



UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHAS A PARTIR DE DIFERENTES
SUBSTRATOS SUSTENTÁVEIS**

GEASI LUCAS MARTINS

JOINVILLE
2024

GEASI LUCAS MARTINS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHAS A PARTIR DE DIFERENTES
SUBSTRATOS SUSTENTÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE – como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia de Processos;

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider

Coorientadora: Profa. Dra. Michele Cristina Formolo Garcia

JOINVILLE

2024

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M386a	Martins, Geasi Lucas Avaliação da produção de kombuchas a partir de diferentes substratos sustentáveis // Geasi Lucas Martins; orientadora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider; coorientadora Dra. Michele Cristina Formolo Garcia. – Joinville: UNIVILLE, 2024. 84 p.: il. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville) 1. Chá de kombucha. 2. Resíduos agrícolas. 3. Melaço. 4. Milhocina. 5. Trub. I. Schneider, Andréa Lima dos Santos (orient.). II. Garcia, Michele Cristina Formolo (coorient.). III. Título. CDD 661.8
-------	--

Termo de Aprovação

“Avaliação da Produção de Kombuchas a partir de Diferentes Substratos Sustentáveis”

por

Geasi Lucas Martins

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Michele Cristina Formolo Garcia
Coorientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Mariana Fensterseifer Fabricio
(URGRS)

Profa. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Desenvolvimento e Gestão de Processos e Produtos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.


Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)
Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos

Joinville, 03 de dezembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação é resultado de uma trajetória de aprendizado, desafios e superação que só foi possível com o apoio de pessoas que estiveram ao meu lado ao longo desse processo.

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu força e sabedoria para superar os obstáculos e alcançar este momento tão significativo. À minha família, em especial meus pais, pelo amor incondicional, compreensão e incentivo constante. Obrigado por acreditarem em mim e me apoiarem mesmo nos momentos de dificuldade.

Às minhas orientadoras, Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider e Profa. Dra. Michele Cristina Formolo Garcia, pelo apoio, orientação, paciência e por compartilharem seu vasto conhecimento. Vocês não apenas contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional.

Às amigas de pesquisa e laboratório, Ana Flávia Feuser e Helena Carolina Hertel, que dividiram comigo os desafios e conquistas ao longo desta jornada, tornando os momentos difíceis mais leves com sua parceria e amizade.

À Profa. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira e à equipe do Departamento de Gastronomia da Univille pela disposição em auxiliar com o comitê de ética e a realização da análise sensorial e estágio docente.

À startup Nanobiocell e empreendedoras Katiusca Wessler Miranda e Janaina Lisi Leite Howarth, por disponibilizar seu espaço para realização de experimentos e compartilhamento de conhecimentos.

Aos parceiros dos laboratórios da Univille, Victória Fonseca Silveira, Sandro Rogério, Kumineck Júnior, Paula Roberta Perondi Furtado e Aline Coan pelo companheirismo e auxílio no processo e desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço à Universidade da Região de Joinville - Univille e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, por possibilitarem a realização desta pesquisa.

Por fim, aos amigos e todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo minha sincera gratidão.

RESUMO

Avaliação Da Produção De Kombucha A Partir De Diferentes Substratos Sustentáveis

A kombucha, uma bebida fermentada à base de chá, açúcares e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY), vem ganhando popularidade devido aos seus benefícios à saúde. Tradicionalmente, ela é feita com chá preto ou verde e açúcar refinado, porém este trabalho explorou a utilização de substratos alternativos, como o trub, resíduo de cervejarias, a milhocina, subproduto da indústria de amido, e o melaço, subproduto da indústria de açúcar. Este estudo investigou a produção de kombucha utilizando diferentes substratos sustentáveis, visando a otimização do processo fermentativo e caracterização sensorial da bebida. A pesquisa foi conduzida em três etapas principais: planejamento experimental com 27 substratos formulados com diferentes concentrações e tipos de fontes de nitrogênio e carbono; análise cinética da fermentação de kombucha para os substratos mais promissores; e análise sensorial comparativa entre as kombuchas produzidas. As variáveis analisadas incluíram a taxa e concentração de açúcares residuais, acidez volátil, conteúdo fenólico total (CFT) e a graduação alcoólica. Os resultados indicaram que os substratos contendo melaço apresentaram maior acidez volátil e conteúdo fenólico, superando os valores registrados nos substratos com açúcar refinado. A fonte de nitrogênio também influenciou o perfil fermentativo, com a milhocina e o trub sendo eficientes no suporte ao crescimento microbiano. A análise estatística revelou que as interações entre as fontes de nitrogênio e carbono foram significativas para a produção de ácidos e consumo de açúcares. Adicionalmente, a cinética de fermentação demonstrou que, para os substratos selecionados, o tempo ótimo de fermentação foi de 8 dias, com máxima produtividade de ácidos orgânicos sendo alcançada nesse período. A kombucha produzida com substratos alternativos apresentou características similares à kombucha tradicional, com vantagem de serem economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis, promovendo a valorização de resíduos agroindustriais. Em termos sensoriais, a kombucha foi considerada aceitável, porém necessita-se de melhorias a fim de tornar o sabor menos ácidos. Este estudo reforça o potencial de inovação na produção de kombucha, utilizando substratos não convencionais, como trub, milhocina e melaço, para otimizar o processo fermentativo e produzir uma bebida com alto valor agregado, tanto nutricional quanto sensorial, além de contribuir para a sustentabilidade na cadeia produtiva de alimentos.

Palavras-chave: kombuchas análogas, resíduos agroindustriais, milhocina, trub, melaço.

ABSTRACT

Evaluation Of Kombucha Production From Different Sustainable Substrates

Kombucha, a fermented beverage made from tea, sugars, and a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY), has been gaining popularity due to its health benefits. Traditionally, it is made with black or green tea and refined sugar. Still, this study explored the use of alternative substrates such as trub (a brewery byproduct), corn steep liquor (a byproduct of the starch industry), and molasses (a byproduct of the sugar industry). This study investigated kombucha production using different sustainable substrates, aiming to optimize the beverage's fermentation process and sensory characterization. The research was conducted in three main stages: experimental design with 27 substrates formulated with different concentrations and types of nitrogen and carbon sources; kinetic analysis of kombucha fermentation for the most promising substrates; and a comparative sensory analysis of the kombuchas produced. The analyzed variables included the rate and concentration of residual sugars, volatile acidity, total phenolic content (TPC), and alcohol content. The results indicated that substrates containing molasses exhibited higher volatile acidity and phenolic content, surpassing the values recorded in substrates with refined sugar. The nitrogen source also influenced the fermentation profile, with corn steep liquor and trub proving efficient in supporting microbial growth. Statistical analysis revealed that interactions between nitrogen and carbon sources were significant for acid production and sugar consumption. Additionally, the fermentation kinetics demonstrated that the optimal fermentation time for the selected substrates was 8 days, with maximum production of organic acids achieved during this period. Kombucha produced with alternative substrates exhibited characteristics similar to traditional kombucha, with the added advantage of being economically viable and environmentally sustainable, promoting the valorization of agro-industrial byproducts. Regarding sensory evaluation, the kombucha was considered acceptable, although improvements are needed to reduce its acidic flavor. This study reinforces the potential for innovation in kombucha production, using unconventional substrates such as trub, corn steep liquor, and molasses. By optimizing the fermentation process, we produced a beverage with high nutritional and sensory value. More importantly, this approach contributes significantly to sustainability in the food production chain, a responsibility we all share and should take pride in.

Keywords: analogous kombuchas, agro-industrial byproducts, milhocina, trub, molasses.

RESUMEN

Evaluación De La Producción De Kombucha A Partir De Diferentes Sustratos Sostenibles

La kombucha, una bebida fermentada a base de té, azúcares y una cultura simbiótica de bacterias y levaduras (SCOBY), ha ganado popularidad debido a sus beneficios para la salud. Tradicionalmente, se elabora con té negro o verde y azúcar refinado; sin embargo, este trabajo exploró el uso de sustratos alternativos, como el trub, un residuo de cervecerías; la milhocina, un subproducto de la industria del almidón; y la melaza, un subproducto de la industria azucarera. Este estudio investigó la producción de kombucha utilizando diferentes sustratos sostenibles, con el objetivo de optimizar el proceso fermentativo y caracterizar sensorialmente la bebida. La investigación se llevó a cabo en tres etapas principales: diseño experimental con 27 sustratos formulados con diferentes concentraciones y tipos de fuentes de nitrógeno y carbono; análisis cinético de la fermentación de kombucha para los sustratos más prometedores; y análisis sensorial comparativo entre las kombuchas producidas. Las variables analizadas incluyeron la tasa y concentración de azúcares residuales, acidez volátil, contenido fenólico total (CFT) y el grado alcohólico. Los resultados indicaron que los sustratos que contenían melaza presentaron mayor acidez volátil y contenido fenólico, superando los valores registrados en los sustratos con azúcar refinado. La fuente de nitrógeno también influyó en el perfil fermentativo, siendo la milhoquina y el trub eficientes para apoyar el crecimiento microbiano. El análisis estadístico reveló que las interacciones entre las fuentes de nitrógeno y carbono fueron significativas para la producción de ácidos y el consumo de azúcares. Además, la cinética de fermentación mostró que, para los sustratos seleccionados, el tiempo óptimo de fermentación fue de 8 días, alcanzándose en ese periodo la máxima productividad de ácidos orgánicos. La kombucha producida con sustratos alternativos presentó características similares a la kombucha tradicional, con la ventaja de ser económicamente viable y ambientalmente sostenible, promoviendo la valorización de residuos agroindustriales. En términos sensoriales, la kombucha fue considerada aceptable, aunque se identificó la necesidad de mejorar el perfil de sabor para reducir la percepción de acidez. Este estudio refuerza el potencial innovador en la producción de kombucha mediante el uso de sustratos no convencionales, como el trub, la milhocina y la melaza, para optimizar el proceso fermentativo y producir una bebida con alto valor agregado, tanto nutricional como sensorial, contribuyendo además a la sostenibilidad en la cadena productiva de alimentos.

Palabras clave: kombuchas análogas, residuos agroindustriales, milhoquina, trub, melaza.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das etapas de preparação dos substratos de kombucha	33
Figura 2 - Aparelhagem esquemática de uma destilação por arraste de vapor	38
Figura 3 – Curvas de nível para as interações entre os fatores (A) [N] e Fonte C e (B) Fonte C e [C] para os resultados de acidez volátil	46
Figura 4 – Curva de nível para a interação entre os fatores Fonte N e [C] para os resultados de graduação alcoólica.....	47
Figura 5 – Curva de nível para a interação entre os fatores Fonte C e [C] para os resultados de CFT	48
Figura 6 – Concentração de açúcar residual (g/L) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.....	51
Figura 7 – Acidez volátil (mEAA/L) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.....	51
Figura 8 – Graduação alcoólica (%) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.....	52
Figura 9 - CFT (mEAG/L) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.	52
Figura 10 – Concentração de açúcares totais (g/L) e de acidez volátil (mEAA/L) por tempo (dias) para o substrato P5R50.....	56
Figura 11 – Concentração de açúcares totais (g/L) e de acidez volátil (mEAA/L) por tempo (dias) para o substrato M5M20.....	57
Figura 12 – Concentração de açúcares totais (g/L) e de acidez volátil (mEAA/L) por tempo (dias) para o substrato T15M20.....	57
Figura 13 – Análise dos atributos de aparência (coloração e turbidez) para as kombuchas análogas (A) M5M20 e (B) T15M20.....	59
Figura 14 – Análise dos atributos de aroma (chá, avinagrado, frutado, azedo e fermentado) para as kombuchas análogas (A) M5M20 e (B) T15M20.....	59
Figura 15 – Análise dos atributos de sabor (chá, avinagrado, doce, frutado e alcoólico) para as kombuchas análogas (A) M5M20 e (B) T15M20.....	60
Figura 16 – Avaliação geral das kombuchas	61

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Diferentes fontes de nitrogênio e carbono para preparo de kombucha	22
Quadro 2 – Fontes e concentrações de nitrogênio e carbono utilizados na formulação dos diferentes substratos de kombucha divididas entre os fatores e níveis investigados no planejamento experimental	31
Tabela 1 – Substratos de kombucha formulados por meio do planejamento experimental com as fontes e concentrações de nitrogênio e carbono.....	32
Tabela 2 – Resultados de taxa de açúcar residual, acidez volátil, graduação alcoólica e CFT para os substratos de kombucha formulados por meio do planejamento experimental	41
Tabela 3 - ANOVA aplicado aos resultados de taxa de açúcar residual	42
Tabela 4 - ANOVA aplicado aos resultados de acidez volátil	42
Tabela 5 - ANOVA aplicado aos resultados de graduação alcoólica	43
Tabela 6 - ANOVA aplicado aos resultados de CFT	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	BEBIDAS FUNCIONAIS.....	16
3.2	KOMBUCHA.....	17
3.2.1	<i>História e popularização da kombucha.....</i>	<i>18</i>
3.2.2	<i>Legislação Vigente para kombucha.....</i>	<i>19</i>
3.2.3	<i>Propriedades da kombucha.....</i>	<i>20</i>
3.2.4	<i>Pesquisas e tendências</i>	<i>21</i>
3.3	FONTE DE NITROGÊNIO	23
3.4	FONTE DE CARBONO.....	25
3.5	FERMENTAÇÃO	27
3.5.1	<i>Leveduras</i>	<i>28</i>
3.5.2	<i>Bactérias.....</i>	<i>29</i>
4	METODOLOGIA	31
4.1	MANUTENÇÃO DA CULTURA STARTER DA KOMBUCHA.....	31
4.2	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS DE KOMBUCHA	31
4.3	AVALIAÇÃO CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA.....	34
4.4	ANÁLISE SENSORIAL DA KOMBUCHA	34
4.4.1	<i>Critérios de exclusão da pesquisa.....</i>	<i>36</i>
4.4.2	<i>Riscos e Benefícios.....</i>	<i>36</i>
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA KOMBUCHA	37
4.5.1	<i>Concentração de Açúcares Totais.....</i>	<i>37</i>
4.5.2	<i>Acidez Volátil</i>	<i>37</i>
4.5.3	<i>Concentração Fenólica Total (CFT)</i>	<i>38</i>
4.5.4	<i>Etanol.....</i>	<i>39</i>
4.5.5	<i>Análise estatística</i>	<i>39</i>
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS DE KOMBUCHA	41
5.2	AVALIAÇÃO CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA.....	50

5.3	ANÁLISE SENSORIAL DAS KOMBUCHAS PRODUZIDAS	58
6	CONCLUSÃO	63
7	REFERÊNCIAS	64
8	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75
9	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO <i>ON LINE</i> PARA ANÁLISE SENSORIAL.....	77
10	APÊNDICE C – RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DAS KOMBUCHAS PRODUZIDAS PARA A ANÁLISE SENSORIAL	83

1 INTRODUÇÃO

As bebidas já estão presentes no cotidiano desde a antiguidade, desde a indispensável água, representando até 70% do volume do corpo humano e presente em basicamente todas as composições de bebidas, até os mais rebuscados coquetéis. De acordo com a legislação brasileira, Lei nº8.918/1994, as bebidas são todo produto industrializado, destinado à ingestão humana, em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica. De forma geral, divide-se as bebidas em alcoólicas, sendo estas fermentadas (como vinho, cerveja e cidra) ou destilados (como vodca, tequila e uísque), e não alcoólicas, como refrigerantes, sucos, bebidas lácteas (como leite e iogurte) e estimulantes (como chás e café) (ELEUTERIO, 2014; VENTURINI FILHO, 2010). Nos últimos anos, há uma tendência de um novo perfil de consumidor que está mais preocupado com a saúde e com questões ambientais, abrindo espaço para a gastronomia funcional.

Acompanhando este novo direcionamento, surgem as bebidas funcionais que são saudáveis e oferecem diversos nutrientes, como água de coco, suco de açaí ou guaraná, chá verde, entre outros. A kombucha surge neste âmbito, sendo uma bebida fermentada produzida através do extrato de *Camellia sinensis* com adição de açúcar e de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (em inglês *symbiotic culture of bacteria and yeast*, SCOBY), passando por um processo de fermentação com duração de 7 a 15 dias comumente. Esse chá fermentado possui componentes como aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, polifenóis, açúcares, antioxidantes, taninos, entre outras substâncias que a tornam uma bebida funcional com grandes benefícios à saúde (LEAL et al., 2018; MIRANDA et al., 2022).

O uso de outros ingredientes para preparar kombucha já é discutido na literatura, utilizando como substitutos para as fontes tradicionais de nitrogênio e/ou carbono, como o trub e o melaço-de-cana respectivamente. Trub é um resíduo úmido das indústrias cervejeiras com alto teor de substâncias orgânicas e quantidades de nitrogênio, fibras e proteínas, além de alguns açúcares sendo a glicose e a xilose os mais abundantes; possui um conteúdo de substâncias bioativas relevantes como compostos fenólicos, taninos e ácidos amargos. O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria de açúcar que encontrou uso na indústria alimentícia como adoçante alternativo que possui uma fonte de carbono abundante em sacarose (ANGELA et al., 2020; DESEO et al., 2020; SARAIVA et al., 2018).

Conforme a fermentação da kombucha ocorre, sabe-se que os microrganismos consomem a sacarose, glicose e frutose, assim suas concentrações diminuem enquanto surge uma maior concentração de etanol, produzido pelas leveduras, e ácidos, produzido

pelas bactérias. Este ácido produzido faz com que o pH da kombucha diminua com o tempo durante a fermentação, sendo os principais o ácido glucônico, glucurônico e acético. Além disso, encontram-se também presentes na composição da kombucha vitaminas, aminoácidos, proteínas, enzimas e outros produtos metabólicos das bactérias e leveduras (BISHOP et al., 2022; KITWETCHAROEN et al., 2023; LEAL et al., 2018).

A soma destes componentes produzidos pelo consórcio microbiano e os compostos obtidos pela infusão de chás estrutura uma bebida potencialmente probiótica com possíveis benefícios para a saúde humana, mesmo que sem muitas evidências científicas baseadas em testes com humanos. Ainda assim, baseados em investigações clínicas, sabe-se de seus efeitos anticâncer, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, hepatoprotetor e anti-inflamatório; além disso, pode auxiliar na desintoxicação, diminuição dos níveis de colesterol e pressão, distúrbios hormonais, manutenção da microbiota intestinal, aumento da imunidade e estimula o metabolismo, também melhorando aspectos estéticos como saúde da pele, cabelo e unhas (KITWETCHAROEN et al., 2023; LEAL et al., 2018; MOUSAVI et al., 2020).

Em função de todos estes benefícios, o mercado de kombuchas vem crescendo significativamente, com o surgimento de diversas marcas oferecendo uma ampla variedade de sabores e ingredientes adicionais, como frutas e especiarias. Pesquisas de mercado mostram que as vendas de kombucha atingiram a marca de US\$ 2,72 bilhões no ano de 2022 a uma taxa de crescimento anual composta de 22,5% no período de 2018-2022 (EXPERT MARKET RESEARCH, 2023).

Considerando esta dinâmica de mercado, a produção de kombuchas e uma busca da sociedade por estilo de vida saudável, este trabalho tem por objetivo avaliar a produção de kombucha a partir de diferentes substratos, analisar a composição química e cinética do processo de fermentação da kombucha, além de aplicar análise estatística e sensorial realizada com uma determinada população.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de kombucha utilizando de resíduos agroindustriais como substrato, investigando a cinética do processo de fermentação e aplicando análise estatística e sensorial.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar produção de kombuchas a partir planejamento experimental com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio e carbono;
- Selecionar a kombucha com o menor teor de açúcar residual e etanol e maior concentração de acidez volátil e conteúdo fenólico;
- Analisar a cinética de fermentação da kombucha para os substratos selecionados e definir o melhor tempo de fermentação;
- Aplicar análise sensorial em relação aos atributos de aparência, sabor e aroma das kombuchas selecionadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bebidas Funcionais

Com o aumento de doenças crônicas e degenerativas a busca por novas formas de tratamento e prevenção aumentaram, somado a uma ampla divulgação da relação entre alimentação e saúde. Logo, entende-se que uma dieta adequada vai além de apenas fornecer energia e os nutrientes essenciais, mas também de desempenhar uma importante função na manutenção do organismo e prevenção de doenças. Os alimentos funcionais são definidos como os produtos alimentícios que, além de satisfazer a fome e fornecer nutrientes ao ser humano, têm efeitos fisiológicos vantajosos, inclusive na prevenção e no tratamento de doenças. Esses produtos podem variar de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente construídos até alimentos processados e derivados de plantas, tendo como principais exemplos compostos bioativos os fitoquímicos, terpenóides, compostos nitrogenados, metabólitos fenólicos, ácidos graxos, polinsaturados, oligossacarídeos e polissacarídeos, fibras, prebióticos e probióticos (BAPTISTA, 2013; WANG; SOYAMA; LUO, 2016).

