



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

VITOR HUGO TSURU

***KOMBUCHA:***

BEBIDA FERMENTADA NÃO ALCOÓLICA, DE CHÁ OOLONG  
OU ERVA-MATE

VITOR HUGO TSURU

***KOMBUCHA:***

BEBIDA FERMENTADA NÃO ALCOÓLICA DE CHÁ OOLONG  
OU ERVA-MATE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Wilma Spinosa  
Coorientador: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

TSURU, VITOR HUGO.

Kombucha: bebida fermentada não alcoólica, de chá oolong ou erva-mate / VITOR HUGO TSURU. - Londrina, 2016.  
73 f. : il.

Orientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Coorientador: Sandra Helena Prudencio .

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Fermentação - Tese. 2. Bebida não alcoólica - Tese. 3. Antioxidante - Tese. 4. Análise sensorial - Tese. I. Spinosa, Wilma Aparecida. II. , Sandra Helena Prudencio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

VITOR HUGO TSURU

***KOMBUCHA:***

BEBIDA FERMENTADA NÃO ALCOÓLICA DE CHÁ OOLONG OU  
ERVA-MATE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida  
Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Profa. Dra. Thais de Souza Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de junho de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Às Profa. orientadora Dra. Wilma Aparecida Spinosa e coorientadora Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio, pela orientação, confiança, incentivo e pelos conhecimentos transmitidos durante esta etapa da minha carreira profissional e de vida.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo ensino e dedicação em suas disciplinas. E aos funcionários, pelo auxílio para a realização de pesquisa.

Aos prof. Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas e Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias, e a sua equipe formada pela Carla Suzuki, Priscilla Cardoso, Carolina Galdino e João Antonio pelas contribuições para esta pesquisa. E a equipe do Laboratório de Virologia Animal da UEL pelo sequenciamento genético.

À equipe da Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf do Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação e Metodologia Analítica da UEL formada por Tiago Madeira, Lycio Watanabe e Alessandra Monteiro pela disponibilidade do cromatógrafo.

Ao Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer e a Dra. Paula Sousa Faria-Tischer do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelos conhecimentos e contribuições.

À Prof. Nina Moori e Marina Bibas pelo auxílio com as culturas mistas.

À técnica Cristina Lopes do Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas e à estagiária Vanessa do Laboratório de Espectroscopia pelo auxílio nas análises.

Aos companheiros do grupo de biotecnologia e da turma de mestrado 2014.

“People who love to eat  
are always the best people.”  
— Julia Child

TSURU, Vitor Hugo. **Kombucha**: bebida fermentada não alcoólica, de chá oolong ou erva-mate. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O *kombucha* é uma bebida fermentada não alcoólica tradicional da cultura asiática produzida com chá (infusão de *Camellia sinensis*) adoçado cujo perfil sensorial é ácido e refrescante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar *kombucha* produzidos a partir de chás *oolong* ou erva-mate e avaliar a sua aceitação em potenciais consumidores. Foram elaborados dois *kombuchas*: *oolong* e mate com adição 10 % de sacarose e inóculo de cultura mista, fermentado por 14 dias mantido a 30 °C. As análises foram feitas em 0, 3, 7, 10 e 14 dias. Os parâmetros avaliados foram sólidos solúveis totais (SS), açúcares (AC), pH, acidez total titulável (ATT), ácidos orgânicos, teor alcoólico (TA), fenólicos totais (FET), flavonoides totais (FLT), atividade antioxidante (AA). Teste afetivo de aceitação foi avaliada para bebidas fermentadas nos tempos 7 e 10 dias. O sequenciamento genético para identificação do inóculo microbiano caracterizou-se como uma cultura mista de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas oryzae*, *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp. e *Meyerozyma caribbica*. O SS para *oolong* reduziu 8,3 % e de mate 7,0 %, e velocidade de consumo de açúcares totais de  $-1,26 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e  $-0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para *oolong* e mate, respectivamente. O pH final das fermentações variou entre 2,81-3,12. A ATT atingiu 8,97 para *oolong* e 6,76 no mate, valores expresso em gramas de ácido acético por litro. O ácido orgânico identificado e quantificado em maior concentração foi ácido acético com  $7,53 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5,75 \text{ g.L}^{-1}$  para *oolong* e mate, respectivamente, no 14º dia. TA não foi detectado nas amostras analisadas. O FET não apresentou diferença ( $p>0,05$ ). O FLT apresentou redução de 45,04 % para *oolong* e 47,42 % para mate. A AA sobre o radical ABTS, a amostra *oolong* indicou taxa de inibição de 90,22 % ao 3º dia e para mate a diferença após o início da fermentação não foi significativo ( $p>0,05$ ). O radical DPPH, *oolong* apresentou inibição de 89,74 % e mate de 86,72 %, ambos no 14º dia. A bebida produzida com mate apresentou maior aceitação global ( $p<0,05$ ) em relação a bebida de *oolong*. O *kombucha* formulado com chá mate resultou em uma bebida com perfil ácido, adoçado, refrescante, com potencial antioxidante e aceitação frente a possíveis consumidores.

**Palavras-chave:** Fermentação. Bebida não alcoólica. Acidez. Antioxidante. Análise sensorial.

TSURU, Vitor Hugo. **Kombucha**: non-alcoholic fermented beverage, of *oolong* or yerba mate tea. 2016. 72 p. Dissertation (Master of Science in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

*Kombucha* is a traditional non-alcoholic beverage of Asian culture produced with sweetened tea (*Camellia sinensis*) with sensory profile sour and refreshing. The aim was to develop and characterize *kombucha* made from *oolong* or yerba-mate and to evaluate their sensory acceptance with potential consumers. Two *kombucha* were prepared: *oolong* and mate added 10 % sucrose and inoculum, fermented for 14 days maintained at 30 °C and sampling in 0, 3, 7, 10 and 14 days. The parameters evaluated were total soluble solids content (TSS), sugars, pH, titratable acidity (TA), organic acids (OA), alcohol content (AC), phenolics (PHE), flavonoids (FL), antioxidant activity (AA). Sensory analysis (acceptance test) was performed for fermented beverages by 7 and 10 days. The sequencing for genetic identification of microbial inoculum was characterized as a mixed culture of *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas oryzae*, *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp. e *Meyerozyma caribbica*. TSS for *oolong* decreased 8.3 % and 7.0 % in mate, and consumption of total sugars were  $-1.26 \text{ g.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$  and  $-0.28 \text{ g.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$  for *oolong* and mate, respectively. Final pH varied between 2.81-3.12. TA reached for *oolong* 8.97 and 6.75 for mate, expressed in grams of acid acetic per liter. Identified and quantified OA in higher concentration was acetic acid with  $7.53 \text{ g.L}^{-1}$  and  $5.75 \text{ g.L}^{-1}$  for *oolong* and mate, respectively, in 14th day. AC wasn't detected in the samples. PHE did not differ during fermentation ( $p>0.05$ ). FL decreased in both samples (*oolong*: 45.04 %, mate: 47.42 %). AA on ABTS radical, *oolong* showed in scavenging capacity of 90.22 % (in 3rd day) and mate after fermentation started did not differ ( $p>0.05$ ). For DPPH radical were 89.74 % in *oolong* and 86.72 % in mate, 14th day. Beverage produced with mate showed higher global acceptance ( $p<0.05$ ) compared to *oolong*. The *kombucha* formulated with yerba mate tea resulted in a beverage with sour profile, sweetened, refreshing, antioxidant potential and acceptance in possible consumers.

**Key words:** Fermentation. Non-alcoholic beverage. Acidity. Antioxidant. Sensory analysis.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura química das catequinas .....	19
<b>Figura 2</b> – Gel de agarose da amplificação genética .....	40
<b>Figura 3</b> – Cromatograma de ácidos orgânicos determinados por CLAE da amostra oolong .....	48
<b>Figura 4</b> – Cromatograma de ácidos orgânicos determinados por CLAE da amostra mate .....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Concentração total de açúcares determinados por CLAE e °Brix ..43
- Gráfico 2** – Relação pH e acidez total titulável .....46
- Gráfico 3** – Relação do teor de ácidos orgânicos quantificados por CLAE e acidez total titulável.....49
- Gráfico 4** – Teores de açúcares e ácidos orgânicos da amostra oolong .....50
- Gráfico 5** – Teores de açúcares e ácidos orgânicos da amostra mate .....51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de cobertura, E-value e identidade do sequenciamento genético.....	40
<b>Tabela 2</b> – Teor de sólidos solúveis totais das infusões fermentadas por 14 dias.....	42
<b>Tabela 3</b> – Teor de açúcares por CLAE.....	43
<b>Tabela 4</b> – Potencial hidrogeniônico .....	46
<b>Tabela 5</b> – Teor de acidez total titulável.....	47
<b>Tabela 6</b> – Teor de ácidos orgânicos determinados por CLAE.....	47
<b>Tabela 7</b> – Teor de fenólicos totais .....	52
<b>Tabela 8</b> – Teor de flavonoides totais .....	53
<b>Tabela 9</b> – Atividade antioxidante sobre radical ABTS .....	54
<b>Tabela 10</b> – Taxa de inibição do radical ABTS .....	54
<b>Tabela 11</b> – Atividade antioxidante sobre radical DPPH.....	55
<b>Tabela 12</b> – Taxa de inibição do radical DPPH.....	55
<b>Tabela 13</b> – Dados demográficos dos julgadores do teste afetivo de aceitação.....	57
<b>Tabela 14</b> – Teste afetivo de aceitação .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIR	Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) diamônio
AEC	Antes da Era Comum
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists International</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – Infusão Cérebro Coração
BLAST®	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEP	Conselho de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	(-)-Epicatequina
ECG	(-)-Epicatequina galato
EGC	(-)-Epigalocatequina
EGCG	(-)-Epigalocatequina galato
Eq.AC	Equivalente de Ácido Gálico
Eq.CA	Equivalente de Catequinas
Eq. Trolox	Equivalente de Trolox
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
g.AC.L <sup>-1</sup>	gramas de ácido acético por litro de amostra
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MYP	<i>Manitol Yeast Peptone</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> – Força Centrífuga Relativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
THIE	<i>Tea e Herbal Infusions Europe</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
YMA	<i>Yeast Malt Agar</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1	BEBIDA KOMBUCHA.....	17
3.2	MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DO KOMBUCHA .....	18
3.2.1	Chá de Camellia Sinensis .....	18
3.2.2	Chá de Ilex Paraguariensis .....	20
3.3	LEGISLAÇÃO SOBRE O CHÁ.....	21
3.4	PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO KOMBUCHA.....	22
3.5	PROCESSO DE GASEIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO KOMBUCHA .....	23
3.6	CARACTERÍSTICAS DA BEBIDA KOMBUCHA .....	24
3.6.1	Quanto aos Aspectos Antimicrobianos.....	24
3.6.2	Quanto a Capacidade Antioxidantes .....	25
3.6.3	Quanto ao Perfil Sensorial.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	MATERIAL.....	27
4.1.1	Chás .....	27
4.1.2	Açúcar Orgânico.....	27
4.1.3	Água Mineral .....	27
4.1.4	Microrganismo .....	27
4.2	MÉTODOS .....	28
4.2.1	Preparo do Inóculo .....	28
4.2.2	Manutenção do Inóculo .....	28
4.2.3	Preparo das Infusões .....	28
4.2.4	Fermentação dos Chás .....	28
4.2.5	Caracterização Microbiológica e Genética Molecular.....	29
4.2.5.1	Análise microbiológica.....	29

4.2.5.2	Extração de DNA bacteriano .....	31
4.2.5.3	Extração de DNA fúngico .....	31
4.2.5.4	Amplicação de DNA genômico bacteriano pela reação em cadeia da polimerase .....	32
4.2.5.5	Amplicação do DNA genômico fúngico pela reação em cadeia da polimerase .....	32
4.2.5.6	Sequenciamento do material genético .....	33
4.2.6	Caracterização Físico-Química .....	34
4.2.6.1	Sólidos solúveis totais .....	34
4.2.6.2	Determinação de açúcares.....	34
4.2.6.3	Potencial hidrogeniônico (pH) .....	35
4.2.6.4	Acidez total titulável.....	35
4.2.6.5	Determinação de ácidos orgânicos .....	35
4.2.6.6	Teor alcoólico por ebulimetria .....	35
4.2.6.7	Determinação de compostos fenólicos.....	36
4.2.6.8	Determinação de flavonoides totais.....	36
4.2.6.9	Avaliação da capacidade antioxidante sobre radical ABTS.....	36
4.2.6.10	Avaliação da capacidade antioxidante sobre o radical DPPH .....	37
4.2.7	Análise Sensorial.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1	PREPARAÇÃO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO .....	39
5.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR.....	39
5.3	ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DA BEBIDA KOMBUCHA.....	42
5.3.1	Teor de Sólidos Solúveis e Açúcares.....	42
5.3.2	Potencial Hidrogênionico (Ph), Acidez Total Titulável e Teor de Ácidos Orgânicos .....	45
5.3.3	Teor Alcoólico.....	51
5.3.4	Determinação de Fenólicos Totais e Flavonoides Totais .....	52
5.3.5	Determinação da Capacidade Antioxidante .....	54
5.3.5.1	Radical ABTS .....	54
5.3.5.2	Radical DPPH.....	55
5.4	ANÁLISE SENSORIAL .....	56

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>68</b>
	APÊNDICE A – Formulário social.....	68
	APÊNDICE B – Ficha de avaliação sensorial.....	69
	APÊNDICE C – Cromatograma de carboidratos .....	70
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>
	ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos produtos fermentados do tipo conservas, derivados lácteos e bebidas alcoólicas e não alcoólicas fazem parte de produtos ofertados no mercado de alimentos e bebidas. A fermentação é um método usado para conservação de alimentos desde períodos em que técnicas de refrigeração não eram disponíveis (CIA, 2011; KATZ, 2003).

O processo de fermentação agrega características sensoriais e ou funcionais ao produto final e estas são aceitas pelo consumidor. Apesar da conservação do alimento fermentado ser importante do ponto de vista econômico o fator de prevalência no consumo é a qualidade sensorial. Estes produtos podem ter características ácidas, alcoólicas ou lácticas (CIA, 2011; KATZ, 2003).

Os produtos da fermentação láctica e alcoólica estão presentes em alimentos comuns do público consumidor como iogurte, pão, cerveja e vinho. Já o ácido acético produzido na fermentação acética é principalmente segmentado no vinagre. Este tem um consumo no Brasil considerado pequeno quando comparado a outros países (KATZ, 2003; KATZ, 2012; McGEE, 2004).

Na cultura asiática é encontrada a bebida denominada *kombucha*, fabricada a partir de chá adoçado e fermentado com perfil sensorial ácido. Os americanos produzem uma bebida equivalente cuja matéria-prima são frutas e é conhecida como *shrub* (KATZ, 2003; KATZ, 2012; McGEE, 2004).

Segundo levantamento feito pela Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (ABIR) o mercado é categorizado em refrigerantes, água, laticínios, bebidas quentes, bebidas para preparo e bebidas prontas para consumo (sucos e néctares, à base de soja, chás gelados, isotônicos e energéticos). No Brasil, o consumo de bebidas fermentadas não alcoólicas e não lácteas é limitado. Diferente do cenário norte americano em que é possível encontrar esta categoria de produto comercializado em grandes redes de varejo e não limitado apenas à comunidade que preza um estilo de vida saudável (ABIR, 2011).

O consumo de bebidas não alcoólicas, no Brasil, representa 53,2 % de participação do mercado geral das bebidas vendidas no país. No ano de 2010, houve um incremento de 9 bilhões de litros quando comparado ao quinquênio 2005-2010. Isto significa um consumo per capita de 206,7 litros por ano. Bebidas quentes



ficaram estáveis no mesmo período e o café domina 90 % da categoria. Já as lácteas tiveram uma redução de 2,8 % com o aumento da concorrência de sucos e bebidas à base de soja. O consumo de bebidas prontas correspondem a 43,7 L per capita, detendo 6 % do mercado e refrigerantes representam 41,6 %. No mesmo ano, o crescimento para chás prontos foi de 11,2 % quando comparado ao período de 2005-2010 (ABIR, 2011).

O perfil de consumo indicado pelo estudo da ABIR (2011) aponta que a região Nordeste teve crescimento médio maior (8,9 %) perante as outras regiões onde a média nacional é 7,5 %.

As bebidas alcoólicas tiveram um aumento de 1,8 % causado pela melhora do poder aquisitivo da população adulta e a cerveja foi a principal escolha (ABIR, 2011; SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS, 2013).

A estimativa é de que produtos à base de *kombucha* movimentaram a cifra de U\$324 milhões de dólares no período de 2008-2009 no mercado de bebidas americano. Este valor foi quadruplicado em comparação ao ano anterior (KATZ, 2012). Esta força econômica pode ser justificada por fatores como a busca por produtos alimentares com apelo saudável, funcionais e mudança no estilo de vida, além de ter uma qualidade sensorial considerada aceitável (NIVA, 2007; QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009).

A publicidade dos possíveis benefícios à saúde influenciam no ato de compra, mesmo que estes não possuam comprovação científicos que corroboram todas as alegações (NIVA, 2007).

Há necessidade de estudos científicos para avaliar os reais benefícios e uma metodologia padronizada para obtenção de um *kombucha*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar bebida fermentada, não alcoólica, da variedade *oolong* de chá produzido a partir de *Camellia sinensis* e outra do chá de erva-mate tostada (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por cultura mista, com perfil sensorial ácido refrescante.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar o processo de fermentação da solução açucarada, por cultura mista, com duas diferentes infusões vegetais: *oolong* (*Camellia sinensis*) e erva-mate tostada (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).

Identificar por biologia molecular a diversidade da população microbiana da cultura mista (iniciadora);

Avaliar o teor de sólidos solúveis totais, açúcares, pH, acidez total titulável, ácidos orgânicos, alcoólico, compostos fenólicos e flavonoides totais, e potencial antioxidante nas bebidas;

Verificar a aceitabilidade da bebida junto a potenciais consumidores.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BEBIDA *KOMBUCHA*

*Kombucha* é uma bebida fermentada tradicional da Ásia. Os primeiros relatos indicam o seu uso desde 220 AEC, na China, com fim medicamentoso para tratar desconfortos digestivos (KALLEL et al., 2012).

A disseminação no continente asiático ocorreu quando o médico chamado Kombu, em 414, levou a bebida da Coreia para o Japão para o tratamento de distúrbios gastrointestinais do Imperador (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

A partir de transações comerciais, a bebida foi introduzida no mercado russo (na forma de *tea kavass*) e disseminada pela Europa oriental na virada do século XIX para o XX (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). Na Alemanha, passou a ser comercializada durante a Segunda Guerra Mundial, e por meados de 1950 chegou à França e as colônias no norte da África (ČETOJEVIĆ-SIMIN et al., 2012).

