

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA E SOLOS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIRIANE FIGUEIREDO BARROS FONSECA

**PLANEJAMENTO FATORIAL POR COMPOSTO CENTRAL DA PRIMEIRA
FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA**

MANAUS
2023

MIRIANE FIGUEIREDO BARROS FONSECA

**PLANEJAMENTO FATORIAL POR COMPOSTO CENTRAL DA PRIMEIRA
FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr : Wenderson Gomes dos Santos

Coordenador do Laboratório de Termodinâmica Aplicada – LABTERMO/FCA/UFAM

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F676p Fonseca, Miriane Figueiredo Barros
Planejamento fatorial por composto central da primeira
fermentação de kombucha / Miriane Figueiredo Barros Fonseca .
2023
51 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Wenderson Gomes dos Santos
TCC de Graduação (Engenharia de Alimentos) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Planejamento fatorial. 2. Análise cinética. 3. Kombucha. 4.
Fermentação. I. Santos, Wenderson Gomes dos. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

MIRIANE FIGUEIREDO BARROS FONSECA

**PLANEJAMENTO FATORIAL POR COMPOSTO CENTRAL DA PRIMEIRA
FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 27 /10 /2023.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wenderson Gomes dos Santos
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Josiane Weise
Avaliadora
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. M. Sc. Klaramelia Consuelo Ramón Carpio
Avaliadora
Universidade Federal do Amazonas

A Deus, ao meu esposo Vitor Hermes
Fonseca, a minha filha Marina Fonseca,
aos meus pais Miranda e Gilcilene Barros,
a minha família, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me deu a oportunidade de chegar até aqui e moveu situações e pessoas para que este trabalho fosse concluído. A minha família, meus pais Miranda e Gilcilene por me apoiarem e terem me ajudado financeiramente para que fosse possível seguir em frente. Sou grata ao meu esposo Vitor Hermes que me apoiou e me ajudou a não desistir e me aconselhou diversas vezes. Sou grata a minha filha Marina por ser meu incentivo para a finalização deste curso. Agradeço aos meus amigos que fiz durante esta caminhada de Engenharia de Alimentos pela força e apoio: Lenira Ferreira, Juliane Balbino, Ruan Moraes, Albert Lopes, e aos demais não citados saibam que foram importantes para mim. Aos colegas de laboratório que me ajudaram e me apoiam no projeto: Lenira Ferreira, Erika Alencar, Sabrina Santos, Ícaro Dirani, Juliane Balbino. Muito obrigada por estarem comigo e pelas trocas de conhecimento compartilhadas. Ao meu orientador de TCC, professor Wenderson Gomes, que me ajudou e incentivou, onde tive a oportunidade de aprender e foi o responsável por me ajudar nesta linha de pesquisa. Seu incentivo e ajuda foi importante para a construção desta pesquisa. Agradeço as oportunidades dentro do laboratório de termodinâmica aplicada - LABTERMO desde o estágio até a finalização deste trabalho. Aos membros da banca examinadora, por dedicarem um tempo a este trabalho e expressarem suas ideias e sugestões de melhoria.

A instituição de ensino UFAM, ao LABTERMO, aos professores e colegas de curso contribuíram para o fim desta jornada acadêmica. A minha família e amigos pelo apoio na vida acadêmica, foram fundamentais para o fim deste ciclo.

RESUMO

A Kombucha é uma bebida fermentada a base de chá (*Camellia sinensis*) com uma cultura de leveduras e bactéria, presente no processo fermentativo. Essa bebida, no Brasil, vem ganhando destaque por suas propriedades funcionais. Dessa maneira, o presente trabalho visa estudar a primeira fermentação da kombucha à base de chá verde (*Camélia Sineses*) por planejamento fatorial de composto central. Realizou-se, então, uma pesquisa de planejamento fatorial de composto central, a fim de estudar a relação das variáveis dependentes e independentes sobre ácido acético presente na kombucha. Além de avaliar a cinética por ponto ótimo escolhidos do planejamento com resultados satisfatórios, quanto ao pH, °Brix, Acidez durante 21 dias de fermentação. Diante disso, verificou-se que o ponto ótimo no planejamento fatorial de composto central em relação a ácido acético apresentou resultado de 12,39 g/mL após 21 dias de fermentação com 70 gramas de açúcar e 8 gramas de chá verde. Foi possível identificar que o tempo de fermentação é o componente mais significativo para produção de acidez na kombucha, seguido de quantidade de açúcar. Para cinética, identificou-se pH e Brix em conformidade com as normas vigentes e coerentes com a literatura. Foi possível concluir que o resultado foi satisfatório e seus delineamentos estatísticos possuem significância, a formação de ácido acético foi positiva pelo planejamento e o comportamento cinético apresentou resultado seguro para o consumo.

Palavras-chave: Planejamento fatorial, Análise cinética, Kombucha.

ABSTRACT

Kombucha is a fermented drink made from tea (*Camellia sinensis*) with a culture of yeasts and bacteria present in the fermentation process. This drink has been gaining prominence in Brazil for its functional properties. The aim of this study was therefore to study the first fermentation of kombucha based on green tea (*Camellia sinensis*) using central composite factorial planning. A central composite factorial design study was carried out in order to study the relationship between the dependent and independent variables on the acetic acid present in the kombucha. In addition to evaluating the kinetics by optimum point chosen from the planning with satisfactory results, in terms of pH, °Brix, Acidity during 21 days of fermentation. It was found that the optimum point in the central compound factorial design in relation to acetic acid was 12.39 g/mL after 21 days of fermentation with 70 grams of sugar and 8 grams of green tea. It was possible to identify that fermentation time is the most significant component in the production of acidity in kombucha, represented by the amount of sugar. For kinetics, pH and Brix were found to be in line with current standards and consistent with the literature. It was possible to conclude that the results were satisfactory and the statistical designs were significant, the formation of acetic acid was positive according to the design and the kinetic behavior showed a result that was safe for consumption.

Keywords: Factorial design, Kinetic analysis, Kombucha.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Camellia sinensis</i>	18
Figura 2: Disco SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts)	19
Figura 3: Sistema de representação fatores x resposta	26
Figura 4: Preparo da kombucha no planejamento	30
Figura 5: Preparo da kombucha para estudo cinético	33
Figura 6: Diagrama de Pareto para as variáveis independentes	36
Figura 7: Superfície de contorno Açúcar X Tempo	38
Figura 8: Curva de contorno (1)	39
Figura 9: Superfície de contorno açúcar x chá	40
Figura 10: Curva de contorno (2)	40
Figura 11: Superfície de contorno Tempo X Chá	41
Figura 12: Curva de contorno (3)	42
Figura 13: Cinética do pH	43
Figura 14: Cinética TSS (Brix)	44
Figura 15: Cinética TSS (Acidez)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros MAPA.....	23
Tabela 2: Variáveis utilizadas no estudo.....	29
Figura 3: Matriz de planejamento.....	30
Tabela 4: Resultados dos planejamentos.....	34
Tabela 5: Análise de variância.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SCOBY	Cultura simbiótica de bactérias e leveduras micro biologicamente ativas
pH	Potencial hidrogeniônico
MAPA	Instrução Normativa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
K	Fatores
ANOVA	Análise de Variância
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
FCA	Faculdade de ciência agrarias
G	Gramas
MI	Mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPERÇÍFICOS.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. DEFINIÇÃO.....	16
3.2 HISTÓRIA	16
3.3 CHÁ CAMELLIA SINENSIS	17
3.4 CULTURA SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS – SCOBY	18
3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	20
3.6 PROCESSO FERMENTATIVO	21
3.7 LEGISLAÇÃO	22
3.8 ASPECTOS NUTRICIONAIS DA KOMBUCHA	24
3.9 TENDÊNCIAS DE MERCADO KOMBUCHA	24
3.10. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.11. AVALIAÇÃO CINÉTICA	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. LOCAL DA PESQUISA	27
4.4.2. OBTENÇÕES DA MATÉRIA PRIMA.....	27
4.4.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
4.5.1. Ph.....	31
4.5.2. ANÁLISE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS	31
4.5.3. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL	31
4.6. PROCESSO CINÉTICO	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO	34
5.2. ANOVA	37
5.3. SUPERFÍCIE DE CONTORNO	38
5.4 .PROCESSO CINÉTICO.....	43

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS ESTUDOS	47
8. REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada de origem asiática que possui sabor adocicado, levemente ácido e levemente gaseificado. Esse processo ocorre pela fermentação do chá preto ou chá verde açucarado ao qual é adicionado um biofilme composto de bactérias (produtoras de ácido acético) e leveduras, denominado de SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), capazes de realizar distintas reações bioquímicas durante o período de fermentação, dentre elas: produção de ácidos orgânicos, etanol, vitaminas hidrossolúveis e uma diversidade de micronutrientes (JAYABALAN et al., 2014; SANTOS, 2018). Os substratos para a fermentação da kombucha não são os únicos fatores determinantes para a composição química e para as características sensoriais da bebida. Diversos parâmetros afetam a qualidade final da bebida, como o tempo, a temperatura e a concentração inicial do inóculo que possui influência na fermentação. Variações na produção se estendem à escolha da fonte de carbono (açúcar) e a sua concentração (LONČAR et al, 2006). As leveduras convertem o açúcar em álcool e dióxido de carbono, já as bactérias acéticas novas divisões de celulose no SCOBY e metabolizam o álcool produzido pelas leveduras em ácidos orgânicos (JAYABALAN et al, 2010). O uso de proporção adequada de açúcar é importante, pois quantidade excessiva pode proceder em uma bebida ácida e excessivamente carbonatada (PALUDO, 2017).