Entre os alimentos funcionais encontram-se laticínios, bebidas, cereais, produtos de panificação, massas, entre outros, não havendo limitação para a aplicação de melhorias. As bebidas funcionais desempenham um papel importante na alimentação através da reposição de diversos nutrientes, como vitaminas, minerais, polifenóis, compostos antioxidantes, entre outros. Geralmente, diferentes compostos podem ser adicionados nas bebidas tornando-a complexa, mas com extensa capacidade de auxílio ao organismo; diversos estudos demonstram que para aumentar a absorção de nutrientes, as bebidas necessitam de carboidratos e sódio a fim de estimular a absorção e retenção de fluídos, colaborando para a hidratação do corpo e absorção de outros compostos (BROUNS; KOVACS, 1997; MENDIOLA et al., 2008; WANG; SOYAMA; LUO, 2016).

As bebidas funcionais podem ser divididas em quatro categorias: as bebidas energéticas que são estimulantes e de rápida absorção, podendo conter cafeína, taurina, guaraná ou ginseng; as bebidas enriquecidas que são aquelas fortificadas com vitaminas, minerais ou outros ingredientes funcionais, com objetivo de promover o aumento da ingestão de nutrientes; as bebidas desportivas que são as que beneficiam o atleta durante e após a realização de um treino ou atividade esportiva, incluindo as bebidas iso, hipo e hipertônicas; e por fim, as bebidas nutracêuticas que funcionam com a combinação de ingredientes para

promover a melhoria na *performance* mental ou física ou algum outro propósito específico (BAPTISTA, 2013).

Além disso, o uso crescente da biotecnologia no desenvolvimento de alimentos e bebidas funcionais voltados à saúde e bem-estar do consumidor tem se tornado um foco significativo de pesquisa, desenvolvimento e inovação. Este aumento nas pesquisas está aproximando a kombucha e outros produtos fermentados não tradicionais ao mercado consumidor. Simultaneamente, estratégias de marketing têm se concentrado em disseminar informações e esclarecer aos consumidores sobre a aplicação, qualidade e segurança dos alimentos e produtos biotecnológicos. A expansão do mercado para produtos alimentícios biotecnológicos é destacada como uma ação futura crucial, conforme delineado no Roadmap de Biotecnologia 2031 (SISTEMA FIEP, 2019).

3.2 Kombucha

O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) define através da Instrução Normativa (IN) nº 41/2019, que 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. Nesta IN também são determinados os ingredientes obrigatórios para a produção de kombucha: água potável, infusão ou extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá preto, verde, oolong etc.) como fonte de nitrogênio, açúcares como fonte de carbono e a cultura simbiótica de bactérias e leveduras (do inglês, *symbiotic culture of bacteria and yeasts*, SCOBY) (MAPA, 2019a).

O processo tradicional para produção de kombucha conta com chá verde ou preto, que com adição de sacarose são considerados o substrato perfeito para a fermentação. Ambos os chás são a fonte principal de nitrogênio para a fermentação, mas cada tipo de chá pode trazer diferentes composições e características sensoriais. Como fonte principal de carbono tem-se o açúcar, sendo majoritariamente utilizado o açúcar refinado em concentrações que podem variar a depender do produto desejado. A concentração de açúcar é extremamente importante para o crescimento dos microrganismos presentes na fermentação, visto que o mesmo o utilizam para produção de energia (JAKUBCZYK et al., 2020; MIRANDA et al., 2022).

O processo de fermentação da kombucha acontece em duas etapas, sendo a primeira fermentação aeróbica e durando de 7 a 21 dias. Posteriormente, é feita a saborização da kombucha, onde ingredientes como frutas, especiarias, ervas e outros são adicionados, para então realizar a segunda fermentação, sendo esta anaeróbica. As concentrações dos

substratos, o tempo, a temperatura e o SCOBY são os principais responsáveis pela concentração de substâncias orgânicas resultantes do processo fermentativo e que desenvolverão as propriedades benéficas da bebida, além do sabor e aroma característico descrito como ácido e carbonatado (COELHO et al., 2020; LEAL et al., 2018; MIRANDA et al., 2022).

Todo este desenvolvimento é promovido pelo SCOBY, que traz consigo todo o consórcio microbiano que realiza o processo de fermentação, mantidos em um biofilme formado por celulose bacteriana (MOUSAVI et al., 2020). As bactérias e leveduras presentes podem ser diferentes para cada produção, o que torna cada SCOBY um consórcio microbiano único; ainda assim, os microrganismos predominantes do SCOBY são as bactérias ácido acéticas, tais como os gêneros *Komagataeibacter*, *Acetobacter* e *Gluconobacter*, e leveduras, principalmente *Brettanomyces*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*; também encontram-se em menores porcentagens as bactérias ácido lácticas, principalmente o gênero *Lactobacillus* (BISHOP et al., 2022; KITWETCHAROEN et al., 2023; LEAL et al., 2018; MIRANDA et al., 2022).

3.2.1 História e popularização da kombucha

A história da kombucha é misteriosa não se sabendo muito sobre sua origem, mas acredita-se que tenha iniciado sua utilização no leste asiático, em meados de 220 a.C. durante a Dinastia Tsin, por suas propriedades desintoxicantes e energizantes. O consumo de chá, bebida originalmente definida como a infusão das folhas de *Camellia sinensis*, sempre foi bastante comum na China, mas a origem de sua fermentação é desconhecida; muitas lendas informam que a busca de um elixir que trouxesse a vida eterna era um grande enfoque entre médicos e estudiosos da época, que acidentalmente acabaram descobrindo a kombucha e conhecendo suas propriedades desintoxicantes e energizantes. Por conta das rotas comerciais, a bebida foi se espalhando pelo leste asiático chegando a países como Índia, Coreia, Japão, Filipinas e Rússia; conta-se histórias de que, em 414, o Doutor Kombu levou o “fungo do chá” da Coreia ao Japão a fim de curar os problemas digestivos do imperador. Quando a kombucha foi introduzida na Rússia pelos mercantes orientais, ela se espalhou pelo país até chegar a Europa, se difundindo pela Alemanha e outros países (BISHOP et al., 2022; COELHO et al., 2020; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Com a crescente difusão da kombucha sendo compartilhada entre amigos e a popularização de suas propriedades benéficas, a bebida rapidamente alcançou proporções mundiais, levando ao surgimento de diversas empresas dedicadas à sua produção. A

industrialização da Kombucha teve início em 1990 na Califórnia, Estados Unidos, um marco que impulsionou a expansão do mercado. Atualmente, a maioria das empresas produtoras de Kombucha está localizada nos Estados Unidos e Canadá, destacando-se também países como México, Espanha e Austrália (BARROS; BOTELHO; CHISTÉ, 2024). No Brasil, a Kombucha ganhou popularidade a partir de 2018, culminando na implementação de regulamentações específicas em 2019. Essas regulamentações têm sido fundamentais para garantir a qualidade e segurança do produto no mercado nacional, refletindo um crescimento significativo tanto em produção quanto em consumo (MAPA, 2019a).

Atualmente, a maior preocupação com a saúde e bem-estar, além da conscientização para consumo de produtos mais naturais, tem impulsionado as vendas de kombucha no mercado que cresce significativamente, inclusive com o surgimento de diversas marcas produtoras. Pesquisas de mercado mostram que as vendas de kombucha atingiram a marca de US\$ 2,72 bilhões no ano de 2022 a uma taxa de crescimento anual composta de 22,5% no período de 2018-2022 e, possivelmente, atingirá a marca de US\$ 10,3 bilhões em 2028, com uma taxa de 24,8% prevista para o período de 2023-2028 (EXPERT MARKET RESEARCH, 2023).

3.2.2 Legislação Vigente para kombucha

Assim como qualquer bebida, a kombucha está sujeita a regulamentações que asseguram sua padronização e adequação ao consumo humano. No Brasil, a Instrução Normativa (IN) nº 41, de 17 de setembro de 2019, expedida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o principal ato normativo que regulamenta e define os padrões de identidade e qualidade da kombucha em todo o território nacional (MAPA, 2019a). Apesar disso, outras legislações abrangentes podem estar relacionadas à produção e comercialização de kombucha, especialmente por meio de regulamentações gerais aplicáveis a bebidas fermentadas.

A Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, estabelece os padrões gerais para a produção e comercialização de bebidas no Brasil, definindo categorias de produtos regulamentados, incluindo as bebidas fermentadas, como a kombucha (BRASIL, 1994). Complementando essa lei, o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, detalha os padrões de identidade e qualidade para diversas bebidas, além de requisitos para rotulagem, fabricação e comercialização (BRASIL, 2009). Embora a kombucha não seja mencionada especificamente, sua categorização como fermentado acético permite que seja abrangida por essas disposições.

Além disso, diversas Instruções Normativas (INs) contribuem para a regulamentação técnica da produção de bebidas: a IN nº 5, de 31 de março de 2000: aprova o Regulamento Técnico para a fabricação de bebidas e vinagres, incluindo orientações para controle de qualidade, composição e processos de fabricação (MAPA, 2000); a IN nº 55, de 18 de outubro de 2002: estabelece critérios para rotulagem e denominação de produtos, sendo relevante para produtores de kombucha que precisam atender às normas de identificação e apresentação (MAPA, 2002); e a IN nº 24, de 8 de setembro de 2005: aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagre, contendo protocolos para análise físico-química e padrões oficiais para registros de bebidas fermentadas (MAPA, 2005).

A regulamentação também se estende aos fermentados acéticos, com a IN nº 6, de 3 de abril de 2012, que define os padrões de identidade e qualidade dessa categoria de bebidas (MAPA, 2012a). Complementarmente, a IN nº 34, de 29 de novembro de 2012, detalha padrões para fermentados como sidra, hidromel, e outros similares (MAPA, 2012b). Ambas foram alteradas pela IN nº 16, de 19 de março de 2020, que proíbe o uso de açúcar na elaboração de fermentados de fruta destinados à produção de fermentados acéticos (MAPA, 2020). Finalmente, a IN nº 75, de 31 de dezembro de 2019, estabelece critérios analíticos para fiscalização e controle de bebidas fermentadas, vinhos e derivados, tanto nacionais quanto importados (MAPA, 2019b).

Apesar da IN nº 41/2019 ser o único ato normativo específico para kombucha, estas outras legislações aplicáveis à produção geral de bebidas, bebidas fermentadas e fermentados acéticos fornecem um arcabouço regulatório importante para sua produção e comercialização.

3.2.3 Propriedades da kombucha

A união das substâncias provindas do substrato juntamente com os compostos formados durante a fermentação torna a kombucha uma bebida rica em compostos orgânicos e inorgânicos capazes de proporcionar diversos benefícios à saúde humana. Polifenóis, açúcares, ácidos orgânicos, fibras, etanol, aminoácidos, aminas bioativas, purinas, lipídios, proteínas, minerais (cobre, ferro, manganês, níquel, zinco etc.), vitaminas, dióxido de carbônico e substâncias antibióticas são alguns dos componentes que podem estar presentes na kombucha e contribuem para as suas propriedades nutricionais (KITWETCHAROEN et al., 2023; LEAL et al., 2018; MIRANDA et al., 2022).

Na kombucha, já foram identificados diversos ácidos orgânicos e compostos fenólicos, especialmente flavonoides, que contribuem para o aumento da propriedade antioxidante

reduzindo a quantidade de radicais livres e, conseqüentemente, impedindo que as células sofram estresse oxidativo. Esta propriedade pode estar relacionada com a melhoria em atividades metabólicas do corpo, como a diminuição de inflamações, redução das chances de doenças cardiovasculares e melhora da imunidade e aparência de pele, cabelo e unhas. Ademais, estuda-se a capacidade anticâncer da kombucha, já que os polifenóis provindos do chá podem impedir a alteração genética inibindo a propagação e promovendo a apoptose de diversos tipos de células cancerígenas; também é observado o equilíbrio do pH do sangue em pessoas em tratamento (CARDOSO et al., 2020; KITWETCHAROEN et al., 2023; MOUSAVI et al., 2020).

Estuda-se também a capacidade da kombucha atuar como antimicrobiano e antifúngico contra bactérias e fungos patogênicos, respectivamente, já que os microrganismos do SCOBY produzem metabólitos, como ácidos orgânicos e catequinas, capazes de inibir o crescimento de patógenos; para a kombucha, a concentração mínima de inibição foi considerada de 250 µL/mL para bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* respectivamente (CARDOSO et al., 2020; KITWETCHAROEN et al., 2023; MIRANDA et al., 2022; MOUSAVI et al., 2020).

Ademais, a kombucha possui vitaminas do complexo B, C e E e minerais que são essenciais nas vias metabólicas e diferentes funções fisiológicas; também já foram observadas propriedades antidiabéticas, redução de colesterol e pressão sanguínea, propriedades como melhora da circulação, suporte ao sistema imunológico e nervoso, estímulo à desintoxicação e as funções gastrointestinais e mantem o equilíbrio hormonal. Entretanto, é importante salientar que os estudos são realizados predominantemente em animais ou *in vitro*, em culturas de células de animais ou humanos, não havendo evidências ainda que sustentem esses benefícios à saúde humana (JAKUBCZYK et al., 2020; KITWETCHAROEN et al., 2023; MIRANDA et al., 2022; XU et al., 2020).

3.2.4 Pesquisas e tendências

Dentre as pesquisas realizadas com kombucha, há interesse sobre a preparação de kombuchas análogas, ou seja, onde se utiliza de outros ingredientes não tradicionais na primeira fermentação da kombucha a fim de obter uma bebida com diferentes perfis químicos e sensoriais. É de grande interesse a utilização de resíduos agroindustriais como efluentes de vinícolas, subprodutos da fabricação de polpas e sucos, cascas de frutas ou árvores e outros mais que serão valorizados e enriquecerão a kombucha com diversos compostos bioativos (CUBAS et al., 2023; LEONARSKI et al., 2022).

Para a utilização destes resíduos muitas vezes são necessários processos como secagem, infusão, trituração, esterilização, diluição, entre outros a fim de que possam ser utilizados para a preparação da kombucha, entregando um produto fermentado com características organolépticas e nutricionais para os consumidores garantindo a padronização e qualidade. Mesmo assim, a utilização dos resíduos agroindustriais é uma incrível oportunidade por ser sócio, econômico e ambientalmente sustentável (CUBAS et al., 2023; LEONARSKI et al., 2022).

No Quadro 1 são apresentadas literaturas que utilizaram diferentes fontes de nitrogênio e carbono na primeira fermentação para a produção de kombuchas análogas. Assim, é possível observar diversas maneiras de produzir kombucha por meio da fermentação de diferentes substratos com variadas fontes de nitrogênio e carbono.

Quadro 1 – Diferentes fontes de nitrogênio e carbono para preparo de kombucha

Fonte de Nitrogênio	Fonte de Carbono	Referência
Chá verde e café 100% arábica Catuaí vermelho	Sacarose	Saito, Santos e Mamede (2024)
Cascas de grão de café arábica	Sacarose	Le et al. (2024)
Café arábica, robusta e liberica	Sacarose	Karyantina, Surulloh e Suhartatik (2024)
Raspas de Madeira de <i>Caesalpinia sappan</i> L.	Sacarose	Zubaidah et al. (2024)
Cogumelo <i>Ganoderma lucidum</i> em pó e chá verde	Sacarose	Elfirta et al. (2024)
Extrato de <i>Curcuma aeruginosa</i> e chá preto	Sacarose	Hartati et al. (2024)
Flores secas de clitoria (<i>Clitoria ternatea</i> L.)	Sacarose	Kushargina et al. (2024)
Folhas e flores de chá grego da montanha (<i>Sideritis scardica</i>)	Mel de Tomilho	Kartelias et al. (2023)
Chá de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Sacarose	Purwaningtyas e Cahyaningtyas (2024)
Cascas de maçã (<i>Malus sylvestris</i>) seca	Sacarose	Fitriasari e Zahrotunisya (2024)

Extrato de folhas de <i>Saurauia vulcani</i> Korth.	Sacarose	Sinaga et al. (2024)
Algas <i>Eucheuma cottonii</i> secas	Sacarose	Rachmawati et al. (2023)
Bagaço de uva	Sacarose	Barakat et al. (2024)
Subprodutos de abacaxi (casca e núcleo) secos	Sacarose	Sornkayasit et al. (2024)
Fruto da jujubeira (<i>Ziziphus jujubas</i>) em pó	Sacarose	La Torre et al. (2024)
Suco de noni (<i>Morinda citrifolia</i>) com chá preto	Sacarose	Surya (2024)
Chá verde em pó	Melaço	Selvaraj e Gurumurthy (2024)
Soro do Leite	Sacarose	Suciati et al. (2024)

As fontes de nitrogênio e carbono são imprescindíveis para o sucesso do processo fermentativo, dado que é por meio delas que os microrganismos irão realizar conversões enzimáticas a fim de produzir energia para sobreviver ao mesmo passo que convertem o substrato em novos componentes que enriquecem a kombucha.

3.3 Fonte de Nitrogênio

A palavra chá vem do mandarim e, conceituado através da botânica, refere-se à planta herbácea *Camellia sinensis*, da família das teáceas, nativa da China e da Índia; suas folhas são alternas, coriáceas e levemente dentadas nas bordas, de cor verde-escura brilhante, flores brancas aromáticas com cinco sépalas e cinco pétalas e frutos capsulares. Por conta disso, o produto da infusão das folhas de chá também é denominado chá, mas culturalmente, o termo similarmente se estende a qualquer infusão preparada com ervas, medicinal ou não (NAMITA; MUKESH; VIJAY, 2012). O processamento das folhas de chá pode originar quatro tipos de chá diferentes, dependendo do grau de oxidação que as folhas são submetidas: o chá branco, que não passa por nenhum processo de oxidação; o chá verde, que passa por processo de oxidação moderado; o chá oolong, que passa por processo de oxidação parcial; e o chá preto, totalmente oxidado (NAMITA; MUKESH; VIJAY, 2012; XU et al., 2020).

Os chás verde e preto são os mais populares em todo o mundo, sendo considerados saudáveis por suas possíveis propriedades quimiopreventivas que inativam o oxigênio dos

radicais livres potencialmente prejudiciais no sistema corporal, além de prevenir obesidade, câncer de mama e doenças coronárias e cardiovasculares. As folhas de chá verde contêm teores de extrato etéreo, taninos, saponinas e compostos fenólicos mais elevados; entre os polifenóis há diversos flavonóis e catequinas, como epicatequina, epigallocatequina, galato-3-epicatequina e galato-3-epigallocatequina, que possuem potenciais benefícios à saúde, entre eles atividade antioxidante e eliminação de radicais livres (LEE et al., 2019; RAMDANI; CHAUDHRY; SEAL, 2013; XU et al., 2020).

Para que não ocorra a oxidação das folhas de chá verde, a enzima polifenol oxidase é desativada através de vaporização ou outros processos de aquecimento. Enquanto isso, a oxidação do chá preto gera uma reação entre quinonas e catequinas, produzindo então os polifenóis teaflavinas e tearubiginas, responsáveis pela cor e sabor fortes; além disso o teor de fibras é maior no chá preto, mesmo assim ambos os chás possuem quantidades equivalentes de proteínas, matéria orgânica e minerais. Estas diferenças nas composições químicas também refletem as diferenças nas variedades, tipos de solo e processos de fabricação a que diferentes folhas de chá foram expostas durante as suas diferentes fases de crescimento e processamento (LEE et al., 2019; RAMDANI; CHAUDHRY; SEAL, 2013; XU et al., 2020).

A infusão das folhas de *Camellia sinensis* é considerada o substrato original e tradicional para a produção de kombucha, oferecendo polifenóis, polissacarídeos, aminoácidos, taninos, poliaminas, alcaloides, óleos voláteis, vitaminas, flavonoides, catequinas, cafeína e outros recursos para a manutenção dos microrganismos e formação dos componentes finais, propriedades e características sensoriais da bebida (LEE et al., 2019; XU et al., 2020; YILMAZ; ÖZDEMİR; GÖKMEN, 2020). Os aminoácidos são responsáveis por importantes reações metabólicas como a síntese proteica. Os principais aminoácidos encontrados no chá são glicina, alanina, serina, ácido glutâmico, arginina, tirosina, fenilalanina e triptofano (KAZAN et al., 2019; YILMAZ; ÖZDEMİR; GÖKMEN, 2020).

Uma alternativa viável como fonte de nitrogênio para a fermentação é o trub, um resíduo úmido gerado pelas indústrias cervejeiras. Este subproduto apresenta um alto teor de substâncias orgânicas, como nitrogênio, fibras, proteínas e açúcares, sendo a glicose e a xilose os carboidratos mais abundantes. O trub é constituído por uma fração significativa de sólidos suspensos que precipitam durante a fervura do mosto, sendo removidos antes do início da fermentação para garantir um produto final clarificado. Sua composição é majoritariamente formada por proteínas insolúveis de alto peso molecular, podendo variar dependendo de fatores como o tipo, a concentração e o grau de solubilização das substâncias

empregadas na produção do mosto, além do processo de trituração e do controle de pH durante a fabricação (ELLWANGER, 2022; MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014).