O *kombucha* é obtido pela fermentação da associação entre bactérias acéticas e leveduras que resulta no conhecido “fungo do chá”. Esta é levada em condições aeróbicas a partir do chá verde ou preto adoçado. O perfil sensorial da bebida é doce, ácido e gaseificado (KALLEL et al., 2012). Existem versões em que frutos ou extratos são utilizados para agregar aromas e sabores distintos (ČETOJEVIĆ-SIMIN et al., 2012).

A versão americana equivalente do *kombucha* foi o *shrub*, cujo consumo era popular durante o período colonial americano. No processo de elaboração, o substrato usado era suco de frutas adoçado com sacarose. A princípio, era um dos modos de conservação de frutos durante a estação de inverno, assim como as geleias e compotas (LOEB, 2012).

O *shrub*, por ter caráter ácido, é descrito como um vinagre bebível e pode ser diluído em coquetéis, vinhos, espumantes, molhos para saladas e sobremesas, visando agregar os sabores provenientes da fermentação e do fruto base. Diferentemente, o *kombucha* pode ser consumido sem diluição, por apresentar uma acidez menos pronunciada (LOEB, 2012).

Atualmente, o interesse dos consumidores pelo *kombucha* e bebidas fermentadas não é ditado somente pelos perfis sensoriais, por serem refrescantes e

de gosto ácido agradável, mas também pelos benefícios terapêuticos e funcionais que lhes são atribuídos. Estes atuam como agente profilático na manutenção da saúde humana (ČETOJEVIĆ-SIMIN et al., 2012).

Relatos da bibliografia pertinente apontam a ação positiva na regulação da microbiota intestinal, fortalecimento do metabolismo, atuação como antibiótico natural e auxílio no equilíbrio fisiológico. Entretanto, a pesquisa científica experimental in vivo para comprovação como bebida funcional é recente (BATTIKH; BAKHROUF; AMMAR, 2012; ČETOJEVIĆ-SIMIN et al., 2012; JAYABALAN et al., 2014).

## 3.2 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DO *KOMBUCHA*

### 3.2.1 Chá de *Camellia sinensis*

A matéria-prima do *kombucha* é o chá elaborado com folhas de *C. sinensis*, uma planta que pertence à família da Theaceae. A partir do mesmo vegetal é possível ter diferentes variedades como chá branco, amarelo, verde, *oolong*, vermelho e preto, cada qual obtido com manejo pré e pós-colheita específicos (McGEE, 2004).

O chá é considerado o medicamento mais antigo, seu uso remota a 5000 anos atrás. Na China, era recomendado por causa dos seus efeitos estimulantes e propriedades desintoxicantes contra álcool e toxinas, melhora do fluxo sanguíneo e urinário, e alívio de dores (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

O consumo acompanha a civilização de diversos países e resiste à passagem do tempo. A sua expansão na Europa pode ser relacionada com as explorações portuguesas e holandesas na China durante o período das grandes navegações, em que a planta foi levada como uma erva medicinal. A presença do chá passou a ser um hábito de alimentação mais por questão sensorial do que pelos benefícios (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

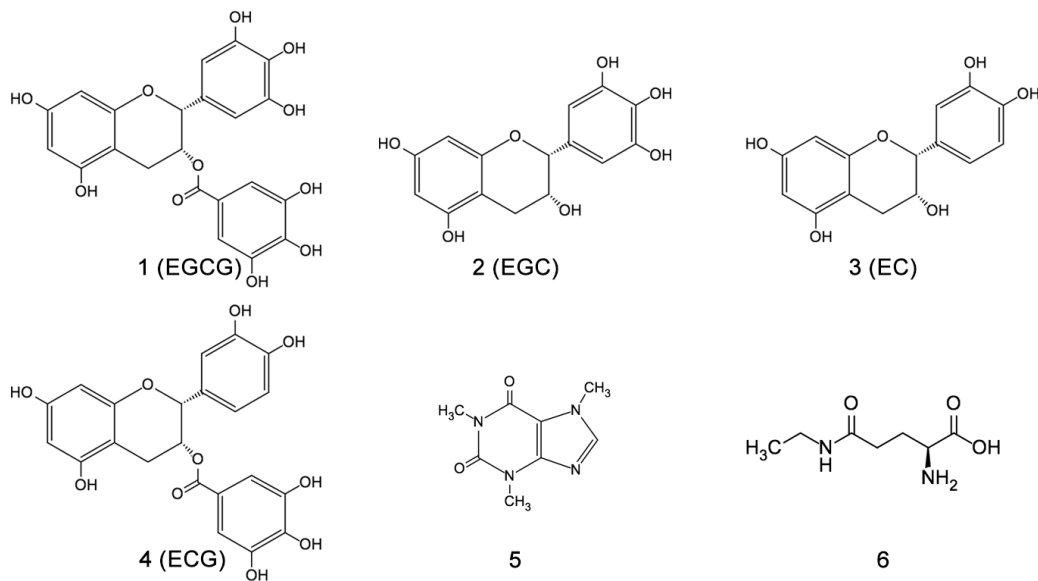
Para a produção do chá verde, as folhas menos desenvolvidas são colhidas e rapidamente secas para inibir enzimas e diminuir a oxidação. Enquanto, para o chá preto é o oposto, as folhas devem ser oxidadas (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001). Para a variedade *oolong*, as folhas passam por dessecamento e agitação para permitir oxidação enzimática parcial (McGEE, 2004).

Estudos indicaram que o consumo de chá verde traz efeitos positivos para a saúde e isto elevou o seu consumo, principalmente, na cultura ocidental que passou a buscar um estilo de vida mais saudável (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001; SONG et al., 2012; DAMIANI et al., 2014).

A principal propriedade atribuída ao chá é a capacidade antioxidante, efeito que pode ser explicado pelos polifenóis presentes na forma de catequinas. Estas são consideradas metabólitos secundários e pertencem ao grupo de flavanóis que integra a família de flavonoides (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

A figura 1 apresenta os compostos de maior prevalência, que na sequência são (-)-Epigalocatequina galato (1, EGCG), (-)-Epigalocatequina (2, EGC), (-)-Epicatequina (3, EC) e (-)-Epicatequina galato (4, ECG).

**Figura 1** – Estrutura química das catequinas



1: (-)-Epigalocatequina galato (EGCG); 2: (-)-Epigalocatequina (EGC); 3: (-)-Epicatequina (EC); 4: (-)-Epicatequina galato (ECG); 5: cafeína; 6: L-teanina

**Fonte:** SONG et al., 2012.

Dentro desta diversidade é considerado que a EGCG é a catequina mais abundante nas folhas de chá (LU et al., 2009; SONG et al., 2012). A cafeína é (5) reconhecida pelos efeitos estimulantes no sistema nervoso, enquanto L-teanina (6) é relacionada com potencial estimulante do sistema imune e propriedades contra estresse (KIMURA et al., 2007; SONG et al., 2012).

A produção do *kombucha* pode ser realizada de acordo com a preferência do consumidor. O modo tradicional utiliza preferencialmente chá verde e

preto. Entretanto, a variedade *oolong* também pode servir de base (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

### 3.2.2 Chá de *Ilex Paraguariensis*

A *I. paraguariensis* é uma árvore perene (até 18 metros) nativa da América do Sul e pertence à família Aquifoliaceae. A distribuição é prevalente na Argentina, Paraguai e Brasil, popularmente é conhecida como erva-mate (HECK; DE MEJIA, 2007).

No Brasil, a produção está dividida entre Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul. De acordo com dados estatísticos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), no ano de 2014 foram produzidas 502,482 mil toneladas de erva-mate. O principal produtor é o estado do Rio Grande do Sul com 45,8 %, seguido do Paraná com 37,2 % do total.

O consumo da planta faz parte da cultura local e antecede a colonização europeia do continente, uma vez que os nativos (índios guaranis) a utilizavam para preparo de bebida estimulante ou para uso medicinal. O hábito foi incorporado pelos colonizadores e transformado em comércio (BRACESCO et al., 2011), similar à trajetória da *C. sinensis* na Ásia.

Assim como a *C. sinensis*, a partir da *I. paraguariensis* é possível produzir diferentes produtos alterando etapas do processamento. Silva et al. (2012) ressaltam os estágios de trituração, secagem e tostagem das folhas. A erva-mate associada ao chimarrão e tererê se difere do chá mate pela ausência da tostagem final. A regulamentação vigente (BRASIL, 2005b) define a erva-mate como:

é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil., obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tererê" podendo ser adicionado de açúcar.

Na medicina popular, a planta é associada ao tratamento de artrite, reumatismo, obesidade, dores de cabeça, diminuição do colesterol e doenças hepáticas (BRACESCO et al., 2011; HECK; DE MEJIA, 2007). As propriedades terapêuticas relacionadas podem estar atreladas ao perfil fitoquímico que incluem a presença de ácidos fenólicos (derivados de cafeoil como caféico e clorogênico) e flavonoides da classe flavonóis (rutina, quercetina e kaempferol, geralmente

glicosilados), metilxantinas (caféina, teobromina e teofilina) (BRACESCO et al., 2011; ISOLABELLA et al., 2010).

### 3.3 LEGISLAÇÃO SOBRE O CHÁ

A legislação vigente sobre a identidade e características de chás é descrita na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 277/2005 (regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis) e RDC nº267/2005 (regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás) (BRASIL, 2005 a), ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela portaria nº 544/1998 (regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para chá pronto para o consumo) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1998).

Na regulamentação brasileira, o termo “chá” não é exclusivo de uma única determinada espécie vegetal. O produto é definido de maneira abrangente como:

o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor (BRASIL, 2005b).

E a designação da bebida segue um padrão em que seja possível reconhecer qual a espécie vegetal foi utilizada na produção:

o produto deve ser designado de "Chá", seguido do nome comum da espécie vegetal utilizada, podendo ser acrescido do processo de obtenção e ou característica específica. Podem ser utilizadas denominações consagradas pelo uso (BRASIL, 2005b).

Entretanto, apesar da regulamentação ser genérica na definição da bebida, não são todas as espécies vegetais e partes que podem ser utilizadas na produção de chás. A RDC nº 267/2005 apresenta quais espécies vegetais e as partes do vegetal que são permitidas. Tanto *C. sinensis* e *I. Paraguariensis* St. Hil. possuem permissão.

No contexto internacional, quando se refere à chá é sinônimo de bebida produzida a base de *C. sinensis*, independente da variedade. Na revisão realizada por Dufresne e Farnworth (2001) é a única espécie vegetal citada.

O mesmo princípio é descrito em publicação da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2015) e quando utilizado outras espécies vegetais o produto resultante é denominado de chá de erva. A *Tea e Herbal Infusions Europe* (THIE, 2014), uma associação europeia que reúne produtores e comerciantes de chá, divulgou diretrizes em que define o chá como derivado feito exclusivamente de folhas de *C. sinensis*, produzido de acordo com as boas práticas de produção e próprios para o consumo.

#### 3.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO *KOMBUCHA*

A fermentação ocorre com a adição de microrganismos à bebida, sob condições controladas. As leveduras presentes são responsáveis pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose, que são fontes de carbono, estes são substratos fermentescíveis. Durante o processo de fermentação existe a formação de uma massa ou biofilme sobrenadante, esta indica a presença de cepas de *Acetobacter xylinum* (KALLEL et al., 2012), caracterizando uma simbiose. Os principais metabólitos presentes nestas bebidas fermentadas são os ácidos acético, láctico, glucônico e glicurônico, além do etanol e do glicerol. Além destes metabólitos, podem detectar-se também outros ácidos tais como cítrico e málico (TEOH; HEARD; COX, 2004).

Os metabólitos gerados pelos microrganismos, tais como álcoois obtidos das leveduras e ácido acético das bactérias, comportam-se como agentes catalisadores. O etanol estimula a produção de ácido acético, que por sua vez, estimula o desenvolvimento das bactérias acéticas e, por consequência, produz mais ácido (KALLEL et al., 2012). Há também outros compostos presentes no *kombucha* como os fenólicos, os nitrogenados na forma de aminoácidos e alcaloides metilxantinas tipo cafeína, teobromina e teofilina. Todos provenientes da infusão do chá verde ou preto, além da produção de vitaminas do complexo B e ácido fólico (BAUER-PETROVSKA; PETRUSHEVSKA-TOZI, 2000; DUFRESNE; FARNWORTH, 2001). Há também compostos como álcoois superiores, aldeídos, cetonas, ésteres e aminoácidos, que auxiliam no perfil sensorial da bebida (TEOH; HEARD; COX, 2004).

A cultura simbiótica fica protegida da contaminação de microrganismos indesejados pela presença de ácidos orgânicos que mantém o pH



ácido do meio (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001). Cada cultura iniciadora usada na fermentação de *kombucha* apresenta uma composição distinta de microrganismos e estes são dependentes de fatores externos tais como geografia, condições climáticas e a microbiota local com espécies nativas que podem caracterizar as diferenças na bebida e na sua qualidade sensorial (ČETOJEVIĆ-SIMIN et al., 2012).

A literatura indica grande diversidade de espécies microbianas na composição das culturas utilizadas para produção do *kombucha*. O biofilme celulósico de cinco amostras de *kombucha*, de diferentes países (Canadá: 2; Irlanda: 1; Estados Unidos: 1; Reino Unido: 1) foram analisadas e indicaram que a bactérias dominantes são *Gluconacetobacter* spp. (85 % de prevalência), *Lactobacillus* spp. (30 %) e *Acetobacter* spp. (<2 %) (MARSH et al., 2014).

As bactérias relatadas na literatura são *Gluconacetobacter* spp. (FU et al., 2014; SREERAMULU, ZHU, KNOL, 2000; WANG et al., 2013), *Lactobacillus plantarum* (FU et al., 2014), *G. sp. A4* (YANG et al., 2010), *Acetobacter* spp. (SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000), *A. aceti*, *A. pasteurianus* (CHEN; LIU, 2000; LIU et al., 1996;), *A. xylinum* (MAYSER et a., 1995; REISS, 1994; SIEVERS et al., 1995).

Na cultura mista de microrganismos do *kombucha* há a presença de diversas espécies de levedura, tais como *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen (FU et al., 2014), *Zygosaccharomyces* sp. (MARSH et al., 2014; MAYSER et al., 1995; SIEVERS et al., 1995), *Brettanomyces bruxellensis* (CHEN; LIU, 2000; LIU et al., 1996; TEOH; HEARD; COX, 2004;), *Candida stellata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspota delbrueckii* (TEOH; HEARD; COX, 2004), *Z. bailii* (CHEN; LIU, 2000; LIU et al., 1996; TEOH; HEARD; COX, 2004), *S. cerevisiae* (CHEN; LIU, 2000; LIU et al., 1996; MAYSER et al., 1995), *B. sp.*, *B. lambicus* (MAYSER et a., 1995).

### 3.5 PROCESSO DE GASEIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO *KOMBUCHA*

A etapa de gaseificação do *kombucha* é similar à elaboração de vinhos espumantes e *champagne*. Os métodos utilizados recorrentes são o *charmat*, em que o vinho base passa pela segunda fermentação em tanques fechados para retenção do gás carbônico e quando envasado permanecerá gaseificado. E o *champanoise*, onde a segunda fermentação e a gaseificação ocorrem na garrafa

após o envase e exige um período de maturação (McGEE, 2004; RIZZON; MENEGUZZO; ABARZUA, 2000).

O processo de elaboração do *kombucha* é próximo ao método *champenoise*. A presença de gás carbônico é de importante contribuição no perfil sensorial de bebidas, no caso de vinhos espumantes, provoca excitação da mucosa bucal e favorece a percepção dos sabores presentes (RIZZON; MENEGUZZO; GASPARIN, 2005).

Apesar do *kombucha* não ser classificado como uma bebida alcoólica na sua essência e a gaseificação ser facultativa, o teor de álcool encontrado no produto pronto é variável e depende do tempo de fermentação. No ponto de interesse para o consumo pode chegar a 6 g.L<sup>-1</sup> e, se permitido que a fermentação continue além deste, é possível atingir teores de álcool de 14 g.L<sup>-1</sup> (GREENWALT; LEDFORD; STEINKRAUS, 1998).

A legislação brasileira dispõe que para ser classificada como bebida não alcoólica a graduação deve apresentar até 5 mL.L<sup>-1</sup> (v.v<sup>-1</sup>) a 20 °C de álcool etílico. Esta classificação é ditada no decreto nº6.871 de 4 de junho 2009 que regulamenta a lei nº 8.91/1994 do MAPA (BRASIL, 2009).

### 3.6 CARACTERÍSTICAS DA BEBIDA *KOMBUCHA*

#### 3.6.1 Quanto aos Aspectos Antimicrobianos

A utilização de outros vegetais é possível na produção do *kombucha* e geralmente, ervas aromáticas são acrescentadas para potencializar os efeitos benéficos e funcionais. A literatura apresenta relatos de análogos do *kombucha* preparados com tomilho (*Thymus vulgaris* L.), limonete (*Lippia citriodora*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), funcho (*Foeniculum vulgare*), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*) e erva-cidreira (*Melissa officinales* L.). Estes estudos investigaram o potencial antimicrobiano. O fermentado de limonete apresentou atividade promissora contra bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*. Na sequência, a hortelã-pimenta apresentou inibição para *E. coli* e *L. monocytogenes*. Para o tomilho não foi evidenciado atividade antibacteriana nem antifúngica (BATTIKH; BAKHROUF; AMMAR, 2012; BATTIKH et al., 2013;

ČETOJEVIĆ-SIMIN, 2012). Há também relatos de atividade antifúngica contra *Candida* sp. para os *kombucha* de funcho, hortelã-pimenta e limonete. Enquanto, os fermentados de alecrim e tomilho não apresentaram atividade contra a levedura (BATTIKH; BAKHROUF; AMMAR, 2012).

### 3.6.2 Quanto a Capacidade Antioxidantes

A capacidade antioxidante do *kombucha* é devida à presença de polifenóis provenientes do chá, ácido ascórbico e ácido glucárico 1,4-lactona. Entretanto, o mecanismo completo ainda não é totalmente elucidado (CHU; CHEN, 2006). Quando comparado com chá não fermentado, apresenta maior atividade antioxidante, e esta é dependente do tempo de fermentação. O substrato inicial e a microbiota da cultura de *kombucha* determina o perfil de metabólitos presentes na bebida (JAYABALAN et al., 2014)

Por se tratar de uma bebida complexa, com variáveis que influenciam no produto final, a seleção do chá é determinante para o potencial antioxidante. A pesquisa de uso de chás alternativos demonstrou que o verde, de baixo custo, apresentou teores de antioxidante de 88 % para o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) quando comparado ao chá em pó e preto (FU et al., 2014).