O planejamento experimental é uma análise de processo estatístico. Este método visa controlar e ajudar estudos em que as variáveis de processo são muitas. (MAINARDI; BIDOIA, 2020). De acordo com Montgomery (2021) o planejamento de experimento é o papel principal na solução futura do problema que motivou o experimento. Este trabalho descreve um planejamento fatorial de Kombucha por composto central. Verificando o resultado de formação de ácido acético como variável independente, utilizando parâmetros para formação da bebida como: açúcar, chá verde e tempo. O estudo da cinética de fermentação por meio dos pontos ótimos estabelecidos no planejamento e verificando seu comportamento durante 21 dias, e verificar se os parâmetros estão atendendo as normas estabelecidas no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a primeira fermentação da kombucha à base de chá verde (Caméllia Sineses) por planejamento fatorial de composto central.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos da concentração de açúcar, da concentração de chá verde (caméllia sineses) e do tempo de fermentação, por meio de planejamento fatorial, no processo fermentativo.
- Avaliar a acidez total como variável de resposta no planejamento experimental;
- Estudar cinética da primeira fermentação da Kombucha é o ponto ótimo do planejamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A kombucha, bebida de sabor ácido e adocicado, obtida pela fermentação do chá verde ou preto com sacarose, por uma cultura simbiótica de bactérias acéticas e leveduras, formando um biofilme no plano do chá (JAYABALAN et al., 2014). Ganhou visibilidade devido a presença de compostos com propriedades antioxidantes, desintoxicantes do fígado e estimulantes do sistema imunológico (LOBO et al., 2017).

3.1 DEFINIÇÃO

A Kombucha é uma bebida fermentada á base de chá verde ou preto conhecida pelos seus benefícios funcionais (DUTTA, 2019). Apresenta um sabor refrescante ácido e agridoce. O sabor agridoce presente na bebida a base de chá é produzido proveniente das bactérias e leveduras, conhecidas como SCOBY - cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (tradução livre para SCOBY, sigla inglês).

As características da bebida variam muito, sendo dependente do tipo de start, o chá, a quantidade de açúcar e água, o tempo de fermentação, além da temperatura do processo (JAYABALAN et al., 2014). O tempo de fermentação encontrada por meio de estudos varia entre 7 a 14 dias, podendo ser encontrada acima do tempo mencionado com um sabor vinagrado (SANTOS, 2016).

3.2 HISTÓRIA

A kombucha tem origem na região da Manchúria no nordeste da China por volta de 220 AC, durante a Dinastia Tsin, tendo suas propriedades desintoxicastes e energizantes apreciadas. No Japão em 414 DC, passou a ser usada para tratar problemas do Imperador Inkyo. Após teve sua expansão na

Rússia e Europa Oriental pelas rotas comerciais (JAYABALAN et al., 2014; KAPP; SUMNER, 2018). A kombucha em alguns locais na Ásia foi considerada uma bebida sagrada (CARDOSO, 2018).

A kombucha teve registro no período antes de Cristo (A.C.), algumas referências afirmam isso. Ela se espalhou e ficou bem famosa por ser usada na Ásia. Outra teoria afirma que a bebida originou dois séculos (A.C). Acredita-se que a referência “bebida de vinagre” refere-se a kombucha, sendo esta resultado de fermentação de chá com a transformação dos açúcares em ácido acético. Na passagem da Bíblia localizada em (Rute 2:14) há cerca de 1000 anos (a.C.): “Vem cá e come um pouco de pão e mergulha teu bocado na bebida de vinagre! E ela se sentou ao lado dos ceifadores”; e ele lhe alcançou cereal torrado e ela comeu e se saciou e ainda sobrou (PINTO,2019).

Por ser considerada uma bebida bem antiga, a kombucha, se tornou muito popular na sociedade ocidental pelo aumento na demanda de alimentos e bebidas funcionais. Agora é possível encontrar em vários locais no mundo, como a Europa Oriental, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá e Brasil (LEAL, 2022).

3.3 CHÁ CAMELLIA SINENSIS

De origem asiática, a planta *Camellia sinensis* é um arbusto conhecido como chá verde ou chá preto. Muito utilizada no preparo de infusão da kombucha (BORATO, 2014).

O chá verde tem origem por conta das suas folhas recém-coletadas e imediatamente desidratadas, já o chá preto vem de uma secagem de folhas (PINTO, 2019). A técnica é feita por oxidação controlada, por conta do processo químico que dá origem ao tipo do chá.

Santos (2016) especificou que existem quatro variedades de chá, sendo estes *Camelia sinensis*, sendo produzido a partir de duas delas, *Camelia sinensis* (assamica) que possui folhas largas (mais utilizada para o chá preto) e *Camelia sinensis* (sinensis) que possui pequenas folhas (mais utilizada para chá

verde). Segundo Dutta (2019) o preparo da kombucha não está mais limitado pelo chá verde ou preto, qualquer substrato de planta misturado com quantidades certas de sacarose pode ser usado, desde que não impeça o crescimento do SCOBY. Na Figura1 podemos observar as folhas de chá verde.

Figura1: *Camellia sinensis*



Fonte: (PINTO, 2019)

3.4. CULTURA SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS – SCOBY

Na Figura 2, a superfície gelatinosa celulósica que se forma na fermentação da kombucha é conhecida como SCOBY, tendo como principal função fermentar a bebida a base de chá até virar Kombucha. Ele transforma a bebida em novas camadas gelatinosas pela 'mãe da Kombucha' que contém microrganismos, como bactérias e leveduras, que é responsável pelo processo de fermentação, ajudando a formar novas camadas de filmes perto da superfície (SANTOS, 2016).

Figura 2: Disco SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts)



Fonte: Autoria própria, (2023)

As bactérias de ácido acético que estão presentes na superfície, ficam no SCOBY, ajudando o oxigênio para que as leveduras presentes no interior das suas camadas tenham oxigênio necessário para o processo fermentativo. O processo fermentativo da Kombucha é conhecido anaeróbico por conta das bactérias precisarem de oxigênio na formação dos ácidos orgânicos. O SCOBY é composto por (bactérias do ácido acético) que produzem ácido acético usando etanol, no processo de quebra da frutose pela levedura (VILLARREAL-SOTO et al., 2018)

O pH da kombucha reduz ao longo do processo fermentativo devido à produção de ácidos orgânicos. A cor do líquido tende a ficar mais clara, em relação à cor original do chá, por alterações dos complexos fenólicos na ação das enzimas microbianas sobre os polifenóis (PALUDO, 2017).

As bactérias acéticas são as mais predominantes como *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter acetie* e *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacte rxylinum* (PALUDO, 2017).

3.5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A kombucha possui vários ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, aminoácidos, aminas biogênicas, purinas, pigmentos, lipídios, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas podem ser encontradas, etanol, cafeína, dióxido de carbono, polifenóis e assim como outros (LEAL,2022). A quantidade dos compostos químicos é determinada pela presença e quantidade dos microrganismos encontrados no SCOBY, os parâmetros de fermentação, concentração de sacarose e tipo de chá (LEAL, 2022).

A principal função dos microrganismos é fermentar o substrato: as enzimas produzidas pelas leveduras quebram a sacarose em glicose e frutose e assim monômeros são convertidos em etanol e dióxido de carbono, após isso, as enzimas do tipo bactérias oxidam o etanol, produzindo ácido acético que resulta em pH baixo (LEAL,2022).

Se a sacarose usada na produção da Kombucha for usada como fonte primária de substrato para os microrganismos, o ácido acético será produzido. Os ácidos glucônico e glucurônico podem ser encontrados neste processo (LEAL,2022).

As vitaminas como C ou ácido ascórbico e vestígios de vitaminas do complexo B, possuem vestígios no processo de fermentação, os cientistas confirmaram por meio de pesquisas uma gama de componentes químicos vindos do chá verde e preto (LEAL,2022).

Os minerais (F, K Mn) vêm do próprio chá (LEAL,2022). Minerais como potássio (K⁺), cobalto (Co²⁺), manganês (Mn⁴⁺), cobre (Cu²⁺), ferro (Fe²⁺) e magnésio (Mg²⁺) são encontrados na bebida feita de chá verde e preto.

Segundo a literatura, os polifenóis constituem aroma e sabor do chá, podendo representar 30 % do peso das folhas secas. Os polifenóis primários encontrados são flavonoides, galato de flavonol e glicosídeos de flavanol (LEAL, 2022).

O etanol é um subproduto da levedura fermentada. A concentração do etanol aumenta de acordo com a fermentação (LEAL, 2022). A faixa de etanol na kombucha pela Food and Drug Administration (FDA) é 0,7–1,3% de álcool por volume (ABV - Alcohol By Volume).

A composição por ácidos orgânicos varia muito pela cultura inicial usada, tempo e temperatura da fermentação, os ácidos presentes na Kombucha como acético, glucônico, glucurônico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico e úrico (JAYABALAN et al., 2014; LEAL, 2022).

A cafeína tem formação de alcalóide natural encontrado em plantas, como café, chá e cacau (LEAL, 2022). Os seres humanos consomem os produtos com cafeína pelo efeito sobre o sistema nervoso fornecendo energia (LEAL, 2022). Compõe cerca de 3% a 6% das folhas de chá, e variam pelas condições de cultivo e processamento das folhas (LEAL, 2022).

3.6. PROCESSO FERMENTATIVO

O processo fermentativo da kombucha inicia pela hidrólise do açúcar em álcool através das leveduras, ocorrendo à quebra da sacarose em glicose e frutose, posteriormente convertida em etanol e dióxido de carbono. O etanol é oxidado pelas bactérias, por conta do oxigênio, formando assim em ácido acético (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A conversão em álcool por meio dos açúcares redutores ocorre nos sete primeiros dias.

O ácido glicônico é produzido por conta das bactérias do ácido acético usando a glicose. A frutose permanece após a fermentação e é aproveitada em menor grau. Parte da glicose não metabolizada e, com a frutose restante não consumida, produz uma bebida de sabor doce (LEAL, 2022).