Esse resíduo contém substâncias bioativas relevantes, incluindo compostos fenólicos, taninos e ácidos amargos (como lupulona, cohumulona e humulona), derivados principalmente do lúpulo. Esses compostos possuem propriedades antioxidantes que podem agregar valor ao processo fermentativo e ao produto final. Estudos indicam que a adição de quantidades substanciais de trub em mostos fermentáveis promove uma atividade mais vigorosa das leveduras, resultando em uma fermentação mais rápida e eficiente. (ELLWANGER, 2022; SARAIVA et al., 2018, 2019).

A milhocina também se caracteriza como uma excelente fonte de nitrogênio para desenvolvimento de microrganismos, sendo essa o resíduo de maceração do milho para produção de amido. A composição da milhocina pode variar para cada produção, mas estudos comprovam que, em média, 6,9% dos sólidos do milho e 30% do nitrogênio do milho, em grande parte aminoácidos (alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina e valina) e polipeptídios, são encontrados nesta. Além destes, a milhocina também apresenta carboidratos, açúcares, minerais, vitaminas e fosfato (LIGGETT; KOFFLER, 1948). Por fim, esse resíduo apresenta potencial para o crescimento de microrganismos, sendo evidente sua utilização para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* (SILVEIRA et al., 2001), ou ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* (RIVAS et al., 2004).

Além das várias fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas na fermentação da kombucha, principalmente para a síntese proteica, é essencial abordar as fontes de carbono, que desempenham um papel igualmente crucial no processo fermentativo. A disponibilidade de carbono, principalmente na forma de açúcares, é fundamental para o crescimento e atividade metabólica dos microrganismos envolvidos na fermentação.

3.4 Fonte de Carbono

Os microrganismos presentes no SCOBY são, majoritariamente, quimiorganotróficos, ou seja, necessitam de uma fonte de carbono para a biossíntese de diversos constituintes celulares, como os carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e outros. Na natureza, grande parte das fontes de carbono são açúcares não redutores, como sacarose, lactose e amido. Estes precisam sofrer hidrólise da ligação glicosídica para oxidar e formar açúcares redutores, tal qual glicose, frutose e galactose, para serem catabolizados pelas vias centrais dos microrganismos. Dessa forma, a reação fermentativa é influenciada pelo tipo de glicídio

utilizado uma vez que as macromoléculas das fontes de carbono precisam ser convertidas em unidades menores por enzimas despolimerizantes antes de serem utilizadas pelos microrganismos (AMARAL, 2022; AZLAN et al., 2020).

Para bebidas em geral, a sacarose é considerada a fonte de carbono convencional, logo a fermentação ocorrerá a partir de um dissacarídeo que necessita ser reduzido a glicose e frutose. A cana-de-açúcar é rica em sacarose e contém moderadas quantidades de ácidos fenólicos, polifenóis e flavonoides, além de ser considerada uma das matérias-primas mais importantes para as indústrias e economia nacional. A produção de açúcar envolve o processamento da cana através de lavagem, extração, purificação, cristalização, secagem e embalagem dando origem ao tradicional açúcar refinado; este fica com 99% de sacarose e perde as fibras e nutrientes. Outros açúcares, como o mascavo ou demerara, passam por uma mínima purificação e são consequentemente mais escuros, mas com uma carga maior de fibras e nutrientes e ainda com 88 a 93% de sacarose (AZLAN et al., 2020).

A concentração ideal de sacarose para a fermentação da kombucha é considerada 50 g/L, mas pode variar de acordo com a preferência do produtor tendo em vista o perfil final desejado para a bebida. Sabe-se que o tipo e a concentração de açúcar utilizado podem acelerar ou retardar o processo já que afetam a quantidade de espécies presentes e o crescimento dos microrganismos. Além disso, também influencia nos produtos da fermentação, como enzimas extracelulares, álcoois, ácidos e entre outros (AMIRI et al., 2024; HANIFAH et al., 2022; SALEHI; SADEGHI; KARIMI, 2021).

Além do açúcar branco, demerara ou mascavo, estudos recentes revelaram o potencial de outras fontes como açúcar de coco, de palma, mel ou, ainda, alguns resíduos agroindustriais como palha de trigo, casca de arroz e melaço de beterraba ou cana. O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria açucareira já utilizado na indústria alimentícia como adoçante alternativo, visto que possui uma fonte de carbono abundante em sacarose. A caracterização do melaço é um desafio, visto que sua composição é influenciada por sua origem e pelos métodos de produção, que variam desde a moagem da cana-de-açúcar até a extração. Sua composição é altamente variável, mas sabe-se que a quantidade de melaço final é geralmente 2,7% do peso da cana-de-açúcar e sua composição contém entre 50 e 60% de sacarose, além de ser uma rica fonte de polifenóis e minerais e com capacidade de maximizar a fermentação de microrganismos. O melaço já é utilizado industrialmente para produção de etanol, dextrano, goma xantana, glutamato monossódico, e ainda possui diversas outras aplicações na indústria farmacêutica, bioquímica e outras (AMIRI et al., 2024; ANGELA et al., 2020; DESEO et al., 2020; MUHIALDIN et al., 2019).

3.5 Fermentação

A fermentação é um processo bioquímico anaeróbico no qual os microrganismos geram energia (ATP) utilizando compostos orgânicos que atuam simultaneamente como doadores e aceptores de elétrons. Essa definição é amplamente aceita nas áreas de microbiologia e bioquímica. No entanto, quando aplicada aos alimentos fermentados, o conceito requer adaptações para refletir a complexidade do processo. Em 2019, a definição de alimentos fermentados foi reformulada, sendo descritos como produtos obtidos por meio do crescimento controlado de microrganismos desejáveis, que promovem conversões enzimáticas nos componentes alimentares. Essa abordagem reconhece que, além das transformações metabólicas dos microrganismos anaeróbios, microrganismos aeróbios também podem desempenhar um papel essencial na modificação dos atributos químicos, sensoriais e funcionais dos alimentos fermentados (MARTIN; LINDNER, 2022).

A fermentação da kombucha é considerada natural e acontece por uma associação simbiótica entre bactérias e leveduras organizadas em uma matriz de celulose, nomeada SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*). As leveduras, com a enzima invertase, catalisam a hidrólise da sacarose em frutose e glicose e produzem etanol pela via glicolítica; enquanto isso, bactérias acéticas produzem ácido acético por meio das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase oxidando o etanol. O ácido acético produzido pelas bactérias estimula as leveduras a sintetizar etanol. Esse etanol é posteriormente consumido pelas bactérias. Ao final do processo, são obtidos água e gás carbônico e a glicose é convertida em ácido glucônico e glucurônico, por meio da via das pentoses-fosfato. Outros ácidos, como lático, cítrico, oxálico e málico, também podem ser formados durante esse processo. Dessa forma, o substrato inicial rico em sacarose e oxigênio se transforma em um produto carbonatado e rico em ácidos e compostos orgânicos. (LEONARSKI et al., 2022; MIRANDA et al., 2022).

O processo microbiológico da fermentação da kombucha ocorre em duas etapas principais. A primeira fermentação, realizada na presença de oxigênio, é caracterizada como um processo aeróbico, com a participação ativa de bactérias e leveduras. Essa etapa dura, geralmente, de 7 a 30 dias, dependendo das condições ambientais e do substrato utilizado. Já a segunda fermentação ocorre na ausência de oxigênio, sendo considerada um processo anaeróbico, no qual as leveduras desempenham o papel principal. Diversos fatores influenciam o processo fermentativo e a biodiversidade microbiana de um SCOBY para outro. Entre os principais estão a localização geográfica, que afeta as espécies microbianas predominantes; as condições climáticas; as espécies locais de bactérias e leveduras; o

substrato utilizado, incluindo tipo de chá e fontes de carbono e nitrogênio; o tempo de fermentação; a temperatura, seja ambiente ou controlada; e as concentrações de nitrogênio e carbono disponíveis (KITWETCHAROEN et al., 2023; MIRANDA et al., 2022; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Para garantir uma kombucha mais estável, é essencial projetar um processo de fermentação controlado, baseado no conhecimento detalhado dos microrganismos envolvidos. A identificação desses microrganismos, tanto no biofilme celulósico quanto dispersos na bebida, é fundamental para esse controle. Estudos conduzidos por Chakravorty et al. (2016), Fabricio et al. (2022) e Villarreal-Soto et al. (2020) utilizaram o sequenciamento de nova geração (NGS) para mapear a microbiota residente de diferentes amostras de kombucha, identificando diversos gêneros e espécies de microrganismos presentes no processo fermentativo.

Além disso, o desenvolvimento de consórcios microbianos personalizados para a fermentação da kombucha tem sido foco de estudos recentes. Essa abordagem permite a utilização de cepas específicas de leveduras e bactérias com o objetivo de otimizar o perfil volátil da bebida, melhorar a aceitação sensorial e, principalmente, aprimorar o controle sobre o processo fermentativo. A seleção de microrganismos adequados pode resultar em um produto final com características aromáticas, sensoriais e químicas superiores, além de aumentar os potenciais benefícios funcionais para a saúde (FABRICIO et al., 2023; LEALI et al., 2022; SAVARY et al., 2021). Essa estratégia também visa a obtenção de uma kombucha padronizada e de alta qualidade, garantindo consistência no sabor, aroma e composição bioquímica, o que é crucial para a comercialização em larga escala. Ao controlar melhor a fermentação, reduz-se a variabilidade entre lotes, aumentando a estabilidade do produto final e, conseqüentemente, sua aceitação pelo mercado.

3.5.1 Leveduras

Leveduras são microrganismos eucarióticos com células esféricas ou ovais de cerca de 8 µm de diâmetro, majoritariamente imóveis e facultativamente anaeróbicos; o crescimento ideal ocorre em temperaturas entre 20 e 30 °C e pH entre 4,5 e 7,0, mas muitas leveduras ainda podem crescer em pH 2,5. As leveduras são parte integral da fermentação da kombucha desempenhando a função de hidrolisar a sacarose e outros açúcares complexos em glicose e frutose por meio da liberação da enzima invertase; posteriormente, elas convertem esses açúcares redutores em etanol e gás carbônico utilizando a via glicolítica. Além disso, em determinadas condições, leveduras também podem produzir, em menor proporção, glicerol,

ácido acético, álcoois superiores e ésteres que contribuem para a formação de aromas (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020).

Comparada às bactérias, a diversidade de leveduras que habita a kombucha é menor, composta predominantemente pelos gêneros *Dekkera/Brettanomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (FABRICIO et al., 2022; LEONARSKI et al., 2022).

3.5.2 Bactérias

As bactérias ácido acéticas (BAA) são os microrganismos mais característicos da fermentação da kombucha. As BAAs são gram-negativas pertencentes a família *Acetobacteraceae*, com células elipsoidais e em forma de bastonete, não esporulam e podem ser móveis. Além disso, são estritamente aeróbias, mas podendo sobreviver em condições de baixa oxigenação. O crescimento ideal destas bactérias ocorre em temperaturas entre 25 e 30 °C e pH 5,0 e 6,5, mas muitas ainda crescem em pH 3,0 a 4,0 ou ainda mais baixo. Um traço característico das BAA, e sua principal função na fermentação da kombucha, é a oxidação periplasmática de álcoois, aldeídos, açúcares e polióis na presença de oxigênio por desidrogenases localizadas na superfície externa de sua membrana citoplasmática. Dessa forma, o etanol proveniente da fermentação das leveduras é oxidado em acetaldeído e, posteriormente, em ácido acético. Além disso, a glicose pode ser oxidada em ácido glucônico, ácido glucurônico, ácido 2-cetoglucônico, ácido 5-cetoglucônico e ácido 2,5-diketoglucônico (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Ademais, na falta de etanol, as BAA também oxidam glicerol em dihidroxiacetona (DHA). O DHA pode entrar na via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e na via da gliconeogênese, resultando na produção de celulose, resultando no biofilme formado na interface líquido-ar. A matriz de celulose é um subproduto da fermentação com aparência gelatinosa permitindo que os microrganismos permaneçam no líquido próximo à interface para obter o oxigênio necessário para o seu metabolismo. Esta camada, que promove uma barreira física contra radiação UV, possui uma grande concentração de microrganismos (MIRANDA et al., 2022). Além disso, a celulose bacteriana é formada por nanofibras com a superfície em contato com líquido sendo mais porosa, possui ótimas propriedades mecânicas, alta retenção de água, pureza e cristalinidade, além de ser biocompatível (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020; LEONARSKI et al., 2021b; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Embora existam cerca de 17 gêneros de BAA, a maioria das bactérias presentes na kombucha pertence aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. Especificamente, as espécies *Komagataeibacter rhaeticus*,

Komagataeibacter hansenii e *Komagataeibacter xylinus* são as principais responsáveis pela formação de celulose e com maior abundância no biofilme (FABRICIO et al., 2022; LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020; LEONARSKI et al., 2021b). Além disso, a temperatura de fermentação é um fator determinante na presença de determinados ácidos. Estudos indicam que uma temperatura de fermentação mais elevada, próxima de 30 °C, afeta a diversidade microbiana, favorecendo a seleção de diferentes espécies de *Gluconacetobacter*, que promovem a produção de ácidos orgânicos. Em contrapartida, temperaturas de fermentação mais baixas, em torno de 20 °C, favorecem o crescimento de bactérias do gênero *Acetobacter* (FILIPPIS et al., 2018; VILLARREAL-SOTO et al., 2020).

A presença de bactérias ácido lácticas (BAL) é um pouco inconsistente, visto que não estão presentes ou estão em pouca quantidade. BAL são gram-positivas pertencentes ao filo dos Firmicutes, não móveis, em forma de bastonetes ou esféricos e não esporulam. Seu crescimento ideal é em temperaturas entre 25 e 40 °C e pH 4,0 e 6,0, o que denota sua baixa presença em pH mais baixos. BAL são características na fermentação de produtos lácteos, pela presença de lactose no substrato que é convertida em ácido láctico. Algumas linhagens podem estar associadas por fermentar glicose em outros metabólitos como etanol, ácido acético, diacetil, gás carbônico e manitol. Os principais representantes deste grupo incluem *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus nagelii*, por serem tolerantes a meio ácido (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção da cultura *starter* da kombucha

Para o preparo das kombuchas foi mantida uma colônia de kombucha onde os microrganismos se mantinham ativos recebendo substrato e de onde sempre se retirava os *starters* necessários para inoculação dos novos substratos; este também recebia as membranas de celulose formadas e foi nomeado de hotel. Para manutenção do hotel, a cada 15 dias era adicionado 500 mL de solução de 2,5 g de chá preto (5 g/L) infusionado com água a 80 °C por 10 min, resfriado e adicionado 25 g (50 g/L) de açúcar refinado.

4.2 Avaliação de diferentes substratos de kombucha

Considerando as diversas possibilidades de produção de kombucha, foi realizado um planejamento experimental para a avaliação dos substratos presentes no Quadro 2; o software Statistica (versão 12) foi utilizado para gerar o planejamento experimental, que conta com 4 fatores a serem analisados em 3 níveis em um fatorial fracionado $3^{(4-1)}$ resultando nos substratos listados na Tabela 1. Por ser um fatorial fracionado, o software seleciona uma fração representativa dos experimentos através da construção de matriz com balanceamento dos fatores e níveis, garantindo que se possa analisar os fatores principais e interações com confiabilidade em um número menor de ensaios.

Quadro 2 – Fontes e concentrações de nitrogênio e carbono utilizados na formulação dos diferentes substratos de kombucha divididas entre os fatores e níveis investigados no planejamento experimental

Fatores	Níveis		
Fonte de Nitrogênio (Fonte N)	Chá Preto (P)	Milhocina (M)	Trub (T)
Concentração da Fonte de Nitrogênio ([N] em g/L)	5,0	10,0	15,0
Fonte de Carbono (Fonte C)	Açúcar Refinado (R)	Açúcar Cristal (C)	Melaço (M)

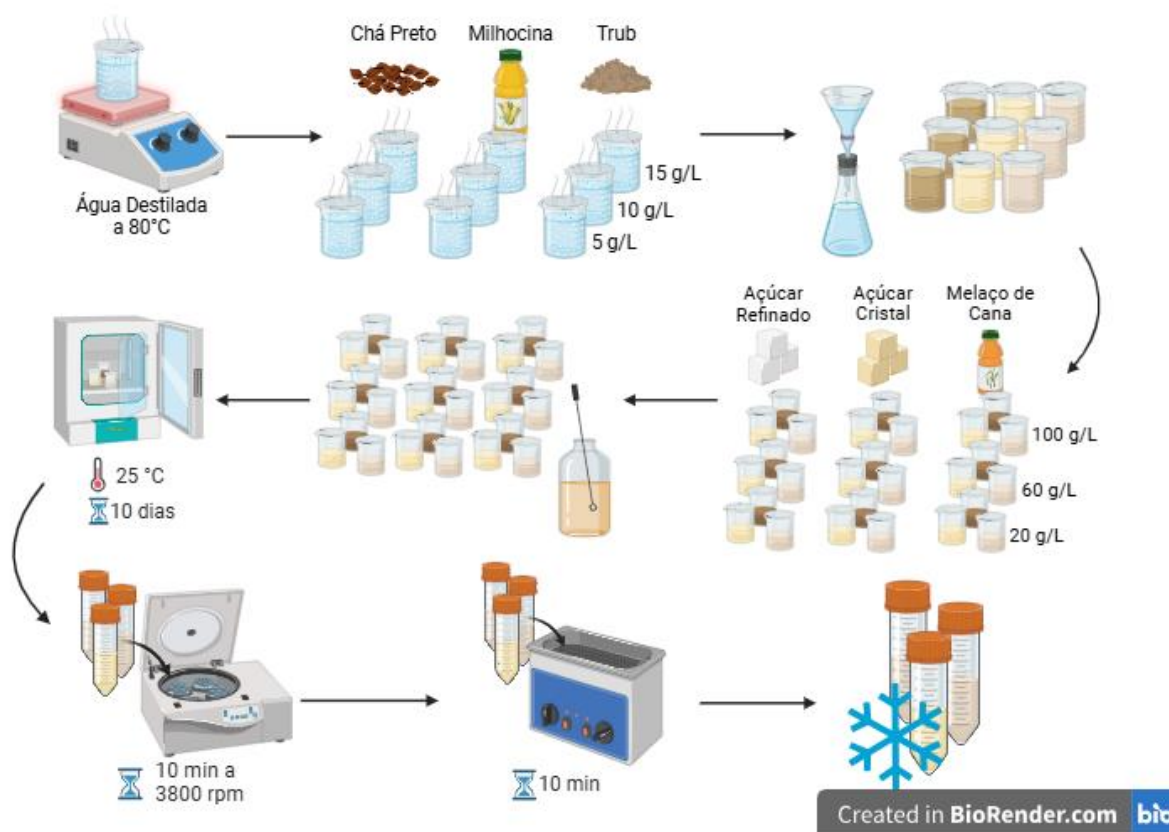
Concentração da Fonte de Carbono ([C] em g/L)	20,0	60,0	100,0
---	------	------	-------

Tabela 1 – Substratos de kombucha formulados por meio do planejamento experimental com as fontes e concentrações de nitrogênio e carbono

Nome	Fonte N	[N] (g/L)	Fonte C	[C] (g/L)
P5R20	Chá Preto	5,0	Açúcar Refinado	20,0
P5C100	Chá Preto	5,0	Açúcar Cristal	100,0
P5M60	Chá Preto	5,0	Melaço	60,0
P10R100	Chá Preto	10,0	Açúcar Refinado	100,0
P10C60	Chá Preto	10,0	Açúcar Cristal	60,0
P10M20	Chá Preto	10,0	Melaço	20,0
P15R60	Chá Preto	15,0	Açúcar Refinado	60,0
P15C20	Chá Preto	15,0	Açúcar Cristal	20,0
P15M100	Chá Preto	15,0	Melaço	100,0
M5R100	Milhocina	5,0	Açúcar Refinado	100,0
M5C60	Milhocina	5,0	Açúcar Cristal	60,0
M5M20	Milhocina	5,0	Melaço	20,0
M10R60	Milhocina	10,0	Açúcar Refinado	60,0
M10C20	Milhocina	10,0	Açúcar Cristal	20,0
M10M100	Milhocina	10,0	Melaço	100,0
M15R20	Milhocina	15,0	Açúcar Refinado	20,0
M15C100	Milhocina	15,0	Açúcar Cristal	100,0
M15M60	Milhocina	15,0	Melaço	60,0
T5R60	Trub	5,0	Açúcar Refinado	60,0
T5C20	Trub	5,0	Açúcar Cristal	20,0
T5M100	Trub	5,0	Melaço	100,0
T10R20	Trub	10,0	Açúcar Refinado	20,0
T10C100	Trub	10,0	Açúcar Cristal	100,0
T10M60	Trub	10,0	Melaço	60,0
T15R100	Trub	15,0	Açúcar Refinado	100,0
T15C60	Trub	15,0	Açúcar Cristal	60,0
T15M20	Trub	15,0	Melaço	20,0

Para a preparação dos substratos, conforme a Figura 1, 80 mL de água destilada foi aquecida a 80 °C para a infusão de cada fonte de nitrogênio nas concentrações correspondentes por 15 min. Em seguida, foi realizada filtração para remoção de folhas e partículas maiores para posterior resfriamento. As concentrações correspondentes de cada fonte de carbono foram solubilizadas nas infusões e foi adicionado 20 mL de *starter* de kombucha (20% v/v); retirou-se 2 mL de cada recipiente para quantificação inicial de açúcar e o recipiente foi mantido tampado com um papel e elástico para ocorrer a fermentação aeróbia em estufa a temperatura de 25 °C por 10 dias.