A investigação de Malbaša et al. (2011) visou determinar a relação entre a cultura de microrganismos na atividade antioxidante. Analisou dois inóculos diferenciando a levedura (*S. cerevisiae* ou *Zygosaccharomyces* sp.) e mantendo uma cultura mista de bactérias acéticas. Para controle utilizou-se cultura mista tradicional. Observou-se maiores valores da atividade antioxidante sobre o radical DPPH e hidroxila para o kombucha de chá verde com a cultura controle. Enquanto, nos tratamentos a amostra com chá preto e *S. cerevisiae* foi a que apresentou resultados maiores antioxidantes.

A fermentação em diferentes condições de temperatura (22, 30 e 35 °C) com a mesma concentração de inóculo (100 mL.L<sup>-1</sup>), por um período de 30 dias influenciou a produção de ácido ascórbico. A concentração máxima foi alcançada em 20 dias, a 35 °C com teor de 2,5 mg.100 mL<sup>-1</sup>. Porém, nesta condição constatou-se perda sensorial. A pesquisa de Lončar et al. (2006) sugere como ótimo a fermentação do *kombucha* por 10 dias a 30 °C e obtenção de 1 mg.100 mL<sup>-1</sup> de ácido ascórbico.

Chu e Chen (2006) realizaram estudo com oito culturas mistas diferentes de *kombucha* em chá preto. Os autores avaliaram o efeito da fermentação em relação à atividade antioxidante considerando o tempo em dias. Os dados coletados indicaram que este parâmetro é dependente do tempo. No tempo inicial (0 dia), a taxa inibitória para o radical DPPH foi de 30 % e alcançou 70 % no 15º dia. Segundo os autores o processo fermentativo prolongado não é recomendado por devido ao acúmulo de ácidos orgânicos e como consequência uma alteração do sabor, logo, afeta o perfil sensorial.

Um comparativo realizado entre chá preto e *kombucha* com uma concentração inicial 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, por 14 dias, na temperatura ambiente determinou aumento de fenólicos totais e flavonoides de 27,2 % e 75 %, respectivamente, em relação ao chá não fermentado. Apesar do aumento nos flavonoides não ser esperado, o autor sugere que foi devido à ação fermentativa da cultura mista (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013).

### 3.6.3 Quanto ao Perfil Sensorial

O grupo de pesquisa dinamarquês *Nordic Food Lab* analisou o perfil sensorial de *kombucha* de limonete alterando a concentração e o tipo de carboidrato usado para adoçar o meio. A bebida de melhor aceitação foi formulada com 5 % de sacarose, fermentada por sete dias, em pH de 3,13 e obtiveram notas sensoriais de gengibre, ácida e aromática. Os mesmos parâmetros foram repetidos com sistema aerado para acelerar a fermentação, mas o produto obtido foi sensorialmente menos complexo e aromático. O uso de frutose produzia bebida com característica de vinagre (PEDERSEN, 2013).

O *kombucha* produzido com chá preto e adoçado com melado de beterraba foi descrito como escuro, ácido, moderadamente carbonatado e doce com notas características de caramelizado e aroma proveniente do melado (MALBAŠA et al., 2008). O perfil sensorial do *kombucha* é transformado durante a fermentação de sabor frutado-ácido e gaseificado em cerca de sete dias (média) para sabor semelhante de vinagre em períodos de incubação prolongados (acima de 14 dias) (JAYABALAN et al., 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Chás

Os chás *oolong* da *Camellia sinensis* produzido por Fujian Tea® (China) e erva-mate tostada (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) produzido por Matte Leão® (Brasil) foram utilizadas como base para a fermentação.

#### 4.1.2 Açúcar Orgânico

A sacarose utilizada foi o açúcar cristal orgânico produzido por Native® (Sertãozinho, São Paulo).

#### 4.1.3 Água Mineral

A infusão base para cada bebida foi preparada com água mineral Ouro Fino® classificada como água mineral alcalino terrosa e fluoretada (Campo Largo, PR). A composição química em mg.L<sup>-1</sup> de 24,88 (cálcio), 1,079 (sódio), 0,02 (fluoreto), 146,62 (bicarbonato), 14,29 (magnésio), 0,542 (potássio), 0,019 (estrôncio), 0,64 (cloreto), dados fornecidos pelo fabricante.

#### 4.1.4 Microrganismo

A cultura mista iniciadora da bebida foi obtida a partir do *kombucha* comercial *Enlightened Kombucha Original*® da marca *GT's Synergy Drinks*® (Beverly Hills, EUA) e também da aquisição da cultura mista, desidratada, comercial da marca *Cultures for Health* (Dakota do Sul, EUA).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparo do Inóculo

A adaptação da cultura mista ao meio de crescimento foi realizado em um período de 10 dias. Inicialmente, preparou-se uma infusão com 8 g.L<sup>-1</sup> de chá *oolong* em água mineral a 85 ±5 °C e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Filtrou-se com papel filtro após 10 minutos de infusão e resfriou-se a uma temperatura de 30 °C.

Adicionou-se 100 mL da cultura iniciadora da *GT's Synergy Drinks*<sup>®</sup>. E para a versão desidratada da *Cultures for Health*<sup>®</sup> acrescentou-se 100 mL.L<sup>-1</sup> de vinagre de álcool cereal a 4 % (m.v<sup>-1</sup>) em ácido acético (CHU; CHEN, 2006; DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

Os preparados inoculados foram mantidos na temperatura de 30±2 °C sem agitação e considerados viáveis com a formação da película característica e observação microscópica de microrganismos.

### 4.2.2 Manutenção do Inóculo

O inóculo foi mantido em infusão de chá *oolong* em solução de sacarose (100 g.L<sup>-1</sup>). Todos os processos de fermentação partiram de alíquotas deste, chamado de inóculo de manutenção.

### 4.2.3 Preparo das Infusões

A solução de sacarose (100 g.L<sup>-1</sup>) preparada com água mineral foi autoclavada e após resfriamento a 85±5 °C adicionou-se 8 g.L<sup>-1</sup> do chá (partes aéreas de *C. sinensis* ou *I. paraguariensis* St. Hil.). Manteve-se em repouso por 10 minutos e filtrou-se para remoção de partículas em suspensão.

### 4.2.4 Fermentação dos Chás

No chá obtido adicionou-se inóculo preparado conforme descrito anteriormente, na concentração de 100 mL.L<sup>-1</sup> de inóculo. O processo em batelada

foi conduzido em frascos reagentes (previamente autoclavados) com o volume de 250 mL dos chás inoculados, e mantidos na temperatura de  $30 \pm 2$  °C.

O delineamento experimental foi realizado em dois blocos, em duplicata, para as amostras de chás (*oolong* e erva-mate) e controle (solução de sacarose com inóculo). O processo foi monitorado nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 e os parâmetros avaliados foram sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix), açúcares ( $\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{m.v}^{-1}$ ), medida do potencial hidrogeniônico (pH), acidez total titulável ( $\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{m.v}^{-1}$ ), ácidos orgânicos ( $\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{m.v}^{-1}$ ), teor alcoólico ( $\text{mL.100mL}^{-1}$ ,  $\text{v.v}^{-1}$ ), fenólicos totais (mM equivalente ácido gálico), flavonoides totais (mM equivalente catequinas) e atividade antioxidante. Os métodos estão descritos nos itens 4.2.6.1, 4.2.6.2, 4.2.6.3, 4.2.6.4, 4.2.6.5, 4.2.6.6, 4.2.6.7, 4.2.6.8, 4.2.6.9 e 4.2.6.10, respectivamente. As amostras analisadas eram de frascos-reagentes únicos para cada dia e foram selecionados de modo aleatorizado através de sorteio.

Para a análise sensorial foram utilizados dois pontos de fermentação para cada chá. O fermentado até o tempo de 7 e 10 dias foram envasados em garrafas de vidro âmbar com tampa do tipo *flip-top* para preservar a gaseificação natural produzida na segunda fermentação, conduzida na temperatura controlada de 30 °C, por quatro dias e após este período o produto foi mantido sob refrigeração a 10 °C.

Os dados passaram por tratamento estatístico aplicando análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação das médias (Tukey) em nível de 5 % de significância ( $p < 0,05$ ) determinados com o auxílio do programa *Statistica*<sup>®</sup> (versão 10, EUA).

#### 4.2.5 Caracterização Microbiológica e Genética Molecular

##### 4.2.5.1 Análise microbiológica

A caracterização microbiológica visou investigar os microrganismos e os possíveis gêneros presentes de bactérias e fungos que compunham a cultura mista de *kombucha*. De acordo com a literatura, o esperado é a presença de bactérias acéticas (gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e/ou *Gluconobacter*), lácticas (gênero *Lactobacillus*) e leveduras (gênero *Saccharomyces*).

O isolamento e purificação dos microrganismos foi realizado por

meio de repiques de esgotamentos nos meios específicos. Uma alíquota de 2 mL do inóculo foi adicionada em 10 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia®, Índia) e incubada entre 24-48 horas em estufa a 30 °C, e 37 °C as amostras para investigação de bactérias lácticas.

Os meios de culturas foram *Manitol Yeast Peptone* (MYP) para bactérias acéticas, *MRS Agar* (BD®, Difco®, EUA) para bactérias lácticas e *Yeast Malt Agar* (YMA) para leveduras. O meio de cultura ágar Nutriente (Himedia®, Índia) também foi utilizado na separação bacteriana.

O MYP é composto de manitol (25 g), extrato de levedura (5 g) e peptona (3 g) para 1 litro de água destilada (SOKOLLEK; HERTEL; HAMMES, 1998). E o YMA produzido com dextrose (10 g), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), extrato de malte (3 g) e ágar (20 g) para 1 litro de água destilada.

As placas de MYP seguiram a metodologia de dupla camada descritas por Entani et al. (1985) com acréscimo de nistatina para inibição fúngica. E o meio YMA foi adicionado com antibacteriano cloranfenicol (100 mg.L<sup>-1</sup>) para inibição bacteriana (FAO, 2006).

Para adequada purificação, repetiu-se este procedimento por cinco vezes, acompanhando a pureza da cultura em microscópio ótico (Leica® - DM E, EUA) e observando a morfologia dos microrganismos pela técnica da coloração de GRAM (RIBEIRO; SOARES, 1993).

As colônias isoladas foram suspendidas em 30 mL de caldo BHI e incubadas entre 24-48 horas para produção de massa celular. Após incubação, o caldo foi centrifugado (rcf de 15557 × g) para recuperação da massa celular. O *pellet* de células formado foi lavado com solução salina 9 g.L<sup>-1</sup> em duas repetições e centrifugado. O armazenamento final foi realizado em caldo de crescimento com crioprotetor (glicerol 100 g.L<sup>-1</sup>) e armazenadas na temperatura de -20 °C.

Para assegurar a inocuidade do produto realizou-se análise microbiológica seguindo os parâmetros para bebidas não-alcoólicas, conforme a Resolução RDC nº 12 de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001). Os métodos de referência foram de acordo com o *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* da *American Public Health Association* (APHA, 2001).



#### 4.2.5.2 Extração de DNA bacteriano

A amostra devidamente purificada mantida na temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi reativada em caldo de crescimento (BHI) por 48 horas à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de 3 mL foi centrifugação (rcf de  $9982 \times g$ ) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado. O *pellet* com a massa celular foi suspenso em 450  $\mu\text{L}$  tampão TE pH 8 (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M (ácido etilenodiamino tetra-acético)), 30  $\mu\text{L}$  SDS ( $10\text{ g.L}^{-1}$  (dodecil sulfato de sódio)) e homogeneizado por inversão. Incubado por 60 minutos à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Adicionou-se 450  $\mu\text{L}$  fenol-clorofórmio (24:25, v/v) e homogeneizou-se. Centrifugou-se por 20 minutos (rcf de  $9982 \times g$ ), o sobrenadante foi transferido para microtubo de fundo cônico e repetiu-se o processo. Mediu-se o volume final do sobrenadante para calcular a quantidade de 1/10 do volume em acetato de sódio (3 M) e 6/10 volume de etanol absoluto gelado ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e homogeneizado. Armazenou-se à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos.

Na sequência, centrifugou-se por 10 minutos (rcf de  $9982 \times g$ ) e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  etanol  $70\text{ mL.L}^{-1}$  ao sedimento e centrifugou-se por 10 minutos (rcf de  $9982 \times g$ ) e o sobrenadante foi descartado. O microtubo com DNA precipitado foi mantido na temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA recuperado foi eluído em 100  $\mu\text{L}$  tampão TE e repousado por 24 horas na temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este foi utilizado para a técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR).

#### 4.2.5.3 Extração de DNA fúngico

A amostra devidamente purificada mantida sob temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi reativada em caldo de crescimento (BHI) por 48 horas à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de 3 mL foi centrifugada (rcf de  $9982 \times g$ ) por 3 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  solução de limpeza (Triton X-100  $20\text{ mL.L}^{-1}$ , SDS  $10\text{ g.L}^{-1}$ , NaCl 100mM, Tris-HCl pH 8 10mM, EDTA pH 8 1mM), 200  $\mu\text{L}$  fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e 0,3 g de micro pérolas de vidro. Homogeneizou-se em agitador tipo *vortex* por 3 minutos. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  tampão TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e homogeneizou-se. Centrifugou-se por 15 minutos (rcf de  $9982 \times g$ ) e o sobrenadante foi transferido para microtubo de

fundo cônico. Adicionou-se 1 mL etanol absoluto gelado (-20 °C) e homogeneizou-se por inversão para precipitar o DNA e manteve-se repousado à -20 °C por 60 minutos.

Centrifugou-se por 15 minutos (rcf de  $9982 \times g$ ) e o sobrenadante foi descartado. O tubo com DNA precipitado foi mantido na temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA recuperado foi eluído em 20 µL tampão TE e repousado por 24 horas na temperatura de -20 °C. Este foi utilizado para a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.2.5.4 Amplificação de DNA genômico bacteriano pela reação em cadeia da polimerase

Os *primers* fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e rD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) utilizados foram sintetizados por Invitrogen Thermo Fisher Scientific® (EUA), a partir da sequência descrita por Weisburg et al. (1991).

A reação de PCR, a partir do DNA extraído, foi feita tendo volume final de 20 µL contendo 11,4 µL água ultrapura estéril, 2 µL tampão PCR 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,4 µL dNTPs (trifosfatos de desoxinucleotídeos, 25 mM), 1 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,5 µL de cada um dos *primers* fD1 e rD1 (10 pmol.µL<sup>-1</sup>), 0,2 µL *Taq* DNA polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>) e 2 µL DNA da amostra. Utilizou-se termociclador (Techne TC-512 Thermal Cycler®, EUA) programado para realizar 30 ciclos depois de uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos. Cada ciclo de amplificação consistiu em três estágios: desnaturação (94 °C, 1 minuto), pareamento (55 °C, 30 segundos) e extensão (72 °C, 2 minutos) e extensão final realizada a 72 °C por 10 minutos.

O produto de amplificação foi avaliado por visualização em eletroforese em gel de agarose (10 g.L<sup>-1</sup>), corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (0,06 µL.mL<sup>-1</sup>, ThermoFisher Scientific®, EUA) e registrado digitalmente em fotodocumentador em luz ultravioleta por L-PIXex® (Loccus Biotecnologia®, Brasil).

#### 4.2.5.5 Amplificação do DNA genômico fúngico pela reação em cadeia da polimerase

A amplificação do DNA fúngico utilizou os *primers* ITS1-F

(CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) sintetizados por Invitrogen ThermoFisher Scientific® (EUA) a partir da sequência descrita por Gardes e Bruns (1993) e White et al. (1990), respectivamente.

A reação de PCR, a partir do DNA extraído, foi feita tendo volume final de 25 µL que continha 16,35 µL água ultrapura estéril, 2,5 µL tampão PCR 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,4 µL dNTPs (2,5 mM), 1 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,25 µL de cada um dos *primers* ITS1-F e ITS4 (10 pmol.µL<sup>-1</sup>), 0,25 µL *Taq* DNA polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>) e 2 µL DNA da amostra. Utilizou-se termociclador (Invitrogen ThermoFisher Scientific®, SimpliAmp™ Thermal Cycler, EUA) programado para realizar 35 ciclos depois de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos. Cada ciclo de amplificação consistiu em três estágios: desnaturação (94 °C, 1 minuto), pareamento (60 °C, 1 minuto) e extensão (65 °C, 1 minuto). Foi realizada extensão final a 65 °C por 5 minutos.

O produto de amplificação foi avaliado por visualização em eletroforese em gel de agarose (10 g.L<sup>-1</sup>), corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (0,06 µL.mL<sup>-1</sup>, ThermoFisher Scientific®, EUA) e registrado digitalmente em fotodocumentador em luz ultravioleta por L-PIXex® (Loccus Biotecnologia®, Brasil).

#### 4.2.5.6 Sequenciamento do material genético

O material genético (bacteriano e fúngico) após a amplificação foi preparado para o sequenciamento com 5 µL de cada amostra e 1 µL dos *primers* específicos em tubos distintos. O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Virologia Animal da UEL. Utilizou-se sequenciador Genetic Analyser® (ThermoFisher Scientific®, ABI3500, EUA) e os *primers forward* e *reverse* com BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

As sequências foram comparadas com o banco de dados *GenBank* utilizando o algoritmo *BLAST*® (*Basic Local Alignment Search Tool*) (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

## 4.2.6 Caracterização Físico-Química

### 4.2.6.1 Sólidos solúveis totais

Realizou-se medidas de sólidos solúveis totais expressos em °Brix (% m.m<sup>-1</sup>) com refratômetro digital (RM40, Mettler Toledo®, EUA) pelo método 932.12 da AOAC (2012).

### 4.2.6.2 Determinação de açúcares

A determinação de sacarose, glicose e frutose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação e Metodologia Analítica da UEL com protocolo baseado em Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011) com modificações.

O cromatógrafo constituído por uma controladora (CBM-20A), bomba (LC-20AT), degaseificador (DGU-20A5), amostrador automático (SIL-20AC HT), forno de coluna (CTO-20A) e detectores de índice refrativo diferencial (RID-10A) e arranjo de fotodiodos UV-VIS (SPD-M20A) todos do modelo Prominence® da Shimadzu® (Japão). Os parâmetros utilizados foram uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (9µm, 7,8 x 300 mm na forma iônica Pb<sup>+2</sup>, Biorad®, EUA) mantida a 80 °C e fase móvel água ultra pura (MilliQ®, Millipore®, EUA), fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, pressão 995 psi e tempo de corrida em 20 minutos. O detector de arranjo de fotodiodos estava programado em comprimento de onda fixo de 215 nm e no modo de varredura de 200 a 400 nm. A aquisição de dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas com o auxílio do software *software* Shimadzu LCsolution®.