O processo de formação do SCOBY se dá pela reação pelas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, que polimerizam os monossacarídeos (LEAL, 2022). Essa via metabólica conta com ajuda da glicose formando o ácido pirúvico, pela

quebra enzimática, em piruvato, formando em ácido lático e acetaldeído (LEAL, 2022).

A acetificação ocorre por meio dos *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Algumas classes acéticas podem oxidar o álcool transformando em ácido acético, e gás carbônico e água. Isto ocorre na maioria das vezes quando as bactérias acéticas decompõem o ácido acético, em teor alcoólico perto de 0,2% (LEAL, 2022).

3.7. LEGISLAÇÃO

A Instrução Normativa N °41, de 17 de setembro de 2019 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina como ingredientes obrigatórios da bebida: a utilização de água potável, infusão ou extrato aquoso da *Camélia sinensis*, açúcares de acordo com a RDC n ° 271 (ANVISA, 2005) tanto orgânicos ou demerara e SCOBY. De acordo com o MAPA (2019) a Kombucha é definida como “Bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas”.

Para o procedimento de nomeação do produto ela necessita ser nomeada por Kombucha – (seguido do nome do vegetal empregado no processo de infusão), acompanhado do ingrediente após a fermentação, como polpas, especiarias, extrato, o aroma, mel, ou partes destes termos para a composição final (BRASIL, 2018). O uso de suco, polpa de fruta, extrato vegetal, mel e outros aditivos precisam ser permitidos pela ANVISA (BRASIL, 2018).

Segundo a legislação definida pelo MAPA a kombucha necessita conter certos parâmetros analíticos para determinar o controle de qualidade.

Na tabela 1 apresentam-se alguns parâmetros que são exigidos pela legislação brasileira.

Tabela 1: Parâmetros MAPA

Parâmetro	Mínimo	Máximo
pH	2,5	4,2
Gradação alcoólica (% v/v) Kombucha sem álcool	-	0,5
Gradação alcoólica (% v/v) Kombucha com álcool	0,6	8,0
Acidez volátil (mEq/L)	30	130
Pressão (atm a 20 ° C) na Kombucha adicionada de CO ₂	1,1	3,9

Fonte: MAPA, (2019).

3.8 ASPECTOS NUTRICIONAIS DA KOMBUCHA

A kombucha vem ganhando destaque por conta dos seus aspectos nutricionais e funcionais para a saúde humana. Um destes aspectos está relacionado pela presença dos polifenóis por seu potencial antioxidante. Sua ação está relacionada à prevenção do desenvolvimento de lesões e danos em distúrbios e doenças metabólicas causadas por radicais livres, desta catarata, degeneração da retina, dermatites, psoríase, envelhecimento, alergias, asma, diabetes, doenças crônicas do rim, gota, doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, anemia, epilepsia, Alzheimer, Parkinson, inflamações crônicas, artrite, diversos tipos de câncer, entre outros, como citado nas pesquisas de Malbaša et al (2011); Vīna et al (2014)); Kumar e Joshi (2016).

O ácido glicurônico tem efeitos desintoxicantes, citado por Lončar et al (2000). A atuação do ácido de se ligar com toxinas no fígado, tornando as solúveis em água, e deste modo, mais fáceis de serem eliminadas pela urina. Já o ácido glucónico, facilita a absorção de ferro pelo corpo, ajudando a prevenir sua deficiência, segundo Vīna et al (2014).

Borato (2014) avaliou a atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica de extratos de chá verde e chá preto em ratas em laboratório. A ação benéfica dos chás da *Camellia sinensis* na úlcera está relacionada com a conservação de muco gástrico, nisto houve redução do estresse oxidativo e diminuição do processo inflamatório. Senger (2010) realizou uma revisão com diversas propriedades funcionais do chá verde, como as propriedades antioxidantes,

efeitos anticarcinogênico, ação anti-inflamatória, ação hipoglicemiante e efeitos no controle do peso.

3.9 TENDÊNCIAS DE MERCADO

A popularidade da kombucha cresceu nos últimos anos, refletindo uma nova tendência de consumo relacionada a alimentos e bebidas saudáveis e funcionais (BALBINO, 2023). A busca pela melhoria de qualidade de vida dos consumidores vêm através da substituição das bebidas carbonatadas que trazem malefícios à saúde, como o refrigerante, pelos que trazem benefícios à saúde, como e o caso da kombucha. Em uma pesquisa no ano de 2021 pela CNN Brasil apontou que o Brasil ocupa a 7ª posição no mercado de alimentos e bebidas saudáveis no mundo com consumidores buscando uma boa alimentação (ALCÂNTARA, 2023). A Kombucha é a bebida que mais cresce no mundo. No Brasil, a sua produção aumentou em 2017, expandindo rapidamente pelo país. No mundo, esse mercado cresce em média 25% ao ano, podendo movimentar cerca de US\$ 4,5 bilhões até 2028. Em um levantamento em 2019, a Kombucha Brewers International (KBI) tinha registrado 235 empresas de kombucha no mundo, destas 12 correspondiam à América Latina, apenas 3 empresas se encontravam no Brasil. Desde 2021 o potencial de crescimento que o país possui nesse setor, chegou a atingir 11 milhões de reais em 2019 e 26 empresas associadas em 2022 (ALCÂNTARA, 2023).

Em Manaus a kombucha começa a fazer sucesso, com produtores e consumidores em ascensão. A bebida tem feito sucesso pelos seus benefícios e sabor, que lembra a cidra, o frizado ou o champanhe. Em Manaus, existe cerca de uma meia dúzia de kombucheiros artesanais, que fazem a comercialização direta ao consumidor em feiras e alguns estabelecimentos. Uma destas empresas que é possível encontrar vendendo kombucha se chama 'Amazon Kombucha', que começou sua produção com 20 litros a cada duas semanas, para consumo próprio. Há registro que há um ano a empresa começou a produzir kombucha artesanalmente, com 20 litros por semana. Atualmente com

120 litros semanais. Além disso, contêm uma priorização de frutas regionais, destas como: camu- camu, cupuaçu, melancia, azeitona roxa com pimenta, araçá boi, e outras frutas da estação, além de chá preto ou verde, hibiscos, hibiscos com gengibre, lúpulo importado, cúrcuma longa, maca peruana e spirulina, esta, sendo uma alga marinha super nutritiva de origem mexicana. Os produtos mais vendidos são o maracujá e hibiscos com maracujá (LEITE, 2023). A kombucha pode ser facilmente encontrada em mercados funcionais, casas e empórios de alimentação saudável e nas redes sociais.

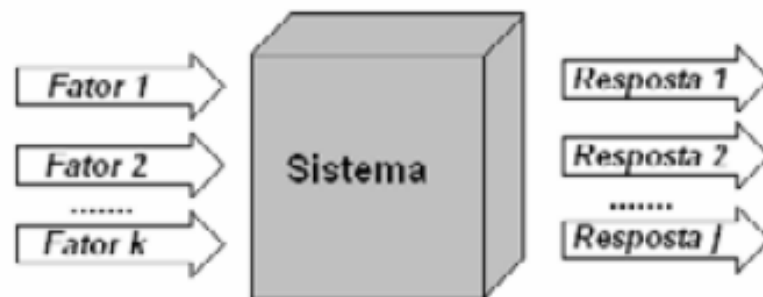
3.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento de experimento pesquisa as informações sobre diferentes fatores, ou seja, ilustra a resposta das variáveis o seu modo de interação. É uma ferramenta de abordagem que procura organizar um experimento, e causa quais os determinados fatores e níveis de relação detêm na resposta do método (MONTGOMERY, 2021).

Segundo Montgomery (2021), um experimento fatorial, de K fatores (variáveis) é representado por níveis (valores usados como referência), sendo os níveis representados por alto (+) e baixo (-). Facilmente são encontrados modelos com mais de três fatores.

Um dos problemas mais comuns de pesquisadores é a determinação da influencia de uma ou mais variáveis sobre outra variável. Esse problema é um caso de uma situação geral particular mostrada na Figura 4, em que certos números de fatores F_1, F_2, \dots, F_k atuando no sistema que está em estudo, produzindo respostas (SARAMAGO, 2008). As respostas produzidas pelo sistema são concebidas por R_1, R_2, \dots, R_j . Nesse tipo de sistema tem-se uma função desconhecida que relaciona as variáveis de entrada conhecida como fatores, e produz respostas como saída. A principal finalidade é conhecer essa função, o conhecimento desta função amplia o conhecimento sobre a influência delas no sistema (SILVA, 2008).

Figura 3: Sistema de representação fatores x resposta



Fonte: (BARROS NETO et al, 1995, p.84)

A matriz experimental é distinguida como aparelhamento dos dados e resposta da variável do experimento (MONTGOMERY, 2021). O planejamento experimental é um instrumento apropriado de aperfeiçoamento em processos, definindo produção de versatilidade, adesão reduzida, diminuição do tempo, produção e gastos totais.

De acordo com Mainardi e Bidoia (2020) o planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que faz diferenciações das variáveis de um processo, os efeitos das estimas presentes, além dos processos por modelagem matemática.

Segundo Montgomery (1984), um planejamento fatorial necessita de:

- Definição de objetivo;
- Especificar as variáveis de processo;
- Elaborar o planejamento fatorial;
- Análise dos efeitos dos fatores nas respostas;
- Análise estatística dos resultados;
- Ajuste dos modelos;
- Verificação utilizando Análise de Variância – ANOVA;
- Análise de superfície de Resposta: definição do ponto ótimo do estudo.