Figura 1 – Representação das etapas de preparação dos substratos de kombucha



Após o tempo da primeira fermentação, cada amostra foi preparada para caracterização físico-química. Para isso, as amostras foram centrifugadas a 3800 rpm por 10 min, a fim de separar o líquido dos microrganismos e partículas, e colocadas em ultrassom por 10 min para decarbonatação; por fim, as amostras foram congeladas até a análise de concentração de açúcares, acidez volátil, concentração de fenólicos totais e graduação alcoólica (item 4.5). Após as análises, determinou-se quais os dois melhores substratos para produção de kombucha de acordo com:

- maior resultado de acidez volátil, seguindo os parâmetros estabelecidos pela IN nº 41/2019 (MAPA, 2019a) que limita a acidez volátil entre 30 e 130 mEq/L;
- maior concentração compostos fenólicos;
- menor taxa de açúcar residual após a fermentação;
- menor resultado de produção de etanol, seguindo os parâmetros estabelecidos pela IN nº 41/2019 (MAPA, 2019a) que limita a graduação alcoólica até 0,5% (v/v).

4.3 Avaliação cinética da fermentação de kombucha

Com os dois melhores substratos definidos a partir dos resultados do planejamento experimental, foi realizada a análise da cinética de fermentação em triplicata, comparando os melhores substratos a um substrato padrão, composto por 5 g/L de chá preto e 50 g/L de açúcar refinado. Para isso prepararam-se os substratos em volumes de 100 mL, seguindo o mesmo procedimento do item anterior, para fermentar de maneira aeróbia em estufa a 25 °C durante 0, 4, 8, 12 e 16 dias. Após o tempo de fermentação, o meio líquido de cada amostra foi centrifugado a 3800 rpm por 10 min, colocado em ultrassom por 10 min e congelado até as análises de caracterização (item 4.5). Por meio dos ensaios, foi analisado o consumo de açúcar e compostos fenólicos e a produção de etanol e ácidos, a fim de definir o tempo ideal da fermentação da kombucha, buscando valor máximo de acidez e mínimo de açúcar. Também foi realizado o cálculo de produtividade máxima para cada substrato a fim de auxiliar na definição do tempo ótimo para maximizar a produção de compostos desejados, garantindo um processo eficiente e sustentável. Considerando que os substratos iniciais, principalmente o açúcar, consumidos durante a fermentação produzem majoritariamente ácidos, tem-se a seguinte equação para produtividade:

$$\text{Produtividade máxima } (P_{max}) = \frac{[A]}{t}$$

onde [A] se refere a maior concentração de ácidos (em mEAA/L) durante a fermentação e t se refere ao tempo correspondente a essa concentração. O resultado de produtividade máxima foi expresso em mililitros de equivalentes de ácido acético por litro e dia (mEAA/L.dia)

4.4 Análise sensorial da kombucha

Definido os melhores substratos e o tempo ideal de fermentação aeróbica, foi realizada a análise sensorial dos substratos mais bem avaliados em comparação ao substrato padrão,

a fim de analisar a aceitação da bebida na comunidade. Para isso, foram produzidos 3 L da kombucha padrão e dos melhores substratos em recipientes de vidro, realizando a infusão da fonte de nitrogênio, filtração, resfriamento, solubilização da fonte de carbono e inoculação do *starter*, conforme item 4.2. A fermentação ocorreu em bancada a temperatura ambiente pelo tempo definido; posteriormente, 2,5 L de cada kombucha foi filtrado em chinoi ultrafino, saborizadas com 250 mL de suco de uva integral (10% v/v) e envasado em garrafas PET de 500 mL para carbonatação (fermentação anaeróbia) por 5 dias. Após esse tempo, as kombuchas foram refrigeradas a 4 °C até o dia da análise sensorial. Além disso, foram retiradas amostras de antes e depois da primeira fermentação e de antes e depois da segunda fermentação para caracterização (item 4.5).

Este projeto foi submetido a análise ética pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univille e foi aprovado para realização da análise sensorial (parecer consubstanciado nº 6.593.411). A análise sensorial ocorreu no mês de junho de 2024 no Laboratório de Bebidas e Análise Sensorial no prédio da Gastronomia da Univille, onde participaram do experimento 71 pessoas da comunidade geral da universidade. Inicialmente, para cada participante foi descrito o objetivo da pesquisa de avaliar a produção de kombucha a partir de diferentes substratos considerando o desenvolvimento de uma marca e a produção de kombuchas relacionados à uma dinâmica de mercado em conjunto a uma maior busca da sociedade por estilo de vida saudável; também foram descritos os produtos que serão analisados, além de seus componentes, compostos formados, os benefícios e riscos que o produto pode oferecer; e por fim, explicou-se sobre o consentimento da participação, mantendo o sigilo quanto aos dados do participante, sendo nenhuma pergunta do questionário obrigatória e com total liberdade a deixar de participar do experimento a qualquer momento, conforme a Resolução CNS 466/2012.

Em seguida, foi entregue um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice A) em duas vias para cada participante assinar e o QRCode com acesso ao questionário *on line*, presente no link <https://forms.gle/J3TPmamywZRuz6hK6> (Apêndice B), juntamente de copos de vidro com as amostras das kombuchas que foram avaliadas, identificadas com etiquetas com letra P para padrão e números aleatórios para os outros substratos; ademais, foram entregues também grãos de café para limpeza olfativa e água para limpeza do paladar. No questionário, cada participante preencheu algumas informações de cunho pessoal, como dados sobre faixa etária, gênero, uso de cigarro, sintomas de gripe ou infecção respiratória etc. Após, cada um avaliou as kombuchas análogas comparadas a padrão quanto a mudança nos atributos de aparência (coloração e turbidez), aroma (chá,

fermentado, frutado, azedo e avinagrado) e sabor (chá, avinagrado, doce, frutado e alcoólico) classificando-as entre ausente, fraco, moderado, forte ou muito forte.

Os dados e documentos produzidos durante a pesquisa foram tratados e analisados estatisticamente a fim de determinar a percepção das características organolépticas da kombucha e a aceitação da kombucha. Todos os dados serão mantidos guardados durante 5 anos após a realização do teste.

4.4.1 Critérios de exclusão da pesquisa

Foi considerado como critério de exclusão da pesquisa pessoas fora da faixa etária de 18 a 60 anos, que façam uso de cigarro, cigarro eletrônico ou outros e que tenha passado por processo infeccioso nos 15 dias antecedentes ao teste.

4.4.2 Riscos e Benefícios

Por ser uma pesquisa envolvendo pessoas, eventuais riscos mínimos como constrangimento de alguma natureza, desconforto dos convidados a responder o questionário, pequenos acidentes como derramamento de líquidos ou até mesmo desconforto gastrointestinal pelo contato atípico com uma bebida probiótica e ácida podem ocorrer, contudo é possível recusar-se a participar, como também o participante tem total liberdade para desistir da pesquisa a qualquer momento sem que lhe acarrete quaisquer prejuízos.

Além disso, a kombucha, por ser um produto fermentado, pode apresentar a presença de etanol produzido pelas leveduras durante o processo fermentativo, numa concentração máxima de até 1%; a kombucha também poderá apresentar quantidades significativas de açúcar que não foi consumido durante a fermentação, além de glúten e derivados de cevada, malte, milho e trigo. Portanto, para participantes sensíveis a estes compostos, foi alertado sobre os efeitos dos mesmos ao corpo.

Porém, com este estudo foi possível demonstrar a aceitação de kombuchas produzidas de maneira análoga ao tradicional utilizando de recursos agroindustriais que viriam a ser descartados, bem como tornar este produto conhecido e elucidar sobre seus possíveis benefícios ao consumo humano. Além disso, a pesquisa também pode contribuir para a melhoria da produção de kombucha ao indicar a proximidade que a comunidade tem de produtos de origem fermentada.

4.5 Caracterização da kombucha

4.5.1 Concentração de Açúcares Totais

Para a quantificação total de açúcares, utilizou-se a técnica de determinação de açúcares redutores com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme Miller (1959). Para tanto, foi necessária uma etapa de hidrólise para a quebra de sacarose (açúcar não redutor) em glicose e frutose (açúcares redutores).

Primeiramente, foi preparada uma curva de calibração de sacarose com concentrações de 0 a 2,0 g/L, com variação de 0,25 g/L. Também foram diluídas as amostras de kombucha na proporção de 1:50 com água destilada adicionando-se em tubos de ensaio 0,1 mL de amostra com 4,9 mL de água destilada. Após, retirou-se 1 mL de cada solução da curva e amostras diluídas e adicionou-se em novos tubos de ensaio juntamente com 1 mL de ácido clorídrico 2 N; os tubos foram levados à fervura por 15 min em banho-maria para completa hidrólise e resfriados em banho de gelo; para neutralizar a reação, foi adicionado 2 mL de hidróxido de sódio 1 N prosseguindo para reação com DNS.

Novamente, em novos tubos de ensaio foram adicionados 1 mL da solução hidrolisada juntamente com 1 mL da solução de DNS, submetido à fervura por 5 min em banho-maria e resfriado em banho de gelo. Por fim, adicionou-se 10 mL de água destilada para realização da leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O resultado é expresso em g de sacarose por litro de amostra (g/L). Para a avaliação dos diferentes substratos formulados com o planejamento experimental, foi realizada o cálculo da taxa de açúcar residual em porcentagem, de acordo com a equação:

$$\text{Taxa de açúcar residual (\%)} = \frac{C_f}{C_i}$$

onde C_i e C_f representam a concentração inicial e final de açúcar na fermentação, respectivamente.

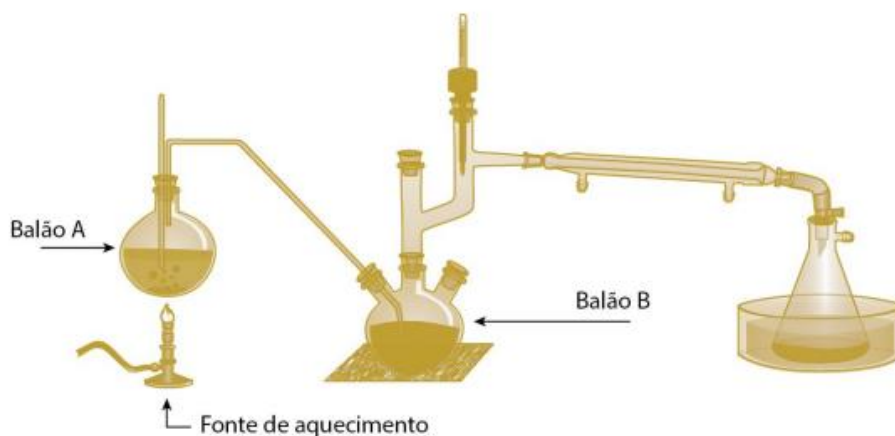
4.5.2 Acidez Volátil

Embora geralmente interpretado como ácido acético, uma análise tradicional de ácidos voláteis inclui todos aqueles ácidos destiláveis a vapor presentes na kombucha. Para esta análise, seguiu-se a metodologia 236/IV para vinhos adaptada do livro Métodos físico-químicos para análise de alimentos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Para tal, foi utilizado um sistema de destilação semelhante ao de Cazenave-Ferré que baseia-se na separação dos ácidos voláteis por arrastamento com vapor de água e posterior titulação do destilado para se obter a acidez volátil. Um esquema do sistema de destilação por arraste de vapor utilizado está representado na Figura 2.

Com o sistema montado, no balão A adicionou-se 250 mL de água e, no balão B, 10 mL da amostra de kombucha que foi borbulhada com vapor; o vapor arrasta os ácidos voláteis e o condensado foi recolhido em uma proveta até completar o volume de 100 mL de destilado.

Figura 2 - Aparelhagem esquemática de uma destilação por arraste de vapor



Fonte: Silva; Queirós; Benite, 2018.

Após, o destilado foi titulado com solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 N até atingir o pH 7,5, monitorado utilizando um pHmetro. O resultado foi expresso em mililitros de equivalente de ácido acético por litro de amostra (mEAA/L) seguindo a fórmula:

$$\frac{n * f * N * 1000}{V} = A$$

onde n é o volume em mL de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, f é fator de correção da solução de hidróxido de sódio, N representa a normalidade da solução de hidróxido de sódio e V o volume em mL da amostra de kombucha utilizado inicialmente.

4.5.3 Concentração Fenólica Total (CFT)

A concentração de fenólicos totais (CFT) foi quantificada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, adaptado da metodologia de Luvison, Dangui e Lima

(2023). Inicialmente foi preparada uma curva de calibração com soluções de ácido gálico nas concentrações entre 0 e 1,0 g/L, variando 0,25 g/L entre as soluções. Além disso, as amostras foram diluídas na proporção 1:4, adicionando-se em tubo de ensaio 1 mL de kombucha e 3 mL de água destilada.

Após, em tubo de ensaio adicionou-se 500 µL de cada solução da curva e amostra de kombucha juntamente com 2 mL de água destilada e 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu, sendo levemente agitada e deixada em repouso no escuro por 5 min; então, adicionou-se 5 mL de carbonato de sódio a 7%, agitado em vórtex e deixado à temperatura ambiente na ausência de luz por 2 h. Por fim, todas as amostras foram avolumadas com 10 mL de água destilada e, em espectrofotômetro, realizou-se a leitura das absorbâncias a 765 nm. Os teores de CFT foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de amostra (mEAG/L).

4.5.4 Etanol

O etanol de cada amostra foi quantificado através de cromatografia líquida de alta performance (*high-performance liquid chromatography*, HPLC). Para isso, 2 mL das amostras foram previamente filtrados com filtro de membrana PES Hidrofílico com poro 0,45 µm. A coluna utilizada foi a Coregel ION 300 (Concise separations) com volume de injeção 20 µL de amostra e efluente de H₂SO₄ 8,5 mM em um fluxo de 0,4 mL/min a temperatura de 70 °C. O detector foi o índice de refração expressando o resultado em g de etanol por L de solução (g/L). O resultado foi expresso em porcentagem de graduação alcoólica do volume de etanol pelo volume total da amostra, de acordo com a fórmula:

$$\text{Graduação Alcoólica (\%)} = \frac{[Et]}{d_{Et}} * 100$$

onde $[Et]$ é a concentração de etanol em g/L proveniente da análise de HPLC e d_{Et} é a densidade do etanol (789 g/L).

4.5.5 Análise estatística

Realizou-se análise estatística na avaliação de diferentes substratos de kombucha utilizando o software Statistica (versão 12) com aplicação de ANOVA a fim de identificar os fatores significativos para cada um dos resultados obtidos (taxa de açúcar residual, acidez volátil, CFT e graduação alcoólica) e a relação e entre as fontes e concentrações de nitrogênio

e carbono para a fermentação da kombucha. Para as interações significativas entre fatores, foi plotado a curva de nível para visualização.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação de diferentes substratos de kombucha

Os diferentes substratos de kombuchas formulados por meio do planejamento experimental foram avaliados quanto a acidez volátil e graduação alcoólica, seguindo os parâmetros estabelecidos pela IN nº 41/2019 (MAPA, 2019a), e a CFT e taxa de açúcar residual da fermentação. Todos os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados de taxa de açúcar residual, acidez volátil, graduação alcoólica e CFT para os substratos de kombucha formulados por meio do planejamento experimental

Amostra	Açúcar Residual (%)	Acidez Volátil (mEAA/L)	Graduação Alcoólica (%)	CFT (mEAG/L)
P5R20	37,30	68,251	0,240	1414,17
P5C100	93,51	58,873	0,314	2009,36
P5M60	32,44	94,822	0,508	6552,20
P10R100	59,75	65,646	0,449	2164,33
P10C60	45,43	46,89	0,369	1742,08
P10M20	31,63	66,167	0,119	3636,90
P15R60	47,13	39,075	0,399	1941,98
P15C20	27,63	84,923	0,223	1748,82
P15M100	18,12	277,693	0,677	7383,22
M5R100	54,10	95,343	0,149	1061,55
M5C60	30,28	92,217	0,194	1234,49
M5M20	6,34	70,335	0,041	2087,16
M10R60	26,94	112,015	0,318	1362,51
M10C20	13,61	43,764	0,162	605,61
M10M100	17,38	309,474	0,179	5357,33
M15R20	5,39	37,512	0,122	717,91
M15C100	36,60	136,502	0,139	1652,24
M15M60	12,05	317,289	0,112	4135,51
T5R60	37,38	70,856	0,149	1465,83
T5C20	11,73	38,554	0,087	643,79
T5M100	53,09	159,426	0,267	7751,57
T10R20	21,05	69,293	0,127	1075,02

T10C100	31,16	92,738	0,106	1400,69
T10M60	32,70	170,367	0,168	7500,02
T15R100	62,43	95,343	0,103	1746,58
T15C60	53,65	80,755	0,080	1544,44
T15M20	13,58	66,688	0,022	2163,52

Analisando estatisticamente os dados apresentados na tabela 2 foi possível identificar os fatores que afetam diretamente a fermentação e cada um dos resultados avaliados. Através da análise de variância (ANOVA) com interação bidirecional, Tabelas 3 a 6, é possível observar os fatores mais significativos para cada resultado do experimento estudado (p -valor $< 0,05$).

Tabela 3 - ANOVA aplicado aos resultados de taxa de açúcar residual

Fator	SS	df	MS	F	p
Fonte N L+Q	2037,82	2	1018,908	7,76644	0,006855
[N] L+Q	451,79	2	225,895	1,72185	0,220080
Fonte C L+Q	1259,33	2	629,665	4,79951	0,029409
[C] L+Q	3726,27	2	1863,134	14,20140	0,000686
Fonte N e [N]	554,38	1	554,379	4,22565	0,062249
Fonte N e Fonte C	42,21	1	42,209	0,32173	0,581026
Fonte N e [C]	25,48	1	25,484	0,19425	0,667241
[N] e Fonte C	69,30	1	69,300	0,52823	0,481292
[N] e [C]	371,73	1	371,728	2,83343	0,118134
Fonte C e [C]	231,48	1	231,482	1,76443	0,208782
Error	1574,32	12	131,194		
Total SS	10710,69	26			

SS – soma quadrática; df – graus de liberdade; MS – média quadrática; valores em vermelho são estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Tabela 4 - ANOVA aplicado aos resultados de acidez volátil

Fator	SS	df	MS	F	p
Fonte N L+Q	11436,7	2	5718,37	4,40865	0,036689
[N] L+Q	8411,2	2	4205,60	3,24236	0,074853
Fonte C L+Q	55834,0	2	27916,99	21,52297	0,000107
[C] L+Q	31713,0	2	15856,51	12,22478	0,001273

Fonte N e [N]	724,2	1	724,22	0,55835	0,469317
Fonte N e Fonte C	306,7	1	306,73	0,23648	0,635522
Fonte N e [C]	720,0	1	720,04	0,55513	0,470572
[N] e Fonte C	14019,0	1	14019,02	10,80815	0,006488
[N] e [C]	2211,5	1	2211,52	1,70500	0,216113
Fonte C e [C]	14991,7	1	14991,70	11,55805	0,005273
Error	15564,9	12	1297,08		
Total SS	158633,5	26			

SS – soma quadrática; df – graus de liberdade; MS – média quadrática; valores em vermelho são estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Tabela 5 - ANOVA aplicado aos resultados de graduação alcoólica

Fator	SS	df	MS	F	p
Fonte N L+Q	0,312146	2	0,156073	20,48460	0,000135
[N] L+Q	0,000797	2	0,000399	0,05230	0,949255
Fonte C L+Q	0,012014	2	0,006007	0,78843	0,476751
[C] L+Q	0,106385	2	0,053193	6,98154	0,009749
Fonte N e [N]	0,011033	1	0,011033	1,44812	0,252033
Fonte N e Fonte C	0,000725	1	0,000725	0,09514	0,763031
Fonte N e [C]	0,036386	1	0,036386	4,77565	0,049420
[N] e Fonte C	0,005399	1	0,005399	0,70861	0,416365
[N] e [C]	0,002160	1	0,002160	0,28353	0,604115
Fonte C e [C]	0,031371	1	0,031371	4,11746	0,065226
Error	0,091428	12	0,007619		
Total SS	0,618764	26			

SS – soma quadrática; df – graus de liberdade; MS – média quadrática; valores em vermelho são estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Tabela 6 - ANOVA aplicado aos resultados de CFT

Fator	SS	df	MS	F	p
Fonte N L+Q	6248351	2	3124175	3,96146	0,047749
[N] L+Q	187900	2	93950	0,11913	0,888730
Fonte C L+Q	84641386	2	42320693	53,66278	0,000001
[C] L+Q	16983491	2	8491746	10,76756	0,002099
Fonte N e [N]	694475	1	694475	0,88060	0,366543

Fonte N e Fonte C	79286	1	79286	0,10054	0,756637
Fonte N e [C]	191056	1	191056	0,24226	0,631460
[N] e Fonte C	604930	1	604930	0,76705	0,398322
[N] e [C]	5853	1	5853	0,00742	0,932769
Fonte C e [C]	7959787	1	7959787	10,09304	0,007966
Error	9463697	12	788641		
Total SS	129142652	26			

SS – soma quadrática; df – graus de liberdade; MS – média quadrática; valores em vermelho são estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

A concentração de carbono ([C]) é um fator fortemente influente na fermentação dado que os microrganismos utilizam da sacarose, fonte mais comum utilizada para kombucha, para a produção de energia para sobreviver, além de outros subprodutos para a kombucha; através da enzima invertase secretada pelas leveduras, a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose que é consumido pelas leveduras e bactérias para formação de etanol e ácidos orgânicos, como acético e glucurônico (FABRICIO et al., 2022; LEONARSKI et al., 2021a; LUVISON; DANGUI; LIMA, 2023; PALUDO, 2017). Essa característica faz com que a [C] afete diretamente todos os resultados provando ser fator significativo em todos estes. Além disso, a fonte de carbono (Fonte C) não se mostrou significativo apenas para os resultados de graduação alcoólica, mas Fonte C e [C] podem ser considerados os fatores mais influentes na produção de kombucha, considerando que ambos foram fatores significativos nos resultados de ANOVA.