Amostras diluídas (1:2, v.v<sup>-1</sup>) em água ultra pura (MilliQ®, Millipore®, EUA) foram filtradas (0,22 µm, Millipore®, EUA) em *vials* para CLAE, 20 µL injetados no sistema. Os tempos de retenção foram comparados com os padrões de sacarose (2,25 mg.mL<sup>-1</sup>), glicose (2,42 mg.mL<sup>-1</sup>) e frutose (3,13 mg.mL<sup>-1</sup>) de grau analítico (Sigma®, EUA).

Para calcular a velocidade de consumo e produção, expressa em grama do carboidrato por litro de amostra por dia (g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), utilizou-se a equação:

$$Velocidade = \frac{(Concentração\ Inicial - Concentração\ Final\ do\ Dia\ Avaliado)}{Tempo\ em\ dias}$$

#### 4.2.6.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

Foi realizada a medida de pH em potenciômetro digital (FE20 FiveEasy®, Mettler Toledo®, EUA) segundo a técnica 981.12 da AOAC (2012)

#### 4.2.6.4 Acidez total titulável

Determinou-se a acidez total titulável por titulometria com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (padronizada), indicador fenolftaleína, de acordo com o método 942.15A da AOAC (2012). A acidez foi expressa em gramas de ácido acético por litro de produto (g.AC.L<sup>-1</sup>).

#### 4.2.6.5 Determinação de ácidos orgânicos

A determinação de ácidos orgânicos foi realizada por CLAE no mesmo equipamento cromatográfico dos açúcares (item 4.2.6.2), protocolo baseado em Reuter (2015). Os parâmetros utilizados foram uma coluna C18 MG (5μ, 250 x 4,6 mm) (CapCell PaK, Shiseido®, Japão) a 40 °C, fase móvel tampão fosfato de sódio 25 mM pH 2,4, fluxo constante 1 mL.min<sup>-1</sup>, isocrático, pressão 995 psi, tempo de corrida em 25 minutos. A aquisição e processamento dos dados foram realizados com o auxílio do *software* Shimadzu LCsolution®.

Amostras diluídas (1:2, v.v<sup>-1</sup>) em água ultra pura (MilliQ®, Millipore®, EUA) foram filtradas (0,45 μm, Millipore®, EUA) em *vials* para CLAE, 20 μL injetados no sistema. Os tempos de retenção foram comparados com os padrões dos ácidos acético (5,25 mg.mL<sup>-1</sup>), succínico (1,2 mg.mL<sup>-1</sup>), oxálico (2,4 mg.mL<sup>-1</sup>), málico (1,5 mg.mL<sup>-1</sup>), cítrico (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>), láctico (1,95 mg.mL<sup>-1</sup>), propiônico (4,95 mg.mL<sup>-1</sup>) de grau analítico (Sigma®, EUA).

#### 4.2.6.6 Teor alcoólico por ebulliometria

O teor alcoólico foi determinado pelo ebuliômetro. Calibrou-se o

equipamento com água destilada e medindo a sua temperatura de ebulição para ser a referência na régua de conversão. Esta é utilizada para determinar a concentração de etanol em mL.100mL<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.6.7 Determinação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram determinados por reação com reagente de *Folin-Ciocalteu* pela metodologia descrita por Damiani et al. (2014).

Uma alíquota de 0,5 mL de amostra diluída (1:10 v.v<sup>-1</sup>) foi colocada em tubos e adicionados 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* (100 mL.L<sup>-1</sup>) e incubou-se em banho-maria a 50 °C. Após 5 minutos, acrescentou-se 2 mL de solução de carbonato sódio (200 g.L<sup>-1</sup>). Na sequência, procedeu-se a leitura da absorbância à 760 nm em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Electron Corporation®, Spectronic Genesys 6®, EUA). A curva padrão de ácido gálico (0,1 a 0,5 mM) foi construída e os resultados expressos em mM equivalente de ácido gálico (mM Eq.AG).

#### 4.2.6.8 Determinação de flavonoides totais

O conteúdo total de flavonoides presente no *kombucha* foi determinado por método espectrofotométrico adaptado por Pękal e Pyrzyńska (2014).

Uma alíquota de 1 mL de amostra foi misturada com 300 µL de solução de nitrito de sódio (50 g.L<sup>-1</sup>), agitados e mantidos protegidos da luz. Depois de 5 minutos foi adicionado 0,5 mL de cloreto de alumínio (100 g.L<sup>-1</sup>), agitados e mantidos protegidos da luz. Ao final de 5 minutos, acrescentou-se 1 mL de hidróxido de sódio 1 M. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 510 nm (Thermo Electron Corporation®, Spectronic Genesys 6®, EUA). A curva padrão de catequinas (0,05 a 0,2 mM) foi construída e os resultados expressos em mM equivalentes de catequinas (mM Eq.CA).

#### 4.2.6.9 Avaliação da capacidade antioxidante sobre radical ABTS

A avaliação utilizou a metodologia descrita por Re et al. (1999). Para gerar o radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido-sulfônico) diamônio (ABTS) preparou-se uma solução estoque de ABTS a 7 mM com 2,45 mM de persulfato de

potássio. A solução final foi armazenada em frasco escuro sob proteção da luz por 16 horas para estabilização.

A solução de trabalho de ABTS foi diluída com etanol para uma absorbância entre 0,698-0,706 no comprimento de onda 730 nm. Uma alíquota de 4 mL ABTS diluído foi misturado com 10 µL de amostra, homogeneizou-se e manteve-se repouso ao abrigo da luz. Após 6 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 730 nm em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Electron Corporation®, Spectronic Genesys 6®, EUA). O controle de cor foi feito sem a adição do radical ABTS, de branco sem a adição da amostra e radical, e o de controle sem adição de amostra. A curva padrão de *Trolox* (1,0 a 8,0 mM) foi construída, os resultados foram expressos em mM equivalente de *Trolox* (mM Eq. *Trolox*) e a taxa de inibição do radical em porcentagem (de acordo com a equação):

$$\% = \left\{ 1 - \left( \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \right) \right\} \times 100$$

#### 4.2.6.10 Avaliação da capacidade antioxidante sobre o radical DPPH

Para atividade antioxidante sobre o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) utilizou-se a metodologia descrita e adaptada por Georgetti et al. (2006) e Casagrande et al. (2007).

A reação se desenvolve com 50 µL amostra misturada com 1 mL etanol absoluto, 1 mL tampão acetato 0,1 M pH 5,5 e 0,5 mL DPPH 250 µM em solução etanólica. Foi homogeneizada e mantida em repouso por 15 minutos ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em 517 nm em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Electron Corporation®, Spectronic Genesys 6®, EUA). O controle de cor foi feito sem a adição do radical DPPH, de branco sem a adição da amostra e radical, e de controle sem adição de amostra. A curva padrão de *Trolox* (0,2 a 1,0 mM) foi construída, os resultados expressos em mM equivalente de *Trolox* (mM Eq. *Trolox*) e taxa de inibição do radical em porcentagem (mesma equação para o radical ABTS, item 4.2.14).

#### 4.2.7 Análise Sensorial

A metodologia da análise foi um teste de aceitação com escala

hedônica híbrida de 10 cm (0: desgostei extremamente; 5: não gostei, nem desgostei; 10 = gostei extremamente) (VILLANUEVA; VILLANUEVA; DA SILVA, 2000).

O teste utilizou uma equipe de 100 julgadores não-treinados, faixa etária acima dos 18 anos, de ambos os sexos. As amostras foram apresentadas de modo codificado, aleatorizado, servida em copos descartáveis transparentes (50 mL de cada a 10 °C) em cabines individuais iluminadas com luz branca.

Antes de cada sessão, os julgadores foram instruídos quanto à dinâmica da avaliação e uma ficha de consentimento foi entregue para assegurar a privacidade e confiabilidade na utilização dos dados coletados (Anexo A). Após o aceite, um formulário para coleta de dados sociais foi entregue (Apêndice A). Por se tratar de um experimento com envolvimento de seres humanos, o projeto inicial foi encaminhado do Conselho de Ética em Pesquisa (CEP), pela Plataforma Brasil para que fosse avaliado. O parecer de liberação consubstanciado do CEP possui o registro número 820.822.

A ficha de coleta (Apêndice B) com a escala hedônica solicitava a avaliação dos atributos aparência, aroma, sabor, sensação na boca e aceitação global. Para a análise foram testadas quatro amostras diferentes sendo que diferiam no tipo de chá base (*oolong* ou erva-mate) e o tempo de fermentação (7 ou 10 dias) para cada um dos chás.

Para o tratamento estatístico dos resultados realizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação das médias (Tukey) em nível de 5 % de significância ( $p < 0,05$ ) foram determinados com o auxílio do programa *Statistica*® (versão 10 EUA).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARAÇÃO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO

Nos testes com a utilização da cultura mista desidratada da *Cultures for Health*<sup>®</sup> não houve desenvolvimento microbiano, nas condições testadas neste trabalho, para a produção de bebida *kombucha*. Isto pode ser atribuído a maneira de secagem da película formada pelo fornecedor, uma vez que foi possível reidratá-la porém não foi visualizado por microscopia a presença de microrganismos.

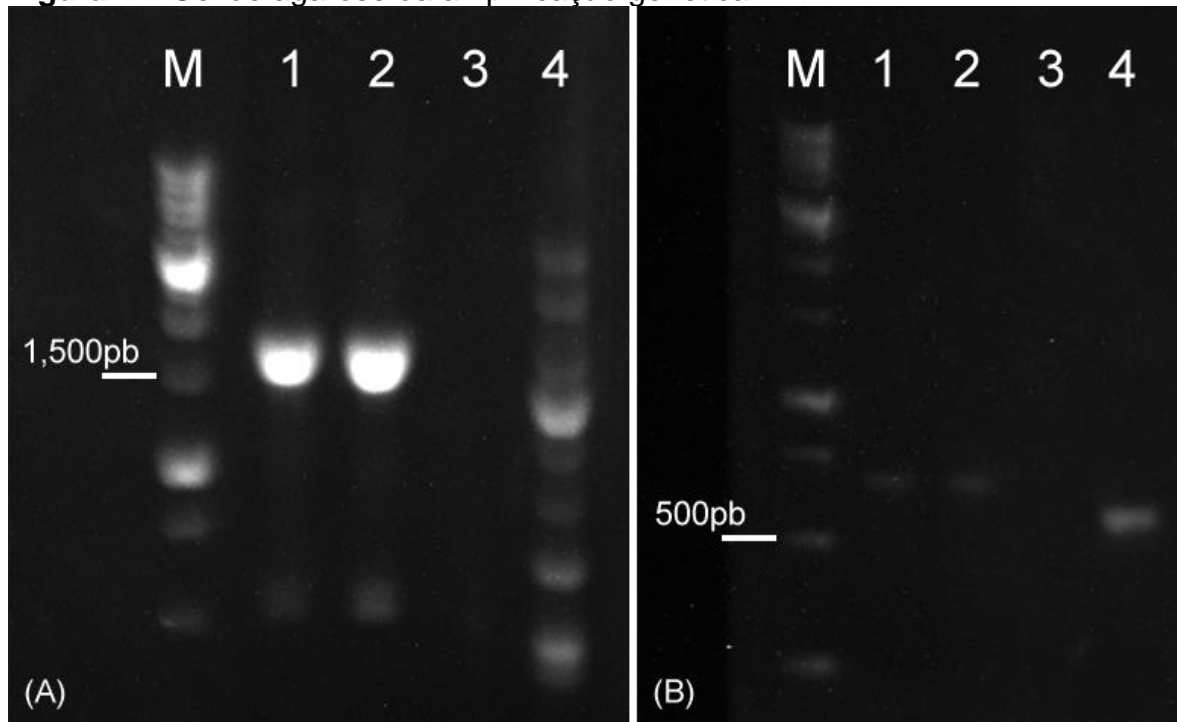
O processo fermentativo foi, então, conduzido com a cultura mista a partir do *kombucha* comercial *Enlightened Kombucha Original*<sup>®</sup>, da marca *GT's Synergy Drinks*<sup>®</sup> (Beverly Hills, EUA). Neste foi possível observar por microscopia a presença de células viáveis e a produção de material extracelular (película), que habilitou o material biológico para o uso na elaboração das bebidas fermentadas *kombucha* de chá *oolong* e de chá mate.

Todos os experimentos e parâmetros avaliados foram obtidos a partir deste inóculo, previamente adaptado ao meio açucarado com a infusão de chá *oolong*. Utilizou-se apenas esta infusão para minimizar fatores de interferência, pois nesta etapa não se tinha conhecimento sobre o comportamento do inóculo na presença da infusão de mate.

### 5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR

A separação e purificação microbiológica do inóculo foi realizada por no mínimo cinco vezes e evidenciou-se a presença de 4 bactérias distintas (Gram positiva e Gram negativa) e uma espécie fúngica. Apesar do uso de meios propícios para bactérias lácticas e acéticas, estas não foram isoladas. E as amostras se apresentaram dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação (BRASIL, 2001), ausência de *Salmonella* sp. e coliformes totais.

A figura 2 apresenta o gel de agarose da PCR do material genético bacteriano e fúngico. Como indicado, apresentou bandas em torno de 1.500 pb (pares de bases) para bactérias e 500 pb para fungos.

**Figura 2 – Gel de agarose da amplificação genética**

(A): material bacteriano; (B): material fúngico; M: marcador de pares de bases. Números representam as amostras microbianas.

**Fonte:** próprio autor (2015).

O sequenciamento do material genético após tratamento na base de dados no *BLAST* (tabela 1) indica a presença de 4 bactérias e 1 espécie fúngica, a *Meyerozyma caribbica* que é a forma sexuada ou telemórfica (*Candida fermentati* é a forma assexuada ou anamorfa). Esta duplicidade no ciclo reprodutivo é uma característica do filo Ascomycota (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; KURTZMAN, SUZUKI, 2010).

**Tabela 1 – Valores de cobertura, *E-value* e identidade do sequenciamento genético**

Microbiota	Descrição	Cobertura	<i>e-value</i> *	Identidade
Bactéria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	73 %	0,0	93 %
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	71 %	0,0	94 %
	<i>Bacillus</i> sp.	85 %	0,0	96 %
	<i>Microbacterium</i> sp.	82 %	0,0	96 %
Fungo	<i>Meyerozyma caribbica</i>	86 %	1e-175	87 %

Parâmetro de confiança do alinhamento (*e-value* ≤ 0)

Os valores de cobertura indicam o quanto a sequência registrada no banco de dados é similar em tamanho com a sequência estudada. A identidade avalia o quanto desse tamanho é idêntico e o *e-value* é um parâmetro de confiança

que informa se o alinhamento ocorreu ao acaso (BLAST®).

Os autores Teoh, Heard e Cox (2004) ao estudarem a microbiota fúngica de *kombuchas* comerciais evidenciaram que a presença de leveduras predominantes varia entre 1 e 3 espécies e *Candida* sp. foi uma das identificadas. E Jayabalan et al. (2014) indicam o isolamento deste gênero em amostras de diferentes origens.

Segundo Romi et al. (2014) a identificação e diferenciação de *M. caribbica* e *M. guilliermondii* (*Candida guilliermondii*) é desafiadora devido à proximidade genética entre as duas espécies. Apesar das formas assexuadas de ambas estarem agrupadas no gênero *Candida*, raramente, a *C. fermentati* é associada como patogênica. As formas telemórficas são associadas com produtos fermentados contribuindo para o perfil sensorial destes. Esta foi isolada em processos fermentativos da amêndoa do cacau e do café (DANIEL et al., 2009; EVANGELISTA et al., 2015).

O sequenciamento genético bacteriano identificou duas espécies do gênero *Pseudomonas*, sendo *P. stutzeri* e *P. oryzihabitans*. Além dos gêneros *Bacillus* sp. e *Microbacterium* sp..

As espécies de *Pseudomonas* spp. identificadas são consideradas patogênicas oportunistas, mas raramente causam infecções em humanos. Elas ocorrem naturalmente no ambiente (terrestre e aquático). *P. aeruginosa* é descrita como potencial produtora de biofilme, assim como *P. oryzihabitans*, porém esta característica não é associada com *P. stutzeri*. A presença destes microrganismos no inóculo adaptado ao meio é no mínimo intrigante, pois a *P. oryzihabitans* não apresenta capacidade fermentativa e a *P. stutzeri* não tolera condições ácidas, e não apresenta crescimento em pH inferior a 4,5 (LALUCAT et al., 2006). O inóculo foi cultivado em meio ácido, com pH entre 2,7-3,0 e acidez total expressa em ácido acético variando de 6,76 e 8,97 g.L<sup>-1</sup>.

Durante o processo de fermentação houve a produção de película na interface ar/líquido do sistema. Espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produção de exopolissacarídeos como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (BOURDICHON et al., 2012; ELSHOLZ; WACKER; LOSICK, 2014; SONG; JEONG; BAIK, 2013).

A presença de *Microbacterium* sp. em alimentos fermentados é descrita na literatura, o isolamento foi obtido em derivados de leite, atuando na maturação de queijos (BOURDICHON et al., 2012).

### 5.3 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DA BEBIDA *KOMBUCHA*

#### 5.3.1 Teor de Sólidos Solúveis e Açúcares

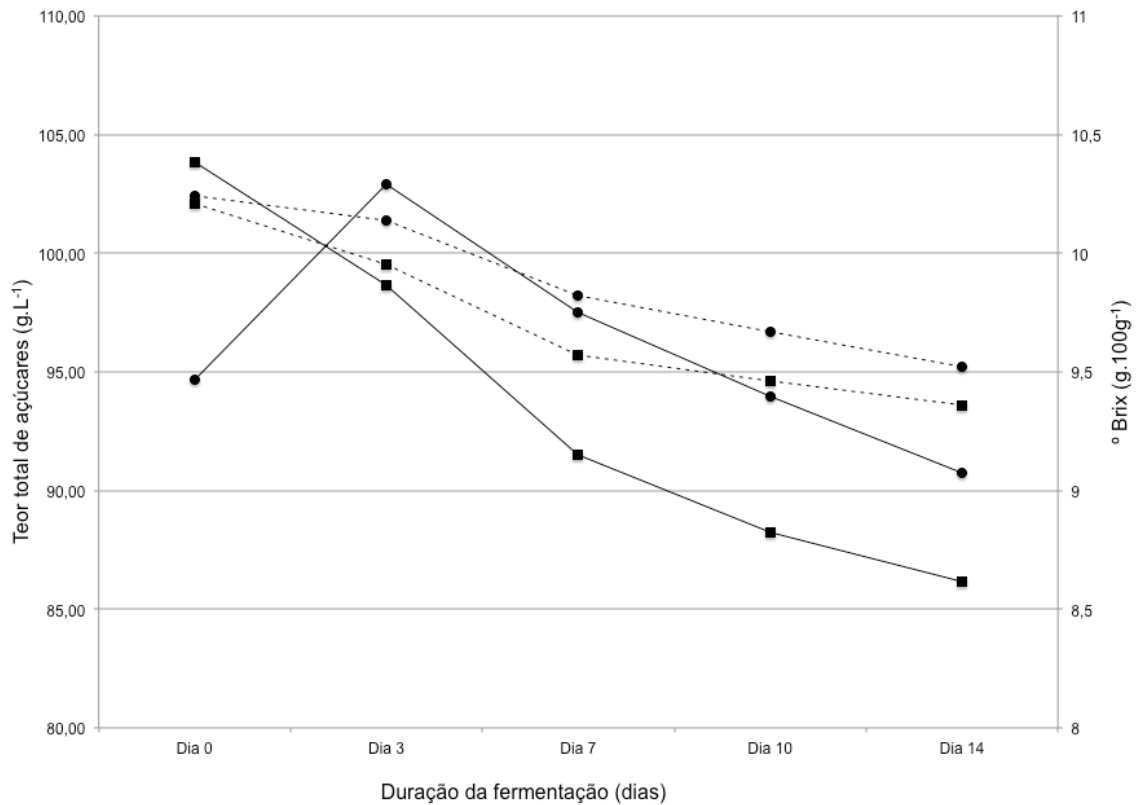
A tabela 2 apresenta a evolução do teor de sólidos solúveis totais nas bebidas durante o período de fermentação que foi de 14 dias. Pode-se observar que houve diminuição destes, que partiu de 10,21 °Brix e atingiu o valor final de 9,36 °Brix, com uma redução de 8,3 % nos sólidos contidos na bebida preparada com *oolong*. Já, no *kombucha* de mate esta variação foi de 7,0 % na solução que tinha um teor inicial de 10,24 °Brix e final de 9,52 °Brix. É possível assumir que esta diminuição é decorrente da utilização do carboidrato como fonte de carbono pela cultura mista. Para o controle, em que apenas foi fornecido solução açucarada ao inóculo, a variação foi não significativa.