3.11 AVALIAÇÃO CINÉTICA

O estudo da cinética é fundamental para atender o decorrer da fermentação e analisar os valores de concentrações de um ou mais componentes (BALBINO, 2023). Segundo Balbino (2023) a avaliação cinética viabiliza o estudo das taxas de substratos e produção de metabólitos, como ácido acético e dióxido de carbono, durante a fermentação. Isso permite compreender a fermentação dos fatores que intervêm na velocidade e melhora a produção buscando a eficiência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Termodinâmica aplicada- LABTERMO do bloco FCA 02, curso de engenharia de alimentos na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Todos os ingredientes foram adquiridos no comércio local da cidade de Manaus/ AM e todos os utensílios utilizados foram corretamente lavados e higienizados.

4.3 PREPARO DA KOMBUCHA

A metodologia para o preparo da kombucha seguiu o método descrito por Jayabalan et al (2014). No entanto o preparo do chá realizado neste estudo foi modificado.

Para a elaboração do chá utilizou-se:

- 1 L de água;
- 50 g de açúcar;
- 5 g de chá;
- 100 ml de chá carreador (vinagre da colônia mãe).

Em uma panela ferveu-se uma quantidade de água, posteriormente acrescentou-se a solução de açúcar e chá verde in natura (*Camellia sinensis*) devidamente pesadas. Agitou-se até a homogeneização, aguardou-se com a panela tampada por 10 minutos o processo de infusão, e posteriormente os resíduos foram removidos por filtração. A mistura coada foi resfriada até 20°C e alocou-se o start. A solução foi então transferida para um recipiente esterilizado, este contendo o chá pronto, água potável e 10% de start (chá já fermentado).

Para se evitar contaminação por moscas das frutas *Drosophila* atraídas pelas soluções açucaradas e ácidas, o recipiente foi coberto com uma toalha de papel e vedado com elástico. O processo de fermentação pode ocorrer por volta de 7 a 30 dias em temperaturas entre 18°C e 28°C.

A kombucha que não contém a camada de SCOBY, nos primeiros dias de fermentação tem o surgimento de uma camada de gel conhecida como “filha” SCOBY, de origem da mãe SCOBY presente no líquido start contendo os microrganismos indispensáveis para o processo fermentativo. Essa camada transparente e fina aumenta de tamanho por volta do transcorrer dos dias 10^o e 14^o dia com pH próximo de 2,0. Ao longo do processo de fermentação a kombucha apresenta formação de bolhas e cheiro fermentado. O SCOBY é extraído com cuidado e mantido em outro recipiente em pequeno volume de chá

fermentado para impedir o ressecamento do disco e no futuro poder ser usado. O chá fermentado restante é filtrado e envasado (DUTTA et al., 2019).

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento fatorial de composto central, deste trabalho, foi baseado no trabalho de Albuquerque (2022).

Para o estudo do processo de fermentação da kombucha, utilizou-se um planejamento fatorial de composto central. Esse método buscou analisar a relação entre os parâmetros escolhidos para entrada e resposta. O planejamento estatístico foi feito no software Statística v.7.0. Destes constituíram: tempo de fermentação (dias); concentração do chá (g/ml); concentração de açúcar (g/ml). Na tabela 2 encontram-se os fatores analisados neste estudo.

Tabela 2: Variáveis utilizadas no estudo

Variáveis	Níveis reais e codificados		
	- 1	0	+ 1
Tempo de fermentação (dias)	7	14	21
Concentração do açúcar (g)	50	60	70
Concentração do chá (g)	5	6,5	8

Fonte: Autoria Própria (2023).

Os valores de referência no processo foram adotados com base em (JAYABALAN et al, 2014) e (ALBUQUERQUE, 2022). Os resultados foram analisados no software Statística v. 7.0 a partir do gráfico de Pareto, da análise de variância (ANOVA) e gráficos de superfície de resposta.

O planejamento descrito abaixo computa as variáveis independentes à concentração de chá verde (g), concentração de açúcar (g) e tempo de

fermentação (dias). Os experimentos destacados estão descritos na tabela 3. Este planejamento é fatorial com 3 variáveis e 4 compostos centrais, nisto 3^{3+4}

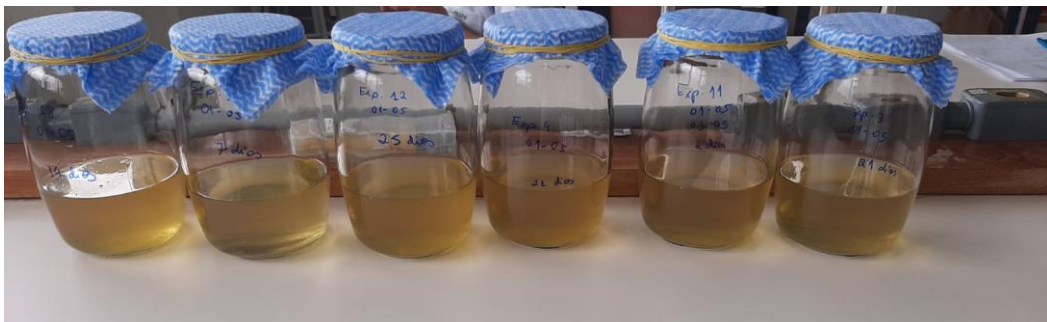
Tabela 3: Matriz de planejamento.

Experimento	Açúcar (g/ml)	Tempo (dias)	Chá (g/ml)
11	60,00000	2,22745	6,500000
12	60,00000	25,77255	6,500000
1	50,00000	7,00000	5,000000
3	50,00000	21,00000	5,000000
4	50,00000	21,00000	8,000000
18 (C)	60,00000	14,00000	6,500000
9	43,18207	14,00000	6,500000
14	60,00000	14,00000	9,022689
7	70,00000	21,00000	5,000000
6	70,00000	7,00000	8,000000
10	76,81793	14,00000	6,500000
2	50,00000	7,00000	8,000000
5	70,00000	7,00000	5,000000
16 (C)	60,00000	14,00000	6,500000
15 (C)	60,00000	14,00000	6,500000
13	60,00000	14,00000	3,977311
17 (C)	60,00000	14,00000	6,500000
8	70,00000	21,00000	8,000000

Fonte: Autoria própria, (2023)

Cada experimento contém 500 ml de kombucha e seus valores de concentração de açúcar, chá verde e tempo de fermentação se encontram na Tabela 3: matriz de planejamento, cada experimento foi realizado seguindo a ordem apresentada na tabela.

Figura 4: Preparo da kombucha no planejamento



Fonte: Autoria Própria (2023)

4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.5.1 PH

As análises de pH foram realizadas conforme a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Foram retiradas alíquotas diariamente da amostra e o eletrodo foi imerso, obtendo-se a leitura no potenciômetro digital já previamente calibrado.

4.5.2 ANÁLISE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

Foram realizadas por meio de refratômetro digital, sendo retiradas gotas de amostra à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em °Brix (IAL, 2008).

4.5.3. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL

A Acidez Total Titulável foi calculada conforme a Equação 1:

$$\frac{V_o \times M \times f \times PM}{V \times 10 \times n}$$

Onde:

Vo= Volume gasto de NaOH na titulação (mL);

f= Fator de correção da solução de NaOH;

M= molaridade da solução de NaOH;

PM= Peso molecular do ácido acético (g);

V= volume da amostra (ml);

n= Número de hidrogênios ionizáveis.

Os resultados documentos em ácido acético (g/100ml).

Com o auxílio de uma pipeta foi coletado um volume de 3 mL, que foi colocado em um Erlenmeyer, juntamente com 50 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se a amostra com uma solução de NaOH 1 mol/L até seu ponto de viragem com coloração rósea, seguindo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A titulação de acidez total foi atingida para quantificar a variável de resposta. A titulação foi feita em triplicata. A solução de NaOH 1 M empregada no processo de titulação foi padronizada e possui fator de correção 0,916.

4.6 PROCESSO CINÉTICO

Para este processo de análise cinética, as condições correspondentes aos pontos 8 e 7 do planejamento foram desenvolvidos em escala maior.

O processo do chá foi realizado pelo aquecimento de 1.350 l de água potável até à temperatura 75 °C, posteriormente foi adicionado o açúcar até ser totalmente dissolvido. O chá verde umedecido com água em temperatura ambiente foi acrescentado e permaneceu por 8 minutos em infusão. Na sequência a bebida foi coada com uma peneira de metal de manta fina, e seus resíduos foram descartados. Foi acrescido o restante de água fria e potável contendo 1.350 l para a dissolução do chá pronto, agitou-se e resfriou-se o chá. Posteriormente ao resfriamento do chá até a temperatura ambiente, foram colocados 10 % de start (chá carreador). Os recipientes foram acomodados em uma bancada limpa por 21 dias para ocorrer à fermentação.

Figura 5: Preparo da kombucha para estudo cinético.



Fonte: Aatoria Própria (2023)

Diariamente uma amostra de 20 ml, sendo uma de cada vidro, passou por análises físico-químicas (°Brix, PH, Acidez), durante o período de fermentação, as amostras foram coletadas e os testes em duplicadas. Em cada recipiente de Kombucha foi preparado um volume de 3 l e suas concentrações de açúcar e chá verde se encontra na Tabela 3: Matriz de planejamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO

Os valores gastos da titulação de NaOH foram anotados e calculados conforme a equação com a metodologia descrita no item (4.5.3. Determinação de acidez total titulável).