Além mais, logicamente, maiores concentrações iniciais de carbono podem resultar em maiores percentuais de taxa de açúcar residual após a fermentação, mas isso não pode ser considerado indesejado, uma vez que baixas concentrações de açúcar também podem resultar em quantificações igualmente baixas de acidez. Também é possível observar que os substratos contendo melaço, tanto em alta como em baixas concentrações, desenvolvem características de acidez e CFT significativamente mais elevadas do que aqueles com açúcar comum. Isso demonstra que o melaço é um resíduo com ótimas características para a fermentação, resultando em substratos com menores percentuais de açúcar residual e maiores quantidades de ácidos e compostos fenólicos (AMIRI et al., 2024; MALBAŠA et al., 2008; SELVARAJ; GURUMURTHY, 2024b).

Ainda, o melaço como fonte de carbono também é responsável por uma maior atividade dos microrganismos. Isso porque nas amostras de fermentação com melaço é possível observar um maior aumento acidez devido à composição química do melaço, que

constitui um substrato muito conveniente para a produção de diferentes ácidos orgânicos; porém é necessário considerar um equilíbrio com a concentração do mesmo, ao perceber que em altas concentrações essa produção pode ser inibida (MALBAŠA; LONČAR; DJURIĆ, 2008; SALEHI; SADEGHI; KARIMI, 2021).

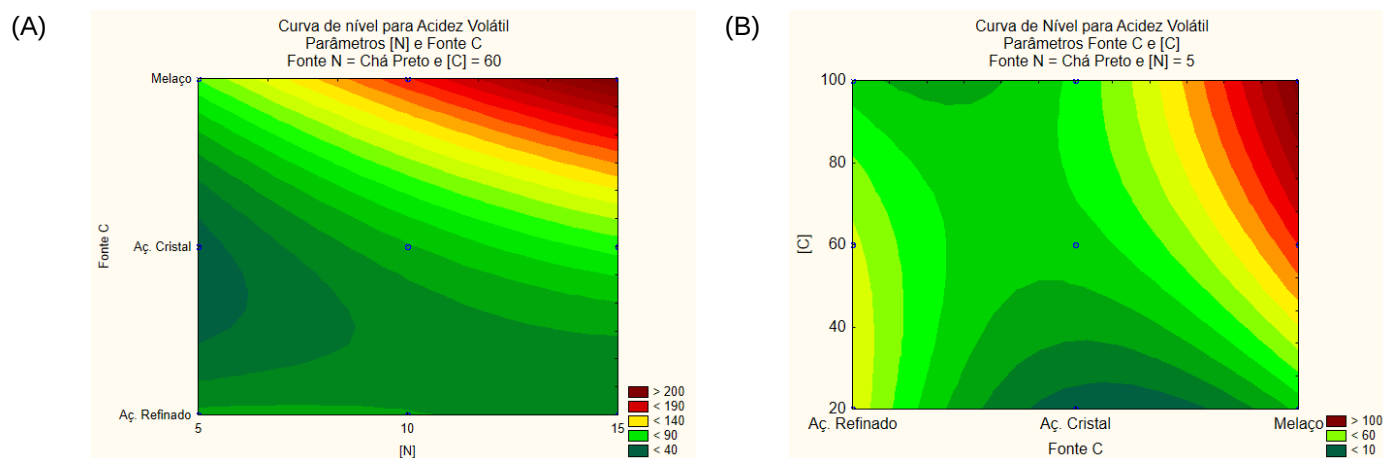
A fonte de nitrogênio (Fonte N) também se mostrou influente em todos os resultados, diferente da concentração de nitrogênio ([N]) que é significativa apenas em interação com Fonte C nos resultados de acidez volátil. As infusões fornecem nitrogênio, purinas e minerais essenciais, além de aminoácidos e outros compostos bioativos; logo, a diferença de Fonte N altera nas atividades metabólicas dos microrganismos de acordo com a disponibilidade de nutrientes e compostos, porém independente da concentração, os microrganismos podem sobreviver da mesma maneira (SHENOY K.; LOBO; DIAS, 2019; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; YILMAZ; ÖZDEMİR; GÖKMEN, 2020).

A milhocina traz em sua formulação nutrientes diferentes do chá, sendo rica em nitrogênio, principalmente orgânico, vitaminas hidrossolúveis, aminoácidos, minerais e outros estimulantes de crescimento biológico; assim altos rendimentos podem ser observados quanto a produção de metabólitos dos microrganismos, como etanol e ácidos orgânicos (AMARTEY; JEFFRIES, 1994; CHEILAS et al., 2000; RIVAS et al., 2004; SILVEIRA et al., 2001). O trub também apresenta uma composição diferenciada, com quantidades consideráveis de minerais, lipídios, taninos, óleos essenciais, vitaminas, proteínas, aminoácidos e demais componentes, tornando assim interessante para aplicações biotecnológicas e, principalmente, fermentativas já que oferece um substrato rico para o desenvolvimento microbiológico (ELLWANGER, 2022; MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014; MUSSATTO, 2009).

Na análise da taxa de açúcar residual, esperava-se que pelo menos 70% da concentração inicial de açúcar deveria ser consumida em um período de 10 dias. A partir desse critério, verificou-se que apenas onze substratos atingiram essa meta; em ordem crescente de taxa de açúcar residual, os substratos identificados foram: M15R20, M5M20, T5C20, M15M60, T15M20, M10C20, M10M100, P15M100, T10R20, M10R60 e P15C20. Os fatores mais significativos para esses resultados foram Fonte N, Fonte C e [C], indicando a influência direta desses parâmetros no consumo de açúcar durante a fermentação. Dentre os substratos que atenderam ao critério estabelecido, seis foram formulados com milhocina e três com trub, destacando-se como fontes eficientes de nitrogênio. Adicionalmente, cinco substratos continham melaço como fonte de carbono, demonstrando que substratos alternativos são igualmente eficazes em comparação ao padrão, no que diz respeito à eficiência de consumo de açúcar.

Na análise da acidez volátil, os valores mais elevados quantificados, que inclusive excederam o limite máximo permitido pela legislação (130 mEq/L), foram observados nos substratos, em ordem decrescente: M15M60, M10M100, P15M100, T10M60, T5M100 e M15C100. Notou-se que cinco desses substratos utilizam milhocina ou trub como Fonte N, e cinco contêm melaço como Fonte C. Além disso, todos os substratos apresentavam concentrações iniciais de carbono de 60 ou 100 g/L. Esses achados sugerem que tanto as fontes de nitrogênio e carbono derivadas de substratos sustentáveis, quanto concentrações mais elevadas de carbono, favorecem a produção de ácidos voláteis pelas bactérias durante o processo fermentativo, resultando em uma acidez volátil superior. Além disso, foi observada significância nas interações entre os fatores [N] e Fonte C, bem como entre Fonte C e [C], conforme analisado nas curvas de nível apresentadas na Figura 3. A análise revela que a maior produção de ácidos ocorre quando há uma concentração mais elevada de nitrogênio associada ao melaço como Fonte C, especialmente em condições de alta [C].

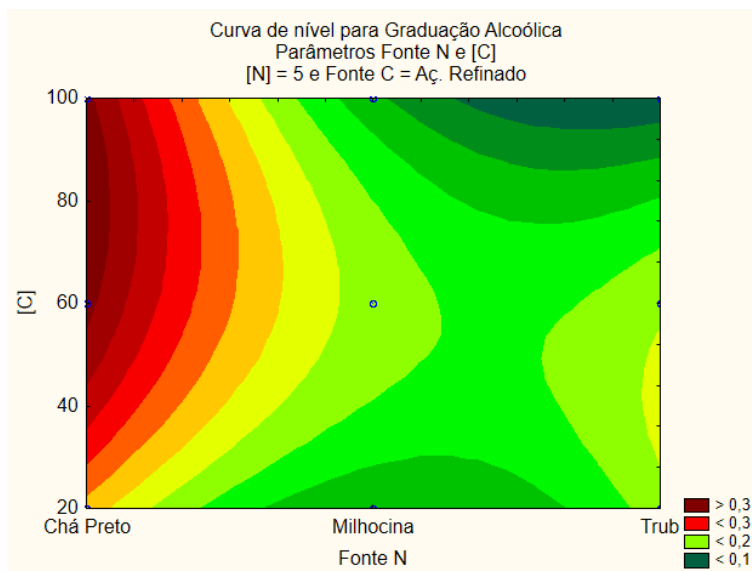
Figura 3 – Curvas de nível para as interações entre os fatores (A) [N] e Fonte C e (B) Fonte C e [C] para os resultados de acidez volátil



Na análise da graduação alcoólica, apenas os substratos P5M60 e P15M100 ultrapassaram o limite permitido pela legislação (0,5%), com Fonte N e [C] sendo os fatores significativos para esses resultados. O chá preto, utilizado como Fonte N, juntamente com concentrações de carbono entre 60 e 100 g/L, mostrou-se mais influente na elevação dos níveis de etanol. Entre os substratos que se mantiveram dentro dos limites regulamentares, os maiores valores, ainda assim, acima de 0,2% de etanol, foram observados em P10R100, P15R60, P10C60, M10R60, P5C100, T5M100, P5R20 e P15C20. Adicionalmente, a interação entre os fatores Fonte N e [C] foi significativa, conforme analisado na curva de nível na

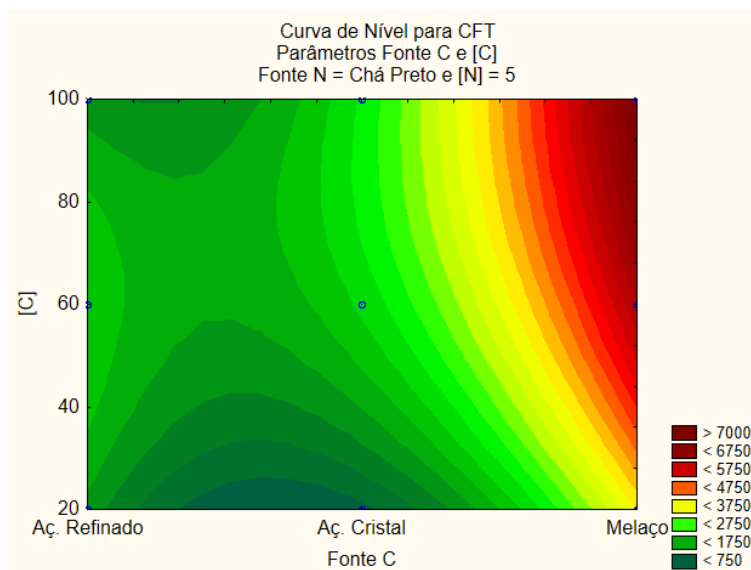
Figura 4. A análise demonstrou uma maior produção de etanol em substratos que utilizam chá preto como Fonte N, particularmente quando a [C] é de 60 g/L ou superior.

Figura 4 – Curva de nível para a interação entre os fatores Fonte N e [C] para os resultados de graduação alcoólica



Na CFT, os substratos que apresentaram os valores mais altos, em ordem decrescente, foram: T5M100, T10M60, P15M100, P5M60, M10M100, M15M60 e P10M20, todos com concentrações superiores a 3500 mEAG/L. A ANOVA revelou que os fatores Fonte N, Fonte C e [C] foram significativamente influentes. O melaço destacou-se como a Fonte C mais impactante na elevação dos níveis de CFT, especialmente em concentrações mais elevadas de carbono. Esse comportamento foi reforçado pela interação significativa entre Fonte C e [C], conforme mostrado na curva de nível apresentada na Figura 5. Esses resultados sugerem que a escolha de substratos ricos em melaço, aliado a concentrações mais altas de carbono, otimiza a produção de compostos fenólicos totais, contribuindo para o perfil antioxidante e funcional da kombucha.

Figura 5 – Curva de nível para a interação entre os fatores Fonte C e [C] para os resultados de CFT



Em um estudo conduzido por Cardoso et al. (2020), foram produzidas kombuchas utilizando chá preto e chá verde, com uma concentração de 12 g/L de folhas de chá, 50 g/L de sacarose e 10% de inóculo, fermentadas por 10 dias. A quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e etanol foi realizada por HPLC, obtendo-se concentrações de 19,29 g/L e 34,97 g/L de sacarose, 1,17 g/L e 0,47 g/L de ácido glucurônico, e 7,29 g/L e 4,90 g/L de etanol para as kombuchas de chá verde e chá preto, respectivamente. Ambas as amostras apresentaram uma concentração de 3 g/L de ácido acético. Semelhantemente, Dartora et al. (2023b) produziu kombuchas utilizando chá preto e chá verde, com uma concentração de 12 g/L de folhas de chá misturadas em diferentes frações, diferentes concentrações de sacarose e diferentes massas de SCOBY para inóculo, fermentadas por 10 dias. A quantificação de acidez e etanol obtiveram concentrações de entre 49,9 e 91,2 mEq/L de ácido acético e 1,468 e 3,209 mg/mL de etanol para as kombuchas. Comparando esses resultados com os substratos de chá preto desenvolvidos no presente estudo, foram observadas diferenças nos níveis de sacarose residual, ácido acético e etanol. As médias para os substratos de chá preto neste trabalho foram 27,74 g/L de açúcar residual, 5,35 g/L de ácido acético e 2,89 g/L de etanol.

Paludo (2017) investigou a produção de kombucha utilizando 10 g/L de chá verde e erva-mate, além de 90 g/L de sacarose, fermentados por 7 dias, tanto em escala laboratorial, com o uso de biorreatores de tanque agitado (STR) de 2 L, quanto em escala artesanal, utilizando jarras de vidro de 1,5 L. As concentrações finais de sacarose nas kombuchas de erva-mate foram de 73,54 g/L (artesanal) e 78,94 g/L (laboratorial), enquanto nas kombuchas de chá verde os valores foram de 36,25 g/L e 63,8 g/L, respectivamente. A concentração de

ácido acético atingiu 2,72 g/L (artesanal) e 4,12 g/L (laboratorial) para a erva-mate, e 4,23 g/L (artesanal) e 5,47 g/L (laboratorial) para o chá verde. A análise de compostos fenólicos resultou em 605,9 mg/L na kombucha artesanal de erva-mate e 785,2 mg/L na versão laboratorial, enquanto as kombuchas de chá verde apresentaram 938,5 mg/L (artesanal) e 1087,4 mg/L (laboratorial). Quanto à quantificação de etanol, esta foi realizada apenas nas amostras artesanais, com concentrações de 4,74 g/L para o chá verde e 2,48 g/L para a erva-mate. Esses resultados evidenciam variações importantes entre a utilização de diferentes substratos, especialmente em termos de consumo de açúcar, produção de ácidos orgânicos e teor de compostos fenólicos, refletindo o impacto da adaptação dos microrganismos em diferentes substratos sobre o perfil final da kombucha.

Barakat et al. (2024) investigaram a produção de kombucha utilizando 100 g/L de bagaço de uva, obtido de uma vinícola local, com infusão a 80 °C por 20 minutos. O estudo variou três parâmetros principais: concentração de sacarose (20 ou 35 g/L), duração da fermentação (7 ou 10 dias), e temperatura (20 ou 25 °C). A maior acidez titulável foi registrada na condição de 35 g/L de sacarose, fermentada por 10 dias a 25 °C, com um valor de 12,41 g/L. No entanto, essa concentração foi superada pelos substratos P15M100 (16,67 g/L), M10M100 (18,58 g/L) e M15M60 (19,05 g/L) no presente estudo. No final da fermentação, as amostras de Barakat et al. apresentaram açúcar residual variando entre 32,16 g/L e 6,63 g/L, enquanto no presente trabalho o açúcar residual variou entre 66,06 g/L e 1,31 g/L. Em relação ao teor alcoólico, a maior concentração de etanol foi observada na amostra com 35 g/L de sacarose fermentada por 7 dias a 25 °C, com 9,30 g/L de etanol. No presente estudo, o substrato P15M100 apresentou 5,338 g/L de etanol.

Selvaraj e Gurumurthy (2024) investigaram a produção de kombucha utilizando 10 g/L de chá verde em pó e 75 g/L de melaço, inoculada com 20 g/L de SCOBY e fermentada por 6 dias a 30 °C. Como controle, produziram uma kombucha com 10 g/L de chá preto e 75 g/L de açúcar, fermentada por 10 dias nas mesmas condições. Os resultados indicaram concentrações de 0,0379 g/L de ácido acético e 0,0178 g/L de ácido glucurônico no controle, enquanto o teste apresentou valores de 0,042 g/L de ácido acético e 0,0214 g/L de ácido glucurônico. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi superior na kombucha produzida com chá verde e melaço (27,1%) em comparação ao controle com chá preto e açúcar (20,8%). As concentrações de açúcares remanescentes também variaram entre as amostras: o controle apresentou 0,006 g/L de glicose, 0,001 g/L de frutose e 0,007 g/L de sacarose, enquanto o teste registrou 0,007 g/L de glicose, 0,004 g/L de frutose e 0,014 g/L de sacarose. Além mais, os resultados obtidos neste trabalho se mostraram mais promissores, pois os

substratos com melaço obtiveram resultados de açúcar residual baixos e elevadas concentrações de acidez volátil.

Esses resultados evidenciam o impacto da substituição das Fonte C e Fonte N, como o açúcar por melaço ou chá por milhocina ou trub, refletindo variações significativas nas concentrações de ácidos orgânicos, compostos fenólicos e açúcares residuais. As variações observadas também destacam a influência de diferentes condições de fermentação e composições de substratos sobre os perfis metabólicos da kombucha, especialmente no que diz respeito à produção de ácidos e etanol. As diferenças no comportamento fermentativo, associadas a variáveis operacionais e ao uso de substratos alternativos, como o bagaço de uva, reforçam a importância do controle dessas variáveis para otimizar o perfil final da bebida.

Para definir as melhores condições de substrato, foi necessário identificar as melhores composições para cada resposta e ponderar dois substratos considerados como melhores para produção de kombucha levando em conta um menor percentual de açúcar residual e etanol produzido e uma alta acidez volátil e CFT, respeitando os limites da legislação. Analisar todos os dados permite tirar diferentes conclusões, dependendo da resposta avaliada. Mas, é importante ressaltar a viabilidade econômica e sustentável da utilização e valorização de resíduos agroindustriais, ponderando-se que as composições de cada resíduo podem variar dependendo da matéria-prima e método de processamento utilizado. Desta forma, pode-se concluir que, de acordo com os resultados e dados discutidos, os melhores substratos alternativos de kombucha são M5M20 e T15M20, visando reduzir o açúcar residual e a formação de etanol, e enriquecer a bebida com ácidos orgânicos e compostos fenólicos.

5.2 Avaliação cinética da fermentação de kombucha

Com os melhores substratos de kombucha definidos, M5M20 e T15M20, a avaliação cinética foi realizada comparando-os a um meio padrão (P5R50) com 5 g/L de chá preto e 50 g/L de açúcar refinado. As médias e desvios padrões para os resultados de concentração de açúcar residual, acidez volátil, graduação alcoólica e CFT para os dias 0, 4, 8, 12 e 16 são apresentados nas Figuras 6 a 9, respectivamente.

Figura 6 – Concentração de açúcar residual (g/L) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.