**Tabela 2** – Teor de sólidos solúveis totais das infusões fermentadas por 14 dias

Tempo (dia)	Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	9,98 ±0,08 <sup>a</sup>	9,98 ±0,05 <sup>a</sup>	9,95 ±0,08 <sup>a</sup>	9,92 ±0,06 <sup>a</sup>	9,97 ±0,05 <sup>a</sup>
Oolong	10,21 ±0,04 <sup>a</sup>	9,95 ±0,05 <sup>b</sup>	9,57 ±0,06 <sup>c</sup>	9,46 ±0,00 <sup>d</sup>	9,36 ±0,03 <sup>e</sup>
Mate	10,24 ±0,08 <sup>a</sup>	10,14 ±0,03 <sup>b</sup>	9,82 ±0,04 <sup>c</sup>	9,67 ±0,06 <sup>d</sup>	9,52 ±0,09 <sup>e</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

O grau Brix (g de sólidos solúveis totais em 100 g de solução) representou neste caso a medida aproximada do teor de açúcar total da solução, uma vez que esta foi preparada com a simples solubilização do carboidrato em água. O gráfico 1 relaciona a concentração total de açúcares, obtida pelo somatório das frações sacarose, glicose e frutose determinadas por CLAE (tabela 3), com o teor de °Brix. Este evidencia a tendência de exatidão destas medidas, o que justifica o uso da determinação de sólidos solúveis totais (°Brix) como parâmetro de controle no processo de fermentação para a obtenção da bebida *kombucha*.

**Gráfico 1** – Concentração total de açúcares determinados por CLAE e °Brix

Linha sólida: concentração total de açúcares; linha tracejada: valores de °Brix; (■) amostra *oolong*; (●) amostra *mate*.

A quantificação dos açúcares das amostras por CLAE (tabela 3) demonstrou a ocorrência de hidrólise da sacarose em glicose e frutose, devido a presença de invertase de origem fúngica que cliva o dissacarídeo (CHEN; LIU, 2000). O cromatograma está apresentado no Apêndice C.

**Tabela 3** – Teor de açúcares por CLAE

Amostra	Tempo (dia)	Açúcares (g.L <sup>-1</sup> )		
		Sacarose	Glicose	Frutose
Oolong	0	83,21	16,62	4,02
	3	76,22	16,14	6,31
	7	62,12	18,86	10,50
	10	52,68	21,69	13,88
	14	40,36	26,37	19,42
Mate	0	79,61	11,12	3,80
	3	82,58	14,71	5,61
	7	73,77	15,97	7,75
	10	66,72	17,80	9,42
	14	54,72	22,59	13,41

A taxa de degradação dos açúcares totais ocorreu em uma maior velocidade durante o período de 0 a 7 dias para as amostras de *oolong* e esta foi diminuindo com o transcorrer do tempo. Os valores obtidos das taxas de degradação dos açúcares totais para o *oolong* foram de  $-1,72 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 3$  dias);  $-1,77 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 7$  dias);  $-1,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 10$  dias);  $-1,26 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 14$  dias). Valores decrescentes eram esperados uma vez que os açúcares são neste caso a principal fonte de carbono para manutenção e multiplicação celular da cultura mista. O teor de açúcar total partiu de  $103,85 \text{ g.L}^{-1}$  com uma provável metabolização pelos microrganismos de 17 % e chegou em  $86,15 \text{ g.L}^{-1}$  ao final do processo fermentativo. Avaliando os resultados da CLAE, observou-se o acúmulo de monossacarídeos com uma taxa de formação em  $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , ao longo dos períodos de 0 a 3; 0 a 7; 0 a 10; 0 a 14 dias, de glicose de  $-0,16$ ;  $0,32$ ;  $0,51$  e  $0,70$ , respectivamente e frutose de  $0,76$ ;  $0,92$ ;  $0,99$  e  $1,10$ , respectivamente para *kombucha* a partir de *oolong*. Os dados levantados apontam para a inferência de que o monossacarídeo metabolizado prioritariamente foi a glicose.

Os valores obtidos das taxas de conversão dos açúcares totais para o mate foram de  $2,75 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 3$  dias);  $-0,40 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 7$  dias);  $-0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 10$  dias);  $-0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ( $\Delta t = 14$  dias). Estes valores oscilam de modo não uniforme quanto a degradação do açúcar total. O teor de açúcares totais iniciou-se em  $94,65 \text{ g.L}^{-1}$  e ao final foi de  $90,73 \text{ g.L}^{-1}$ , com decréscimo de 4 %. Já a taxa de formação em  $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  ao longo dos períodos de 0 a 3; 0 a 7; 0 a 10; 0 a 14 dias de glicose foram  $1,16$ ;  $0,67$ ;  $0,66$ ;  $0,81$  e frutose foram  $0,60$ ;  $0,56$ ;  $0,56$  e  $0,69$ , respectivamente para *kombucha* a partir de mate. Considerando que o acúmulo de monossacarídeo em maior quantidade neste caso foi de glicose poder-se-ia sugerir que a frutose foi metabolizada pelos microrganismos constituintes da cultura mista. É sabido que os microrganismos priorizam a rota de degradação da glicose em detrimento à frutose, porém esta também pode ser fonte de energia para a célula e metabólitos intermediários quando envolvem o sistema das enzimas fosfotransferase e frutoquinase para a fosforilação da molécula de frutose (CAESCU et al., 2004).

Kallel et al. (2012) estudaram dois tipos de *kombucha*, a partir de chá verde e de preto, com concentração inicial de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, fermentados por 15 dias, na temperatura de  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O resultado apresentado para a taxa de degradação de sacarose foi de  $2,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e na bebida final foi encontrado  $5,2 \text{ g.L}^{-1}$  para glicose e  $12,2 \text{ g.L}^{-1}$  para a frutose, na bebida produzida

com chá verde. Já para o chá preto a degradação de sacarose ao final do décimo quinto dia foi de  $2,5 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ . O teor de glicose neste foi de  $9,4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $17,8 \text{ g.L}^{-1}$  para a frutose. No presente estudo a taxa de degradação da sacarose para o *oolong* foi de  $3,1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  e  $1,8 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  para o mate. O consumo de carboidratos é dependente de fatores tais como período de fermentação e temperatura. Já os teores de glicose e frutose em  $\text{g.L}^{-1}$ , no *kombucha* com *oolong* foram 26,4 e 19,4, respectivamente. Para as bebidas com mate foram de  $22,6 \text{ g.L}^{-1}$  para a glicose e  $13,4 \text{ g.L}^{-1}$  para a frutose. Estes valores contradizem àqueles encontrados pelos autores mencionados. Entretanto, Lončar et al. (2000) relatam 25,59 e  $5,4 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e frutose, respectivamente, para bebida fermentada com chá preto nas condições de temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , com concentração inicial de  $70 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, por 21 dias. Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho. Pode-se supor que as concentrações finais dos açúcares indiquem destinos metabólicos diferentes durante a fermentação. Um fator a ser considerado é a diversidade da microbiota que não é a mesma entre as pesquisas comparadas (JAYABALAN et al., 2014).

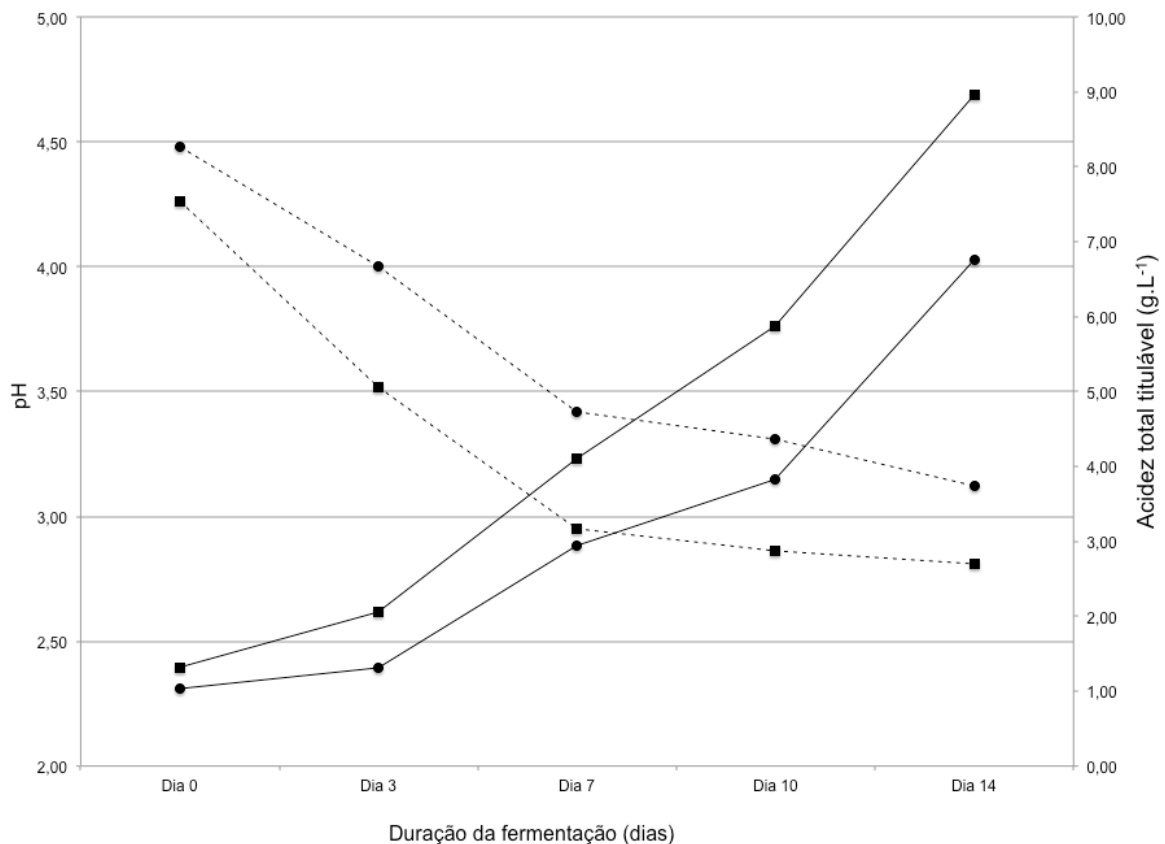
### 5.3.2 Potencial Hidrogênionico (pH), Acidez Total Titulável e Teor de Ácidos Orgânicos

As bebidas fermentadas a partir de substrato açucarado com a infusão dos chás apresentaram diminuição do pH com o passar do tempo de fermentação. Isto pode ser em consequência do metabolismo microbiano que ao produzir ácidos orgânicos diminui o pH do meio. Estes resultados e suas correlações estão apresentadas na tabela 4 e no gráfico 2, respectivamente. O pH decaiu de 4,26 para 2,95 (amostra *oolong*), ao final do sétimo dia e se manteve sem diferença significativa até o décimo quarto dia. Os valores observados estão de acordo com os estudos de Greenwalt, Ledford e Steinkraus (1998), Kallel et al. (2012), Sreeramulu, Zhu, Knol (2000) e Steinkraus et al. (1996), em que *kombucha* produzidos a partir de distintas culturas iniciadoras e infusões de chá (preto ou verde; preto ou verde; preto; preto, respectivamente), resultaram em um valor de pH próximo de 2,5 nas bebidas em tempos diferentes 9, 15, 6 e 7 dias, respectivamente.

**Tabela 4 – Potencial hidrogeniônico**

Tempo (dia)	pH				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	4,21 ±0,44 <sup>a</sup>	3,70 ±0,29 <sup>b</sup>	3,08 ±0,13 <sup>c</sup>	2,96 ±0,16 <sup>c</sup>	2,91 ±0,09 <sup>c</sup>
Oolong	4,26 ±0,37 <sup>a</sup>	3,52 ±0,16 <sup>b</sup>	2,95 ±0,09 <sup>c</sup>	2,86 ±0,03 <sup>c</sup>	2,81 ±0,09 <sup>c</sup>
Mate	4,48 ±0,36 <sup>a</sup>	4,00 ±0,21 <sup>b</sup>	3,42 ±0,05 <sup>c</sup>	3,31 ±0,05 <sup>c</sup>	3,12 ±0,07 <sup>c</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Gráfico 2 – Relação pH e acidez total titulável**

Linha sólida: teor de ácidos totais; linha tracejada: medição do pH; (■) amostra *oolong*; (●) amostra *mate*.

A diminuição do valor de pH foi significativo após o terceiro dia de fermentação para ambos os chás e do sétimo dia até o final da fermentação não apresentou diferença significativa. De acordo com Malbaša et al. (2011), isto pode ser uma consequência do efeito tampão entre a síntese de ácidos orgânicos fracos com os minerais provenientes dos chás e da água mineral.

Diferente do encontrado no teor de sólidos solúveis totais (tabela 2), a amostra controle acompanhou a tendência de diminuição do valor de pH das amostras de *oolong* e de *mate* e a análise estatística apresentou que esta medida foi



diferente significativamente quando comparou-se o início e o terceiro dia, e do sétimo até o final não foi significativa.

A acidez total titulável (tabela 5) aumentou ao decorrer do tempo de fermentação, os maiores valores foram observados no décimo quarto dia. A amostra *oolong* iniciou com um valor absoluto de acidez de 1,32 g de acidez total expressa em ácido acético por litro de amostra (g.AC.L<sup>-1</sup>) e atingiu 8,97 g.AC.L<sup>-1</sup>. Enquanto, a amostra *mate* no início do processo tinha um valor de 1,03 g.AC.L<sup>-1</sup> e atingiu o seu máximo em 6,76 g.AC.L<sup>-1</sup>. Os resultados observados estão de acordo com os encontrados por Kallel et al. (2012) cujas condições experimentais já foram citadas. Assim como Jayabalan et al. (2007) que utilizou chás verde ou preto com teores iniciais de sacarose de 100 g.L<sup>-1</sup>, por 18 dias, na temperatura de 24 °C (9,5 e 6,2 g.AC.L<sup>-1</sup>, respectivamente, no décimo quinto dia).

**Tabela 5 – Teor de acidez total titulável**

Tempo (dia)	Teor de acidez total titulável em ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	0,59 ±0,00 <sup>c</sup>	1,18 ±0,49 <sup>c</sup>	1,62 ±0,39 <sup>b</sup>	2,06 ±0,34 <sup>b</sup>	2,94 ±0,00 <sup>a</sup>
Oolong	1,32 ±0,29 <sup>d</sup>	2,06 ±0,34 <sup>d</sup>	4,11 ±0,48 <sup>c</sup>	5,88 ±0,48 <sup>b</sup>	8,97 ±0,88 <sup>a</sup>
Mate	1,03 ±0,29 <sup>c</sup>	1,32 ±0,29 <sup>c</sup>	2,94 ±0,00 <sup>b</sup>	3,82 ±0,43 <sup>b</sup>	6,76 ±1,40 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey, p<0,05).

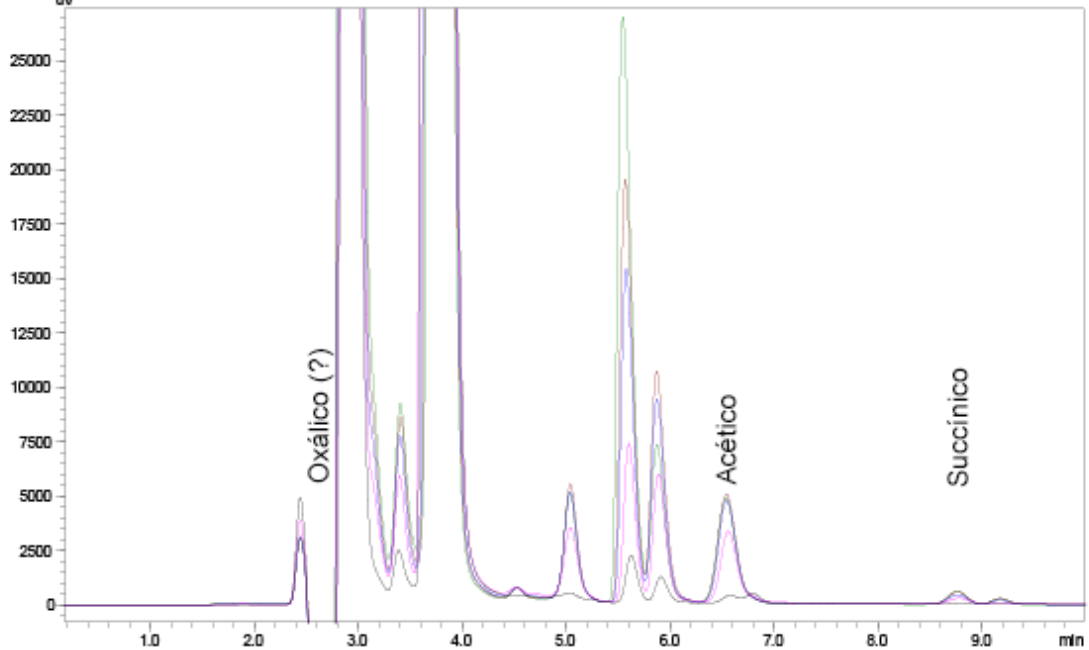
Os principais ácidos orgânicos responsáveis por conferir acidez aos produtos, que foram separados e quantificados por CLAE, nas amostras de *kombucha* com infusão de *oolong* e *mate* foram o acético e o succínico (tabela 6).