Tabela 4: Resultados dos experimentos

Experimento	Açúcar (g/ml)	Tempo (dias)	Chá (g/ml)	Acidez total (g/ml)
1	50,00000	7,00000	5,000000	2,20
2	50,00000	7,00000	8,000000	3,04
3	50,00000	21,00000	5,000000	5,55
4	50,00000	21,00000	8,000000	6,96
5	70,00000	7,00000	5,000000	2,56
6	70,00000	7,00000	8,000000	3,22
7	70,00000	21,00000	5,000000	10,01
8	70,00000	21,00000	8,000000	12,39
9	43,18207	14,00000	6,500000	3,53
10	76,81793	14,00000	6,500000	7,20
11	60,00000	2,22745	6,500000	1,57
12	60,00000	25,77255	6,500000	7,15
13	60,00000	14,00000	3,977311	4,76
14	60,00000	14,00000	9,022689	5,61
15 (C)	60,00000	14,00000	6,500000	6,05
16 (C)	60,00000	14,00000	6,500000	6,23
17 (C)	60,00000	14,00000	6,500000	6,16
18 (C)	60,00000	14,00000	6,500000	4,40

Fonte: Autoria própria (2023).

Na tabela 4, tem-se que:

- Os valores de 1 a 8: pontos fatoriais, contendo 8 experimentos;
- Os valores de 9 a 14: pontos axiais, contendo 6 experimentos;
- Os valores de 15 a 18: pontos centrais, contendo 4 experimentos.

Os valores mínimo e máximo para a resposta de acidez obtidos nos experimentos de 1 a 18 foram de (1,57 a 12,39 g/ml), respectivamente o comportamento das variáveis empregadas no processo de fermentação expressa que, à medida que a concentração de açúcar e o tempo em destaque aumentam, os valores de acidez da kombucha crescem.

Os pontos fatoriais de 1 a 8 têm variáveis maiores de tempo no processo fermentativo, possuindo uma maior influência significância diretamente na acidez. Os pontos destacados como pontos centrais de 15 a 18 contiveram valores próximos entre si, com valores entre 4,40 e 6,05. O experimento 18 foi o único ponto central com valor diferente no resultado. Isto pode estar relacionado com a influência da temperatura sofrida na titulação do experimento, e também na pesagem dos ingredientes para o preparo do chá, obtendo um resultado diferente dos demais experimentos de ponto central.

Analisando todos os efeitos das concentrações escolhidas sobre a variável de resposta, os menores valores de tempo não influenciam positivamente no processo fermentativo.

Ao se analisar o estudo da kombucha por planejamento experimental deste trabalho com outros autores presentes na literatura, observa-se valores próximos à pesquisa em questão. Albuquerque (2022) ao ponderar o estudo fatorial de Kombucha obteve valor de 0,93 (g/mL). Souza (2022) ao analisar kombucha como resultado em ácido acético teve um resultado 1,60 g/L. Por outro lado, Blauth (2019) encontrou um valor de 16,57 (g/mL) de ácido acético.

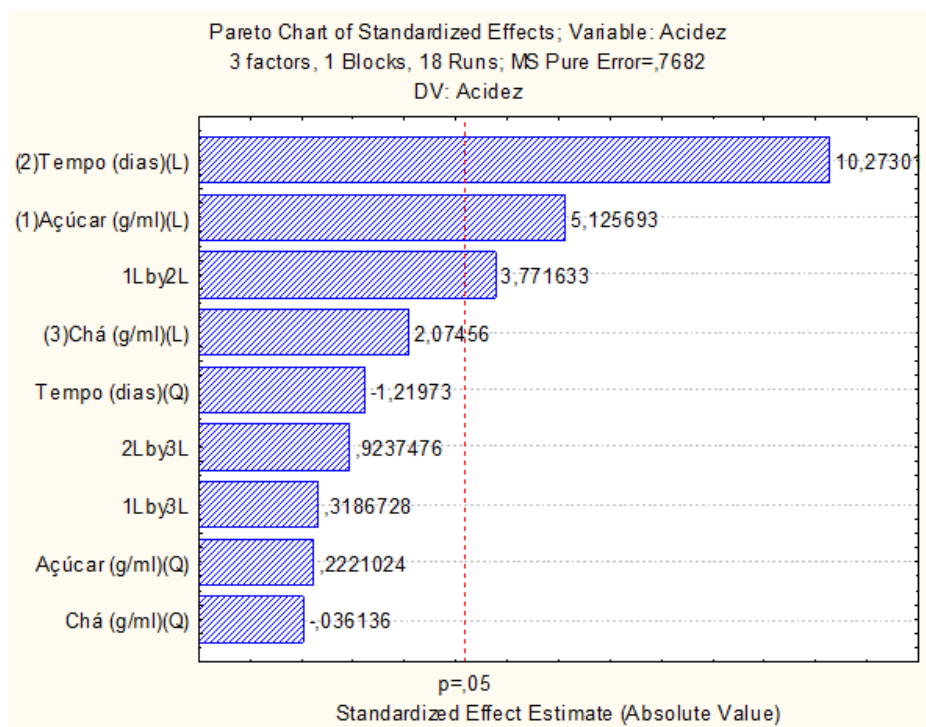
As variações dos resultados observados podem ser atribuídas aos parâmetros diferentes entre eles avaliados como: quantidade de açúcar, concentração de chá, temperatura e tempo.

Nos experimentos 9 e 10 obteve-se concentrações diferentes de ácido acético, denotando que o efeito da concentração de açúcar é importante, de forma que , quanto maior a quantidade de açúcar maior é a concentração do ácido acético. Os pontos axiais (9, 10, 11, 12, 13,14) na avaliação contêm valores modificados aos restantes, servindo somente para delineamento estatístico (PEREIRA et al., 2021). O teste possui pontos centrais (15,16,17,18)

possuindo valores aproximados. Os pontos 6 e 2 possuem valores parecidos, o consumo de açúcar foi maior no ponto 6 com pouca diferença de acidez. O ponto 8 é o ponto que apresentou a melhor resposta estudada. O ponto 8 e 7 foram refeitos para avaliar se o resultado se manteria. A acidez total adquirida no experimento 8 foi de 14,48 g/ ml com valor perto do planejamento de 12,39 g/ ml de ácido acético, já para o ponto 7 com resultado encontrado 12,94 g/ ml de 10,01g/ ml de ácido acético, exemplificando um experimento que pode ser reproduzido.

Na figura 6 apresenta-se o comportamento entre as variáveis tanto dependentes e independentes, exemplificando suas interações. O diagrama de Pareto mostra que os parâmetros têm significância estatística com confiança de 95 % ($p = 0,05$), definidas pelas barras horizontais.

Figura 6: Diagrama de Pareto para as variáveis independentes



Fonte: Autoria própria (2023).

O diagrama de Pareto determina a magnitude e a importância dos efeitos (PCZIECZEK, et al, 2019). O maior valor variável linear destaca-se o tempo de

fermentação (dias) sendo maior valor estatístico e concentração do açúcar (g), segundo maior valor. A interação de açúcar x tempo se destaca no gráfico de Pareto. A variável concentração de chá (g) foi menos significativa em relação às outras variáveis. O teste mostra que possui valores positivos e negativos, esses valores indicam que sofrem significância com valores menores durante o processo. Os efeitos na acidez com a variação das variáveis mostram o aumento de 10,27 dias, 5,12 g/ml (OLIVEIRA, 2022).

Com essas faixas compreendemos que o tempo durante a fermentação contribui diretamente para a acidez, quando estes valores passam de 7 a 21 dias é possível visualizar um maior crescimento. Visualizando os valores de concentração de açúcar passam de 50 a 70 g como segunda variável, mas influente no processo.

5.2 ANOVA

O resultado para a resposta acidez total apresentado na Tabela foi analisado por regressão com coeficiente de determinação alcançado com (0,91347) tem-se que o processo estudado foi explicado 91,34%, comprovando um ótimo ajuste do modelo. Isso tem capacidade de explicar a variabilidade apresentada pelas respostas. A análise de variância (ANOVA) demonstra que a significância estatística do modelo para as variações experimentais. O valor da estatística F calculada (Tabela 5) descarta a falta de ajuste do modelo em um nível de confiança de 95%.

Tabela 5: Estimativa das variáveis entre níveis

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	Fcal	p
Açúcar	20,1827	1	20,18271	26,2727	0,014378
Tempo	81,0718	1	81,0718	105,5348	0,001967
(1L). (2L)	10,9278	1	10,9278	14,2252	0,032629
Falta de ajuste	8,8314	5	1,76627	2,2992	
Erro puro	2,3045	3	0,76820	-	
Total	128,6996	17	-	-	-

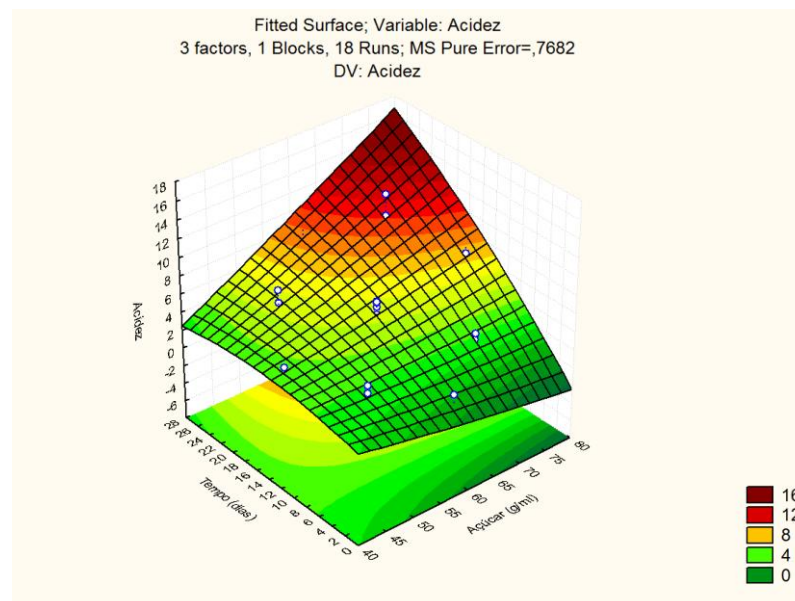
Fonte: Autoria própria, 2023.