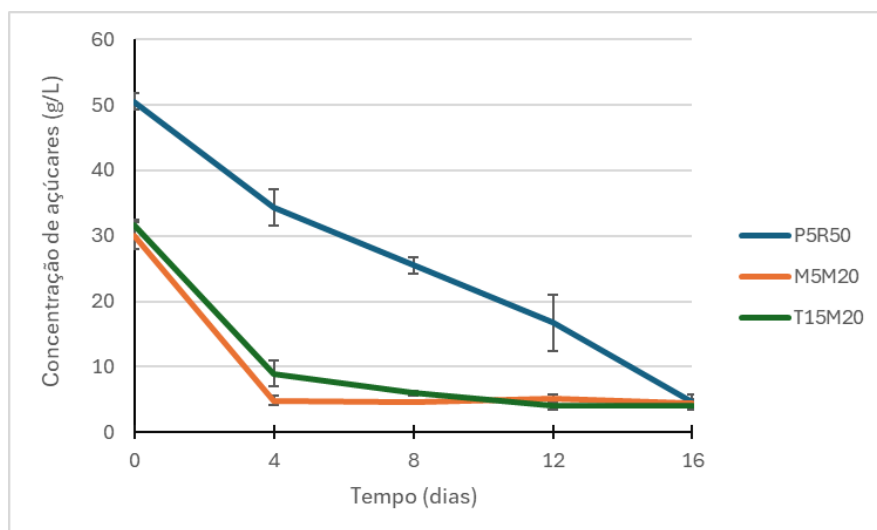


Figura 7 – Acidez volátil (mEAA/L) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.

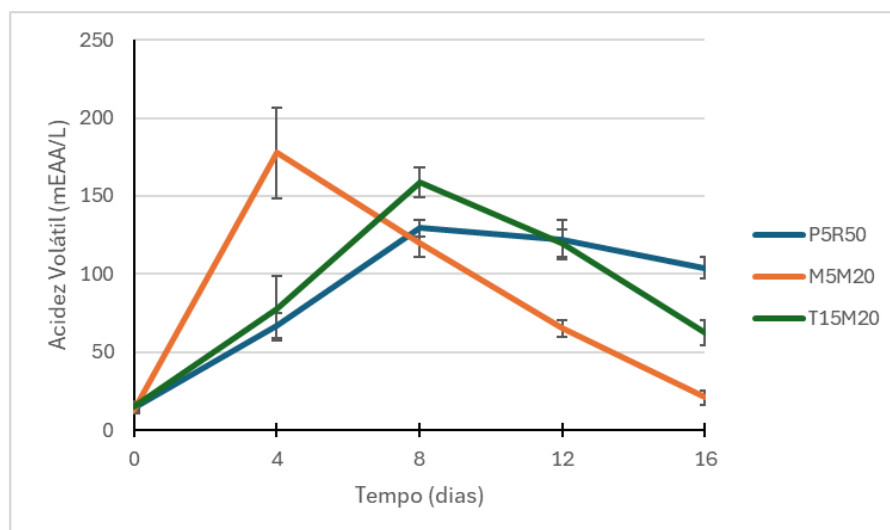


Figura 8 – Graduação alcoólica (%) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.

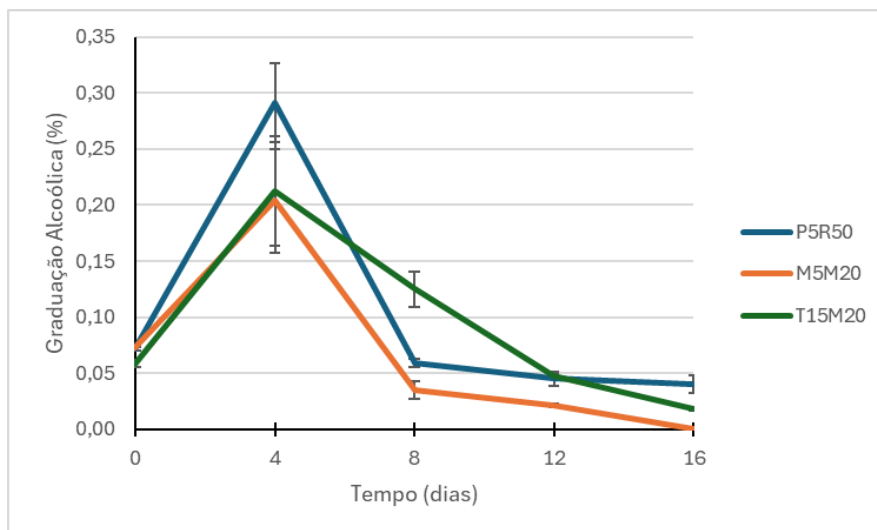
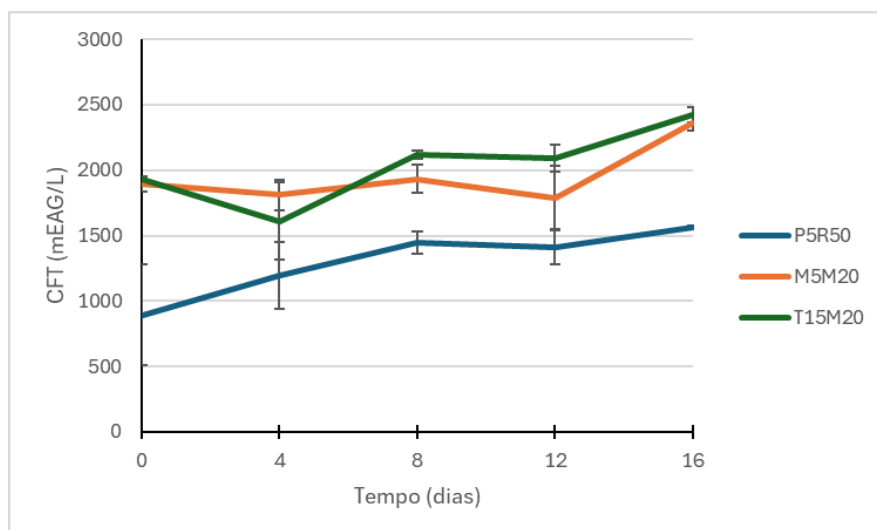


Figura 9 - CFT (mEAG/L) em função do tempo (dias) para os substratos de fermentação P5R50, M5M20 e T15M20.



O substrato padrão P5R50 apresentou comportamento típico durante o processo de fermentação, onde a concentração de açúcar total reduziu até atingir o valor médio de, aproximadamente, $4,592 \pm 1,110$ g/L ao fim do processo; a concentração de ácidos voláteis aumentou gradativamente até o dia 8 alcançando um pico de, aproximadamente, $129,38 \pm 5,57$ mEAA/L, havendo uma redução nos dias posteriores; a concentração de etanol teve seu maior pico no dia 4 e reduzindo a $0,32 \pm 0,062$ g/L ao fim da fermentação e, por fim, a CFT

elevou gradativamente durante todo processo atingindo o valor de $1562,10 \pm 10,83$ mEAG/L com 16 dias de fermentação.

Os meios alternativos M5M20 e T15M20 apresentaram uma redução brusca da concentração de açúcar total até o dia 4 e mantiveram-se constantes próximo ao valor de $4,350 \pm 0,757$ g/L para M5M20 e $3,986 \pm 0,210$ g/L para T15M20 até o final da fermentação. Esta queda brusca na concentração de açúcar pode indicar que a fase de crescimento exponencial dos microrganismos foi mais intensa. O mesmo se aplica aos resultados de concentração de etanol e acidez volátil, que obtiveram picos no dia 4 com valores de $1,61 \pm 0,336$ g/L e $1,68 \pm 0,383$ g/L de etanol para M5M20 e T15M20, respectivamente, e $177 \pm 29,08$ mEAA/L para M5M20, havendo exceção da acidez para o meio T15M20 que teve seu pico apenas no dia 8 com $158,73 \pm 9,61$ mEAA/L, e que a partir daí reduziram seus valores de concentração de etanol e acidez volátil; este comportamento era esperado para o etanol que seria produzido pelas leveduras e oxidado pelas bactérias, quanto aos ácidos é considerável que a falta de uma fonte de carbono abundante da metade dos dias em diante levou os microrganismos a consumi-los. A CFT apresentou o mesmo perfil que o substrato padrão, entretanto apresentando valores maiores, sendo o valor médio final de $2360,12 \pm 56,26$ mEAG/L para M5M20 e $2422,87 \pm 59,63$ mEAG/L para T15M20 (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Ao realizar uma pesquisa sobre fermentação de kombucha utilizando de diferentes chás de *Camellia sinensis*, Jakubczyk et al. (2020) preparou kombuchas com 8 g/L de chá verde, preto, branco e vermelho e 100 g/L de açúcar fermentando a 28 °C por 1, 7 e 14 dias para determinação de CFT e propriedades antioxidantes, além de ácido acético, açúcares e etanol. A CFT quantificada para cada chá antes e após a fermentação foi de 0,27 e 0,32 g/L para o chá verde, 0,18 e 0,21 g/L para o chá preto, 0,18 e 0,23 g/L para o chá branco e 0,23 e 0,27 g/L para o chá vermelho; dessa forma, todos demonstraram aumento de fenólicos durante a fermentação, assemelhando-se ao comportamento registrado neste estudo. Além mais, a concentração de etanol também demonstrou comportamento semelhante a este estudo, tendo pico em 7 dias e diminuindo até o dia 14 com valores finais de 2,75%, 2,0%, 3,0% e 3,0% para as kombuchas de chá verde, preto, branco e vermelho, respectivamente. Quanto a acidez, foi denotado valores mais altos de ácido acético que os obtidos nesta pesquisa, como 9,083 g/L de ácido acético em kombucha de chá preto fermentado por 14 dias.

Semelhantemente, Dartora et al. (2023b) produziram kombuchas utilizando 10 g/L de chá verde e 25 g/L de açúcar, inoculadas com 30 g/L de SCOBY e 10 mL/L de starter fermentado, mantidas a 25 °C por 14 dias. A acidez inicial de 40,1 mEq/L atingiu 384,0 mEq/L

ao final do período de fermentação, com aumento contínuo até o 10º dia, seguido de um leve decréscimo — comportamento semelhante ao observado nos experimentos deste estudo. A concentração de etanol aumentou até o 7º dia, alcançando 5,38 g/L, mantendo-se estável até o 14º dia. Esse comportamento difere das amostras P5R50, M5M20 e T15M20 do presente trabalho, nas quais o pico alcoólico foi observado no 4º dia, com valores de 0,29%, 0,20% e 0,21%, respectivamente, seguido de uma redução gradual. A concentração total de polifenóis nas kombuchas de Dartora et al. (2023b) aumentou até o 7º dia, estabilizando-se até o 10º dia e decaindo no 14º dia. Esse resultado contrasta com o presente estudo, no qual o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) continuou a aumentar ao longo de todo o experimento.

Correspondente a este estudo, Kuzu et al. (2023) produziu kombuchas utilizando diferentes infusões de ervas e frutas (chá verde, chá preto, sálvia, tília, mirtilo, rosa mosqueta, maçã e romã) na proporção de 10 g/L juntamente de sacarose nas concentrações de 10, 40 ou 70 g/L, incubados por 10 dias a 24 °C com amostragem diária. Após as fermentações, foi observado que os substratos com maior concentração de açúcar residual foram 55,40 g/L da kombucha de tília e 48,39 g/L da kombucha de maçã, ambas com 70 g/L de sacarose inicial, demonstrando uma fermentação similar da kombucha de chá preto deste estudo, onde os açúcares levaram mais tempo para serem consumidos. Outra consideração é sobre a quantificação de ácidos totais, que mostrou os maiores valores para kombucha de sálvia e 40 g/L de sacarose com 4,21% e para kombucha de rosa mosqueta e 70 g/L de sacarose com 2,55%, expondo que são necessárias quantidades maiores de açúcares para uma produção maior de ácidos que se difere das kombuchas M5M20 e T15M20 que obtiveram quantidades altas de ácido mesmo em uma concentração considerada baixa de açúcares.

Leonarski et al. (2021a) realizou a produção de kombucha utilizando do subproduto seco da clarificação do suco de acerola nas proporções de 1, 3 e 5% (m/v em base seca), 70 g/L de substrato (glicose e frutose 1:1) e 10% de inóculo, fermentando a 30 °C por 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias. Com a utilização deste substrato, foi observado uma preferência pelo consumo de glicose que frutose por parte dos microrganismos, mas isso pode ser afetado pela presença de diferentes tipos de espécies presentes na kombucha; além mais, notou-se um aumento no consumo de açúcar conforme aumentou a concentração de subproduto de acerola, alcançando 56,6% de consumo dos açúcares totais para a kombucha com 5% de subproduto de acerola após 15 dias, comportamento equivalente às kombuchas de trub e milhocina, onde o consumo de açúcares também foi maior. Também, Leonarski et al. (2021a) obteve a concentração final de etanol aproximada de 9 g/L, contudo seu crescimento foi linear, o que se difere do estudo aqui realizado que apresenta pico de produção de etanol com 4 dias seguido de diminuição.

De forma semelhante, Malbaša, Lončar e Djurić (2008) estudaram a produção de 2 L de kombucha utilizando 3 g de chá preto e 140 g de sacarose ou três diferentes melaços (adicionados com quantidade suficiente para atingir 140 g de sacarose); a fermentação ocorreu a 22 °C durante 14 dias, com amostras nos dias 0, 3, 7, 10 e 14. Inicialmente, já foi possível observar que mesmo antes da fermentação as kombuchas com melaço apresentavam quantidades significativamente maiores de ácidos (0,9 g/L) que a com sacarose (0,15 g/L), circunstância que não ocorreu neste estudo no qual a acidez volátil inicial se mostrou semelhante para todas as amostras. Com o decorrer da fermentação, Malbaša, Lončar e Djurić (2008) observaram que todas as amostras aumentaram a concentração de ácidos chegando a 1,15 g/L na kombucha com sacarose e 3,1 g/L como média geral das kombuchas com melaço, porém a amostra mais significativa de melaço alcançou 4,2 g/L de ácidos orgânicos; a cinética do presente estudo se difere por mostrar que as kombuchas com melaço tiveram um pico de maior acidez seguido da diminuição da mesma.

Por fim, para Malbaša, Lončar e Djurić (2008) o açúcar começou a ter um consumo mais elevado a partir do terceiro dia até o décimo dia em que entrou em um estado estacionário, onde a kombucha com sacarose obteve aproximadamente 35 g/L de açúcar residual, enquanto as kombuchas de melaço restaram apenas de 2 a 12 g/L; neste trabalho, todas as kombuchas tiveram sua concentração de açúcar final aproximado de 5 g/L, com um consumo brusco até o quarto dia para os substratos M5M20 e T15M20 e um consumo linear para o substrato P5R50.

Adicionalmente, Fabricio et al. (2022) produziu kombuchas utilizando 8 g/L de chá verde e 80 g/L de açúcar demerara orgânico, estudando diferentes formas de inocular a bebida utilizando o *starter* tradicional, com 50 g/L de biofilme e 100 mL/L de kombucha, como controle comparado a um *starter* centrifugado, com 50 g/L de biofilme e 100 mL/L de kombucha centrifugada e ressuspensa em chá nas mesmas condições do substrato, e um *starter* liofilizado, com 50 g/L de biofilme e 100 mL/L de kombucha centrifugada ambos liofilizados. A fermentação ocorreu em biorreatores a 28 °C por 5 dias de maneira aeróbia e, posteriormente, colocados em vidros herméticos e incubados a 25 °C por 2 dias, ocorrendo a fermentação anaeróbia. Dessa forma, foi possível observar que a kombucha inoculada com *starter* centrifugado obteve aproximadamente 50% dos seus açúcares consumidos, alcançando aproximadamente 35 g/L, e com uma produção de 5 g/L de ácido acético e 6 g/L de etanol ao fim do processo. Comparando-se ao substrato padrão P5R50 deste estudo, é possível observar um comportamento similar para o consumo de açúcar e a produção de ácido acético e etanol que também ocorreram de maneira linear, alcançando no 4º dia valores

de 34,35 g de açúcares por L, 67,04 mEAA/L, equivalente a 4,02 g de ácido acético por litro e 2,30 g/L de etanol.

Dessa forma, observa-se que diversos fatores podem acarretar mudanças diversas na composição química do produto final da kombucha, portanto deve-se analisar qual o melhor ponto para interromper a fermentação a fim de obter um produto com maiores quantidades de compostos orgânicos (ácidos e CFT) e menor concentração de açúcares e etanol, que podem trazer reações adversas ao organismo. A produtividade máxima de acidez volátil obtida para cada substrato foi de 16,17 mEAA/L.dia para P5R50 e 19,84 mEAA/L.dia para T15M20, ambos obtidos no 8º dia, e 44,46 mEAA/L.dia para M5M20 obtido no 4º dia; estes dados mostram que os substratos análogos possuem maior capacidade de produção se comparados ao substrato padrão, mesmo que em sua continuidade haja um decréscimo do valor de acidez. Ainda, realizando uma correlação entre a concentração de açúcar total e acidez volátil para os três substratos estudados (P5R50, M5M20 e T15M20), Figuras 10 a 12, pode-se observar como o consumo do substrato atua na formação de produtos.

Figura 10 – Concentração de açúcares totais (g/L) e de acidez volátil (mEAA/L) por tempo (dias) para o substrato P5R50

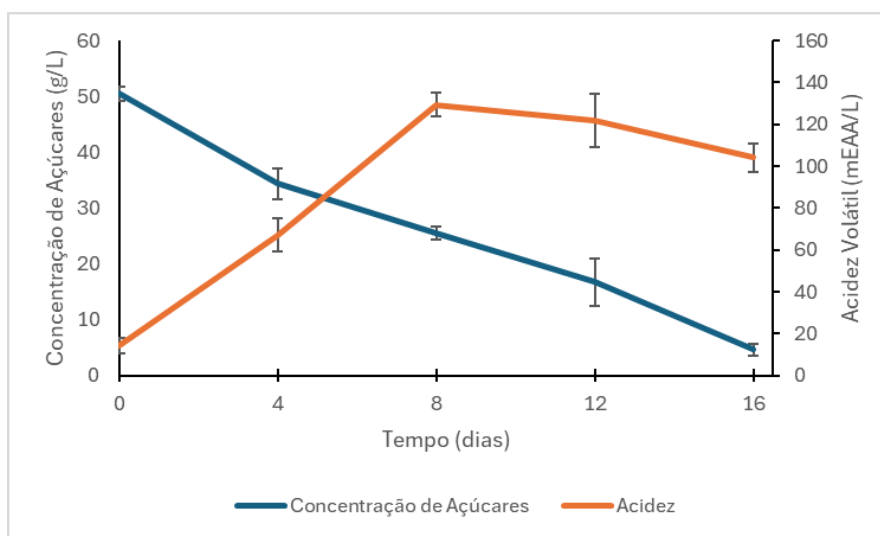


Figura 11 – Concentração de açúcares totais (g/L) e de acidez volátil (mEAA/L) por tempo (dias) para o substrato M5M20

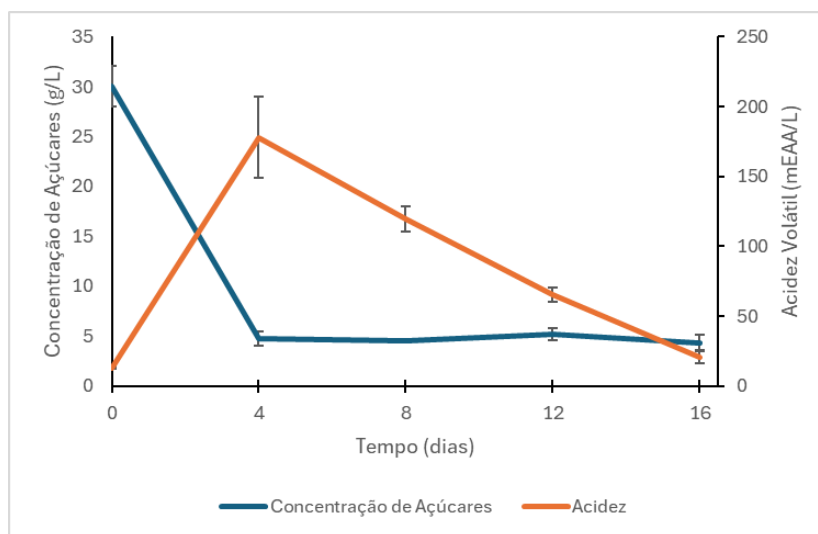
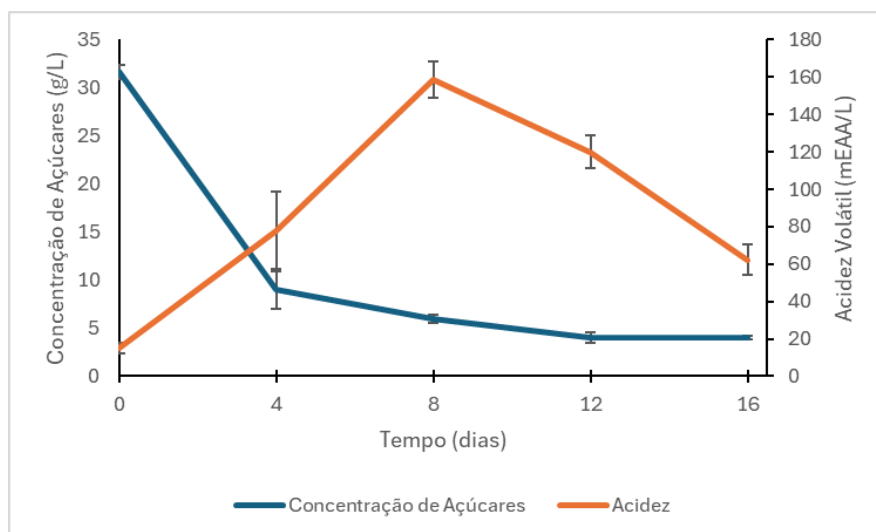


Figura 12 – Concentração de açúcares totais (g/L) e de acidez volátil (mEAA/L) por tempo (dias) para o substrato T15M20



Sabendo que para os três substratos testados, a CFT aumenta ao longo do tempo de fermentação e no oitavo dia a graduação alcoólica está abaixo de 0,15%, pode-se chegar a conclusão de que a kombucha padrão (P5R50) tem seu melhor tempo de fermentação aos 16 dias quando apresenta valor máximo de acidez volátil e mínimo de concentração de açúcar total. Por outro lado, as kombuchas análogas apresentam valores baixos de concentração de açúcares totais no quarto dia de fermentação, mas em relação a acidez volátil, os dois substratos apresentaram valores superiores ao limite de acidez volátil de 130mEq/L com 177 mEAA/L para M5M20 no quarto dia e 158,73 mEAA/L para T15M20 no oitavo dia. Ainda assim, levando em consideração que o aumento de escala de produção irá afetar estes

valores, foi considerado que o melhor tempo de fermentação para as kombuchas análogas T15M20 e M5M20 é de 8 dias.