**Tabela 6 – Teor de ácidos orgânicos determinados por CLAE**

Amostra	Tempo (dia)	Ácidos orgânicos (g.L <sup>-1</sup> )	
		Ácido acético	Ácido succínico
Oolong	0	0,50	0,02
	3	1,69	0,06
	7	3,76	0,11
	10	4,94	0,14
	14	7,53	0,15
Mate	0	0,54	0,02
	3	1,05	0,04
	7	2,31	0,09
	10	3,04	0,12
	14	5,75	0,17

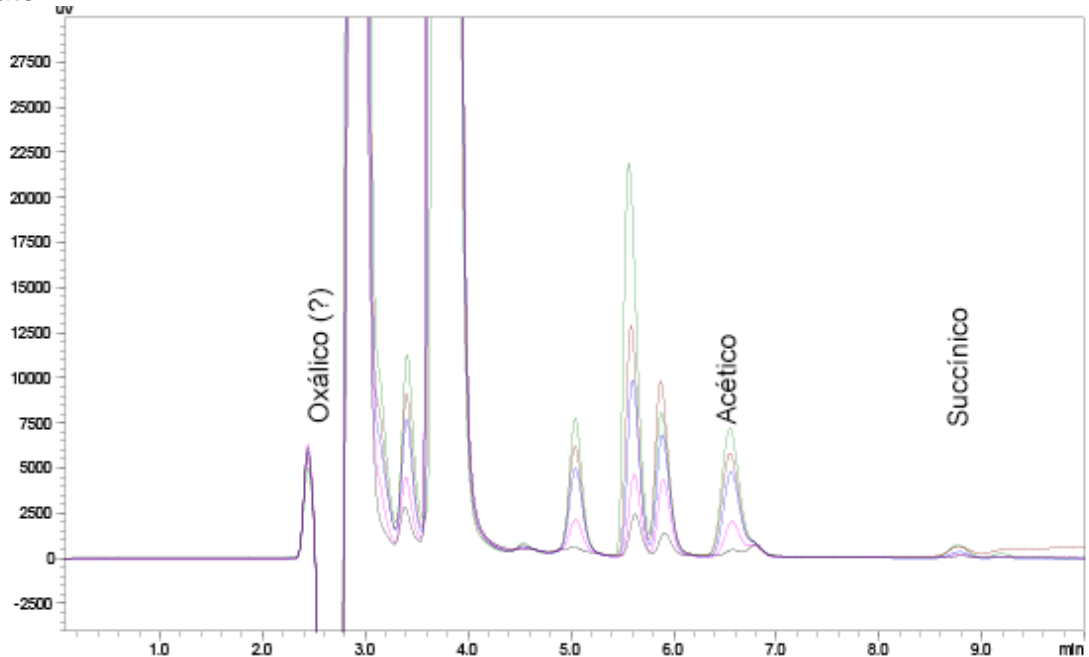
O ácido oxálico foi detectado, entretanto, a sua quantificação não foi possível devido à natureza heterogênea da amostra. Os cromatogramas da amostras *oolong* e *mate* estão apresentados nas figuras 3 e 4, respectivamente.

**Figura 3** – Cromatograma de ácidos orgânicos determinados por CLAE da amostra *oolong*



Cromatograma de ácidos orgânicos da amostra *oolong*. Dia 0 (preto); dia 3 (rosa); dia 7 (azul); dia 10 (magenta); dia 14 (verde).

**Figura 4** – Cromatograma de ácidos orgânicos determinados por CLAE da amostra *mate*

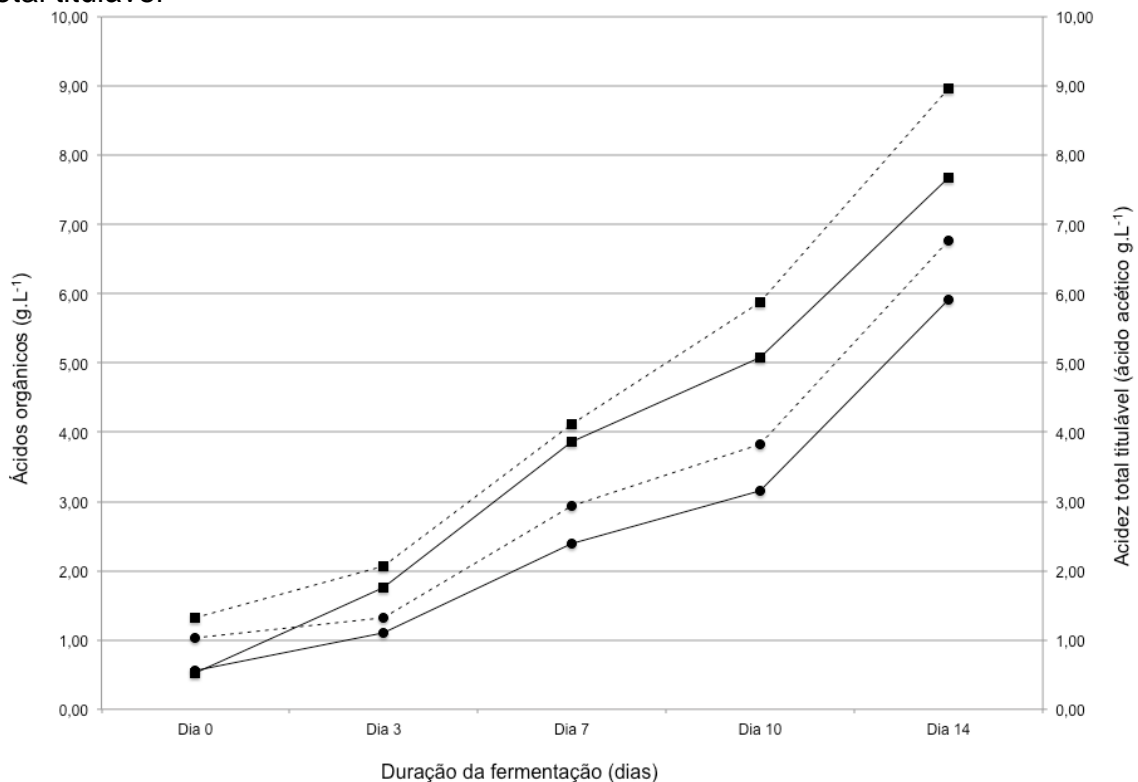


Cromatograma de ácidos orgânicos da amostra *mate*. Dia 0 (preto); dia 3 (rosa); dia 7 (azul); dia 10 (magenta); dia 14 (verde).

Outros compostos com eluição próxima ao tempo de retenção do ácido oxálico impossibilitaram a sua quantificação, do ponto de vista qualitativo, mas foi possível observar o pico de detecção de componente nos cromatogramas. Para a quantificação deste ácido seria necessário, sob o aspecto analítico, a validação de outra metodologia. Tal procedimento não foi realizado pois não era o objetivo do presente estudo.

Ao relacionar o teor de ácidos totais determinados por CLAE e acidez total titulável (gráfico 3) observou uma diferença na quantificação, isto pode indicar a presença de outros ácidos distintos e não pesquisados na cromatografia

**Gráfico 3** – Relação do teor de ácidos orgânicos quantificados por CLAE e acidez total titulável



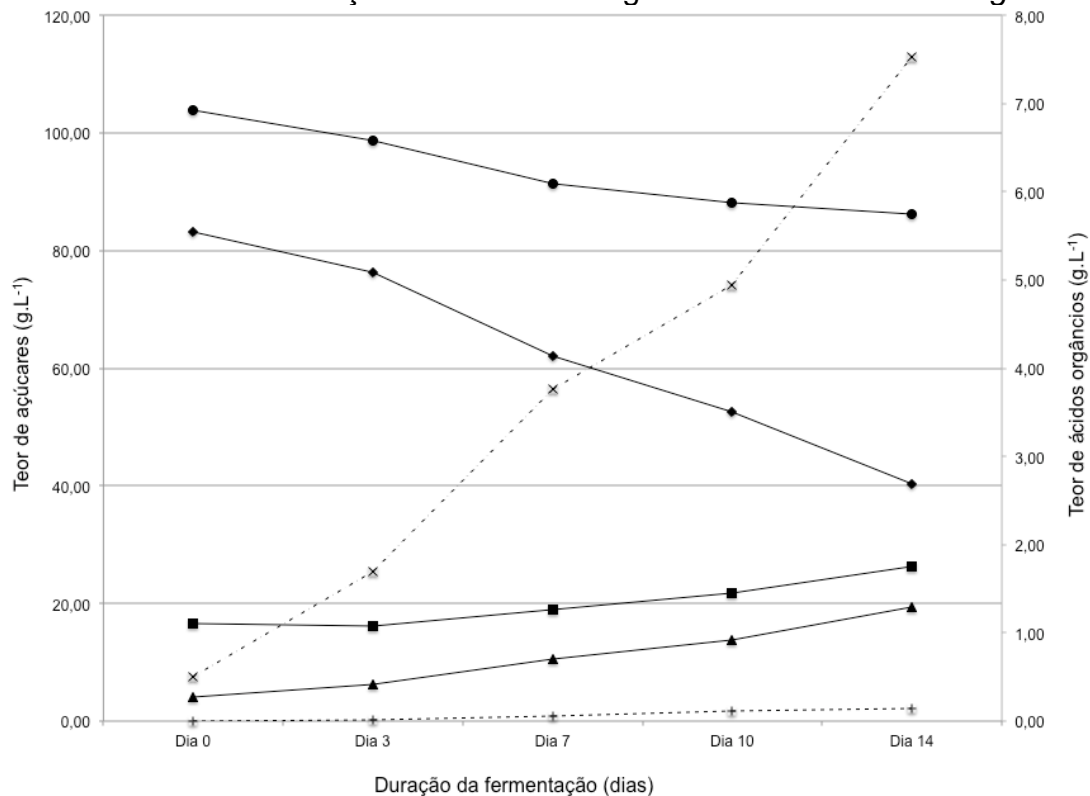
Linha sólida: teor de ácidos totais por CLAE; linha tracejada: acidez total titulável; (■) amostra *oolong*; (●) amostra *mate*.

Jayabalan et al. (2014) apresentam *kombuchas* elaborados de modos diferentes e relatam uma diversidade de ácidos orgânicos tais como acético, glucônico, cítrico, L-lático, málico, tartárico, oxálico e succínico. A síntese destes é atribuída à ação microbiana na metabolização dos açúcares presentes na infusão açucarada. A glicólise produz o ácido pirúvico e a partir da sua decomposição pode ser formado ácido acético, lático, propiônico, succínico, málico e cítrico (no ciclo dos

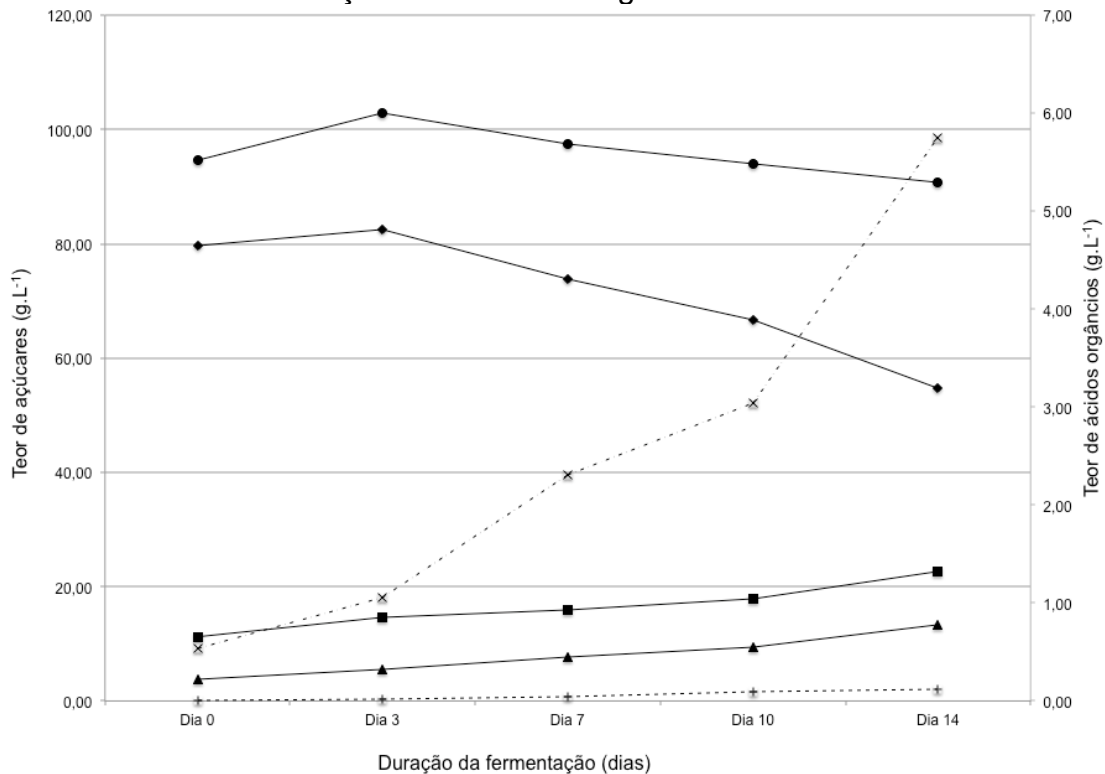
ácidos tricarboxílicos) (HUTKINS, 2006; RATLEDGE; KRISTIANSEN, 2006; SAUER et al., 2008). Enquanto, o ácido glucônico é produzido por desidrogenação enzimática da glicose. E o ácido oxálico está presente naturalmente nas folhas de chá de *C. sinensis* (RUSINEK, 2012; SCHARBERT; HOFMANN, 2005).

Os gráficos 4 e 5 apresentam a relação do substrato com os produtos formados para as distintas bebidas. A cultura mista basicamente composta por bactérias e fungo possivelmente metabolizou os carboidratos proveniente do açúcar dissolvido em água alcalina terrosa que consistia no substrato e produziu ácidos orgânicos.

**Gráfico 4 – Teores de açúcares e ácidos orgânicos da amostra *oolong***



Linha sólida: teor de açúcares; linha tracejada: teor dos ácidos orgânicos; (◆) sacarose; (■) glicose; (▲) frutose; (●) açúcar total; (×) ácido acético; (+) ácido succínico.

**Gráfico 5 – Teores de açúcares e ácidos orgânicos da amostra mate**

Linha sólida: teor de açúcares; linha tracejada: teor dos ácidos orgânicos; (◆) sacarose; (■) glicose; (▲) frutose; (●) açúcar total; (×) ácido acético; (+) ácido succínico.

O teor de ácido acético determinado no experimento para o *oolong* após 14 dias de fermentação foi de 7,53 g.L<sup>-1</sup> e para o mate 5,75 g.L<sup>-1</sup>. Chen e Liu (2000) fermentaram infusão de chá preto com uma concentração inicial de 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, a 27 °C e obtiveram 11 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético após 30 dias do início e este decaiu a 8 g.L<sup>-1</sup> depois de 60 dias. Valores inferiores de ácido acético (0,59 g.L<sup>-1</sup>) foram encontrado por Jayabalan, Marimuthu e Swaminathan (2007) quando fizeram uso de melado de beterraba com concentração inicial de 50 ou 35 g de sacarose por litro, após 14 dias de fermentação a 22 °C. E, quando a concentração inicial de açúcar da mesma fonte era de 70 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, o teor de ácido acético foi de 0,19 g.L<sup>-1</sup>. As condições de fermentação e a fonte de açúcar parecem influenciar no teor de ácido acético produzido.

### 5.3.3 Teor Alcoólico

Nas amostras analisadas não foram detectados teores alcoólicos utilizando ebuliômetro, cuja faixa de detecção está entre 0,1-0,5 % (MANSFIELD,

2010).

O teor de álcool nos *kombuchas* podem variar em relação a concentração de sacarose fornecida ao sistema e à cultura mista. O estudo realizado por Reiss (1994) verificou a influência de diferentes tipos de carboidratos (sacarose, lactose, glicose, frutose) e suas concentrações (30, 50, 70, 100, 150 g.L<sup>-1</sup>) no processo fermentativo (chá verde, por 17 dias, na temperatura de 22 °C). O teor de etanol foi maior para concentrações menores de sacarose (30 e 50 g.L<sup>-1</sup>), sendo que o máximo observado foi no décimo dia (6,3 g.L<sup>-1</sup>) com a concentração 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Para 70 e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose resultou em concentrações de etanol de 1,0 e 0,01 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, ao final do décimo sétimo dia. Outros autores observaram valores de 5,5 g.L<sup>-1</sup> (décimo dia) e 6 g.L<sup>-1</sup> (nono dia) ambos com concentração 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (CHEN; LIU, 2000; GREENWALT, LEDFORD, STEINKRAUS, 1998).

#### 5.3.4 Determinação de Fenólicos Totais e Flavonoides Totais

Por ser uma bebida produzida a partir de chá foi detectado teores de fenólicos nos *kombuchas*. Para a amostra *oolong*, a concentração de fenólicos totais apresentou diferença significativa entre o terceiro e sétimo dia. Entretanto, de modo global não diferiu durante o início e o final da fermentação. A amostra *mate* estatisticamente não apresentou diferenças significativas durante a fermentação. A amostra controle apresentou valores para fenólicos (não diferiu), uma vez que o inóculo de *kombucha* é produzido com infusão de *C. sinensis* (tabela 7).

**Tabela 7 – Teor de fenólicos totais**

Tempo (dia)	Teor fenólicos totais (mM equivalente ácido gálico)				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	0,394 ±0,13 <sup>a</sup>	0,427 ±0,201 <sup>a</sup>	0,500 ±0,011 <sup>a</sup>	0,423 ±0,094 <sup>a</sup>	0,494 ±0,094 <sup>a</sup>
Oolong	3,766 ±0,491 <sup>ab</sup>	4,125 ±0,494 <sup>a</sup>	3,116 ±0,152 <sup>b</sup>	4,109 ±0,209 <sup>a</sup>	3,569 ±0,335 <sup>ab</sup>
Mate	2,361 ±0,969 <sup>a</sup>	2,418 ±0,123 <sup>a</sup>	2,699 ±0,283 <sup>a</sup>	2,867 ±0,269 <sup>a</sup>	3,309 ±0,416 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey, p<0,05).