Conforme Barros Neto, Scarminio e Bruns (1995), para fins estatisticamente significativos descreve que o F calculado contenha valores de 4 a 5 vezes maiores que o F tabelado ou possuir um valor R^2 igual ou maior que 90 %. Rejeitando a hipótese inicial (H_0), pois o teste F tem significância a 5% de probabilidade. As médias presentes no teste não são iguais, ou seja, diferem das demais, criando uma hipótese alternativa. Assim estatisticamente uma das medias presentes é diferente das médias de tratamento.

5.3 SUPERFÍCIE DE CONTORNO

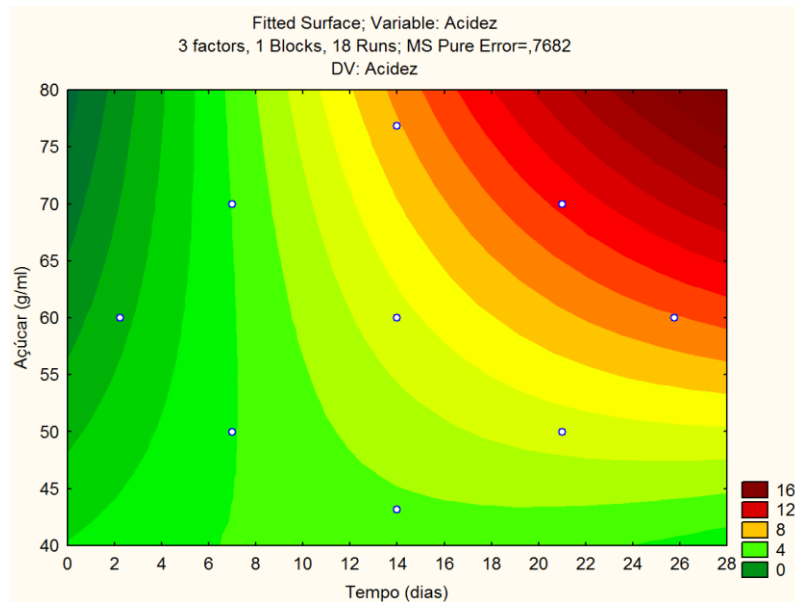
Essa superfície evidencia que os valores de açúcar e tempo possui uma significância maior, alcançando uma alta produtividade de ácidos. O diagrama de Pareto explica essa interação tempo (dias) x açúcar (g/ml), possuindo resultados melhores. Para a faixa de concentração de açúcar apresenta uma faixa de 60 a 70 g.

Figura 7: Superfície de contorno Açúcar X Tempo



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 8: Curva de contorno (1)



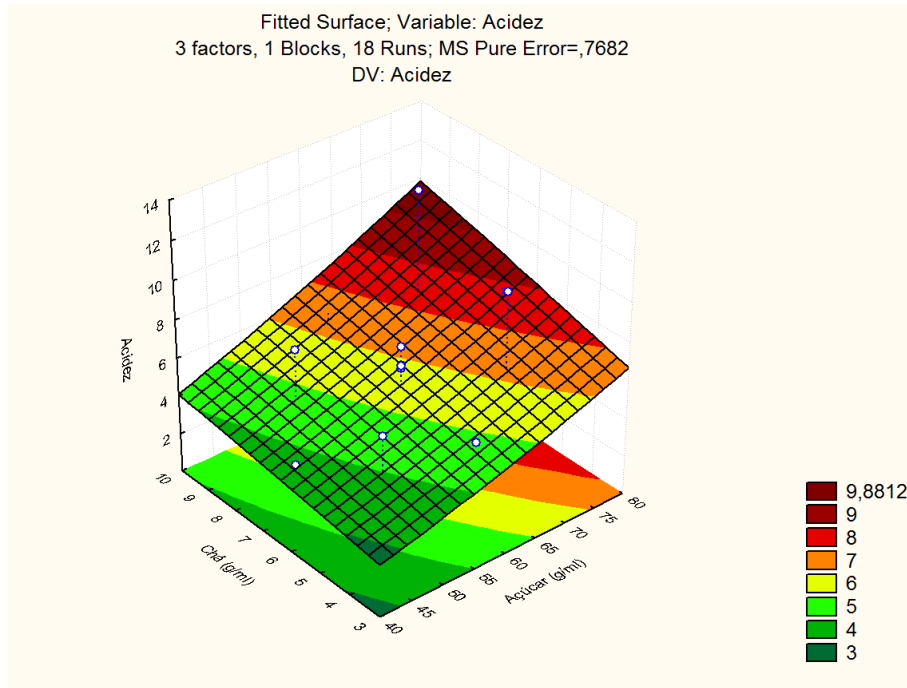
Fonte: Autoria própria, 2023.

Analisando a curva de contorno tempo (dias) x açúcar (g/ml) de 14 a 22 dias se encontram pontos críticos, um maior tempo no experimento favorece o rendimento de ácido acético. Visto que a formação de ácido é significativa.

Essa superfície de resposta (RSM) permite estudar as relações entre respostas variáveis de entradas independentes (COMPARINI et al., 2021).

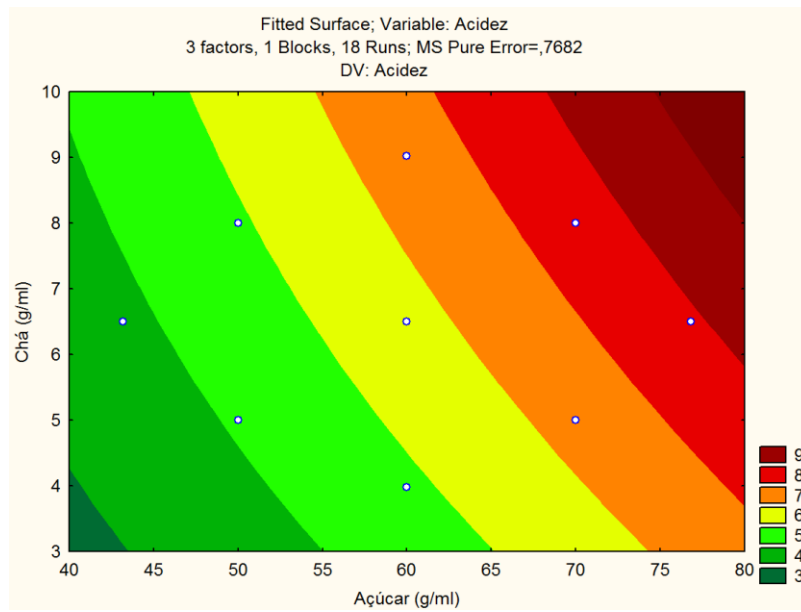
Albuquerque (2022) evidencia que nos pontos de tempo 7 a 14 dias e 25 e 50g de açúcar a interação entre as variáveis são divergentes, evidenciando a falta de ajuste entre as duas variáveis. Esse comportamento pode ser explicado por ter valores mínimos e máximos com a mesma quantidade de significância. Nisto, este mesmo método é apropriado nesta superfície.

Figura 9: Superfície de contorno açúcar x chá



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 10: Curva de contorno (2)

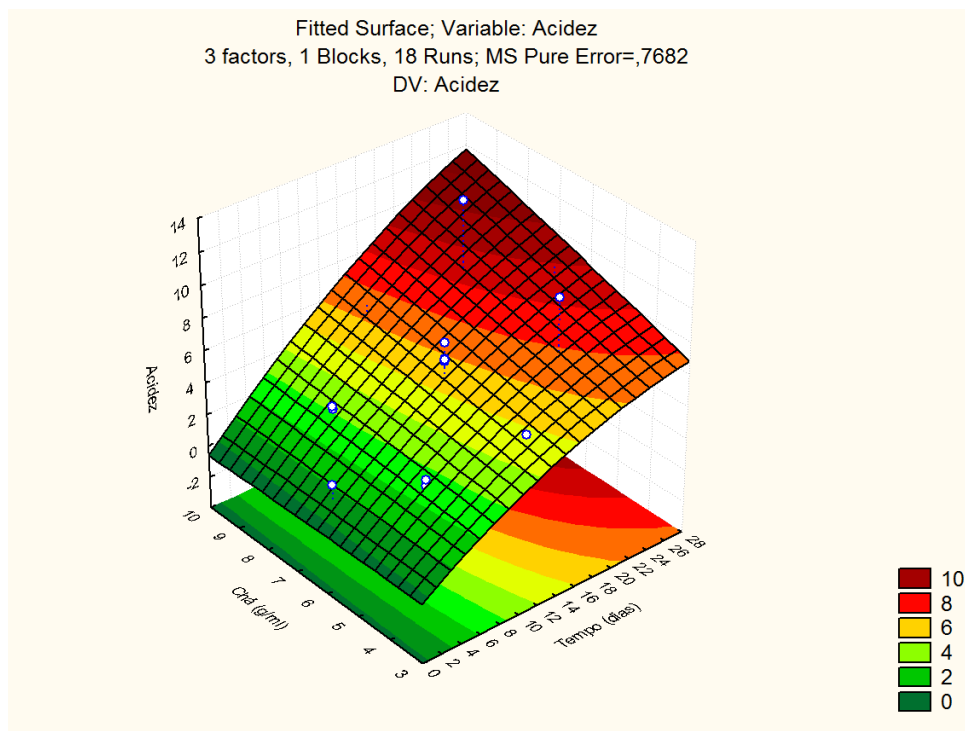


Fonte: Autoria própria, 2023.

A partir da figura 9, é visualizado o aumento da produção de acidez por conta da influência da concentração de açúcar em relação à concentração de chá verde. A influência do açúcar é maior no processo que a influência da de chá na formação de acidez. Os melhores valores encontrados são 75 a 60 g de açúcar e 6 a 8 g de chá. O diagrama de Pareto mostra que a variável açúcar possui uma boa resposta que influência no experimento.