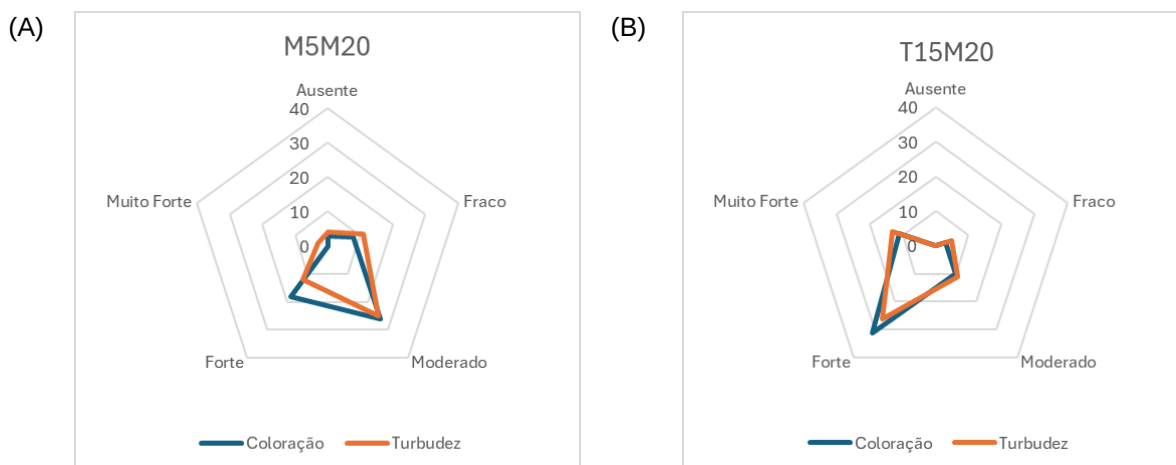
5.3 Análise sensorial das kombuchas produzidas

Para a análise sensorial foram avaliadas as kombuchas M5M20 e T15M20 fermentadas por 8 dias comparadas a kombucha P5R50 fermentada por 16 dias. Foram realizadas análises físico-químicas das amostras antes e após a primeira e antes e após a segunda fermentação (kombucha saborizada e kombucha carbonatada), com os resultados sendo apresentados no Apêndice C.

A análise sensorial contou com a participação de 71 pessoas da comunidade da universidade, incluindo alunos, professores e colaboradores. Destes, 4 pessoas afirmaram no questionário *on line* que fumam cigarro, cigarro eletrônico ou outros e 12 pessoas afirmaram no questionário *on line* sentir algum sintoma de gripe ou infecção respiratória nos 15 dias antecedentes ao dia do teste; logo, por conta dos critérios de exclusão, estas respostas foram desconsideradas na análise, obtendo-se 55 respostas remanescentes. Essa população se caracteriza por 80% ter entre 18 e 30 anos, 80 % ser do gênero feminino e 58,2% já conhecer e/ou consumir a kombucha.

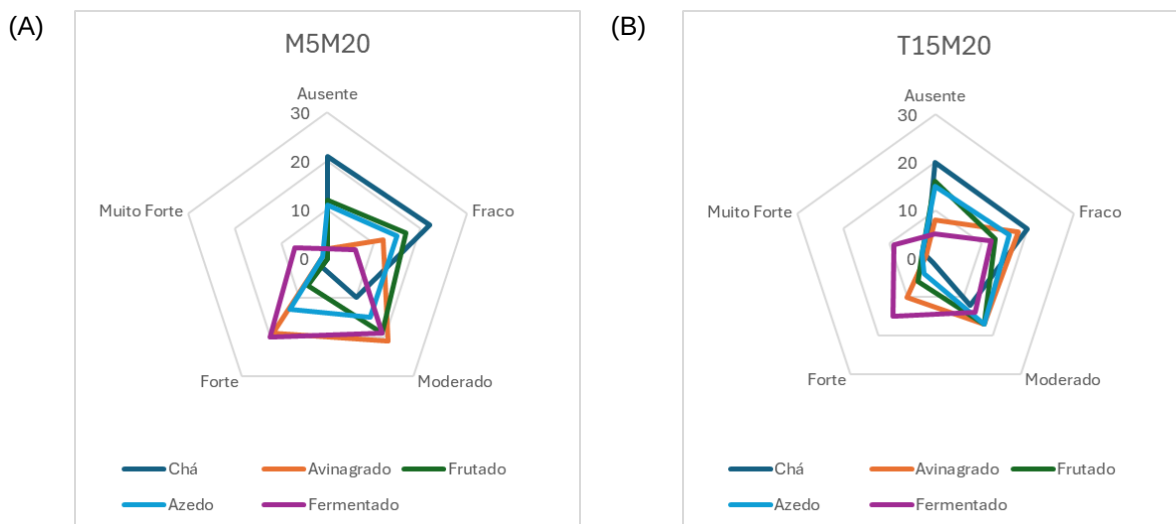
As respostas obtidas foram analisadas e apresentadas nas Figuras 13 a 15, onde observa-se o perfil de análise dos atributos de aparência (coloração e turbidez), aroma (chá, fermentado, frutado, azedo e avinagrado) e sabor (chá, avinagrado, doce, frutado e alcoólico) classificando-as entre ausente, fraco, moderado, forte ou muito forte das kombuchas análogas em comparação a kombucha padrão. A Figura 16 apresenta uma avaliação geral das kombuchas padrão e análogas identificando-as entre muito ruim a muito boa.

Figura 13 – Análise dos atributos de aparência (coloração e turbidez) para as kombuchas análogas (A) M5M20 e (B) T15M20



Pode-se notar que o atributo de aparência das kombuchas obteve um perfil único, onde a coloração e turbidez da kombucha M5M20 foram moderadamente mais intensos enquanto a kombucha T15M20 apresentou intensidade forte de coloração e turbidez se comparadas a kombucha padrão. Tal fato ocorre pela presença do melaço que escurece e aumenta a turbidez da bebida.

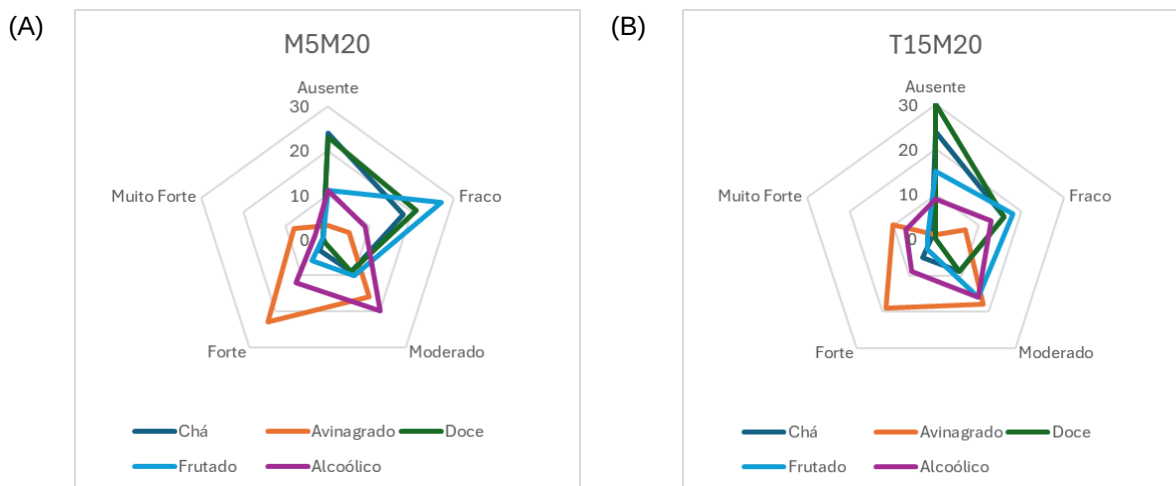
Figura 14 – Análise dos atributos de aroma (chá, avinagrado, frutado, azedo e fermentado) para as kombuchas análogas (A) M5M20 e (B) T15M20



Na análise de aroma percebe-se que, para ambos os casos, o aroma de chá é classificado majoritariamente como fraco ou ausente demonstrando que este se perde quase completamente. A kombucha M5M20 apresenta maior intensidade nos aromas de fermentado e avinagrado, ao passo que os aromas de azedo e frutado podem ser percebidos por algumas pessoas, mas não por outras, tendo

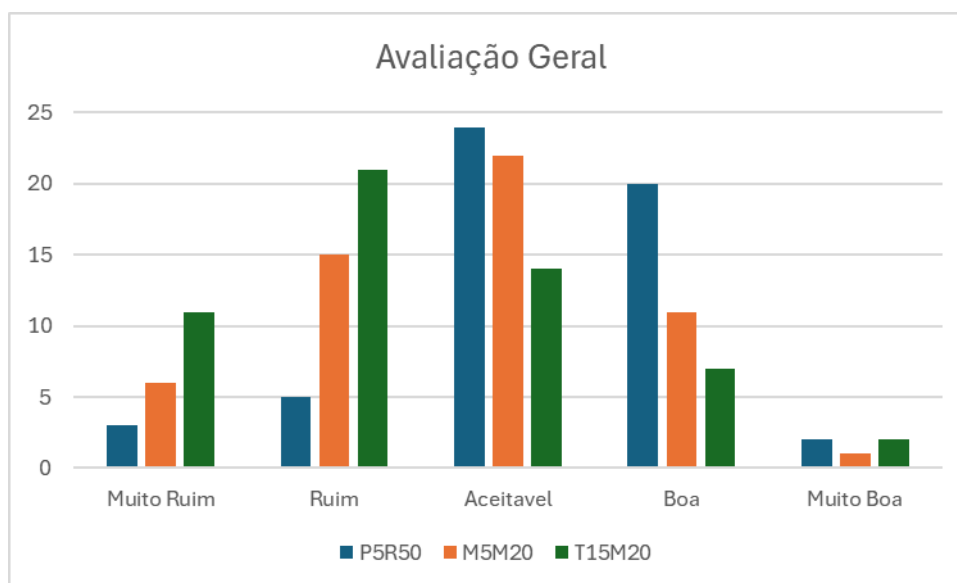
intensidade classificada desde ausente até forte. Diferentemente, a kombucha T15M20 apresentou seus aromas com intensidades mais equilibradas onde todos estão majoritariamente classificados com intensidade moderada a fraco, com uma pequena parcela do aroma avinagrado e fermentado para a intensidade forte.

Figura 15 – Análise dos atributos de sabor (chá, avinagrado, doce, frutado e alcoólico) para as kombuchas análogas (A) M5M20 e (B) T15M20



O sabor foi o atributo que apresentou maiores diferenças entre cada critério avaliado, mas de forma geral o sabor de chá e doce foram avaliados predominantemente como ausente para ambas as kombuchas. A intensidade do sabor alcoólico foi classificada desde ausente a forte enquanto do sabor avinagrado desde moderado a muito forte para ambas as kombuchas. Já o sabor frutado foi classificado principalmente como fraco para a kombucha M5M20 e variou desde intensidade ausente a moderada na kombucha T15M20. Isso demonstra, em geral, que as kombuchas análogas possuem altos valores de acidez e baixos em açúcar mesmo após saborizada e com a presença de compostos aromáticos provenientes dos insumos utilizados apresenta perfil sensorial, principalmente, avinagrado e fermentado, não muito comum para a maioria das pessoas

Figura 16 – Avaliação geral das kombuchas



A avaliação geral demonstra que a kombucha padrão é considerada majoritariamente aceitável e boa pelos participantes, com porcentagens de 44,4% e 37,0% respectivamente. A kombucha M5M20 foi considerada aceitável por 40,0%, ruim por 27,3% e boa por 20,0% dos participantes, enquanto a T15M20 foi classificada como ruim, aceitável e muito ruim por 38,2%, 25,4% e 20,0% dos participantes, respectivamente. Como opção pode-se pensar em aumentar a taxa de adição do componente de saborização para alterar este perfil benéficamente tornando a bebida mais palatável.

Diversas literaturas apresentam diferentes análises sensoriais de diferentes kombuchas, mas o perfil ácido e/ou avinagrado está praticamente sempre presente. Neffe-Skocińska et al. (2017) caracterizou o perfil sensorial da tradicional kombucha (com chá preto ou verde e açúcar) principalmente com aroma de chá, limão e azedo, enquanto os cheiros de acético, fermento e outros e os sabores de chá e azedo eram quase imperceptíveis, mas com uma bebida altamente clarificada. Zou et al. (2021) demonstrou que a kombucha preparada com chá Zijuan (uma variedade de *Camellia sinensis* produzida na China) teve seu perfil visual e olfativo mais bem avaliados enquanto sua pontuação para o perfil de sabor ficou 5,8% e 4,0% menor que as kombuchas de chá preto e verde, respectivamente; ainda assim, mesmo com sabor amargo e ácido mais pronunciáveis por conta de uma maior concentração de ácidos orgânicos, antocianinas e catequinas, a bebida foi melhor pontuada na aceitabilidade geral.

Dartora et al. (2023) utilizaram a metodologia *Check-all-that-apply* (CATA) para a caracterização sensorial de amostras de kombucha feitas com chá verde, chá preto e erva-mate. Os participantes do estudo identificaram o sabor de vinagre em todas as amostras,

porém, não mencionaram a presença de aroma ou sabor alcoólico, embora a análise instrumental tenha detectado etanol em todas as amostras. O estudo também revelou que a kombucha de erva-mate foi percebida como tendo um cheiro e sabor mais suaves e doces, além de cor clara, características mencionadas pela maioria dos participantes. Adicionalmente, os consumidores descreveram a kombucha ideal como doce, com sabor e aroma suaves, perfil distante das kombuchas desenvolvidas neste trabalho que apresentam aromas e sabores pronunciáveis de fermentado e alcoólico.

Malbaša et al. (2008) destacam que as kombuchas produzidas com melaço apresentam características sensoriais distintas em comparação com as kombuchas tradicionais. Essas versões são notavelmente mais escuras, levemente mais carbonatadas e têm um perfil de doçura mais acentuado, com notas de caramelo e um aroma característico do melaço. Em contraste, a kombucha feita com chá preto exibe uma coloração marrom clara, é mais espumante, tem um sabor ácido e refrescante, preservando as qualidades típicas do chá fermentado.

Além disso, diferentes procedimentos durante a produção de kombucha podem influenciar significativamente seu perfil sensorial, tornando-a mais palatável. Um controle mais rigoroso das condições de fermentação, como temperatura, pH e tempo, ou o aumento da proporção de componentes utilizados na saborização, são estratégias que podem melhorar a aceitação do produto. Fabricio et al. (2022) também sugere que a adoção de métodos alternativos, como a produção de kombucha sem a fração líquida do starter ou o uso de starters liofilizados, pode proporcionar maior controle sobre a microbiota presente. Esses procedimentos tendem a reduzir a produção de etanol e as concentrações de ácido acético, resultando em um produto final com menor acidez e menor teor alcoólico, o que pode ser altamente benéfico para melhorar a aceitação sensorial da bebida.

6 CONCLUSÃO

Ao avaliar a produção de kombuchas a partir do planejamento experimental foi possível demonstrar a importância das Fonte N, Fonte C e [C] na formulação de substratos para o crescimento microbiano e o desenvolvimento de novos produtos, o que torna o trabalho mais custoso. Neste trabalho foram escolhidos como melhores substratos os identificados como M5M20 e T15M20, compostos pelos resíduos agroindustriais milhocina, trub e melaço, por apresentarem menor taxa de açúcar residual e graduação alcoólica e maior acidez volátil e CFT.

Definir o melhor tempo de fermentação para as kombuchas com os dois substratos selecionados por meio da cinética de fermentação gerou informações importantes com relação ao crescimento microbiano e o desenvolvimento do produto ao decorrer do tempo. Foi fundamental saber que as kombuchas análogas possuem um menor tempo de produção quando comparada ao produto padrão, porque o consumo de açúcares e a produção de ácidos são muito mais rápidos. Dessa forma, sabe-se que a produção de kombuchas utilizando os substratos análogos demonstram uma maior produtividade.

Por outro lado, a análise sensorial para os atributos de aparência, sabor e aroma das kombuchas demonstrou que a kombucha padrão apresenta o perfil que melhor agrada aos diversos tipos de paladares. A vista disso, desenvolver melhor o substrato ou trabalhar melhor a saborização podem ser opções para melhorar a kombucha tornando-a mais palatável, visto que os substratos são considerados ótimos para a produção. Outro ponto a ser considerado é como a legislação considera esses produtos, visto que apenas é considerado como kombucha o produto da fermentação de *Camellia sinensis*, sendo permitido a combinação da mesma com outros ingredientes.

7 REFERÊNCIAS

AMARAL, T. M. **FATORES DE CONTROLE NO PROCESSO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA: UMA REVISÃO**. TCC (Tecnólogo)—Morrinhos: Instituto Federal Goiano, 2022.

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. W. **COMPARISON OF CORN STEEP LIQUOR WITH OTHER NUTRIENTS IN THE FERMENTATION OF D-XYLOSE BY PICHIA STIPITIS CBS 6054**BIOTECHNOLOGY LETTERS. [s.l: s.n.].

AMIRI, S. et al. Enhancing the production of bacterial cellulose in Kombucha through the utilization of sugarcane molasses via central composite design. **Journal of Food Science and Technology (Iran)**, v. 21, n. 150, p. 26–43, 1 ago. 2024.

ANGELA, C. et al. **Isolation and Screening of Microbial Isolates from Kombucha Culture for Bacterial Cellulose Production in Sugarcane Molasses Medium**. KnE Life Sciences. **Anais...Knowledge E**, 11 fev. 2020.

AZLAN, A. et al. Antioxidant activity, nutritional and physicochemical characteristics, and toxicity of minimally refined brown sugar and other sugars. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 9, p. 5048–5062, 1 set. 2020.

BAPTISTA, S. A. E. **TENDÊNCIAS DE MERCADO – BEBIDAS FUNCIONAIS**. Dissertação—Estoril: ESCOLA SUPERIOR DE HOTELARIA E TURISMO DO ESTORIL, 2013.

BARAKAT, N. et al. Development of a New Kombucha from Grape Pomace: The Impact of Fermentation Conditions on Composition and Biological Activities. **Beverages**, v. 10, n. 2, p. 29, 17 abr. 2024.

BARROS, V. C.; BOTELHO, V. A.; CHISTÉ, R. C. **Alternative Substrates for the Development of Fermented Beverages Analogous to Kombucha: An Integrative Review**. **Foods**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jun. 2024.

BISHOP, P. et al. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 1–9, 1 out. 2022.

BRASIL. LEI Nº 8.918, DE 14 DE JULHO DE 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e dá outras providências. . 1994.

BRASIL. DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. . 2009.

BROUNS, F.; KOVACS, E. **Functional drinks for athletes**. [s.l: s.n.].

CARDOSO, R. R. et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, p. 1–10, 1 fev. 2020.

CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2 mar. 2016.

CHEILAS, T. et al. **Hemicellulolytic activity of Fusarium oxysporum grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinanase***Process Biochemistry*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/procbio>.

COELHO, R. M. D. et al. Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, p. 1–12, 1 dez. 2020.

CUBAS, A. L. V. et al. Advances in the Production of Biomaterials through Kombucha Using Food Waste: Concepts, Challenges, and Potential. **Polymers**, v. 15, n. 7, p. 1–21, 1 abr. 2023.

DARTORA, B. et al. Kombuchas from black tea, green tea, and yerba-mate decocts: Perceived sensory map, emotions, and physicochemical parameters. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 33, p. 100789, 1 set. 2023a.

DARTORA, B. et al. Factors influencing kombucha production: effects of tea composition, sugar, and SCOBY. **Food Science and Technology**, v. 43, 5 out. 2023b.