Em experimentos (KALLEL et al., 2012) realizados com chá verde ou preto foram encontrados aumentos nos teores de fenólicos totais entre o início e o final da fermentação (décimo quinto dia) de 39 % no chá verde (de 4,584 para 6,348 mM Eq.AG) e 12 % no chá preto (de 5,936 para 6,583 mM Eq.AG). De maneira similar, Jayabalan et al. (2008) relatou aumento de 19 % de fenólicos totais no chá verde (de 4,996 para 7,344 mM Eq.AG) e 17 % no chá preto (de 3,526 para 4,232 mM Eq.AG) ao final da fermentação (décimo oitavo dia) para *kombucha* feitos com 12 g.L<sup>-1</sup> de chá, concentração 100 g.L<sup>-1</sup> e sacarose, 18 dias, na temperatura de 24 ±3 °C. Este aumento pode estar relacionada com a degradação de compostos fenólicos complexos (como os flavonoides) presentes no chá em decorrência do ambiente ácido e ação de enzimas produzidas pelos microrganismos da cultura mista (JAYABALAN et al., 2008; JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007).

O teor de flavonoides totais (tabela 8) para o chá *oolong* teve uma redução de 45,04 % entre o início e término da fermentação e para o chá mate a redução foi de 47,42 % considerando o mesmo período. O controle também apresentou diminuição de 39, 28 % e a presença é em decorrência do inóculo ser feito com chá *oolong*.

**Tabela 8 – Teor de flavonoides totais**

Tempo (dia)	Teor flavonoides totais (mM equivalente catequinas)				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	0,056 ±0,007a	0,044 ±0,004b	0,035 ±0,002c	0,037 ±0,002bc	0,034 ±0,003c
Oolong	0,595 ±0,126a	0,499 ±0,042ab	0,361 ±0,022bc	0,414 ±0,040bc	0,327 ±0,020c
Mate	1,164 ±0,402a	0,775 ±0,084b	0,740 ±0,128b	0,665 ±0,152b	0,612 ±0,117b

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey, p<0,05).

Os resultados obtidos estão de acordo com Jayabalan, Marimuthu e Swaminathan (2007) que pesquisaram o impacto da fermentação do *kombucha* na degradação de quatro isômeros de epicatequinas ((-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epigallocatequina galato (EGCG)) em chá verde ou preto. Estes foram feitos com 12 g.L<sup>-1</sup> de chá, uma concentração 100 g.L<sup>-1</sup> e sacarose, fermentados por 18 dias, na temperatura de 24 ±3 °C. Para EGCG verificou uma degradação de 18 % (chá verde) e 30 % (chá preto), e ECG foi de 23 % e 48 % em chá verde e preto, respectivamente, no nono dia de fermentação.

### 5.3.5 Determinação da Capacidade Antioxidante

#### 5.3.5.1 Radical ABTS

Na avaliação antioxidante sobre o radical ABTS (tabela 9), a amostra *oolong* no tempo zero diferiu dos tempos terceiro, décimo e décimo quarto dia. O sétimo dia apresentou diferença significativa para o terceiro e décimo dia. Enquanto, não diferiu do tempo zero e do décimo quarto dia. Em relação a taxa inibitória (tabela 10), os tempos terceiro, décimo e décimo quarto dia não diferiram entre si. Mas foram diferentes significativamente para o tempo zero.

**Tabela 9** – Atividade antioxidante sobre radical ABTS

Tempo (dia)	ABTS (mM equivalente de <i>Trolox</i> )				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	0,454 ±0,422 <sup>a</sup>	0,435 ±0,275 <sup>a</sup>	0,344 ±0,237 <sup>a</sup>	0,285 ±0,202 <sup>a</sup>	0,120 ±0,098 <sup>a</sup>
Oolong	6,252 ±0,783 <sup>b</sup>	7,964 ±0,361 <sup>a</sup>	6,401 ±0,289 <sup>bc</sup>	7,670 ±0,454 <sup>a</sup>	7,498 ±0,480 <sup>ac</sup>
Mate	5,393 ±1,370 <sup>a</sup>	2,916 ±0,449 <sup>b</sup>	3,792 ±0,790 <sup>ab</sup>	3,385 ±0,685 <sup>b</sup>	3,347 ±0,372 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 10** – Taxa de inibição do radical ABTS

Tempo (dia)	Taxa de inibição sobre o radical ABTS (%)				
	0	3	7	10	14
Amostra					
Controle	8,81 ±4,85 <sup>a</sup>	8,81 ±2,98 <sup>a</sup>	6,72 ±4,72 <sup>a</sup>	7,13 ±2,29 <sup>a</sup>	4,07 ±3,56 <sup>a</sup>
Oolong	71,72 ±8,46 <sup>c</sup>	90,22 ±3,91 <sup>a</sup>	73,32 ±3,12 <sup>bc</sup>	87,05 ±4,91 <sup>a</sup>	85,19 ±5,18 <sup>ac</sup>
Mate	68,75 ±9,60 <sup>a</sup>	35,63 ±4,85 <sup>b</sup>	45,11 ±8,54 <sup>b</sup>	40,71 ±7,40 <sup>b</sup>	40,30 ±4,02 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Para a amostra mate em relação ao radical ABTS observou-se diminuição da atividade antioxidante entre o início e o final da fermentação. No tempo zero apresentou os maiores valores tanto para a equivalência em *Trolox* quanto na taxa de inibição (5,393 mM e 68,75 %, respectivamente), esta situação pode ser atribuída ao inóculo que forneceu compostos fenólicos por ter como base uma infusão de *C. sinensis*. No décimo quarto dia foi observado atividade antioxidante de 3,357 mM Eq. *Trolox* e 40,30 % de taxa de inibição do radical ABTS.

A capacidade antioxidante do *kombucha* é uma característica esperada, uma vez que os chás utilizados na produção da bebida possuem



compostos fenólicos como flavonoides, polifenóis e derivados do cafeoil (como ácido clorogênico) (HECK; DE MEJIA, 2007; LU et al., 2009; SILVA et al., 2012; SONG et al., 2012).

### 5.3.5.2 Radical DPPH

A capacidade antioxidante em relação ao radical DPPH (tabela 11) apresentou aumento ao longo da fermentação para as amostras de chá e diminuição para o controle que inicialmente possuía valores maiores. As atividades antioxidantes equivalentes ao *Trolox* aumentaram 4,53 % para o *oolong* (de 0,949 para 0,992 mM Eq.*Trolox*) e 3,44 % para o *mate* (de 0,928 para 0,960 mM Eq.*Trolox*), respectivamente.

A taxa de inibição (tabela 12) para o *oolong* e o *mate* no início foi de 85,75 e 83,69 %, respectivamente, ao final da fermentação apresentaram valores de 89,74 e 86,72 %, respectivamente. O controle partiu de 71,98 % e finalizou com 44,01 %, isto pode ser decorrente das interações entre os compostos da amostra (fenólicos, ácidos orgânicos, enzimas da cultura mista) e o radical utilizado.

**Tabela 11 – Atividade antioxidante sobre radical DPPH**

Tempo (dia)	DPPH (mM equivalente de <i>Trolox</i> )				
	0	3	7	10	14
<b>Amostra</b>					
Controle	0,803 ±0,023 <sup>a</sup>	0,744 ±0,103 <sup>a</sup>	0,479 ±0,044 <sup>b</sup>	0,466 ±0,071 <sup>b</sup>	0,505 ±0,029 <sup>b</sup>
Oolong	0,949 ±0,009 <sup>c</sup>	0,971 ±0,006 <sup>b</sup>	0,973 ±0,005 <sup>b</sup>	0,982 ±0,004 <sup>a</sup>	0,992 ±0,005 <sup>a</sup>
Mate	0,928 ±0,018 <sup>b</sup>	0,935 ±0,012 <sup>b</sup>	0,930 ±0,001 <sup>b</sup>	0,941 ±0,008 <sup>a</sup>	0,960 ±0,003 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 12 – Taxa de inibição do radical DPPH**

Tempo (dia)	Taxa de inibição sobre o radical DPPH (%)				
	0	3	7	10	14
<b>Amostra</b>					
Controle	71,98 ±2,21 <sup>a</sup>	66,47 ±9,63 <sup>a</sup>	41,58 ±4,15 <sup>b</sup>	40,33 ±6,67 <sup>b</sup>	44,01 ±2,75 <sup>b</sup>
Oolong	85,75 ±0,88 <sup>c</sup>	87,74 ±0,57 <sup>b</sup>	87,96 ±0,51 <sup>b</sup>	88,82 ±0,37 <sup>ab</sup>	89,74 ±0,45 <sup>a</sup>
Mate	83,69 ±1,71 <sup>b</sup>	84,40 ±1,15 <sup>b</sup>	83,91 ±0,12 <sup>b</sup>	84,99 ±0,74 <sup>a</sup>	86,72 ±0,28 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Os autores Chu e Chen (2006) ao analisarem *kombucha* produzidos com oito culturas mistas diferentes e com a mesma base de infusão nas condições

de 4 g.L<sup>-1</sup> de chá preto, com concentração de 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, por 15 dias, na temperatura de 30 °C, observaram aumento na taxa de inibição do radical DPPH. Dentre essas culturas mistas, quatro apresentaram taxas de 61,2 %; 64,3 %; 69,2 % e 62,2 % sendo que iniciaram em 34,3 % e comparado com chá preto foi de 1,7 vezes maior. As outras quatro amostras também aumentaram durante a fermentação, partindo de 36,4 %, atingiram 47,8 %; 39 %; 43 % e 49 %. Os autores consideraram que este aumento foi em menor velocidade. As mesmas amostras também foram avaliadas em relação ao radical ABTS e o aumento geral na taxa de inibição foi de 1,4 vezes (aproximadamente de 45 % de inibição para 63 %). Os autores sugerem que a capacidade inibitória do *kombucha* pode estar associado à microbiota da cultura mista.

Dados similares foram determinados em comparativo de *kombuchas* produzidos a partir de chá verde ou preto (12 g.L<sup>-1</sup> de chá, 18 dias), ao final da fermentação possuíam 88 % e 80 %, respectivamente (JAYABALAN et al., 2008).

Chu e Chen (2006) explicam que as diferenças observadas em relação à capacidade antioxidante determinadas por diferentes radicais nos *kombuchas* podem ser decorrentes das características dos compostos presentes nas amostras tais como polaridade, estado de ionização e efeito estérico que foram originariamente esclarecidas por Rice-Evans, Miller e Paganga (1996). As diferenças também foram observadas neste trabalho e podem ser atribuídas à explanação citada.

#### 5.4 ANÁLISE SENSORIAL

O perfil dos julgadores (tabela 13) foi majoritariamente feminino (66 %), jovem (18-26 anos) e, como foi realizando dentro da universidade era esperado que a ocupação fossem estudantes (91 %) e cursando uma graduação (65 %).

**Tabela 13 – Dados demográficos dos julgadores do teste afetivo de aceitação**

Característica	Descrição	Julgadores*
Gênero	Feminino	66
	Masculino	34
Faixa etária	18-26 anos	72
	27-35 anos	21
	acima 40	7
Ocupação	Estudante	91
	Professor	6
	Funcionário	3
Escolaridade	Ensino médio	2
	Graduação	65
	Mestrado	17
	Doutorado	10
	Pós-doutorado	6

\*Dados expressos em números de julgadores

A tabela 14 sumariza as notas dos atributos avaliados para as quatro amostras de bebidas propostas. Em relação à aparência, a nota da amostra *oolong* fermentada por 10 dias diferiu significativamente em relação às demais, além de ser a menor (6,2) para o atributo. As bebidas possuíam partículas suspensas no líquido proveniente da película produzida pela cultura mista, o que pode ter influenciado na nota atribuída pelos julgadores.

**Tabela 14 – Teste afetivo de aceitação**

Amostra	Atributos avaliados				
	Aparência	Aroma	Sabor	Sensação na boca	Aceitabilidade
Oolong Dia 7	6,8±2,2 <sup>a</sup>	4,5±2,6 <sup>a</sup>	5,6±2,7 <sup>b</sup>	5,9±2,8 <sup>a</sup>	5,5±2,6 <sup>b</sup>
Oolong Dia 10	6,2±2,3 <sup>b</sup>	4,3±2,5 <sup>a</sup>	5,2±2,9 <sup>c</sup>	5,0±2,9 <sup>b</sup>	4,7±2,7 <sup>c</sup>
Mate Dia 7	6,9±2,1 <sup>a</sup>	4,8±2,5 <sup>a</sup>	6,4±2,3 <sup>a</sup>	6,5±2,3 <sup>a</sup>	6,3±2,2 <sup>a</sup>
Mate Dia 10	6,9±2,1 <sup>a</sup>	4,7±2,2 <sup>a</sup>	6,2±2,6 <sup>ab</sup>	6,5±2,5 <sup>a</sup>	6,1±2,4 <sup>ab</sup>

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ). 0: desgostei extremamente; 1: desgostei muito; 2: desgostei moderadamente; 3: desgostei ligeiramente; 4: desgostei; 5: não gostei nem desgostei; 6: gostei; 7: gostei ligeiramente; 8: gostei moderadamente; 9: gostei muito; 10: gostei extremamente.

O atributo aroma não apresentou diferença significativa para nenhuma das amostras ( $p > 0,05$ ). A recusa para o aroma pode ser justificado pela presença de ácido acético que possui um limiar de detecção entre 0,7-1,1 g.L<sup>-1</sup> em vinhos e 0,001-0,005 g.L<sup>-1</sup> no reagente puro (EUROPEAN COMMISSION, 2012; QUEROL; FLEET, 2006). O teor de ácido acético das amostras variam entre 3,76-4,94 g.L<sup>-1</sup> para *oolong* e 2,31-3,04 g.L<sup>-1</sup> para *mate* (tempo 7 e 10, respectivamente).

Para o sabor, as amostras *oolong* apresentaram diferenças entre si, sendo 5,6 e 5,2 para o tempo 7 e 10, respectivamente, indicando uma resposta neutra para a bebida. As amostras de mate não diferiram si. Entretanto, a amostra mate no tempo 7 foi diferente significativamente em relação as amostras de *oolong*. Esta atingiu nota de 6,4 demonstrando que os julgadores gostaram da característica ácida agregada ao chá fermentado. Não houve diferenças significativas entre as amostras *oolong* dia 7 e mate dia 10.

O atributo sensação na boca a amostra *oolong* dia 10 diferiu das demais amostra e apresentou a menor nota (5). A intenção desta avaliação foi avaliar a sensação produzida pela carbonatação natural que a bebida possui, mas o atributo sabor também pode influenciar, devido à presença dos ácidos orgânicos decorrentes da ação microbiana. Verificou-se que a produção destes aumenta de acordo com o tempo de fermentação. E pelo observado, os julgadores demonstraram uma recusa as bebidas mais ácidas (ambas amostras de *oolong*).

A aceitabilidade para as amostras produzidas com mate apresentaram notas médias acima de 6, mas sem diferença significativa entre os tempos 7 e 10. Isto sugere que os julgadores gostaram da bebida. As amostras *oolong* obtiveram as menores médias 5,5 e 4,7 para dia 7 e 10, respectivamente, e diferiram entre si. A amostra *oolong* dia 7 não apresentou diferença do mate dia 10.

O *kombucha* proposto com chá mate apresentou maior nota na aceitação em relação ao produzido com *oolong*. Esta preferência é devido, provavelmente, a familiaridade com o sabor do chá mate.

As notas obtidas para os atribuídos avaliados podem ter sofrido interferência negativa em decorrência do painel julgador ser predominantemente jovem (18-26 anos). Por serem, justamente, jovens podem não estar acostumados à consumir produtos fermentados e com característica ácida. Logo, a memória gustativa e olfativa ainda estão em formação.

## 6 CONCLUSÃO

A identificação genética do inóculo indicou a presença de duas espécies e dois gêneros globais de bactérias (*Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp.) e uma fúngica (*Meyerozyma caribbica*). A cultura mista ainda pode ser explorada tanto no chá *oolong* quanto no chá mate, e a possibilidade de adequação para a produção do inóculo a partir do chá mate.

As bebidas formuladas com chá *oolong* ou mate apresentaram-se como uma alternativa na produção do *kombucha*. A cultura mista utilizada na fermentação exibiu crescimento positivo em ambas infusões e a bebida final apresentou o perfil sensorial característico do *kombucha*, ácido e refrescante.

Com relação ao teor de carboidratos, a velocidade de consumo e produção destes para o chá *oolong* indicaram uma coerência esperada. Para o mate, não demonstrou a mesma constância. A relação entre a medida de graus Brix e os quantificados por CLAE evidenciam uma tendência de exatidão, desta maneira, o uso da determinação de sólidos solúveis totais (°Brix) como um parâmetro de controle viável durante a produção de *kombucha*.

O protocolo de produção indicou uma relação entre o tempo de fermentação e a produção de ácidos orgânicos e acidez total titulável. Quanto mais prolongada este período, a concentração de ácidos orgânicos e o teor de acidez aumentam. Enquanto, o pH se estabilizou no tempo sétimo dia tanto para *oolong* quanto mate. A quantificação de ácidos orgânicos indicou a presença de ácido acético e succínico em ambas amostras, tendo predominância do acético.

O processo fermentativo não influenciou significativamente os teores de fenólicos totais nos chás. Entretanto, os teores de flavonoides diferiram significativamente entre tempo zero e décimo quarto dia, houve diminuição.

A atividade antioxidante (taxa de inibição do radical) apresentou diferença significativa, para ambas amostras, apenas frente ao radical DPPH considerando o período inicial e final do processo fermentativo. Para o radical ABTS, a amostra *oolong* não diferiu do tempo zero e décimo quarto dia. Apesar a amostra mate ter diferido para o tempo zero e décimo quarto dia, os tempos terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dia não diferiram entre si.

A análise sensorial evidenciou que o aroma característico de

fermentado ácido não é um aspecto desejado. Entretanto, a aceitabilidade indicou uma preferência para *kombuchas* a base de chá mate e sem diferença entre as bebidas do tempo 7 e 10. Para o *oolong*, o tempo de fermentação prolongado influenciou negativamente nas características sensoriais da bebida. A faixa etária dos julgadores pode ter influenciado nas notas atribuídas, devido à falta do hábito no consumo de alimentos fermentados com característica ácida, e a memória gustativa e olfativa estarem em formação ainda.

## REFERÊNCIAS

- APHA, American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, 2001.
- ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. 2nd ed. Boca Raton, FL; Cambridge: CRC Press: WP, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES E DE BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS (ABIR). **BNA Brasil Relatório 2011**: consumo de todas as bebidas comerciais 2005-2010 – elaboração. Brasília, 2011. Disponível em: < <http://abir.org.br/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=322> >. Acesso em: 20 jun. 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19 ed. Arlington, 2012.
- BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of *kombucha* analogues. **Food Science and Technology**, v.47, n. 1, p.71-77, jun. 2012.
- BATTIKH, H. et al. Antibacterial and antifungal activities of black and green *kombucha* teas. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 231-236, 2013.
- BAUER-PETROVSKA, B.; PETRUSHEVSKA-TOZI, L. Mineral and water soluble vitamin content in the *kombucha* drink. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, p. 201-205, 2000.
- BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Effect of *kombucha*, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328-340, out. 2013.
- BLAST. Basic local alignment search tool. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, Immunomodulators. v. 136, n. 3, p. 378–384, 14 jul. 2011.
- BOURDICHON, F. et al. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87–97, 15 mar. 2012.
- BRASIL. Decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei n.8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a padronização e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 de jun. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura da Pecuária e do Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 544, de 16 de novembro de 1998. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para refresco. Regulamento técnico

para fixação dos padrões de identidade e qualidade para chá pronto para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 nov. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 ago. 2005. (a)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 ago. 2005. (b)

CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 183-90, 10 jan. 2007.

