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 47, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3083>

TRAN, T.; BILLET, K.; TORRES-COBOS, B.; VICHI, S.; VERDIER, F.; MARTIN, A.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; TOURDOT-MARÉCHAL, R. Use of a Minimal Microbial Consortium to Determine the Origin of Kombucha Flavor. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

TRAN, T.; GRANDVALET, C.; VERDIER, F.; MARTINS, A.; ALEXANDRE, H.; TOURDOT-MARÉCHAL, R. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2050–2070, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>

TU, C.; TANG, S.; AZI, F.; HU, W.; DONG, M. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 81–89, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.024>

- ULUSOY, A.; TAMER, C. E. Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus ideaus*) for kombucha beverage production. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1524–1536, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00068-w>
- VALENZUELA, A. El consumo de té y la salud: Características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. **Revista Chilena De Nutrición**, v.31, p. 72–82, 2004.
- VELIĆANSKI, A.; CVETKOVIĆ, D.; MARKOV, S. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from *Lamiaceae* family. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 1. 2013.
- VELIĆANSKI, A.; CVETKOVIĆ, D.; MARKOV, S.; ŠAPONJAC, V.; VULIĆ, J. Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 52, n. 4, p. 420–429, 2014.
- VENTURIM, B. C. Produção de kombucha a partir de diferentes inóculos brasileiros. **Dissertação Mestrado em Microbiologia Agrícola**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2022.
- VIJAYARAGHAVAN, R.; SINGH, M.; RAO, P. V.; BHATTACHARYA, R.; KUMAR, P.; SUGENDRAN, K.; DUFRESNE SINGH, R. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 293–299. 2000.
- 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, 2018.
- VITAS, J. S.; VUKMANOVIĆ, S. Z.; MALBAŠA, R. V.; TEPIĆ-HORECKI, A. N. Influence of process temperature on ethanol content in kombucha products obtained by fermentation of fluted must effluent. *Acta Periodica Technologica*, p. 311-315, 2019.
- WALKER, M. Características do Consumidor, Aceitação e Conhecimento e Preferências pelo Kombucha. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Maine, Orono, ME, EUA, 2021.
- WANG, B.; RUTHERFURD-MARKWICK, K.; NAREN, N.; ZHANG, X.-X.; MUTUKUMIRA, A. N. Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Black Tea Kombucha Fermented with a New Zealand Starter Culture. **Foods**, v.12, 2023.
- WANG, K.; LIU, F.; LIU, Z.; HUANG, J.; XU, Z.; LI, Y.; YANG, X. Comparison of catechins and volatile compounds among different types of tea using high performance liquid chromatograph and gas chromatograph mass spectrometer. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n.7, p.1406–1412, 2011.
- WANG, X.; PANG, Z.; CHEN, C.; XIA, Q.; ZHOU, Y.; JING, S.; WANG, R.; RAY, U.; GAN, W.; LI, C.; CHEN, G.; FOSTER, B.; LI, T.; HU, L. All-Natural, Degradable, RolledUp Straws Based on Cellulose Micro- and Nano-Hybrid Fibers. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 22, 2020.

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. 1, n. 11, 2015 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/591869>

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with Kombucha “tea fungus.” **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 2, p. 490–498, 2016.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; WAISUNDARA, V. Y. Enhancement of the functional properties of coffee through fermentation by “tea fungus” (kombucha). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 2596–2603, 2015 b.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; LAN VU, H. T.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012

YAMAZAKI, S. Kombucha for beginners: How to brew kombucha at home. S.i, 2015.

YANG, H. B.; LIU, Z.; YIN, C.; HAN, Z.; GUAN, Q.; ZHAO, Y. X.; LING, Z.; LIU, H. C.; YANG, K.; SUN, W. B.; YU, S. Edible, Ultrastrong, and Microplastic-Free Bacterial Cellulose-Based Straws by Biosynthesis. **Adv. Funct. Mater**, v. 32, n. 15, 2021.

YI, T.; ZHU, L.; PENG, W. L.; HE, X. C.; CHEN, H. L.; LI, J.; CHEN, H. B. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 194–201, 2015.

YIKMIŞ, S., & TUĞGÜM, S. Evaluation of Microbiological, Physicochemical and Sensorial Properties of Purple Basil Kombucha Beverage. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 7, n. 9, p. 1321–1327, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1321-1327.2550>

ZHANG, B. **The Characteristics of New Zealand Oolong Tea**. Dissertação (Master of Science) - The University of Waikato, 2012.

ZHANG, J.; VAN MULLEM, J.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. The Chemistry and Sensory Characteristics of New Herbal Tea-Based Kombucha. **J. Food Sci.**, v. 86, p. 740–748, 2021.

ZHAO, Z. J.; SUI, Y. C.; WU, H. W.; ZHOU, C. B.; HU, X. C.; ZHANG, J. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 732-741, 2018.

ZOU, C.; LI, R.-Y.; CHEN, J. X.; WANG, F.; GAO, Y.; FU, Y. Q.; XU, Y. Q.; YIN, J. F. Zijuan tea-based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile, **Food Chemistry**, v. 363, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130322>.

ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v. 57, p. 307–316, 2002.