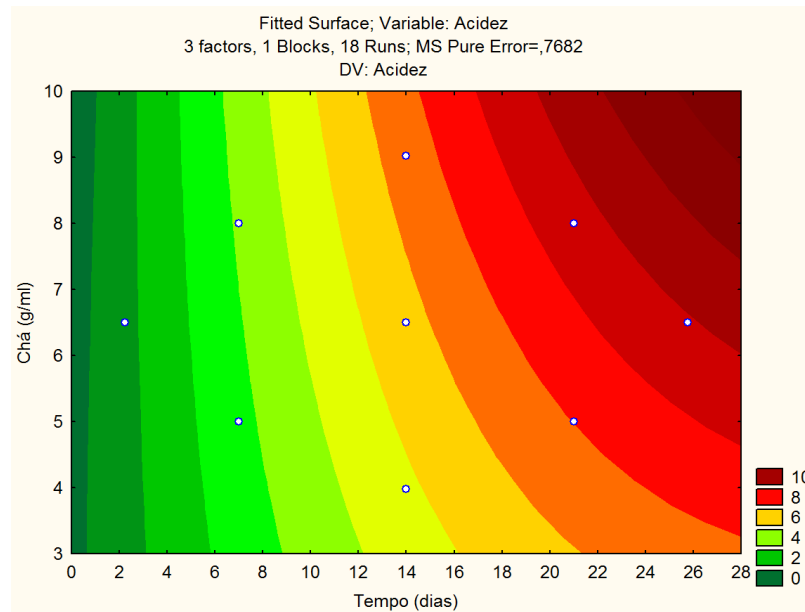
O chá verde possui valores tanto altos quanto baixos e precisa estar com concentrações altas para uma ótima produção de acidez. É possível identificar que os valores de chá têm influência melhor por ser usado em concentrações menores na formação de ácido acético. Este processo tem relação de dois substratos importantes no processo fermentativo da Kombucha, esses substratos são fontes importantes (ALBUQUERQUE, 2022).

Figura11: Superfície de contorno Tempo X Chá



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura12: Curva de contorno (3)



Fonte: Autoria própria, 2023.

Aponta-se que quanto maior for o tempo, mais intensa será a resposta na formação de acidez. Ambas as variáveis possuem uma boa resposta, constituindo que o tempo da fermentação da kombucha se encontra de acordo com os valores já encontrados em outros trabalhos nas faixas de 7 a 31 dias, tendo uma ótima resposta até 26 dias, afetando diretamente na produção de ácidos. A concentração de chá possui uma ótima resposta em todas as superfícies vistas. Portanto, é necessário usar concentração máxima para uma ótima produção de acidez.

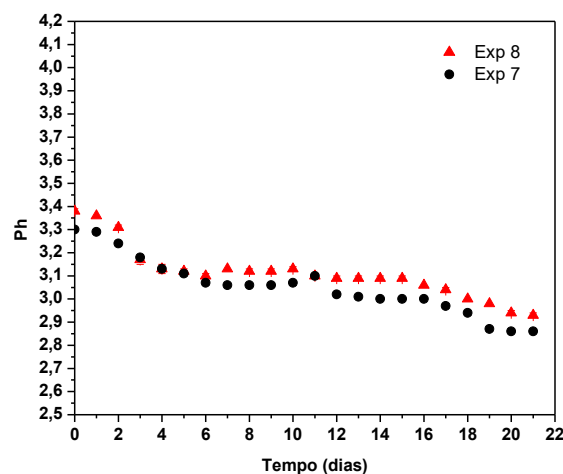
A partir de 14 dias acidez cresce esta resposta pode estar relacionada o modo de degradação do chá, ou seja, ele necessita de um tempo maior de transformação em relação aos outros parâmetros vistos (ALBUQUERQUE, 2022).

Considerando-se os gráficos a variável tempo aponta um dos melhores comportamentos junto com a variável açúcar, o tempo possui ótimos valores acima de 14 dias possuindo um ponto máximo a 26 dias como resposta satisfatória. Já a variável açúcar mostra que a sua relação é afetada pela quantidade de dias para a produção de acidez.

5.4 PROCESSO CINÉTICO

Nas figuras 13, 14 e 15 pode-se observar o comportamento da kombucha no decorrer dos 21 dias de fermentação. Foi utilizado o software OriginPro v. 9.0 para análises dos parâmetros cinéticos por meio dos gráficos de (pH, acidez total titulável, °Brix).

Figura 13: Cinética do pH

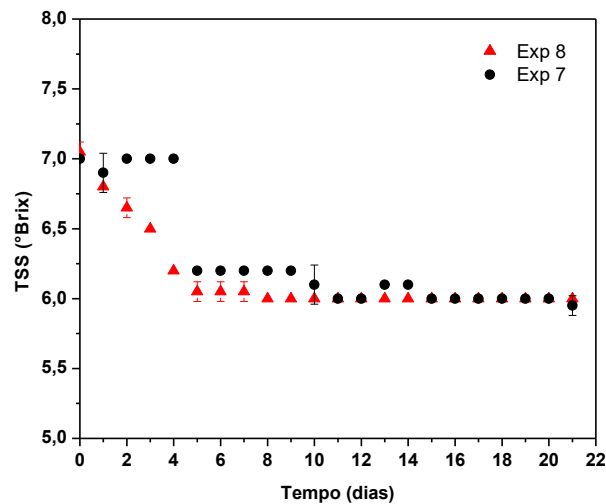


Fonte: Autoria própria, 2023

Observou-se na figura 13 que o Ph variou de acordo com o tempo durante o processo fermentativo. A diminuição do pH foi rápida no início dos processos por volta do 2º dia para duas condições estudadas. Com relação ao experimento 8, notou-se o seu declínio durante o processo e se manteve acima da outra condição, isto pode ser explicado por conter uma concentração maior de substratos presente no experimento.

Os ácidos orgânicos produzidos por bactérias diminuem o pH ao longo da fermentação. No início do experimento se encontravam valores de 3,4- 3,3 e no final 3,0-2,9. A legislação padroniza o Ph em valores de 2,5- 4,2, no final a bebida se manteve dentro das normas estabelecidas.

Figura 14: Cinética TSS (°Brix)



Fonte: Autoria própria, 2023.

Os valores de sólidos solúveis acompanhado durante 21 dias para a formação da Kombucha são apresentados na figura 14. Ocorreu um declínio rápido no experimento 8 do zero ao quarto dia com valor inicial de 7,0 °Brix e final 6,0 °Brix.

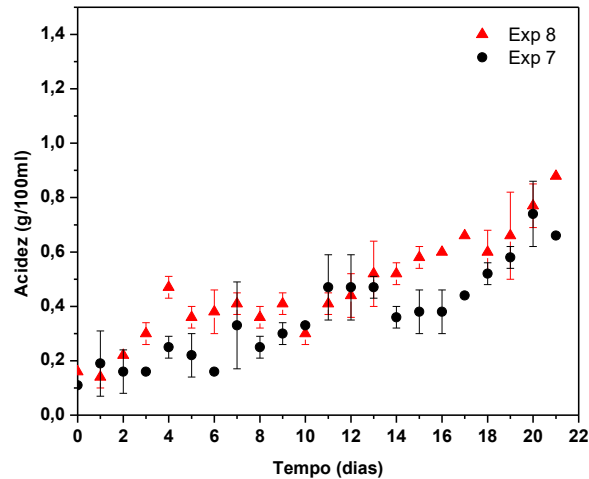
Este processo pode ser respondido pelo consumo dos microrganismos utilizando os açúcares presentes. No quinto dia de experimento houve uma estabilidade evidenciando o consumo total desse substrato. Moura (2019) descreve este comportamento em kombucha de erva mate, ao longo do sétimo dia, com redução de Brix e consumo total dos açúcares no décimo dia.

No experimento 7 teve-se uma estabilidade até o quarto dia de experimento e após um grande declínio e volta de estabilidade depois do décimo quarto dia. Pode ser explicado por conta da sua inativação por conta dos microrganismos e formação de ácido. Ou seja, seu consumo foi por volta do quarto dia de experimento. Vale ressaltar que tanto o experimento 8 e 7 iniciaram com 7 °Brix e no final 6 °Brix.

Na pesquisa de Balbino (2023), também foi observado uma queda gradativa no processo usando kombucha saborizada com cupuaçu com 8,0 °Brix

inicial e final 6,2 °Brix. Mesmo sendo uma bebida saborizada não possui uma diferença grande em relação ao resultado desta pesquisa.

Figura 15: Cinética Acidez.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Na figura 15, observa-se que nas primeiras horas do processo fermentativo a acidez foi muito baixa. O processo foi linear durante 21 dias. Iniciando com faixas para os dois experimentos com 0,2 de acidez.

No experimento 8 pode ser visto o aumento da acidez no quarto dia explicando o papel dos microrganismos presentes neste processo, pois a degradação dos açúcares teve o início do processo fermentativo, logo a formação do ácido acético, com estabilidade presente no décimo dia, com consumo completo dos açúcares. O experimento 7 do sétimo dia em diante teve uma forte formação de acidez no processo, podendo ser explicado pelo comportamento do °Brix.

Chakravorty et al (2016) realizou um estudo de cinética de kombucha por 21 dias e exemplifica a ação das bactérias acéticas que consomem o álcool produzido pelas leveduras aumentando a acidez e diminuindo pH.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sobre o planejamento experimental 3^{3+4} da primeira fermentação da Kombucha pode se concluir: o variável tempo (dias) possui uma significância maior na formação de ácido acético para o processo, junto com outras variáveis e combinações seus efeitos se tornam positivo, dentro das margens de 7 a 21 dias encontradas em outros estudos. A variável açúcar é um dos substratos importantes para os microrganismos, a formação da acidez depende de concentração maior para a produção. O chá verde funciona tanto com valores menores e maiores que a sua formação de acidez vão depender diretamente a quantidade da concentração usada, este sendo um substrato importante na produção da bebida.