CAESCU, C. I. et al. *Bifidobacterium longum* requires a fructokinase (Frk; ATP:d-fructose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.4) for fructose catabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 19, p. 6515–6525, out. 2004.

ČETOJEVIĆ-SIMIN et al. Bioactivity of lemon balm *kombucha*. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p.1756-1765, jul. 2012.

CHEN, C.; LIU, B.Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 834-839, 2000.

CIA, The Culinary Institute Of America. **The professional chef**. 9th ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.

CHU, S-C.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of *kombucha*. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p.502-507, 2006.

DAMIANI, E. et al. Antioxidant activity of different white teas: comparison of hot and cold tea infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p.59-66, feb. 2014.

DANIEL, H.-M. et al. Yeast diversity of ghanaiian cocoa bean heap fermentations. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 5, p. 774-783, 1 ago. 2009.

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

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, n. 7, p.404-421, jul. 2001.



ELSHOLZ, A. K. W.; WACKER, S. A.; LOSICK, R. Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. **Genes & Development**, v. 28, n. 15, p. 1710-1720, 1 ago. 2014.

ENTANI, E. et al. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.31, p.475-490, 1985.

EUROPEAN COMMISSION. Recommendation from the scientific committee on occupational exposure limits for acetic acid. Employment, Social Affairs & Inclusion. Disponível em: < <http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=7877&langId=en>>. Acesso em: 25 Jan. de 2016.

EVANGELISTA, S.R. et al. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation, **International Journal of Food Microbiology**, vol. 210, p. 102-112, 2015.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Expert Committee on Food Additives**: combined compendium of food additive specifications, vol. 4, 2006.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World tea production and trade**: current and future development, 2015.

FU, C. et al. Antioxidant activities of *kombucha* prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Sci. Technol (Campinas)**, Campinas, v. 34, n. 1, mar. 2014.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, abr. 1993.

GEORGETTI, S. R. et al. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 64, n. 1, p. 99-106, 2006.

GREENWALT, C.J.; LEDFORD, R.A.; STEINKRAUS, K.H. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea *kombucha*. **LWT Food Sci Technol**, v. 31, p. 291-296, 1998.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1 jul. 1999.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 1 nov. 2007.

HUTKINS, Robert W. **Microbiology and technology of fermented foods**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.

IBGE. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa agrícola municipal** culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, 2014.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695-699, 1 out. 2010.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during *kombucha* tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n.1, p. 392-398, 2007.

JAYABALAN, R. et al. Changes in free-radical scavenging ability of *kombucha* tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 1 jul. 2008.

JAYABALAN, R. et al. A review on *kombucha* tea: microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 538-550, 2014.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of *kombucha* teas and potential impacts of *kombucha* drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226-232, nov. 2012.

KATZ, S. E. **The art of fermentation**: an in-depth exploration of essential concepts and processes from around the world. Burlington: Chelsea Green Publishing, 2012.

KATZ, S. E. **Wild fermentation**: the flavor, nutrition, and craft of live-culture foods. Burlington: Chelsea Green Publishing, 2003.

KIMURA, K. et al. L-theanine reduces psychological and physiological stress responses. **Biological Psychology**, v.74, n. 1, p. 39-45, jan. 2007.

KURTZMAN, C.P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of Ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleromyces*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Micoscience**, v. 51, p. 2-14, 2010.

LALUCAT, J. et al. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 510-547, 1 jun. 2006.

LIU, C.H. et al. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, haipao, and their interactions during haipao fermentation, **Food Microbiology**, v.13, n. 6, p. 407-415, dec. 1996.

LOEB, K. **Shake, stir, pour-fresh homegrown cocktails**: make syrups, mixers, infused spirits, and bitters with farm-fresh ingredients 50 original recipes. New York: Quarry Books, 2012.

LONČAR, E. S. et al. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. **Food / Nahrung**, v. 44, n. 2, p. 138-139, 1 mar. 2000.

LONČAR, E.S. et al. Influence of working conditions upon *kombucha* conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, v.84, n. 3, p. 186-192, September 2006.

LU, J.-L. et al. Determination of purine alkaloids and catechins in different parts of *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. **J. Sci. Food Agric.**, v. 89, p. 2024-2029, 2009.

MALBAŠA, R. V. 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. V. et al. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of *kombucha* beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727-1731, 15 ago. 2011.

MANSFIELD, A. K. **Percent Alcohol 3 ways**. College of agriculture and life sciences. Cornell University, 2010.

MARSH, Al. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple *kombucha* (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p.171-178, apr. 2014.

MAYSER, P. et al. The yeast spectrum of the 'tea fungus *kombucha*'. **Mycoses**, v. 38, p.289-295, 1995.

McGEE, Harold. **On food and cooking: the science and lore of the kitchen**. New York: Scribner, 2004.

NIVA, Mari. All foods affect health: understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. **Appetite**, v. 48, n. 3, p.3 84-393, may 2007.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v. 34, n. 4, 2011.

PEDERSEN, J. A. Nordic Food Lab. **Kombucha: a tasty symbiotic culture of bacteria and yeasts**, 2013. Disponível em: <<http://nordicfoodlab.org/blog/2013/2/komboooucha>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, 11 fev. 2014.

QUEROL, A.; FLEET, G. H. **Yeasts in Food and Beverages**. Springer Science & Business Media, 2006.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435-44, jul. 2009.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. Cambridge University Press, 2006.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REISS, J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 98, p. 258-261, 1994.

REUTER, W. M. **Analysis of organic acids in fruit juices by HPLC and uv detection**. Perkin Elmer, 2015. Disponível em: <[https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-75518APP\\_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299\\_01.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-75518APP_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299_01.pdf)>. Acesso em: 05 abr. 2015.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R.; **Microbiologia prática: roteiro e manual**; Atheneu; 1993.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; ABARZUA, C. E. **Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; GASPARIN, A. M. **Elaboração de vinho moscatel espumante**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005.

ROMI, W. et al. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 52, 28 fev. 2014.

RUSINEK, E. Evaluation of soluble oxalates content in infusions of different kinds of tea and coffee available on the polish market. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 63, n. 1, p. 25-30, 2012.

RYAN, L.; SHEERA, S. Comparison of the effects of different types of soya milk on the total antioxidant capacity of black tea infusions. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3115-3117, nov. 2011.

SAUER, M. et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100-108, 1 fev. 2008.

SCHARBERT, S.; HOFMANN, T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 5377-5384, 1 jun. 2005.

SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS. **II Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Elaboração, redação e organização: Ronaldo Laranjeira ...[et al.] ; Revisão técnica científica: Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2013.

SIEVERS, M. et al. Microbiology and fermentation balance in a *kombucha* beverage obtained from a tea fungus fermentation. **Systematic and Applied Microbiology**, v.18, n. 4, p. 590-594, 1995.

- SILVA, C. M. G. DA et al. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos chás mate e verde antes e após a biotransformação por lipases. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 661-669, 1 dez. 2012.
- SOKOLLEK, S. J.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. **Cultivation and preservation of vinegar bacteria. Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 3, p.195-206, feb.1998.
- SONG, R. et al., Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 707-714, 1 aug. 2012.
- SONG, Y.-R.; JEONG, D.-Y.; BAIK, S.-H. Optimal production of exopolysaccharide by *Bacillus licheniformis* KS-17 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 417–423, 30 abr. 2013.
- SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. *Kombucha* fermentation and its antimicrobial activity. **J Agri Food Chem**, v. 48, n. 2589-2594, 2000.
- STEINKRAUS, K. H. et al. Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/*kombucha* beverage. **Acta Biotechnologica**, v. 16, n. 2-3, p. 199-205, 1 jan. 1996.
- STONE, H.; BLEIBAUM, R.; THOMAS, H. **Sensory Evaluation Practices**. 4th ed. New York: Academic Press, 2012.
- TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of *kombucha* fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, n. 2, p.119-126, sept. 2004.
- THIE, Tea and Herbal Infusions Europe. **Compendium of guidelines for tea (Camellia sinensis)**, v. 3, Hamburg, 2014.
- VILLANUEVA, N. D. M.; VILLANUEVA, A. J.; DA SILVA, M. A. A. P. Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model. **Food Qual. Prefer.**, Kidlington, v. 11, n. 5, p. 363-370, 2000.
- WANG, Y. et al. Hepatoprotective effects of *kombucha* tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 265-272, jul. 2013.
- WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.** 1991; 173, 697–703.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

**APÊNDICES****APÊNDICE A – FORMULÁRIO SOCIAL****NOME:** \_\_\_\_\_**GÊNERO:** ( ) Feminino ( ) Masculino**IDADE:** \_\_\_\_\_**OCUPAÇÃO:** \_\_\_\_\_**ESCOLARIDADE:**

( ) Ensino Fundamental

( ) Ensino Médio

( ) Graduação

( ) Mestrado

( ) Doutorado

( ) Pós-doutorado

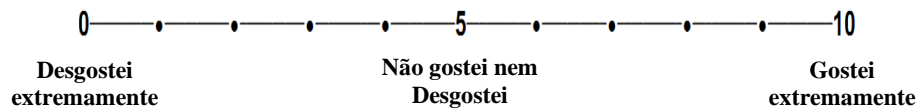
## APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

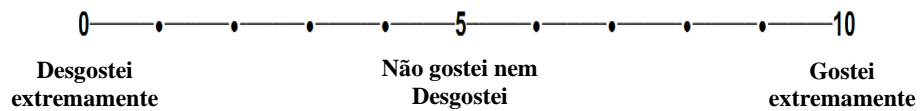
Por favor, prove a amostra e indique com um **traço vertical** em qualquer ponto da escala (inclusive entre os pontos) onde melhor representa o quanto você **gostou** ou **desgostou** com respeito à:

**AMOSTRA:** \_\_\_\_\_

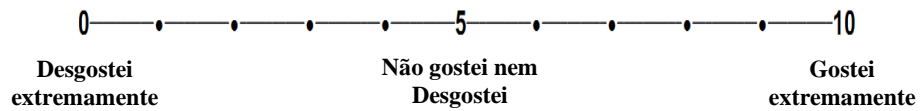
APARÊNCIA:



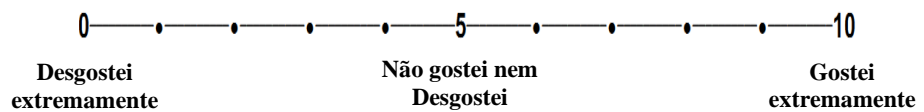
AROMA:



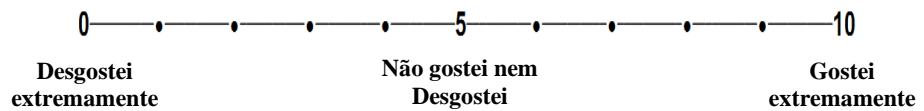
SABOR:



SENSAÇÃO NA BOCA:



ACEITAÇÃO GLOBAL:



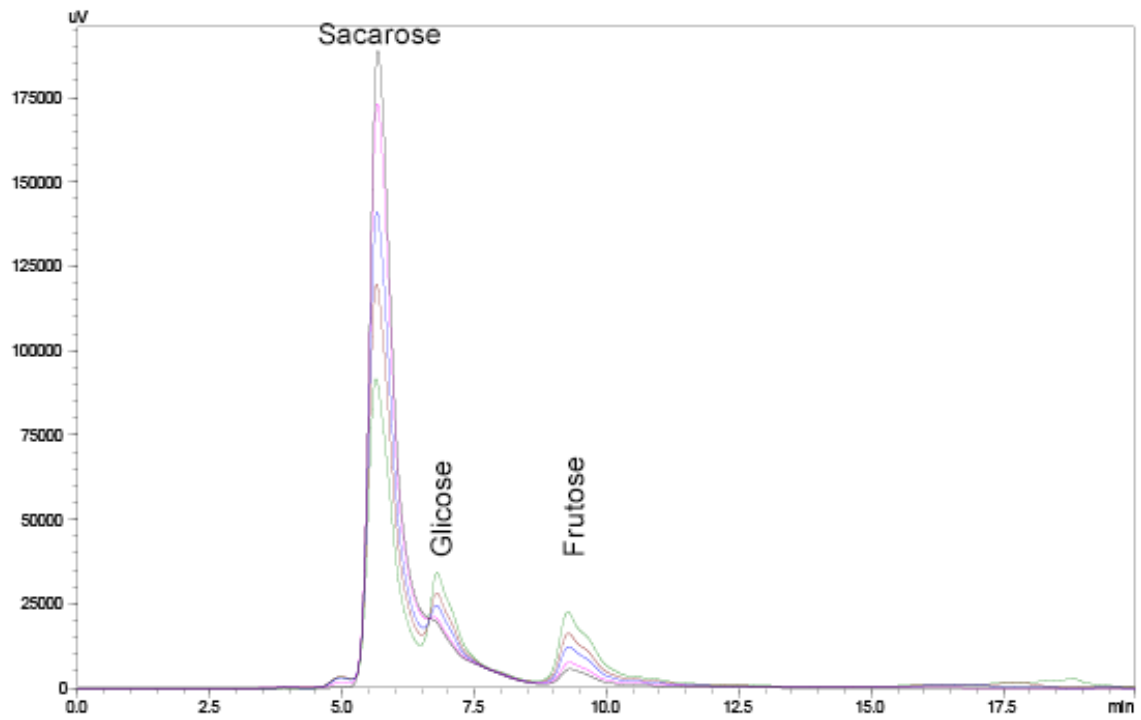
COMENTÁRIOS: ( ) Nenhum.

Comentário: \_\_\_\_\_

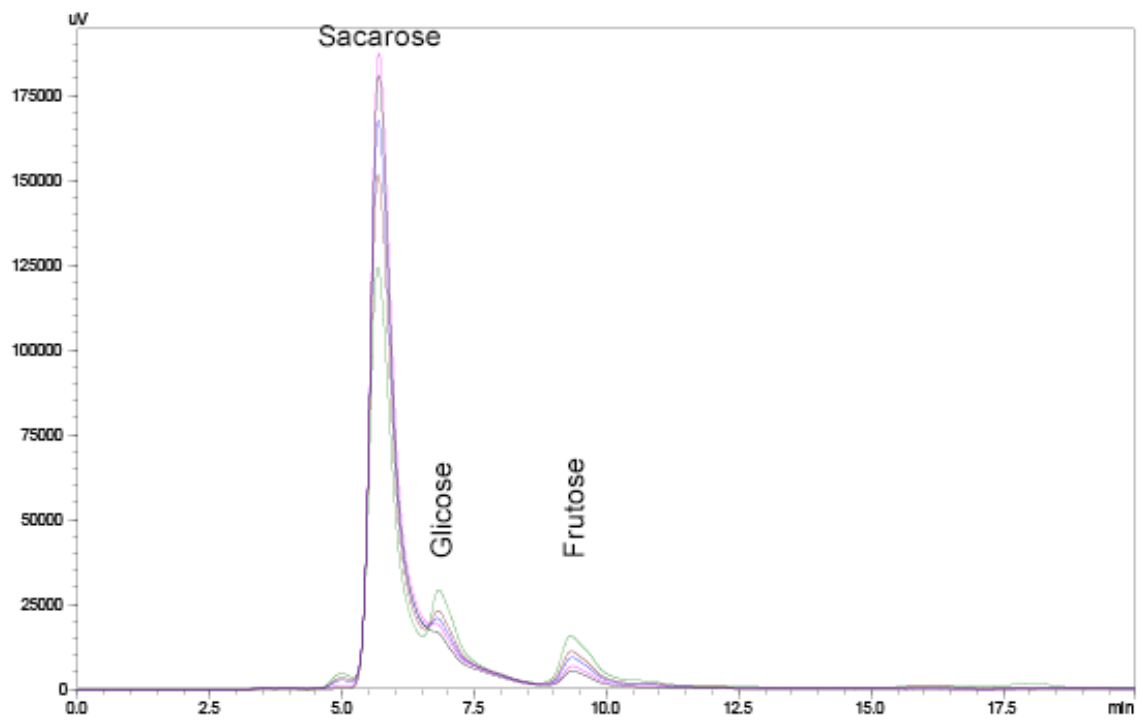
---

---

---

**APÊNDICE C – CROMATOGRAMA DE CARBOIDRATOS**

Cromatograma de carboidratos da amostra *oolong*. Dia 0 (preto); dia 3 (rosa); dia 7 (azul); dia 10 (magenta); dia 14 (verde).



Cromatograma de carboidratos da amostra *mate*. Dia 0 (preto); dia 3 (rosa); dia 7 (azul); dia 10 (magenta); dia 14 (verde).



## ANEXOS

### ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**“KOMBUCHA: desenvolvimento e caracterização de bebida não alcoólica, fermentada de *Camellia sinensis* por cultura mista”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“KOMBUCHA: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA NÃO ALCOÓLICA, FERMENTADA DE CHÁ OOLONG E ERVA-MATE POR CULTURA MISTA”**, a ser realizada em **“Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, Londrina/PR”**. O objetivo da pesquisa é **“desenvolver uma bebida a base de chá fermentado com cultura mista de bactérias acéticas e leveduras”**. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **durante a sessão será julgador das características de aparência, aroma, sabor, sensação na boca e impressão global em relação a amostra da bebida.**

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para esta e futuras pesquisas e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são **desenvolver uma bebida de chá fermentada potencialmente funcional (com benefícios à saúde), sendo uma alternativa as bebidas gaseificadas existentes no mercado.** Quanto aos riscos, o consumo do produto formulado não traz riscos à saúde, entretanto, reações adversas não são descartadas em indivíduos sensíveis aos compostos presentes naturalmente nos chás. A dosagem utilizada na análise sensorial é mínima. A cultura mista utilizada na

fermentação é não patogênica e com boas práticas de produção a bebida obtida é considerada inócua.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (**Profª Wilma Spinosa, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos /UEL, (43)3371-4585, wilma.spinosa@uel.br, ou Vitor Hugo Tsuru, Rua Borba Gato, 1099, (43)9607-7255, vitortsuru@gmail.com**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

**Pesquisador Responsável:** Vitor Hugo Tsuru  
Mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
RG: 82219994

\_\_\_\_\_ (**NOME POR EXTENSO**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_