## APÊNDICE A – FICHA DA ANÁLISE SENSORIAL DAS KOMBUCHAS PRODUZIDAS

**COLOQUE O NÚMERO DA PRIMEIRA AMOSTRA QUE VOCÊ RECEBEU: \_\_\_\_\_**

**1.0** Você recebeu uma amostra de kombucha em uma taça, **OBSERVE-A** e avalie quanto a sua **APARÊNCIA**:

<p><b>1.1) O quanto você gostou ou desgostou da APARÊNCIA dessa amostra?</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end; text-align: center;"> <div style="width: 10%;">1</div> <div style="width: 10%;">2</div> <div style="width: 10%;">3</div> <div style="width: 10%;">4</div> <div style="width: 10%;">5</div> <div style="width: 10%;">6</div> <div style="width: 10%;">7</div> <div style="width: 10%;">8</div> <div style="width: 10%;">9</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; text-align: center; margin-top: 5px;"> </div>	<p>Coloque aqui suas impressões com relação a aparência da bebida:</p> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
--	--

**1.2.** Abaixo estão listados vários termos descritores de aparência. **OBSERVE** a amostra e marque o **GRAU DE INTENSIDADE** dos termos que a **CHARACTERIZAM**:

DESCRITORES	Nada	Pouquíssimo	Pouco	Médio	Muito	Muitíssimo
Presença de bolhas	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Presença de espuma	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor pêssego	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor alaranjada	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor rosada	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Brilhante	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Translúcida (límpida)	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Turva (presença de material em suspensão)	( )	( )	( )	( )	( )	( )

**2.0** Faça movimentos circulares com a taça e aproxime do nariz, sinta o cheiro da kombucha e avalie o **AROMA**:

<p><b>2.1) O quanto você gostou ou desgostou do AROMA dessa amostra?</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end; text-align: center;"> <div style="width: 10%;">1</div> <div style="width: 10%;">2</div> <div style="width: 10%;">3</div> <div style="width: 10%;">4</div> <div style="width: 10%;">5</div> <div style="width: 10%;">6</div> <div style="width: 10%;">7</div> <div style="width: 10%;">8</div> <div style="width: 10%;">9</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; text-align: center; margin-top: 5px;"> </div>	<p>Coloque aqui suas impressões com relação ao aroma da bebida:</p> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
--	---

**2.2.** Abaixo estão listados vários termos descritores de aroma. **OBSERVE** a amostra e marque o **GRAU DE INTENSIDADE** dos termos que a **CHARACTERIZAM**:

DESCRITORES	Nada	Pouquíssimo	Pouco	Médio	Muito	Muitíssimo
Aroma de fermentado	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de acerola	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma frutado	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma doce	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma cítrico	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de vinagre	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de erva	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de chá	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de chá verde	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de erva cidreira	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma de erva doce	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma fermentado de pão	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Aroma apodrecido	( )	( )	( )	( )	( )	( )

### 3.0 Prove a bebida e avalie o SABOR:

<p><b>3.1) O quanto você gostou ou desgostou do SABOR dessa amostra?</b></p> <p>1      2      3      4      5      6      7      8      9</p> <p>        </p> <p>Desgostei muitíssimo    Desgostei muito    Desgostei Desgostei pouco    Nem gostei nem desgostei    Gostei pouco    Gostei Gostei muito    Gostei muitíssimo</p>	<p>Coloque aqui suas impressões com relação ao sabor da bebida:</p> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
<p><b>3.2) Abaixo estão listados vários termos descritores de sabor. OBSERVE a amostra e marque o GRAU DE INTENSIDADE dos termos que a CARACTERIZAM.</b></p>	

DESCRITORES	Nada	Pouquíssimo	Pouco	Médio	Muito	Muitíssimo
Gosto doce	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Gosto salgado	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Gosto ácido	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Gosto amargo	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor frutado	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de acerola	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de chá	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de chá verde	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de erva cidreira	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de erva doce	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de vinagre	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor refrescante	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor adstringente	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor desagradável	( )	( )	( )	( )	( )	( )

4.0 De MANEIRA GLOBAL, indique o quanto gostou ou desgostou da amostra sinalizando abaixo:

4.1) ACEITAÇÃO GLOBAL?	Comentários:
<p>1 2 3 4 5 6 7 8 9</p> <p>        </p> <p>Desgostei Desgostei Desgostei Desgostei Nem gostei Gostei Gostei Gostei Gostei muitíssimo muito pouco nem gostei pouco muito muitíssimo</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>

4.2) Caso você encontrasse essa bebida no mercado, qual seria sua **INTENÇÃO DE COMPRA**?

- ( ) Certamente compraria
- ( ) Provavelmente compraria
- ( ) Talvez comprasse/talvez não comprasse
- ( ) Provavelmente não compraria
- ( ) Certamente não compraria

### PERFIL DO CONSUMIDOR

Nome: \_\_\_\_\_ Data de degustação das bebidas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Idade:**

- ( ) Menos de 18 anos  
 ( ) Entre 18 e 25 anos  
 ( ) Entre 26 e 35 anos  
 ( ) Entre 36 e 50 anos  
 ( ) Entre 51 e 65 anos  
 ( ) Acima de 65 anos

**Responda as seguintes questões:**

- |                                   |         |         |
|-----------------------------------|---------|---------|
| a) Você gosta de suco de acerola? | Sim ( ) | Não ( ) |
| b) Você sabe o que é kombucha?    | Sim ( ) | Não ( ) |
| c) Você já consumiu kombucha?     | Sim ( ) | Não ( ) |

**Caso tenha respondido que sim a pergunta anterior, com que frequência costuma consumir tais bebidas?**

	Suco de Acerola	Kombucha
<b>Diariamente</b>	( )	( )
<b>2 ou 3 vezes por semana</b>	( )	( )
<b>1 vez por semana</b>	( )	( )
<b>Quinzenalmente</b>	( )	( )
<b>Mensalmente</b>	( )	( )
<b>Semestralmente</b>	( )	( )