O ponto ótimo da bebida em relação à formação de ácido acético é 70 g de açúcar, 8 g de chá e 21 dias com resposta de 12,39 g/ml de acidez. O experimento 8 e 7 com melhores respostas de acidez foram repetidos e verificados e determinados em : 14,48 g/ml de ácido acético para o experimento 8 com valor perto do planejamento, e 12,94 g/ml de ácido acético para o experimento 7.

Ocorreu a avaliação cinética para avaliar o comportamento fermentativo e verificar se os parâmetros se encontram dentro da legislação. O ph dos experimentos variou em torno de 3,0-2,9. O °Brix em torno de 6 e acidez com resultado satisfatório, é possível ver o crescimento ao longo dos dias, indicando a formação de ácidos.

É importante ressaltar que o processo durou 21 dias e a Kombucha não virou vinagre, e os resultados obtidos se encontram dentro das faixas de segurança. Este trabalho teve importância na verificação do ácido acético e conhecimento para garantir a segurança do produto.

7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS ESTUDOS

- Realizar análise sensorial para verificar a taxa de aceitação;
- Verificar o planejamento com o teste de Tukey, comparação de suas médias;
- Replicar os mesmos parâmetros como variáveis de entrada e usar variável de saída diferente;
- Realizar a saborização da Kombucha e estudar seus efeitos com este obtido neste estudo.

8. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Matheus Lôbo De Araújo. OTIMIZAÇÃO DA PRIMEIRA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA POR PLANEJAMENTO FATORIAL DE COMPOSTO CENTRAL. Trabalho de conclusão de curso. **CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE MANAUS - CEULM CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2022.**

ALCÂNTARA, Giovana Araújo; SANTOS, Wenderson Gomes Do. **KOMBUCHA: TENDÊNCIA DE MERCADO E SINÔNIMO DE SAÚDE.** 5. ed. Manaus: Revista Real Conhecer, 2023. v. 3. ISBN 2763-5473.

ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RDC Nº 271, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. **Ministério da saúde, 2005.**

BALBINO, Juliani Woitovicz. Estudo cinético e microbiológico de kombucha saborizada com cupuaçu (*theobroma grandiflorum* (willd. ex spreng) schum). Trabalho de conclusão de curso. **Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Agrícola e Solos, Engenharia de Alimentos, 2023.**

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos.** 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1995. 299 p.

BLAUTH, Cristina Maldaner. KOMBUCHA: Tecnologia de produção e composição. 2019. Trabalho de conclusão de curso. **Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Departamento de Nutrição Tecnologia em Alimentos, 2019.**

BORATO, D.G. Caracterização da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da *Camelliasinensis*(L.) Kuntze em ratas. 2014. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014

BRASIL. Portaria nº 103 de 20 de setembro de 2018. Instrução Normativa que visa estabelecer em todo território nacional o padrão de identidade e qualidade de kombucha. Diário Oficial da União, Brasília, n. 188, seção 1, p. 18, 28 set. 2018.

CARDOSO, B.S. et al., Physical, chemical and antimicrobial evaluation of probiotic kombucha (*Medusomyces gisevii* lindau) and comparative analysis with other probiotics marketed in Brazil. *Nutrição Brasil*, Joinville SC, 17 (1):2-8, 12/2018.

Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Fermentação do chá de kombucha: dinâmica microbiana e bioquímica. *Int J Microbiol Alimentar*. 2016; 220:63-72.

Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P. Vitamina C na prevenção e cura de doenças: uma visão geral. *Indiano: J Clin Biochem*. 2013; 28(4): 314-328.

COMPARINI, Anaisa *et al.* METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: UMA INTRODUÇÃO NOS SOFTWARES R E STATISTICA: DISSERTAÇÃO. **ICMC – USP**, 2021.

David Laureys, Scott J. Britton & Jessika De Clippeleer (2020) Fermentação do Chá de Kombucha: Uma Revisão, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78:3, 165-174.

Dutta, H., & Paulo, S.K. (2019). Kombucha Drink: Aspectos de Produção, Qualidade e Segurança. *Produção e Gestão de Bebidas*.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físicos e químicos para análises de alimentos. 4ª. ed. São Paulo: IAL, 2008

Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S. e Sathishkumar, M. (2014), Uma revisão sobre o chá de kombucha - microbiologia, composição, fermentação, efeitos benéficos, toxicidade e fungo do chá. *Revisões Abrangentes em Ciência de Alimentos e Segurança de Alimentos*, 13: 538-550.

JAYABALAN, R., MALINI, K, SATHISHKUMAR, M., SWAMINATHAN, K., YUN, S.-E. (2010-06). Características bioquímicas do fungo do chá produzido durante a fermentação do kombucha. *Ciência e Biotecnologia de Alimentos* 19 (3): 843-847.

KAPP JM, SUMNER W. Kombucha: uma revisão sistemática das evidências empíricas do benefício para a saúde humana. *Ana Epidemiol*. 2019.

KUMAR, Vikas; JOSHI, V.k. Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. International Journal Of Food And Fermentation Technology, [s.l.], v. 6, n. 1, p.13-24, 2016.

LEAL, Rayrone Suelyton Da Silva. Influência da concentração de carboidrato na produção de kombucha. Trabalho de conclusão de curso, **Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química**, 2022.

LEITE, Marcelo. Bebida milenar faz sucesso em Manaus. **Jornal do Comercio**, 2023. Disponível em: <https://www.jcam.com.br/noticias/bebida-milenar-faz-sucesso-em-manaus/>. Acesso em: 08 nov. 2023.

LOBO, R., CHANDRASEKHAR SAGAR, B., & SHENOY, C. (2016). Bio-chá previne a desestabilização da membrana durante a lesão miocárdica induzida por isoproterenol. *Revista de Microscopia e Ultraestrutura*, 5, 146 - 154.

LONČAR, E.S., PETROVIČ, S.E., MALBAČA, R.V. E VERAC, R.M. (2000), Biossíntese de ácido glucurônico por meio do fungo do chá. *Nahrung*, 44: 138-139.

MALBAŠA, R., LONČAR, E.S., DJURIĆ, M., KLAŠNJA, M.T., KOLAROV, L.J., & MARKOV, S.L. (2006). Scale-up da fermentação em lote de chá preto por kombucha. *Processamento de Alimentos e Bioprodutos*, 84, 193-199.

MAINARDI, P.H.; BIDOIA, E.D. Modelos estatísticos fatoriais: conceitos e aplicações. *Exatas Online*, v. 11, n. 1, p. 32-49, 2020

MALBAŠA, R., LONČAR, E.S., VITAS, J., & CANADANOVIC-BRUNET, J. (2011). Influência de culturas iniciadoras na atividade antioxidante da bebida kombucha. *Química de Alimentos*, 127, 1727-1731.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.; MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019. , 2019.

MONTGOMERY, D.C., "Design and analysis of experiments", John Wiley & Sons, Nova York, 2ed., 537p., 1984.

MONTGOMERY, Douglas C.; RUNGER, George C. Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros. **SCRIBD**, 2021.

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

OLIVEIRA, Gleyson Batista De. Bebida à base de mel de abelha com adição de suco de abacaxi pérola e hortelã: Estudo da cinética de fermentação bebida à base de mel de abelha com adição de suco de abacaxi pérola e hortelã. Trabalho de conclusão de curso. Universidade federal de campina grande, curso de engenharia de biotecnologia e bioprocessos, 2022.

PALUDO, N. Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

PCZIECZEK, A., EFFTING, C, GOMES, I. R, SCHACKOW, A, e HENNING, E. Statistical Analysis of Mechanical Properties of Mortars With Fly Ash and Waste Tire Rubber. 2019

PEREIRA, Érika C.; DOS SANTOS, N. M. S.; FORMAGGINI, R. S.; DE OLIVEIRA, R. G. Geração de biogás a partir da biomassa do malte da fabricação de cervejas artesanais / Biogas generation from the biomass of craft beer malt. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 99933–99946, 2021.

PINTO, Rachel De Luca Carriço P. Desenvolvimento, avaliação química e sensorial de um kombucha com suco de graviola para cardápios de meios de hospedagem. Trabalho de Conclusão de Curso, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 2019.

SANTOS, G. C. et al. Kombucha: Uma Bebida com Potenciais Benefícios para a Saúde, Produzida a partir de Chá Verde Utilizando uma Colônia Simbiótica de Bactérias e Leveduras. *Food Science and Technology (Campinas)*, v. 38, Suppl. 1, p. 181-188, 2018.

SANTOS, Mafalda Jorge dos. KOMBUCHA: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS ALIMENTARES PARA USO EM RESTAURAÇÃO. 2016. Dissertação (Mestrado) - Ciências Gastronómicas, Nova Lisboa, 2016.

SARAMAGO, Simone P.; STEFFEN JR, Valder. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS MISTOS: DISSERTAÇÃO. **FAMAT em Revista**, 2008.

SENGER, A. E. SCHAEANKE, C. H. A. e GOTTIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Sci. Med.* v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SILVA, Andréia Souto da. Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto central. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SOUZA, Joyce Santos de. Caracterização físico-química da bebida fermentada kombucha. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2022.

VILLARREAL-SOTO, S. A., BEAUFORT, S., BOUJILA, J., SOUCHARD, J., & TAILLANDIER, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, v. 83, n. 3, p. 580-588.

VĪNA, I., SEMJONOV, P., LINDE, R., & DENIŅA, I. (2014). Current evidence on physiological activity and expected health effects of Kombucha fermented beverage. *J. Med. Food* 17, 179–188.