DARTORA, B. et al. Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, v. 174, p. 113569, 1 dez. 2023c.

DESEO, M. A. et al. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract. **Food Chemistry**, v. 314, p. 1–10, 1 jun. 2020.

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

ELEUTERIO, H. **Serviços de Alimentação e Bebidas**. 1. ed. São Paulo: Érica, 2014.

ELFIRTA, R. R. et al. Antioxidant Properties of Kombucha Beverage Infused with *Ganoderma lucidum* and Green Tea from *Camellia sinensis* (L.) Kuntze with Several Fermentation Times. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 10, n. 1, p. 141–152, 2024.

ELLWANGER, E. R. A. **PRODUÇÃO DE FILME DE CELULOSE BACTERIANA COM RESÍDUO CERVEJEIRO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS**. Dissertação (Mestrado)—Belo Horizonte: Universidade do Estado de Minas Gerais, 2022.

EXPERT MARKET RESEARCH. **Global Kombucha Tea Market**. Disponível em: <<https://www.expertmarketresearch.com/reports/kombucha-tea-market>>. Acesso em: 1 jul. 2024.

FABRICIO, M. F. et al. Effect of freeze-dried kombucha culture on microbial composition and assessment of metabolic dynamics during fermentation. **Food Microbiology**, v. 101, 1 fev. 2022.

FABRICIO, M. F. et al. Revamping kombucha production: Achieving consistency and probiotic potential through a tailor-made microbial consortium. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 34, 1 dez. 2023.

FILIPPIS, F. DE et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11–16, 1 ago. 2018.

FITRIASARI, P. D.; ZAHROTUNISYA, D. T. **Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of fermented apple peels kombucha and their chemical content.** IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**Institute of Physics, 2024.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

HANIFAH, A. et al. The Effect of Variations in Sugar Types and Fermentation Time on Enzyme Activity and Total Titrated Acid on Eco-Enzyme Results of Fermentation. **Advances in Biological Sciences Research**, v. 22, p. 585–589, 2022.

HARTATI, F. K. et al. Potential anticancer agents of *Curcuma aeruginosa*-based kombucha: In vitro and in silico study. **Food Chemistry Advances**, v. 4, 1 jun. 2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.** 4. ed. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 2008.

JAKUBCZYK, K. et al. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 1–15, 1 maio 2020.

KARTELIAS, I. G. et al. Kombucha Fermentation of Olympus Mountain Tea (*Sideritis scardica*) Sweetened with Thyme Honey: Physicochemical Analysis and Evaluation of Functional Properties. **Foods**, v. 12, n. 18, 1 set. 2023.

KARYANTINA, M.; SURULLOH, A.; SUHARTATIK, N. **Antioxidant activity kombucha coffee (Coffee spp) with variation concentration and type.** BIO Web of Conferences. **Anais...**EDP Sciences, 1 abr. 2024.

KAZAN, R. M. et al. Determination of amino acids content in tea species using liquid chromatography via pre-column fluorescence derivatization. **Microchemical Journal**, v. 150, p. 2–6, 1 nov. 2019.

KITWETCHAROEN, H. et al. Kombucha Healthy Drink—Recent Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2023.

KUSHARGINA, R. et al. **Metagenomic Analysis, Safety Aspects, and Antioxidant Potential of Kombucha Beverage Produced from Telang Flower (*Clitoria ternatea* L.) Tea**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ssrn.com/abstract=4723889>>.

KUZU, K. T. et al. Production and Characterization of Kombucha Tea from Different Sources of Tea and Its Kinetic Modeling. **Processes**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2023.

LA TORRE, C. et al. Improved Antioxidant Properties and Vitamin C and B12 Content from Enrichment of Kombucha with Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) Powder. **Fermentation**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2024.

LAUREYS, D.; BRITTON, S. J.; CLIPPELEER, J. DE. Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 3, p. 165–174, 2 jul. 2020.

LE, B. X. N. et al. Coffee Husk By-Product as Novel Ingredients for Cascara Kombucha Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 673–680, 2024.

LEAL, J. M. et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 1 jan. 2018.

LEALI, N. F. et al. Reconstruction of Simplified Microbial Consortia to Modulate Sensory Quality of Kombucha Tea. **Foods**, v. 11, n. 19, 1 out. 2022.

LEE, M. K. et al. Characterization of catechins, theaflavins, and flavonols by leaf processing step in green and black teas (*Camellia sinensis*) using UPLC-DAD-QToF/MS. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 5, p. 997–1010, 1 maio 2019.

LEONARSKI, E. et al. Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. **LWT**, v. 135, 1 jan. 2021a.

LEONARSKI, E. et al. Typical kombucha fermentation: Kinetic evaluation of beverage and morphological characterization of bacterial cellulose. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 12, p. 1–9, 1 dez. 2021b.

LEONARSKI, E. et al. **Production process and characteristics of kombucha fermented from alternative raw materials. Food Bioscience** Elsevier Ltd, , 1 out. 2022.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. CORN STEEP LIQUOR IN MICROBIOLOGY. **Bacteriological Reviews**, v. 12, n. 4, p. 297–311, dez. 1948.

LUVISON, A.; DANGUI, A. Z.; LIMA, K. P. DE. Desenvolvimento de kombucha de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) saborizado com manga (*Mangifera indica* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 17, n. 1, p. 4057–4079, 2023.

MALBAŠA, R. et al. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 926–932, 1 jun. 2008.

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, 1 fev. 2008.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 5. **Diário Oficial da União**. 31 mar. 2000.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 55. **Diário Oficial da União**. 18 out. 2002.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 24. **Diário Oficial da União**. 8 set. 2005.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 6. **Diário Oficial da União**. 3 abr. 2012a.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 34. **Diário Oficial da União**. 29 nov. 2012b.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 41. **Diário Oficial da União**. 17 set. 2019a.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 75. **Diário Oficial da União**. 31 dez. 2019b.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 16. **Diário Oficial da União**. 19 mar. 2020.

MARTIN, J. G. P.; LINDNER, J. D. D. **MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS FERMENTADOS**. São Paulo: Blucher, 2022.

MATHIAS, T. R. DOS S.; MELLO, P. P. M. DE; SÉRVULO, E. F. C. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 30 jul. 2014.

MENDIOLA, J. A. et al. Profiling of different bioactive compounds in functional drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p. 234–241, 25 abr. 2008.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MIRANDA, J. F. DE et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503–527, 1 fev. 2022.

MOUSAVI, S. M. et al. Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

MUHIALDIN, B. J. et al. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 481–487, abr. 2019.

MUSSATTO, S. I. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. Em: **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. [s.l.] Springer Netherlands, 2009. p. 313–326.

NAMITA, P.; MUKESH, R.; VIJAY, K. J. *Camellia Sinensis* (Green Tea): A Review. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 52–59, 2012.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. Contenido de ácido y efectos de las condiciones de fermentación en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de bebidas de té de Kombucha. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2 out. 2017.

PALUDO, N. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**. Trabalho de Conclusão de Curso—Porto Alegre: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2017.

PURWANINGTYAS, Y. R.; CAHYANINGTYAS, Y. D. W. Effect of Long Fermentation to Titrated Acid Total (TAT) in Lemongrass Kombucha Tea (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **International Journal of Health Sciences and Research**, v. 14, n. 4, p. 112–118, 11 abr. 2024.

RACHMAWATI, N. F. et al. ANALYSIS OF CHEMICAL CHARACTERISTICS OF KOMBUCHA TEA SEAWEED *Eucheuma cottonii*. **Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology Available**, v. 19, n. 4, p. 199, 2023.

RAMDANI, D.; CHAUDHRY, A. S.; SEAL, C. J. Chemical composition, plant secondary metabolites, and minerals of green and black teas and the effect of different tea-to-water ratios during their extraction on the composition of their spent leaves as potential additives for ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4961–4967, 22 maio 2013.

RIVAS, B. et al. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 93–98, 1 dez. 2004.

SAITO, M. S.; SANTOS, W. A. DOS; MAMEDE, M. E. DE O. Coffee Flavoured Kombucha: Development, Physicochemical Characterization and Sensory Analysis. 2024.

SALEHI, S.; SADEGHI, A.; KARIMI, A. Growth performance, nutrients digestibility, caecum microbiota, antioxidant status and immunity of broilers as influenced by kombucha fermented on white sugar or sugar beet molasses. **Italian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, p. 1770–1780, 2021.

SARAIVA, B. R. et al. Valorização de resíduos agroindustriais: fontes de nutrientes e compostos bioativos para a alimentação humana. **Pubsaúde**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2018.

SARAIVA, B. R. et al. Waste from brewing (trub) as a source of protein for the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 1247–1255, 1 abr. 2019.

SAVARY, O. et al. **Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: microbiota-induced biochemical changes and biofilm formation**. [s.l: s.n.].

SELVARAJ, S.; GURUMURTHY, K. Metagenomic, organoleptic profiling, and nutritional properties of fermented kombucha tea substituted with recycled substrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024.

SHENOY K., C.; LOBO, R. O.; DIAS, F. O. Kombucha (bio-tea): An elixir for life? Em: **Nutrients in Beverages: Volume 12: The Science of Beverages**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 591–616.

SILVEIRA, M. M. et al. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 442–445, 2001.

SINAGA, E. et al. Identifying therapeutic effect of kombucha Pirdot (*Saurauia vulcani* Korth.) against colorectal cancer: The experimental data and in silico approach. **Medicine in Microecology**, v. 20, 1 jun. 2024.

SISTEMA FIEP, F. DAS I. DO E. DO P. **BIOTECNOLOGIA 2031: ROTAS ESTRATÉGICAS PARA O FUTURO DA INDÚSTRIA PARANAENSE**. [s.l: s.n.].

SOARES, M. G.; LIMA, M. DE; SCHMIDT, V. C. R. **Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2021.

SORNKAYASIT, K. et al. Immunomodulatory potentials of modified kombucha with pineapple by-products in aging: An ex vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 112, 1 jan. 2024.

SUCIATI, F. et al. Effect of Various Types of Sugars on Antioxidant Activity and Physico-chemical Properties of Kombucha Fermented Whey. **Jurnal Peternakan**, v. 21, n. 1, p. 105–114, 2024.

SURYA, J. R. **Antioxidant Activity and Consumer Acceptance Level of Kombucha Tea with Noni Fruit Extract (Morinda citrifolia)**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**Institute of Physics, 2024.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Não Alcoólicas**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2010.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. **Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha**. [s.l: s.n.].

WANG, T.; SOYAMA, S.; LUO, Y. Development of a novel functional drink from all natural ingredients using nanotechnology. **LWT**, v. 73, p. 458–466, 1 nov. 2016.

XU, L. et al. Ultrafiltration isolation, physicochemical characterization, and antidiabetic activities analysis of polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 11, p. 4025–4032, 1 nov. 2020.

YILMAZ, C.; ÖZDEMİR, F.; GÖKMEN, V. Investigation of free amino acids, bioactive and neuroactive compounds in different types of tea and effect of black tea processing. **LWT**, v. 117, p. 1–7, 1 jan. 2020.

ZOU, C. et al. Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. **Food Chemistry**, v. 363, 30 nov. 2021.

ZUBAIDAH, E. et al. Antioxidant and antibacterial activity of sappan wood (*Caesalpinia sappan* L.) kombucha. **Advances in Food Science, Sustainable Agriculture and Agroindustrial Engineering**, v. 7, n. 1, p. 10–19, 2024.

8 APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: Avaliação da Produção de Kombuchas a partir de Diferentes Substratos

Pesquisador Responsável: Geasi Lucas Martins

Você está sendo convidado(a) para ser participante do Projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da Produção de Kombuchas a partir de Diferentes Substratos” de responsabilidade do pesquisador Geasi Lucas Martins, sob orientação da Prof.^a Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider e Prof.^a Dra. Michele Cristina Formolo Garcia.

Antes de participar da análise sensorial, leia cuidadosamente o que se segue e pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Sentindo-se esclarecido(a) sobre as informações que estão neste termo e pronto a participar do estudo, peço que rubrique cada página e assine ao final deste documento, em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável pela pesquisa. Saiba que você tem total direito de não querer participar.

1. O trabalho tem por objetivo analisar propriedades organolépticas de kombuchas produzidas a partir de diferentes substratos considerando o desenvolvimento de uma marca e produção de kombuchas relacionados à uma dinâmica de mercado em conjunto a uma maior busca da sociedade por estilo de vida saudável;
2. A participação nesta pesquisa consistirá em realizar análise visual, olfativa e gustativa em kombuchas produzidas com diferentes substratos. Este teste ocorrerá apenas uma vez no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Gastronomia da Univille, durando, em média, de 20 a 30 minutos, onde lhe serão dados copos com as kombuchas que serão avaliadas visual, olfativa e gustativamente, e posteriormente, preenchido um formulário online. Também será oferecido grãos de café e água antes, entre e após as degustações.
3. Durante a execução da pesquisa poderão ocorrer riscos de pequenos acidentes, como derramamento de líquidos, ou pequeno desconforto gastrointestinal por se tratar de uma bebida ácida e probiótica. A bebida pode conter mínimas doses de álcool (até 1%) além de açúcar, glúten e derivados de cevada, malte, milho e trigo.
4. Os benefícios com a participação nesta pesquisa serão o desenvolvimento de um produto probiótico com possíveis propriedades benéficas ao organismo. O consumo diário da kombucha pode trazer melhorias ao organismo como o equilíbrio da flora intestinal, ação

antioxidante, melhora de atividades metabólicas e da imunidade, além de auxiliar na diminuição de diabetes e outras propriedades. No entanto, para a participação nesta pesquisa, o consumo isolado não acarretará nenhum benefício.

5. Os participantes não terão nenhuma despesa ao participar da pesquisa e poderão retirar sua concordância na continuidade da pesquisa a qualquer momento.

6. Não há nenhum valor econômico a receber ou a pagar aos voluntários pela participação, no entanto, caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente da participação no estudo, os voluntários poderão pleitear indenização, segundo as determinações do Código Civil (Lei nº 10.406 de 2002) e das Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde.

7. O nome dos participantes será mantido em sigilo, assegurando assim a sua privacidade, e se desejarem terão livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que queiram saber antes, durante e depois da sua participação.

8. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e os resultados poderão ser publicados.

Qualquer dúvida, pedimos a gentileza de entrar em contato com Geasi Lucas Martins, pesquisador responsável pela pesquisa, telefone: (47) 98404-2816, e-mail: geasilm@gmail.com.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Univille, localizado na Rua Paulo Malschitzki, 10 - Bairro Zona Industrial - Campus Universitário – CEP 89219-710 - Joinville – SC ou pelo telefone (47) 3461-9235 ou e-mail: comitetica@univille.br.

Eu, _____, declaro ter sido informado e concordo em participar do projeto de pesquisa acima descrito.

Joinville, _____ de junho de 2024.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

9 APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO *ON LINE* PARA ANÁLISE SENSORIAL

Projeto de Pesquisa - Avaliação de Kombuchas

Você está sendo convidado(a) para ser participante do Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da Composição Química e Cinética da Fermentação de Kombucha Produzida a partir de Diferentes Substratos" de responsabilidade do pesquisador Geasi Lucas Martins, sob orientação da Prof.^a Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider e Prof.^a Dra. Michele Cristina Formolo Garcia.

O trabalho tem por objetivo avaliar a produção de kombucha a partir de diferentes substratos estimando o açúcar residual e fenólicos totais e a formação de etanol e ácidos totais considerando o desenvolvimento de uma marca e produção de kombuchas relacionados à uma dinâmica de mercado em conjunto a uma maior busca da sociedade por estilo de vida saudável.

A participação nesta pesquisa consistirá em realizar análise visual, olfativa e gustativa em Kombuchas produzidas com diferentes substratos comparando a uma kombucha padrão. A participação e resposta a cada pergunta é livre de qualquer obrigatoriedade, então sinta-se livre para deixar de participar a qualquer momento ou de responder a qualquer questão. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e os resultados poderão ser publicados

Questionário Pessoal

1. Faixa Etárias

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Entre 18 e 30 anos
- ☐ Entre 31 e 45 anos
- ☐ Entre 46 e 60 anos
- ☐ Mais de 60 anos

2. Gênero

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Masculino
- ☐ Feminino
- ☐ Outro
- ☐ Prefiro não dizer

3. Fuma cigarro, cigarro eletrônico, palheiro ou outros com frequência?

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não

4. Sente ou sentiu algum sintoma de infecção (gripe, resfriado, covid, etc.) ou alergia nos últimos 15 dias?

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não

5. Já consumiu ou consome Kombucha?

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não

Análise Sensorial

Consistirá em realizar análise visual, olfativa e gustativa em Kombuchas produzidas com diferentes substratos. Serão dados copos com as kombuchas que serão avaliadas e preenchido o formulário online. Também será oferecido água para beber antes, entre e após as degustações

6. Referente a Análise Visual da Kombucha com **menor número** comparado a Kombucha P, assinale a intensidade de cada aspecto

Marcar apenas uma oval por linha.

	Ausente	Fraco	Moderado	Forte	Muito Forte
Coloração	☐	☐	☐	☐	☐
Turbidez	☐	☐	☐	☐	☐

7. Referente a Análise Visual da Kombucha com **maior número** comparado a Kombucha P, assinale a intensidade de cada aspecto

Marcar apenas uma oval por linha.

	Ausente	Fraco	Moderado	Forte	Muito Forte
Coloração	☐	☐	☐	☐	☐
Turbidez	☐	☐	☐	☐	☐

8. Referente a Análise Olfativa da Kombucha com **menor número** comparado a Kombucha P, assinale a intensidade de cada aroma

Marcar apenas uma oval por linha.

	Ausente	Fraco	Moderado	Forte	Muito Forte
Chá	☐	☐	☐	☐	☐
Avinagrado	☐	☐	☐	☐	☐
Frutado	☐	☐	☐	☐	☐
Azedo	☐	☐	☐	☐	☐
Fermentado	☐	☐	☐	☐	☐

9. Referente a Análise Olfativa da Kombucha com **maior número** comparado a Kombucha P, assinale a intensidade de cada aroma

Marcar apenas uma oval por linha.

	Ausente	Fraco	Moderado	Forte	Muito Forte
Chá	☐	☐	☐	☐	☐
Avinagrado	☐	☐	☐	☐	☐
Frutado	☐	☐	☐	☐	☐
Azedo	☐	☐	☐	☐	☐
Fermentado	☐	☐	☐	☐	☐

10. Referente a Análise Gustativa da Kombucha com **menor número** comparado a Kombucha P, assinale a intensidade de cada sabor

Marcar apenas uma oval por linha.

	Ausente	Fraco	Moderado	Forte	Muito Forte
Chá	☐	☐	☐	☐	☐
Avinagrado	☐	☐	☐	☐	☐
Doce	☐	☐	☐	☐	☐
Frutado	☐	☐	☐	☐	☐
Alcoólico	☐	☐	☐	☐	☐

14. Gostaria de fazer algum comentário sobre o que achou das kombuchas?
Fique a disposição para dizer ou não como se sentiu ao realizar o teste e o que achou sobre as kombuchas.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google.

Google Formulários

**10 APÊNDICE C – RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DAS KOMBUCHAS
PRODUZIDAS PARA A ANÁLISE SENSORIAL**

Análise de Concentração e Açúcares (g/L)				
Amostra	Antes da 1ª Fermentação	Após a 1ª Fermentação	Antes da 2ª Fermentação	Após a 2ª Fermentação
P5R50	68,41	21,28	29,75	22,75
M5M20	27,91	10,97	16,49	10,97
T15M20	31,22	9,86	21,28	9,86
Acidez Volátil (mEAA/L)				
Amostra	Antes da 1ª Fermentação	Após a 1ª Fermentação	Antes da 2ª Fermentação	Após a 2ª Fermentação
P5R50	6,77	63,56	57,83	47,93
M5M20	5,21	53,66	43,76	43,24
T15M20	4,69	61,48	60,44	42,72
Gradação Alcoólica (%)				
Amostra	Antes da 1ª Fermentação	Após a 1ª Fermentação	Antes da 2ª Fermentação	Após a 2ª Fermentação
P5R50	0,21	1,01	0,96	1,15
M5M20	0,23	0,87	0,76	1,09
T15M20	0,23	0,97	0,84	1,03
Composição Fenólica Total (mEAG/L)				
Amostra	Antes da 1ª Fermentação	Após a 1ª Fermentação	Antes da 2ª Fermentação	Após a 2ª Fermentação
P5R50	892,48	1008,56	1385,83	1143,99
M5M20	1240,73	1250,40	1632,51	1477,73
T15M20	1487,40	1429,36	1927,55	1429,36

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 29/01/2025.

1. Identificação do material bibliográfico: () Tese (X) Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Geasi Lucas Martins

Orientadora: Andréa Lima dos Santos Schneider

Coorientadora: Michele Cristina Formolo Garcia

Data de Defesa: 03/12/2024

Título: Avaliação da produção de kombuchas a partir de diferentes substratos sustentáveis

Instituição de Defesa: Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.

Assinatura do autor

Joinville, 29 de janeiro de 2025

Local/Data